

INTISARI

Efektivitas kitosan sebagai agen antibakteri dapat ditingkatkan dengan modifikasi sebagai nanopartikel. Untuk aplikasi sebagai bahan pengawet ikan selain aktivitas antibakteri yang tinggi juga diperlukan stabilitas yang tinggi selama penyimpanan. Stabilitas tersebut meliputi stabilitas ukuran partikel dan zeta potensial. Target selama penyimpanan adalah mempertahankan ukuran partikel dalam kisaran 100-200 nm dan zeta potensial minimal +30 mV untuk menjamin karakter antimikrobia yang optimum. Metode gelasi ionik, yaitu kompleksasi kitosan dengan mikroanion *tripolyphosphate* (TPP) sebagai *cross-linker*, telah diketahui dapat menghasilkan nanokitosan yang memiliki aktivitas antibakteri dan stabilitas yang tinggi. Namun penggunaan TPP untuk aplikasi pengawetan ikan memiliki keterbatasan yaitu merugikan konsumen dari aspek ekonomi sehingga perlu dicari alternatif penggantinya. Pada penelitian ini dilakukan formulasi nanokitosan untuk pengawetan ikan dengan metode presipitasi dan kompleks polielektrolit menggunakan makroanion yang dibandingkan dengan gelasi ionik. Tahap formulasi dilakukan dengan mengamati pengaruh berat molekul kitosan, jenis *crosslinker* dan rasio kitosan-*crosslinker* terhadap ukuran partikel, zeta potensial, dan aktivitas antimikrobia.

Kitosan dengan berat molekul medium menghasilkan stabilitas ukuran partikel, zeta potensial dan penghambatan pertumbuhan bakteri yang baik. Oligosakarida yang berpotensi menggantikan TPP sebagai *crosslinker* adalah gum arab dengan rasio kitosan-gum arab optimum berkisar antara 0,38:1-0,83:1 sedangkan rasio kitosan-TPP adalah 3:1. Ketiga metode pembuatan nanokitosan menghasilkan partikel yang diinginkan (sekitar 200nm). Namun metode presipitasi mengalami reduksi zeta potensial karena ada penetralan muatan akibat penambahan basa, sedangkan kedua metode yang lain tetap berada di atas +30 mV.

Mekanisme pembentukan partikel nanokitosan diprediksi berdasarkan fitting data pada model matematis yang mengkorelasikan rasio kitosan-*crosslinker*, ukuran partikel dan zeta potensial. Model disusun berdasarkan asumsi bahwa ukuran partikel dan zeta potensial ditentukan oleh kesetimbangan muatan listrik yang melingkupi partikel nanokitosan sebagai *slipping layer*. Hasil fitting data mengarah pada dugaan bahwa terjadi mekanisme yang berbeda untuk metode gelasi ionik dan kompleks polielektrolit. Perbedaan jenis anion mempengaruhi mekanisme pembentukan partikel tersebut. Pada metode gelasi ionik, penambahan mikroanion pada larutan kitosan mendorong timbulnya gerak Brownian yang random akibat ukuran molekul yang relatif kecil untuk membentuk inti partikel. Tahapan ini sesuai dengan model Gaussian. Selanjutnya tahapan pembentukan inti diikuti mekanisme pembesaran partikel yang mengikuti pola pertumbuhan logistik sampai tercapai kesetimbangan muatan maupun gaya antar partikel dan ukuran partikel dalam populasi menjadi konstan. Mekanisme yang berbeda teramati pada proses kompleks polielektrolit. Pada proses kompleks elektrolit, penggunaan makroanion dengan molekul berukuran lebih besar menyebabkan hambatan sterik yang tidak memungkinkan gerak random untuk pembentukan inti partikel seperti pada proses

gelasi ionik. Dalam proses kompleks elektrolit, sejak awal pembentukan partikel langsung mengikuti model pertumbuhan kuadratik tanpa menunjukkan fase random pembentukan inti partikel. Perbedaan mekanisme pembentukan partikel tersebut membawa dampak pada perbedaan distribusi ukuran partikel dimana kompleks kitosan-makroanion menghasilkan populasi nanopartikel dengan distribusi ukuran partikel yang lebih lebar dari kitosan-mikroanion. Oleh karena itu, walaupun karakter antimikrobal nanokitosan dari metode gelasi ionik dan metode kompleks polielektrolit relatif sama, metode kompleks polielektrolit memerlukan kontrol yang sangat baik untuk menjamin heterogenitas ukuran partikel masih dalam kisaran yang bisa diterima.

Setelah memahami mekanisme pembentukan nanokitosan, dilakukan penyesuaian formulasi nanokitosan dengan kondisi aplikasi di lapangan agar sesuai dengan selera konsumen dan kebiasaan pengguna. Penyesuaian yang dilakukan meliputi reduksi asam asetat, pembekuan nanokitosan, dan penambahan garam. Reduksi asam asetat tidak merubah kemampuan nanokitosan dalam mengawetkan ikan justru meningkatkan penerimaan konsumen. Sedangkan pembekuan dan penambahan garam mempengaruhi stabilitas koloid. Oleh karena itu, disadari bahwa diperlukan edukasi pada calon pengguna untuk mengaplikasikan nanokitosan sebagai pengawet secara optimal, dengan sedikit mengubah kebiasaan calon pengguna dalam penanganan ikan segar selama ini.

Pengujian sifat antimikrobal menunjukkan bahwa nanokitosan yang diproduksi dengan metode gelasi ionik dan kompleks polielektrolit menghasilkan performa pengawetan ikan yang sama dan keduanya lebih baik dari larutan kitosan. Performa pengawetan ikan tersebut dievaluasi berdasarkan parameter kinetika pembusukan (*3-parameter logistic model*). Kemampuan penetrasi nanokitosan ke dalam tubuh ikan adalah kunci utama dalam mengawetkan ikan. Pengawetan ikan juga dapat dilakukan dengan memanfaatkan kemampuan *coating* dari kitosan namun diperlukan konsentrasi kitosan yang tinggi agar lebih viskos. Dengan demikian, nanokitosan memiliki keuntungan karena memerlukan jumlah kitosan yang lebih sedikit per satuan berat ikan.

Pengkajian nanokitosan sebagai bahan pengawet ikan mulai dari proses formulasi hingga aplikasi untuk pengawetan ikan yang disajikan dalam disertasi ini diharapkan memberikan suatu alternatif solusi penyediaan pangan yang aman dan menyehatkan. Mengingat potensi bahari Indonesia yang sangat besar, maka faktor pengawetan menjadi sangat penting untuk memanfaatkan kekayaan bahari Indonesia seoptimal mungkin untuk kesejahteraan bangsa.

Kata kunci: nanokitosan, stabilitas koloid, ukuran partikel, zeta potensial, antibakteri, pengawet ikan

ABSTRAK

The effectiveness of chitosan as antibacterial agent can be improved by modifying the particle size to nanoparticles. For application as antibacterial agent in fish preservation, besides antibacterial properties, high stability properties of colloid are also needed during storage. Colloidal stability includes the stability of particle size and zeta potential, have to be maintained at 100-200 nm and minimum of +30 mV respectively for the purpose of optimum preservative characteristic. Ionic gelation method, i.e. complexation between chitosan molecule and micro-anion tripolyphosphate (TPP) as crosslinker, has been recognized as a method to produce nano-chitosan with high antibacterial activity and colloid stability. However, for the case of fish preservation, the use of TPP as a chitosan crosslinker caused economic fraud to consumers so that it is necessary to find more appropriate substitute. In this study, nanochitosan formulation for fish preservation was carried out by precipitation and polyelectrolyte complex method to be compared to ionic gelation method using TPP. The study on formulation was focused on the effect of chitosan molecular weight, crosslinker type and chitosan-crosslinker ratio on the particle size, zeta potential, and antimicrobial activity.

Medium molecular weight chitosan resulted in good stability on particle size and zeta potential and also good bacterial growth inhibition. Oligosaccharide that showed the best potential to replace TPP as a crosslinker was arabic gum with the optimum ratio of chitosan-gum arabic ranging from 0.38:1 to 0.83:1 while the chitosan-TPP ratio was 3:1. All three nano-chitosan production methods tested in this study generated the desired particle size (around 200 nm). However, the precipitation method exhibited large zeta potential reduction because the particle charge was neutralized by bases, while the other two methods successfully maintained zeta potential above +30 mV.

The mechanism of nano-chitosan particle formation was predicted based on data fitting on proposed mathematical model which correlated the ratios of chitosan-crosslinker, particle size, and zeta potential. The model was developed based on the assumption that particle size and zeta potential was governed by equilibrium charges which covered each particle as the so-called slipping layer. The result of data fitting led to a possibility that there were different mechanisms in the methods of ionic gelation and polyelectrolyte complex. The difference in the size of anions used as crosslinkers played an important role in the mechanism of nanoparticle formation. In ionic gelation method, the addition of micro-anion (TPP) into chitosan solution triggered random Brownian motion as a result of small molecules freely moving in the system which led to particle nucleus formation. This phase was very well fit Gaussian model. Nucleus formation was followed by particle enlargement which followed logistic growth pattern until charges around particles and interparticle forces reached equilibrium. Particle size and zeta potential remained constant after equilibrium was reached. On the other hand, in polyelectrolyte complex method, different mechanism was observed. The use of macro-anion as

crosslinker in polyelectrolyte method did not induce free Brownian motion due to large steric hindrance of the large molecules. Therefore in this method, random nucleus formation phase was not observed. From the very beginning, the particles were growing and following quadratic growth pattern. The difference between the mechanisms of both methods brought a consequence on the particle size distribution. The particle size distribution in polyelectrolyte complex method was larger than that of ionic gelation method. Therefore, although the nano-chitosan from both methods showed similar antimicrobial activities, the method of polyelectrolyte complex needed better control to ensure acceptable size heterogeneity.

After understanding the mechanism of nano-chitosan formation, it was necessary to study the possible adjustment on the formulation of nano-chitosan to the conditions expected by customers and habitual behaviour of fishermen as the main prospective users. The adjustments included reduction of acetic acid for better taste, freezing, and salt addition. Reduction of acetic acid concentration did not change the ability of nano-chitosan to preserve fish and it even increased consumer acceptance. Meanwhile freezing and salt addition caused negative effect on colloidal stability. Therefore, it is important to note that education to prospective users will be needed to ensure appropriate acceptance of the users on the unique characteristics of nano-chitosan which might slightly change their habit in handling fresh fish.

Antimicrobial test showed that nano-chitosan produced by ionic gelation and polyelectrolyte complex methods exhibited the same performance on fish preservation and both were better than chitosan solution. Fish preservation performance was evaluated based on deterioration kinetics parameters (using the 3-parameter logistic model). The ability of nano-chitosan to penetrate into the flesh of the fish was the main factor to preserve fish. Fish preservation was also possible to be undertaken by utilizing the coating capability of chitosan but it needs high concentration of chitosan in order to get high viscosity. This fact underlined the advantage of using nano-chitosan over chitosan solution, i.e. by using nano-chitosan, much less chitosan was required for each unit of fish weight to achieve the same preservation performance to be compared with chitosan solution.

This dissertation presented the comprehensive research of nano-chitosan as a fish preservative starting from the formulation process up to the application on fish preservation. It is expected that the innovation presented in this dissertation becomes an alternative solution to provide safe preservation agent, especially for fish preservation. Considering the huge potential on Indonesian marine resources for food, preservation is the most important key to utilize this richness for the nation prosperity.

Keywords: nano-chitosan, colloid stability, particle size, zeta potential, antibacterial, fish preservative