

KOMBINASI KITOSAN-EKSTRAK PALA SEBAGAI BAHAN ANTIBAKTERI DAN PENGAWET ALAMI PADA FILET KAKAP MERAH (*Lutjanus sp.*)

THE COMBINATION OF CHITOSAN-NUTMEG EXTRACT FOR THE NATURAL ANTIBACTERIA AND PRESERVATIVE AGENTS OF RED SNAPPER (*Lutjanus sp.*) FILLET

Nastiti Siswi Indrasti^{*}, Suprihatin, dan Wahyu Kamal Setiawan

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, Kotak Pos 122, Bogor 16002
Email: nastiti@indo.net.id

ABSTRACT

*Chitosan is produced by deacetylation of chitins which are found in the outer shell of crustacea such as shrimps and crabs. The ability of chitosan as an agent of antibacteria depends on the degree of deacetylation. This experimental work aimed to study the possibility of chitosan as natural antibacteria of red snapper fillet. The experiments were carried out in three steps. The first step was the production of chitosan from shrimp shells. The produced chitosan was analyzed by FTIR (Fourier Transform Infra Red) and proximate analysis. The second step was investigation of antibacterial activity of chitosan and its combination with nutmeg extract. The concentrations of chitosan were varied 1%; 1.5%; and 2% (w/v) while nutmeg extract were 0%, 5% and 10%. The final step was application of the best combination for red snapper fillet preservation by the dipping method. The chitosan produced in this research meet the commercial standard: particle size, colour of extract, water content (7.89%), ash content (0.79%), and degree of deacetylation (73.86%). Combination of chitosan 1.5% and nutmeg extract 10% showed synergic inhibition againsts *Escherichia coli* with an inhibition diameter of 34.60 ± 0.57 mm. Combination of 1.5% chitosan and 10% nutmeg extract inhibited the growth rate of bacteria on red snapper fillet ($\text{Sig} < 0.05$). This combination was able to reduce the formation of Total Volatile Base (TVB) during preservation period ($\text{Sig} < 0.05$). This combination was an effective preservative agent for red snapper fillet on refrigerated temperature $4 \pm 1^\circ\text{C}$ were able to extend the shelf life for 4 days.*

Keywords: antibacterial activity, chitosan, nutmeg extract, red snapper fillet preservation

ABSTRAK

Kitosan diproduksi dengan deasetilasi kitin yang terdapat pada kulit terluar Crustacea seperti udang dan kepiting. Kemampuan kitosan sebagai bahan antibakteri tergantung pada derajat deasetilasi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kemungkinan kitosan sebagai antibakteri alami untuk filet kakap merah. Penelitian terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama adalah produksi kitosan dari kulit udang. Kitosan yang telah diproduksi dianalisis menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) untuk mengetahui derajat deasetilasi dan analisis proksimat. Tahap kedua adalah pengujian aktivitas antibakteri kitosan dan kombinasinya dengan ekstrak pala menggunakan metode difusi sumur agar. Konsentrasi kitosan divariasikan: 1%; 1,5% and 2% (b/v) sedangkan ekstrak pala: 0%, 5% dan 10% (b/v). Tahap terakhir adalah aplikasi kombinasi terbaik pada filet kakap merah dengan metode pencelupan. Kitosan yang dihasilkan memiliki karakteristik yang sesuai dengan standar mutu kitosan komersial meliputi ukuran partikel (berbentuk serpihan), warna larutan (bening), kadar air (7,89%), kadar abu (0,79%), dan derajat deasetilasi (73,86%). Kombinasi kitosan 1,5% dengan ekstrak pala 10% menunjukkan penghambatan yang sinergis terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* dengan nilai diameter hambat sebesar $34,60 \pm 0,57$ mm. Aplikasi kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada filet kakap merah selama penyimpanan suhu $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ($\text{Sig} < 0,05$). Kombinasi tersebut juga mampu menurunkan pembentukan *Total Volatile Base* (TVB) filet kakap merah ($\text{Sig} < 0,05$). Kombinasi kitosan dan ekstrak pala merupakan bahan antibakteri yang efektif untuk filet kakap merah pada penyimpanan suhu $4 \pm 1^\circ\text{C}$ dan mampu memperpanjang daya simpan selama empat hari.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, kitosan, ekstrak pala, daya simpan filet kakap merah

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan yang direncanakan dalam program revitalisasi perikanan Indonesia. Produksi udang tiap tahun selalu meningkat, data tahun 2010 produksi udang Indonesia mencapai 626 ribu ton,

meningkat 18persen dari tahun 2009 sebesar 592 ribu ton (Kementrian Kelautan dan Perikanan, 2012). Saat ini Indonesia memiliki 170 unit pengolahan udang dengan kapasitas produksi mencapai 500 ribu ton per tahun. Jika rendemen limbah hasil pengolahan udang berupa kulit dan kepala diketahui sebesar 60-70% dari bobot udang,

maka diperkirakan dari total unit pengolahan udang akan dihasilkan limbah 325 ribu ton per tahun. Jika kapasitas produksi meningkat, maka akan dihasilkan limbah hasil olahan udang yang lebih banyak untuk dimanfaatkan menjadi kitosan. Menurut Prasetyo (2010), ekstraksi kitin dari limbah olahan udang menghasilkan rendemen sebesar 20 % dan rendemen kitosan dari kitin 80% sehingga dengan limbah 325 ribu ton akan dihasilkan 65 ribu ton kitin per tahun atau kitosan 52 ribu ton per tahun.

Kitosan merupakan senyawa dengan rumus kimia poli (2-amino-2-dioksi- β -D-glukosa) yang dapat dihasilkan dengan proses hidrolisis kitin menggunakan basa kuat (Muzarelli dan Peter, 1997). Kitosan memiliki sifat yang mudah mengalami degradasi secara biologis, tidak beracun, merupakan kation kuat, flokulan, koagulan yang baik dan mudah membentuk membran atau film. Kitosan diketahui memiliki kemampuan untuk mengawetkan berbagai bahan pangan karena kandungan senyawa antibakterinya (Tsai *et al.*, 2002).

Kitosan adalah bahan alami yang aman digunakan untuk memperpanjang kesegaran ikan dan memiliki kemampuan sebagai antimikroba yang bersifat bakterisidal. Aplikasi kitosan sebagai pengawet produk perikanan telah banyak dilakukan diantaranya pada fillet ikan patin (Suptijah *et al.*, 2007), fillet ikan salmon atlantik dan ikan *haddock*. Salah satu produk yang digemari masyarakat dunia adalah kakap merah. Daging ikan ini sangat rentan terhadap kerusakan mikrobiologi terutama oleh bakteri, sehingga perlu pengawetan.

Bahan lain yang dapat digunakan untuk mengawetkan ikan adalah jenis rempah. Rempah-rempah dikenal sebagai bahan tambahan pangan yang memiliki sifat pedas (*pungent*) dan umumnya digunakan untuk memberikan aroma pada makanan. Komponen utama dalam rempah yang memberikan efek antimikrob adalah minyak esensial. Biji pala merupakan jenis rempah yang sangat populer di Indonesia. Mawaddah (2008) dalam risetnya menyebutkan bahwa pala merupakan antimikrob alami yang efektif, layak, dan mudah dalam aplikasinya. Pala juga merupakan sumber antimikroba untuk genus *Salmonella*. Kandungan senyawa fenolik dan terpenoid di dalamnya dapat menghambat pertumbuhan berbagai jenis bakteri. Senyawa fenolik yang ditemukan dalam biji pala adalah eugenol dan isoeugenol sedangkan senyawa terpenoid adalah *d*-pinene, *d*-champene dan dipentene.

Menurut Outtara *et al.* (2000) kombinasi kitosan dengan bahan lain dapat meningkatkan aktivitas antibakteri dan dapat diaplikasikan untuk mengawetkan makanan dari berbagai jenis kerusakan terutama yang berasal dari kontaminasi bakteri. Menurut Guenther (1952) komponen utama dalam biji pala memiliki aktivitas antibakteri. Kombinasi kitosan dan biji pala dapat digunakan sebagai alternatif pengawet alami dan diharapkan

dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen dan memberikan aktivitas antioksidan yang baik pada filet kakap merah sehingga dapat memperpanjang umur simpan.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan kitosan dari kulit udang, mengetahui aktivitas antibakteri kitosan dan kombinasinya dengan ekstrak pala, serta mengetahui pengaruh kombinasi larutan kitosan dan ekstrak pala terhadap umur simpan filet kakap merah selama penyimpanan pada suhu $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit udang kering yang didapatkan dari pengumpul, bubuk biji pala (*Myristica fragans* Houtt.), bahan kimia untuk produksi kitosan, meliputi akuades, HCl 1,5 N; NaOH 3,5 N; asam asetat 1%, NaOCl 10 %, dan H₂O₂ 1 %; biji pala; media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Plate Count Agar* (PCA), dan garam fisiologis (NaCl); bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii*; serta ikan kakap merah segar, dipreparasi menjadi filet *skin on* dengan ukuran 50-70 g.

Alat-alat yang digunakan terdiri dari perangkat untuk produksi kitosan meliputi: gelas, termometer, kertas pH, dan pengering; perangkat untuk analisis mutu kitosan meliputi oven, tanur, perangkat alat Kjehdahl, dan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*); perangkat alat uji aktivitas antibakteri, perangkat untuk aplikasi kitosan serta perangkat alat untuk analisis kimia, mikrobiologi, dan sensori filet kakap merah selama penyimpanan.

Metode

Produksi Kitosan

Produksi kitosan dilakukan dengan metode yang telah digunakan Suptijah *et al.* (1992). Sebanyak 500 g kulit udang didemineralisasi menggunakan HCl 1,5 N 1:7 (b/v) suhu 90°C selama 1 jam, proses pengeringan, proses deproteinisasi dengan NaOH 3,5 N 1:10 (b/v) suhu 90°C selama 1 jam diikuti proses pengeringan. Proses depigmentasi kitin dilakukan dengan perendaman dalam NaOCl 10% dan H₂O₂ 1% selama 10 menit. Proses deasetilasi dilakukan dengan NaOH 50% suhu 140°C 1:10 (b/v) selama 1 jam. Netralisasi dilakukan dengan akuades setelah proses demineralisasi, deproteinisasi, depigmentasi, dan deasetilasi. Proses pengeringan dilakukan pada suhu 55°C selama 12 jam.

Karakterisasi Kitosan

Karakterisasi kitosan meliputi perhitungan derajat deasetilasi kitosan dan analisis kadar air, kadar abu, serta kadar nitrogen. Penentuan derajat deasetilasi dilakukan dengan spektrum FTIR

menggunakan metode garis dasar. Sebanyak $\pm 2 \mu\text{g}$ kitosan masing-masing dibuat pelet dengan KBr 1%, kemudian dilakukan penyusutan pada daerah frekuensi antara $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$. Puncak tertinggi dicatat dan diukur dari garis dasar yang dipilih. Perbandingan antara absorbansi 1655 cm^{-1} (serapan pita amida I) dengan absorbansi 3450 cm^{-1} . Menurut Suptidjah *et al.* (1992) deasetilasi kitin yang sempurna (100%) diperoleh nilai pada $A = 1,33$. Pengukuran nilai absorbansi pada puncak yang terkait derajat N-deasetilasi dapat dihitung dengan rumus:

$$\% N - \text{deasetilasi} = 1 - \left(\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right) \times 100 \right)$$

Ekstraksi Biji Pala

Sebelum dijadikan bubuk, kulit luar biji pala yang keras dipecahkan. Lalu diambil biji pala yang tidak berkapang. Kemudian biji pala digiling dengan mesin penggiling dan diayak, sehingga di dapat butiran-butiran partikel biji pala. Bubuk biji pala kemudian dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi 5% (5g/100 mL akuades) dan 10% (10 g/100 mL akuades). Ekstraksi senyawa aktif dalam biji pala dilakukan pada suhu 40°C selama 2 jam (Susilawati, 1987).

Pembuatan Kombinasi Larutan dan Ekstrak Pala

Kitosan dilarutkan dalam asam asetat 1% dengan konsentrasi 1% (1g/100 mL asam asetat 1%); 1,5% (1,5 g/100 mL asam asetat 1%); dan 2% (2 g/100 mL asam asetat 1%) kemudian dipanaskan suhu 40°C selama ± 10 menit sampai larut kemudian ditera menggunakan akuades sampai mencapai konsentrasi yang diinginkan. Larutan kitosan dan ekstrak pala dicampurkan dengan rasio 3:1 (v/v). Hal ini dilakukan agar tidak mengubah aroma dan rasa filet kakap merah ketika proses perendaman dalam larutan uji.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri kitosan dan ekstrak pala dilakukan dengan metode difusi sumur agar. Metode yang digunakan mengacu pada Carson dan Riley (1995). Satu ose isolat bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella thypimirum* masing-masing diinokulasi ke dalam 9 mL media *Nutrient Broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur dengan jumlah bakteri 10^5 cfu/mL sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam cawan petri dan dituangkan media agar sebanyak 20 mL, dibiarkan membeku lalu dibuat sumur dengan diameter 5 mm. Sampel larutan antibakteri dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 300 μL , diinkubasi pada 37°C dan diukur diameter zona bening yang terbentuk setelah 24 jam. Pengujian dilakukan dua kali ulangan dan diuji secara statistik dengan analisis ragam.

Aplikasi Kombinasi Kitosan dan Ekstrak Pala pada Filet Kakap Merah

Perlakuan yang memberikan aktivitas antibakteri terbaik dari penelitian pendahuluan diaplikasikan pada filet kakap merah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap umur simpan bahan. Filet kakap merah direndam 5 menit dalam larutan terpilih, dikemas dalam nampan plastik (6 filet/nampan) yang tertutup oleh plastik penutup, selanjutnya disimpan selama 12 hari pada suhu dingin $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Pengamatan dilakukan setiap empat hari sekali dengan parameter uji: TPC, pH, TVB, dan organoleptik (tekstur, warna, aroma dan penerimaan umum). Analisis ragam dilakukan terhadap parameter TPC, pH, dan TVB sedangkan parameter organoleptik diuji menggunakan uji Kruskal Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Kitosan

Sebanyak 500 g kulit udang yang melalui proses demineralisasi dan deproteinisasi menghasilkan kitin sebanyak 96,9 g sehingga rendemen kitin yang dihasilkan sebesar 17%. Rendemen kitin yang dihasilkan cukup rendah. Hal ini disebabkan saat proses pencucian dan penetralan dengan akuades setelah proses demineralisasi dan deproteinisasi terdapat susut bobot yang cukup besar. Susut bobot diakibatkan adanya degradasi mineral-mineral dan komponen protein yang terdapat dalam kulit udang sehingga dapat mengurangi bobot produk yang dihasilkan. Kitin tersebut selanjutnya di deasetilasi dan menghasilkan 87,4 g kitosan. Rendemen kitosan yang dicapai cukup tinggi yaitu 90,2% karena pada proses deasetilasi tidak banyak kitin yang hilang oleh pelarut maupun saat hidrolisis. Proses pencucian dan penetralan dengan akuades juga dilakukan secara hati-hati sehingga susut bobot dapat dikurangi.

Karakteristik Kitosan

Sebelum digunakan sebagai bahan pengawet dan antibakteri, dilakukan analisis kitosan untuk mendapatkan informasi sifat dan karakteristiknya untuk selanjutnya dibandingkan dengan karakteristik kitosan komersial. Hasil analisis kitosan dan perbandingannya dengan karakteristik kitosan komersial seperti pada Tabel 1.

Ukuran partikel kitosan sangat dipengaruhi oleh bahan baku yang digunakan. Bahan baku yang berasal dari kulit udang memiliki bentuk yang lebih halus dan mudah hancur selama proses pembuatan kitosan. Ukuran partikel akan mempengaruhi kelarutan kitosan, semakin kecil ukuran partikel maka semakin mudah kitosan larut dalam pelarut. Pada Tabel 1 terlihat bahwa ukuran partikel kitosan uji tidak terlalu berbeda dengan standar yang ada. Bentuk kitosan uji berupa serpihan kecil dapat diakibatkan oleh sifat bahan baku yang telah lama

disimpan sehingga sifat fisiknya telah berubah karena kitosan memiliki sifat mudah menyerap air (Kumar, 2000).

Tabel 1. Karakteristik kitosan hasil produksi

Sifat	Parameter	
	Kitosan komersial*	Kitosan uji**
Ukuran partikel	Serpihan sampai bubuk	Serpihan kecil
Kadar air (% bk)	≤ 10%	7,89%
Kadar abu (% bk)	≤ 2%	0,79%
Total nitrogen (% bk)	≤ 5%	5,86%
Derajat deasetilasi	≥ 70%	73,86%
Warna larutan (1,5%) (b/v)	Bening	Bening
Viskositas (cP) (1%)	210	-
Kandungan logam (ppm)		
- As	<0,003	
- Cd	< 0,002	
- Hg	< 0,001	-
- Pb	< 0,1	
- Cu	3,38	
- Zn	6,48	

Sumber : *Protan Laboratories diacu dalam Suptidjah *et al.* (1992)
**Analisis proksimat kitosan uji

Kadar air merupakan parameter mutu yang ditetapkan untuk kitosan. Nilai kadar air kitosan diketahui sebesar 7,89%. Nilai ini lebih rendah dibandingkan karakteristik kitosan komersial dengan nilai kadar air ≤ 10%. Besarnya nilai kadar air dipengaruhi oleh kondisi dan sarana pengeringan.

Kadar abu pada kitosan merupakan parameter penting yang dapat mempengaruhi kelarutan, mengakibatkan viskositas rendah atau dapat mempengaruhi karakteristik produk akhir (No dan Meyers, 1995). Hasil analisis kitosan menunjukkan nilai kadar abu yang diperoleh sebesar 0,79%, dan sesuai dengan persyaratan mutu yang telah ditetapkan. Faktor yang mempengaruhi nilai kadar abu kitosan adalah proses demineralisasi dan air yang digunakan ketika penetralan pH. Proses demineralisasi yang efektif akan banyak menghilangkan mineral (Angka dan Suhartono, 2000), sehingga pengotor dapat tereduksi dan kinerja kitosan semakin optimal (Rahardyani, 2011). Air yang digunakan untuk penetralan harus tidak mengandung mineral karena dapat meningkatkan kadar mineral dalam bahan, sehingga jumlah pengotor semakin meningkat (Suptidjah, 2006).

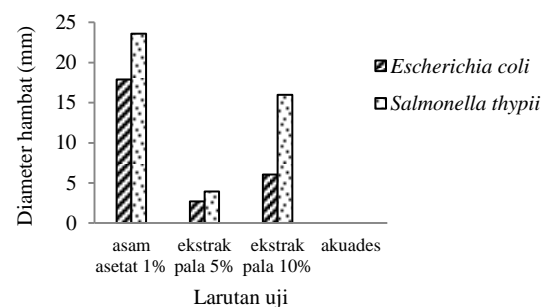
Kadar total nitrogen murni dalam kitosan berkisar antara 3-4,5%. Semakin tinggi kandungan nitrogen dalam kitosan maka akan menyebabkan semakin berkurang fungsinya. Protein terikat secara kovalen dengan kitosan membentuk struktur yang stabil dengan kitin dan kitosan sehingga sulit untuk menghasilkan produk yang bebas dari residu protein

(Austin *et al.*, 1981). Hasil analisis kitosan menunjukkan nilai total nitrogen sebesar 5,86%. Nilai total nitrogen kitosan uji juga belum sesuai standar kitosan yang telah ditetapkan. Hal ini disebabkan fluktuasi suhu proses mempengaruhi degradasi atau penghilangan protein kitosan.

Derajat deasetilasi yang tinggi menunjukkan kemurnian kitosan yang dihasilkan (Bastaman, 1989). Derajat deasetilasi kitosan menentukan seberapa banyak gugus asetil yang hilang selama proses deasetilasi kitin. Hasil analisis kitosan uji menunjukkan derajat deasetilasi sebesar 73,86%, sesuai dengan standar kitosan komersial yakni ≥70%. Muzarelli dan Peter (1997) menyatakan bahwa semakin besar derajat deasetilasi, maka kitosan akan semakin aktif karena banyaknya gugus amina yang menggantikan gugus asetil. Gugus amina lebih reaktif dibandingkan gugus asetil karena adanya pasangan elektron bebas pada atom nitrogen dalam struktur kitosan.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Asam Asetat Dan Ekstrak Pala

Pengujian awal dari difusi sumur adalah pengujian ekstrak pala 5% dan 10%(b/v) serta asam asetat (1%) dan akuades sebagai pelarut. Hasil difusi sumur agar menunjukkan bahwa pelarut akuades tidak bersifat menghambat pertumbuhan bakteri uji, dengan demikian tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri senyawa ekstrak pala. Hasil uji ekstrak pala dan asam asetat (pelarut kitosan) menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji ditandai dengan adanya zona bening. Diameter zona hambat ekstrak pala 5% dan 10% serta asam asetat 1% dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Histogram diameter hambat asam asetat, ekstrak pala, dan akuades terhadap bakteri uji

Diameter zona hambat ekstrak biji pala pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* cukup kecil sehingga efektivitasnya tergolong rendah terutama pada konsentrasi rendah. Diameter zona hambat ekstrak biji pala 5% diketahui sebesar $2,67 \pm 3,77$ mm pada *Escherichia coli* dan $3,92 \pm 0,83$ mm pada *Salmonella thypii* sedangkan diameter zona hambat ekstrak biji pala 10% diketahui sebesar $6,02 \pm 0,50$

mm pada *Escherichia coli* dan $15,98 \pm 8,13$ mm pada *Salmonella thypii*. Penghambatan ekstrak biji pala lebih besar terhadap *Salmonella thypii* dibandingkan *Escherichia coli* baik dengan konsentrasi 5% maupun 10%. Hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* lebih tahan terhadap senyawa antibakteri dalam ekstrak pala dibandingkan dengan *Salmonella thypii*. Proses ekstraksi menggunakan akuades belum mampu memisahkan secara baik senyawa aktif yang terkandung dalam biji pala.

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji pala yang digunakan, maka semakin besar diameter hambatan pertumbuhan bakteri uji. Peningkatan konsentrasi ekstrak pala dapat mengakumulasi senyawa aktif seperti miristisin, pinene, champene, dan fenol sehingga akan semakin baik untuk merusak dinding sel bakteri. Interaksi senyawa-senyawa tersebut dalam jumlah besar dapat menyebabkan lisis dinding sel bakteri dengan efektivitas lebih besar.

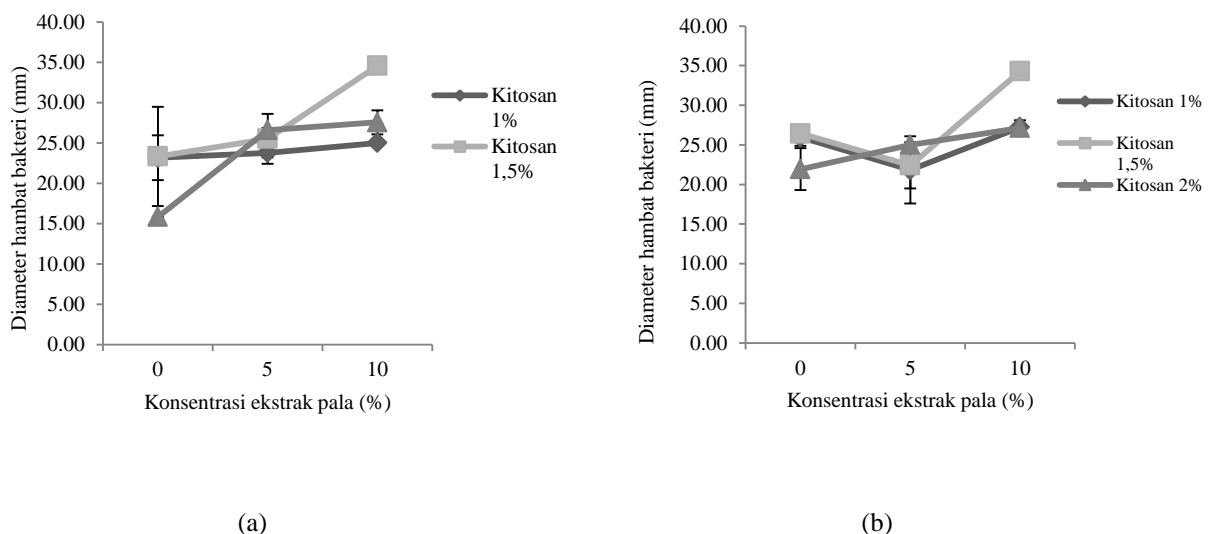
Menurut Piddock (1990) dalam Branen *et al.* (2005), aktivitas antimikrob yang menghasilkan diameter penghambatan 30-35 mm dinyatakan aktivitas antimikrobnya tergolong tinggi. Jika diameter penghambatan antara 20-30 mm, maka aktivitas antimikrobnya tergolong sedang, dan jika diameter penghambatan 15-20 mm, maka aktivitas antimikrobnya tergolong rendah. Asam asetat 1% memiliki diameter hambatan sebesar $17,88 \pm 1,31$ mm terhadap *Escherichia coli* dan $23,58 \pm 0,50$ mm pada *Salmonella thypii*. Nilai diameter hambatan asam asetat 1% terhadap kedua bakteri uji cukup tinggi

sehingga efektivitasnya dapat dikatakan sedang. Derajat keasaman larutan asam asetat 1% yang relatif rendah dapat mengganggu metabolisme sel bakteri sehingga pertumbuhannya terhambat. Fardiaz (1983) menyatakan bahwa nilai pH optimum untuk pertumbuhan *Escherichia coli* adalah 7,0-7,5 sedangkan pH optimum untuk pertumbuhan *Salmonella* adalah 6,5-7,5. Nilai pH yang cenderung rendah pada asam asetat 1% akan merusak komponen intraseluler bakteri terutama yang mengandung protein.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Kitosan dan Kombinasinya dengan Ekstrak Pala

Hasil pengujian aktivitas antibakteri kitosan dengan penambahan ekstrak pala dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan, kombinasi kitosan (1% ; 1,5% dan 2 %) dan ekstrak pala (0%, 5% dan 10 %) menunjukkan penghambatan terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* yang berbeda nyata satu sama lain ($\alpha < 0,05$). Diameter penghambatan terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* yang ditunjukkan oleh kombinasi kitosan dan ekstrak pala memiliki nilai yang lebih besar daripada diameter penghambatan kitosan atau ekstrak pala jika digunakan secara terpisah.

Hal ini menunjukkan adanya sinergi yang maksimum antara gugus reaktif kitosan yang berupa NH_2 terprotonasi dengan gugus fungsional ekstrak pala berupa senyawa terpenoid seperti pinena dan champena. Keduanya saling bekerja sama mengganggu aktivitas metabolisme sel bakteri.



Gambar 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri kitosan dan ekstrak pala pada bakteri uji (a). *Escherichia coli*; (b) *Salmonella thypii*

Uji lanjut Duncan terhadap diameter penghambatan *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* memperlihatkan bahwa kombinasi kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% memiliki nilai penghambatan paling tinggi sebesar $34,60 \pm 0,57$ mm pada *Escherichia coli* dan $34,30 \pm 0,28$ mm pada *Salmonella thypii*. Diameter penghambatan kitosan 1,5% terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* memiliki nilai paling tinggi dibandingkan nilai penghambatan kitosan 1% dan 2%. Yulina (2011) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi, maka viskositas akan semakin meningkat sehingga kitosan akan lebih sulit berdifusi dalam agar pada saat pengujian aktivitas antibakteri. Ekstrak pala dengan konsentrasi 10% memiliki nilai diameter penghambatan terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii* paling tinggi dibandingkan ekstrak pala dengan konsentrasi lainnya disebabkan adanya akumulasi senyawa fenol dan terpenoid seiring bertambahnya konsentrasi. Hal inilah yang mengakibatkan kombinasi kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% memiliki nilai penghambatan tertinggi terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypii*.

Aplikasi Kitosan dan Ekstrak Pala pada Filet Kakap Merah

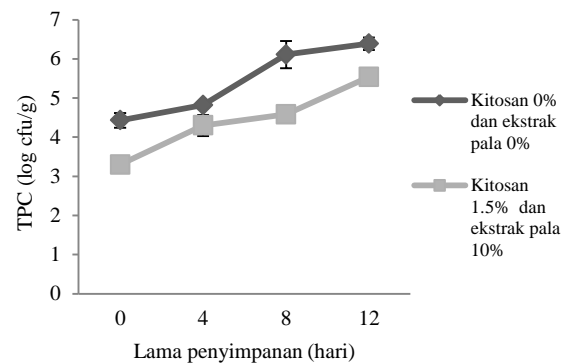
Penelitian tahap ini dilakukan untuk menggunakan perlakuan terbaik dari penelitian tahap sebelumnya sebagai bahan antibakteri filet kakap merah. Penyimpanan suhu $4 \pm 1^\circ\text{C}$ dilakukan pada filet kakap merah setelah perendaman dalam larutan terpilih selama 5 menit. Parameter yang diamati meliputi jumlah bakteri total, nilai pH, TVB (*Total Volatile Base*), dan organoleptik.

Jumlah Bakteri Total (TPC)

Jumlah bakteri yang tumbuh pada sampel filet kakap merah berkisar antara 3,30 log cfu/g sampai 6,51 log cfu/g. Perubahan nilai TPC filet kakap merah dengan perlakuan kitosan dan ekstrak pala selama penyimpanan pada suhu 4°C selama 12 hari disajikan pada Gambar 3.

Selama penyimpanan, nilai total bakteri memiliki kecenderungan meningkat baik pada kontrol maupun pada filet dengan perlakuan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10%. Analisis ragam untuk kedua perlakuan yang dilakukan menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh nilai TPC yang nyata pada penyimpanan hari ke-0. Perbedaan nilai TPC yang signifikan terjadi pada penyimpanan hari ke-8. Pada akhir penyimpanan, filet kakap merah dengan perlakuan kitosan memiliki nilai total bakteri yang masih dalam batas aman konsumsi manusia yakni sebesar 5,54 log cfu/g (syarat mutu filet kakap merah untuk cemaran mikroba ALT menurut SNI 01-2696-2006 maksimum 5×10^5 koloni/g atau setara dengan 5,7 log cfu/g), sedangkan nilai total bakteri filet kakap merah tanpa perlakuan sebesar 6,58 log cfu/g, dalam kategori tidak layak konsumsi. Hal ini

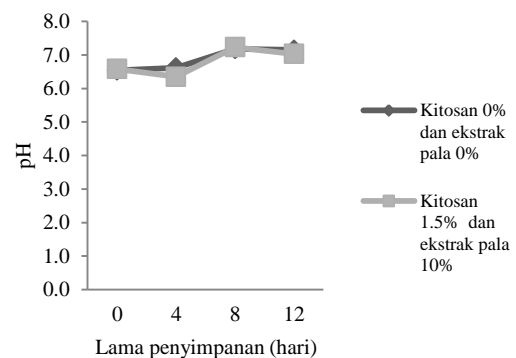
membuktikan bahwa kombinasi kitosan dan ekstrak pala memiliki aktivitas antibakteri yang sinergis pada filet kakap merah. Lapisan tipis yang dibentuk kitosan dan ekstrak biji pala pada permukaan tubuh ikan akan menghambat masuknya oksigen dan air sehingga pertumbuhan mikroba akan terhambat (Allan dan Hadwiger, 1979, dalam El Ghaouth *et al.*, 1994). Sinergi antara polikation kitosan dan senyawa terpenoid serta fenolik mampu merusak permeabilitas membran sel bakteri. Peningkatan permeabilitas membran sel bakteri mengakibatkan keluarnya cairan sel sehingga akan terjadi lisis.



Gambar 3. Perubahan nilai TPC filet kakap merah selama penyimpanan

Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH filet kakap merah pada penelitian ini berkisar antara 6,54 sampai 7,15 (kontrol) dan 6,38 sampai 7,03 (kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10%). Perubahan nilai pH filet kakap merah selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 4.



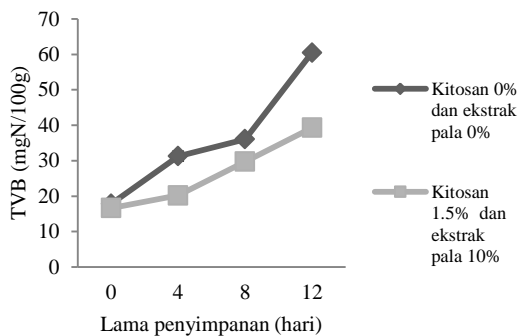
Gambar 4. Perubahan nilai pH filet kakap merah selama penyimpanan

Analisis ragam terhadap nilai pH menunjukkan bahwa selama 12 hari penyimpanan tidak terdapat pengaruh nyata terhadap nilai pH filet kakap merah dengan perlakuan kitosan dengan tanpa perlakuan ($\text{Sig} > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% tidak berpengaruh terhadap derajat keasaman filet kakap merah.

Kadar TVB

Semakin rendah mutu ikan, maka kadar TVB semakin meningkat. Kenaikan kadar TVB terutama diakibatkan oleh adanya aktivitas bakteri pembusuk pada ikan. Sejumlah bakteri mampu menghasilkan TMA dari hasil reduksi TMAO (*trimethylamine oxide*), bertanggungjawab terhadap bau ikan dan mampu memanfaatkan TMAO sebagai terminal aseptor elektron (Sikorski *et al.*, 1990). Bakteri pembusuk yang dapat mereduksi TMAO menjadi TMA antara lain *Aeromonas sp*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, dan *Vibrio sp* (Gram dan Dalgaard, 2002).

Nilai rata-rata TVB pada filet kakap merah berkisar antara 17,82 mgN/100 g sampai 60,48 mgN/100 g sampel (kontrol) dan 16,64 mgN/100 g sampai 39,29 mgN/100 g sampel (kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10%). Perubahan nilai TVB filet kakap merah selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Perubahan nilai *total volatile base* (TVB) filet kakap merah selama penyimpanan

Nilai TVB filet kakap merah mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu penyimpanan. Peningkatan nilai TVB ini diakibatkan adanya degradasi protein atau turunannya, menghasilkan sejumlah basa yang mudah menguap seperti amoniak, histamin, hidrogen sulfida, dan trimetilamin (Suptijah *et al.*, 2007).

Dari hasil pengamatan selama 12 hari, terlihat bahwa kombinasi kitosan 1,5% dan pala 10% memiliki efek yang sinergis dalam menekan peningkatan nilai TVB. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan dan ekstrak pala mampu menghambat aktivitas bakteri pembusuk seperti *Pseudomonas* yang dapat menghasilkan basa-basa nitrogen yang bersifat volatil. Pengaruh suhu lingkungan ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) ikut berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk karena sebagian bakteri patogen memiliki suhu optimum untuk dapat melakukan aktivitasnya pada kisaran $30-37^\circ\text{C}$.

Analisis ragam yang dilakukan memperlihatkan hasil tidak terdapat pengaruh nyata TVB antara kedua perlakuan pada penyimpanan hari ke-0 dan hari ke-8 ($\text{Sig} > 0,05$) sedangkan pada hari ke-4 dan hari ke-12 terdapat perbedaan nilai TVB yang nyata antara kedua perlakuan ($\text{Sig} < 0,05$). Pada hari ke-0, kondisi daging ikan relatif sama sehingga nilai TVB yang diperoleh juga tidak berbeda jauh sedangkan pada hari penyimpanan selanjutnya aktivitas gugus aktif kitosan dan ekstrak pala mengakibatkan kondisi daging kakap dengan perlakuan kitosan lebih baik dilihat dari perbedaan nilai TVB yang signifikan. Secara umum selama penyimpanan nilai TVB filet kakap merah dengan lebih rendah dibandingkan dengan filet kakap merah tanpa perlakuan.

Pengujian Organoleptik

Pengujian ini mempunyai peranan penting sebagai indikator awal untuk mengetahui penyimpangan dan perubahan produk. Penilaian organoleptik pada filet kakap merah meliputi parameter tekstur, warna, aroma, dan penerimaan umum dengan perlakuan kitosan dan ekstrak pala.

Tekstur

Hasil uji Kruskal-Wallis yang dilakukan terhadap nilai organoleptik tekstur filet kakap merah dengan perlakuan kitosan selama penyimpanan suhu dingin memberikan nilai yang tidak berbeda nyata satu sama lain ($\text{Sig} > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan larutan kitosan 5% dan ekstrak pala 10% tidak berpengaruh nyata terhadap nilai organoleptik tekstur filet kakap merah selama penyimpanan suhu dingin ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Warna

Penggunaan kombinasi larutan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% mampu mempertahankan nilai organoleptik warna daging filet kakap merah lebih baik dibandingkan dengan perlakuan tanpa kitosan dan ekstrak pala. Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis yang dilakukan, pada hari ke-0 diperoleh nilai $\text{Sig} > 0,05$; artinya perlakuan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% tidak memberikan pengaruh nyata pada filet, terlihat dari nilai organoleptik warna daging yang relatif sama. Perbedaan terjadi pada penyimpanan hari ke-4 sampai hari ke-12, dengan nilai $\text{Sig} < 0,05$; artinya nilai perlakuan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% memberikan pengaruh nyata pada warna daging filet kakap merah.

Aroma

Berdasarkan uji Kruskal-Wallis yang dilakukan terhadap variabel aroma, perlakuan kitosan pada penyimpanan hari ke-0 sampai hari ke-4 tidak mempengaruhi penilaian panelis terhadap variabel aroma filet kakap merah terlihat dari nilai rata-rata kedua perlakuan yang hampir sama.

Perlakuan kitosan 5% dan ekstrak pala 10% memberikan pengaruh nyata terhadap penilaian panelis (mulai tercium aroma busuk pada sampel filet kakap merah) setelah penyimpanan hari ke-8 dengan nilai Sig<0,05.

Penerimaan Umum

Berdasarkan uji Kruskal-wallis, perlakuan filet kakap merah dengan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% tidak memberikan pengaruh nyata (Sig>0,05) terhadap penilaian penerimaan umum oleh panelis pada hari ke-0 dan ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa suhu penyimpanan (4±1°C) mampu mempertahankan mutu filet kakap merah tanpa perlakuan sampai hari ke-4. Pada hari ke-8 sampai hari ke-12, terdapat pengaruh yang nyata (Sig<0,05) antar perlakuan terhadap penilaian penerimaan umum. Filet kakap merah dengan perendaman kitosan dan ekstrak pala memiliki nilai organoleptik penerimaan umum yang lebih tinggi daripada kontrol. Kondisi ini mengimplikasikan bahwa perbedaan dalam hal tekstur, warna, serta aroma telah mampu memberikan pengaruh nyata bagi tingkat kesukaan panelis terhadap produk filet kakap merah secara keseluruhan pada pengamatan hari ke-8 sampai hari ke-12.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kitosan yang dihasilkan dalam penelitian ini telah memenuhi standar kitosan komersial dilihat dari karakteristik ukuran partikel, warna larutan, kadar air, kadar abu, dan derajat deasetilasi dengan rendemen sebesar 17%. Hasil pegujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa kombinasi larutan kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% memiliki penghambatan terhadap bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Salmonella thypii*) paling tinggi dibandingkan kombinasi larutan lainnya. Kombinasi larutan kitosan 1,5% dengan ekstrak pala 10% tersebut mampu menekan pertumbuhan bakteri dan menekan peningkatan nilai TVB pada penyimpanan suhu 4 ± 1°C selama 12 hari ditunjukkan dengan adanya signifikansi perbedaan nilai TPC dan TVB dengan kontrol (Sig<0,05). Perlakuan kitosan dan ekstrak pala tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai derajat keasaman filet kakap merah selama penyimpanan. Perlakuan filet kakap merah dengan perendaman dalam kitosan 1,5% dan ekstrak pala 10% memberikan pengaruh nyata (Sig<0,05) terhadap penilaian warna, aroma, tekstur, serta penerimaan umum oleh panelis pada hari ke-8 sampai hari ke-12 penyimpanan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kombinasi kitosan dan ekstrak pala merupakan bahan antibakteri yang efektif untuk filet kakap merah pada penyimpanan suhu dingin dan mampu memperpanjang daya simpan selama 4 hari.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek penambahan ekstrak pala dengan konsentrasi tertentu terhadap produk pangan. Biji pala diketahui memiliki kandungan miristisin yang merupakan zat racun yang dapat menyebabkan degenerasi hati jika penggunaannya berlebihan. Pelarut nonpolar untuk isolasi senyawa aktif biji pala juga perlu digunakan untuk mengisolasi senyawa antibakteri dalam pala secara maksimal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Teknologi Industri Pertanian FATETA IPB yang telah memberikan bantuan dana untuk kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Angka SI dan Suhartono MT. 2000. Pemanfaatan Limbah Hasil Laut: Bioteknologi Hasil Laut. Bogor: Pusat Sumberdaya Pesisir dan Lautan, IPB.
- Austin PR, Brine CJ, Castle JE, Zikakis JP. 1981. Chitin: New Facets of Research. *Sci*. 212:749-753.
- Bastaman S. 1989. Studies on Degradation and Extraction of Chitin and Chitosan from Prawn Shells. England: The Department of Mechanical Manufacturing Aeronautical and Chemical Engineering. The Queen University.
- Carson CF dan Riley TV. 1995. Antimicrobial Activity of The Major Components of The Essential Oil of *Melaleuca Alternifolis*. *J Appl Bacteriol*. 78:264-269.
- Clucas IJ dan PJ Sutcliffe. 1981. *An Introduction to Fish Handling and Processing*. Tropical Products Institute: 56-62, London: Gray's Inn Road.
- Davidson PM dan Branen AL. 1993. *Antimicrobial in Foods*. Ed Ke-2. New York: Marcel Dekker, Inc.
- El Ghaouth A, Grenier Jabv, Benhamoun N, Asselin A, Belenger. 1994. Effect of Chitosan on Cucumber Plant Suppression of Phytium Aphan Denider Matur and Induction of Defence Reaction. *Phytopathd* 84:3.
- Fardiaz S. 1983. *Keamanan Pangan*. Bogor: Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Fardiaz S. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan I*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB.
- Gram I dan Dalgaard P. 2002. Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion Biotechnol*. 13: 226-266.

- Guenther E. 1952. *The Essential Oil*. New York : D. Van Nostrand Company, Inc.
- Hadi HNSS. 2008. Aplikasi Kitosan dengan Penambahan Ekstrak Bawang Putih sebagai Pengawet dan *Edible Coating* Bakso Sapi [Tesis]. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Hongpattakere T dan Riyaphan O. 2008. Effect of Deacetylation Condition on Antimicrobial Activity of Chitosan Prepared from Carapce of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarinn J Science and Technol.* 30 (1): 1-9.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2012. Statisti Perikanan Tangkap, Perikanan Budaya dan Ekspor – Impor Setiap Provinsi seluruh Indonesia. Pusat Data Statistik dan Informasi, Sekretariat Jenderal Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kumar R. 2002. A Review of Chitin and Chitosan Application. *Reactive Function Polym.* 46:1-27.
- Mawaddah R. 2008. Kajian Riset Potensi Antimikroba Alami dan Aplikasinya dalam Bahan Pangan di Pusat Informasi Teknologi Pertanian FATETA IPB [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Muzarelli RAA dan Peter MG. 1997. *Chitosan Handbook*. European Chitin Society.
- No HK dan Meyers SP. 1995. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan-a Review. *J Aqua Food Prod Technol.* 42(2):27-52
- Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. 2000. Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-Based Antibacterial Packaging Films. *J Food Sci* 65:768-773.
- Prasetyo KW. 2010. Pembuatan Kitin, Bisnis Masa Depan. <http://www.biomaterial.lipi.go.id/p=154>. [19 Desember 2011]
- Rahardyani R. 2011. Efek Daya Hambat Kitosan sebagai *Edible Coating* terhadap Mutu Daging Sapi Selama Penyimpanan Suhu Dingin [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sikorski ZE, Kolakowska A, dan Pan BS. 1990. Postharvest biochemical and microbial change. Di dalam: Sikorski ZE, editor. *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. Boca Raton, Florida: CRC Press. P55-76.
- Suptijah P, Salamah E, Sumariyanto H, Purwaningsih S, Santoso J. 1992. Pengaruh berbagai Metode Isolasi Kitin Kulit Udang terhadap Kadar dan Mutunya. [Laporan Penelitian]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Suptijah P, Gushagia, dan Sukarsa DR. 2007. Kajian Efek Daya Hambat Kitosan terhadap Kemunduran Mutu *Fillet* Ikan Patin (*Pangasius hypothalamus*) pada Penyimpanan Suhu Ruang. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 11(2):89-101.
- Tsai GJ dan Su WH. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan againts *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 62: 239-243.
- Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. 2002. Antimicrobial Activity of Shrimp Chitin and Chitosan from Different Treatments and Applications of Fish Preservation. *Fish Sci.* 68: 170-177.
- Yulina IK. 2011. Aktivitas Antibakteri Kitosan Berdasarkan Perbedaan Derajat Deasetilasi dan Bobot Molekul [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Zheng LY dan Zhu JF. 2003. Study on Antimicrobial Activity of Chitosan With Different Molecular Weight. *Carbohydr Polym.* 54: 527-530.