

TOXICITY OF CHITOSAN OLIGOMER ENZYMATIC LOW DEGREE OF DEACETYLATION USING BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT) METHOD

Toksisitas Oligomer Kitosan Derajat Deasetilasi Rendah Enzimatis Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sarni¹

¹ Midwifery Academic of National Healing Foundation, Jl. Palagimata, Baubau-Indonesia

*Corresponding author, email: sarni_malik@yahoo.com

Received: Dec. 2016 Published: Jan. 2017

ABSTRACT

Chitosan oligomers or chitooligomer is a mixture of oligomers of D-glucosamine which are formed through a process of depolymerization of chitosan with cutting its β -glycosidic bonding. Chitosan oligomer has received much attention in various fields because of the specific biological activity 10 times greater than chitosan. Chitosan oligomer having biological activity as antibacterial, antiviral, antioxidant, anti-tumor and anti-cancer. Before it is applied to humans, the bioactive compounds to be used as pharmaceutical products must pass a preliminary test using test animals. BSLT method is often used to praskrining against bioactive compounds. This method uses shrimp larvae are widely used in searches that are toxic bioactive compounds from natural materials. This study aims to determine the toxicity of chitosan oligomers enzymatic (crude) as a preliminary test before being used as a pharmaceutical product either as anti-cancer or anti microbial with BSLT method. The results showed chitosan oligomer (crude) hydrolysis of leather tiger shrimp chitosan (DD 60%) with chitosanase enzyme for each time of incubation has strong toxicity properties with a value of 36.90 ppm LC50 (1 hour incubation); 47.43 ppm (incubation 2 hours) and 104.86 ppm (incubation 3 hours).

Keywords: Chitosan Oligomers, Toxicity, BSLT

PENDAHULUAN

Oligomer kitosan atau kitoooligomer merupakan campuran oligomer dari D-glukosamin yang terbentuk melalui proses depolimerisasi kitosan dengan memutus ikatan β -glikosidik. Kitoooligomer merupakan kitosan yang telah terdepolimerisasi sehingga memiliki ukuran dan bobot molekul yang lebih kecil. Berkurangnya bobot molekul dari kitosan ini menjadikan sifatnya lebih mudah larut di dalam air dibanding sebelum terdepolimerisasi (Srijanto dkk., 2006; Julianti dkk., 2012).

Oligomer kitosan dapat dihasilkan dengan iradiasi sonik, hidrolisis secara kimiawi dan hidrolisis secara enzimatis. Hidrolisis secara kimiawi dan iradiasi sonik bersifat acak, tidak terkontrol, efisiensi yang rendah dan menghasilkan oligomer dengan derajat polimerisasi (DP) yang rendah dengan lebih banyak monomer D-glukosamin. Sedangkan, hidrolisis secara enzimatis bersifat spesifik, terkontrol, menghasilkan oligomer kitosan dengan DP yang lebih tinggi dan sedikit

glukosamin yang dihasilkan serta ramah lingkungan (Jeon dkk., 2000; Meidina dkk., 2005; Wahyuni dkk., 2006; Liu dkk., 2007; Chasanah, 2010), sehingga cara enzimatis ini lebih baik dan umumnya digunakan dalam memproduksi Oligomer kitosan. Salah satu enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis kitosan adalah enzim kitosanase (Choi dkk., 2004).

Oligomer kitosan memiliki manfaat yang lebih besar jika dibandingkan kitin maupun kitosan. Oligomer kitosan menjadi lebih penting karena memiliki potensi yang tinggi dan dapat diaplikasikan di bidang makanan fungsional, bantuan medis, obat-obatan dan agen pertanian (Yoon dkk., 2001). Pada bidang biomedik, oligomer kitosan lebih unggul karena mendekati 100% dapat diserap oleh tubuh manusia. Hal ini berarti bahwa dalam bentuk yang sederhana, kitosan akan lebih mudah dimanfaatkan dalam metabolisme (Pratitis, 2006). Oligomer kitosan ini mendapat banyak perhatian di berbagai bidang dikarenakan aktivitas spesifik biologisnya (Hotmatua, 2004). Aktivitas dan

fungsi biologis oligomer kitosan 10 kali lebih besar dibandingkan kitosan (Pratitis, 2006). Oligomer kitosan mudah diserap melalui usus, cepat masuk ke dalam aliran darah dan memiliki efek biologis yang sistemik dalam organisme karena berat molekulnya yang rendah jadi karakteristik utama aktivitas biologisnya (Mourya dkk., 2011). Oligomer kitosan mempunyai aktivitas biologis sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antitumor, menurunkan tekanan darah tinggi (Struszczyk dkk., 2009), antimikroba, hemostatik, penstimulasi sistem imun, osteokonduktivitas, anti koagulan, penurun kolesterol dan masih banyak lagi sehingga penggunaannya dalam industri makanan dan farmasi serta dalam bidang medis semakin luas (Mourya dkk., 2011; Natalia, 2013).

Beberapa penelitian melaporkan potensi oligomer kitosan dari bahan berkitin, misalnya Pae (2001) melaporkan terjadinya induksi granulositik pada sel *promyelocytic leukemia* (HL-60) oleh *water-soluble chitosan oligomer* (WSCO). Caiqin Qin dkk (2002) melaporkan kitosan larut dalam air secara enzimatis dan aktivitasnya sebagai anti tumor. Sri Wahyuni dkk (2006) melaporkan aktivitas anti kanker senyawa-senyawa kitooligomer. Qingsong Xu dkk (2007) melaporkan Oligomer kitosan dapat menginduksi apoptosis cell kanker *hepatocellular* pada manusia. Sanaa T. El-Sayed dkk (2012) melaporkan Oligomer kitosan yang dihasilkan dengan kitosanase dari *Capsicum annuum* efektif dalam menghambat sel karsinoma *hepatocellular* (HEP-G2), sel kanker usus dan sel kanker payudara (MCF7) pada konsentrasi yang berbeda.

Uji toksisitas adalah suatu uji pendahuluan untuk mengetahui aktivitas farmakologi suatu senyawa. Prinsipnya komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah (Meyer dkk., 1982). Sebelum diaplikasikan kepada manusia, senyawa bioaktif yang akan digunakan sebagai produk farmasi harus melewati uji pendahuluan menggunakan hewan uji (Marwati, 2012).

Metode BSLT sering digunakan untuk praskrining terhadap senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan. Metode ini menggunakan larva udang yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini

dapat digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam karena mudah, cepat, dan murah (Meyer dkk., 1982).

Oleh karena itu pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas dari oligomer kitosan sebagai uji pendahuluan sebelum digunakan sebagai produk farmasi baik itu sebagai anti kanker ataupun sebagai anti mikroba dengan metode BSLT.

METODOLOGI

Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya Oligomer kitosan enzimatis dengan waktu inkubasi 1,2 dan 3 jam dari Kitosan DD 60 % (Sarni, 2016), CH₃COOH 33%, NaOCl 0,5 % (Merk), air laut steril, aquades, telur *Artemia Salina Leach*.

Alat

Alat yang digunakan adalah Micro pipet, Aerator, Lampu TL 15 watt serta beberapa peralatan gelas (*pyrex*).

Prosedur Kerja

A. Penyiapan Larva *Artemia Salina Leach*

Telur *Artemia salina* Leach direndam dengan aquades selama 10 menit, kemudian ditambah beberapa tetes NaOCl 5% dan dicuci dengan aquades. Selanjutnya telur *Artemia salina* Leach dimasukkan ke wadah berisi air laut, diaerasi di bawah sinar lampu selama 24 jam. Telur akan menetas setelah 24 jam dan menjadi larva. Larva yang berumur 2 hari siap digunakan sebagai hewan uji

B. Persiapan Larutan Sample

Senyawa oligomer kitosan enzimatis inkubasi 1, 2 dan 3 jam dibuat larutan stok dengan konsentrasi 5000 ppm. Selanjutnya, dibuat seri konsentrasi sampel sebesar 10; 20; 40; 80 dan 160 ppm dari larutan stok tersebut dengan pengenceran menggunakan air laut. Sebagai kontrol, digunakan pelarut air laut.

C. Pelaksanaan Pengujian Sampel

Sepuluh ekor larva *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam tabung yang berisi sampel dan kontrol. Volume tabung dicukupkan hingga 5 mL dengan air laut. Masing-masing perlakuan dan kontrol dilakukan tiga kali ulangan.

Selanjutnya, semua tabung diinkubasikan di bawah lampu TL 15 watt selama 24 jam. Setelah diinkubasi, jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada tiap tabung dilihat dengan bantuan kaca pembesar dan dihitung untuk menentukan persentase kematiannya. Nilai *Lethal Concentration* (LC₅₀) dihitung menggunakan analisis probit.

Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian larva menggunakan rumus (Meyer *et al.*, 1982):

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100 \%$$

Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina* Leach, kemudian dicari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan garis : $Y = Bx + A$

Dimana, $Y = \log \text{ konsentrasi}$, dan

$X = \text{Angka probit}$

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit (50% kematian). Apabila pada kontrol ada larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus Abbot (Meyer dkk., 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Suatu senyawa dikatakan sangat toksik jika nilai LC₅₀ < 30 ppm, toksik jika nilai LC₅₀ 30 – 1000 ppm dan jika nilai LC₅₀ > 1000 ppm. Nilai LC₅₀ Oligomer kitosan yang dihasilkan secara enzimatis untuk tiap waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji toksisitas oligomer kitosan dengan metode BSLT

Sampel	Jumlah larva sampel mati pada tiap konsentrasi					LC ₅₀
	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	
Kontrol	2	2	3	3	4	-
	3	3	3	3	3	
	3	2	4	2	3	
	Total kematian	8	7	10	8	
% kematian	26,67	23,33	33,33 %	26,67 %	33,33 %	
OK. 1 jam	7	9	8	7	10	36,90 ppm

	7	8	8	8	9	(Toksik)
	4	7	8	10	8	
Total kematian	18	24	24	25	27	
% kematian	60 %	80 %	80%	83,33%	90 %	
	3	9	9	10	10	
OK. 2 jam	7	8	8	8	6	47,43 ppm (Toksik)
	7	4	8	9	10	
Total kematian	17	21	25	27	26	
% kematian	56,67 %	70%	83,33 %	90 %	86,67%	
	4	5	6	7	10	
OK. 3 jam	4	4	7	7	10	104,86 ppm (Toksik)
	5	4	4	6	10	
Total kematian	13	13	17	20	30	
% kematian	43,33%	43,33%	56,67 %	66,67 %	100 %	

Oligomer kitosan untuk tiap waktu inkubasi memiliki sifat toksik dengan nilai LC₅₀ yang semakin meningkat dari inkubasi 1 jam hingga 3 jam. Nilai LC₅₀ untuk 1,2 dan 3 jam inkubasi berturut-turut 36,90 ppm; 47,43 ppm dan 104,86 ppm (Tabel 1). Semakin kecil nilai LC₅₀ maka semakin toksik senyawa tersebut. Dengan demikian tingkat toksisitas Oligomer kitosan yang dihasilkan semakin lama waktu inkubasi akan semakin berkurang. Hal ini terjadi karena semakin lama waktu inkubasi maka akan semakin banyak monomer atau Oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi rendah yang dihasilkan, yang mana bersifat tidak toksik.

Oligomer kitosan yang dihasilkan dari hidrolisis kitosan dari kulit udang windu (DD 60 %) dengan enzim kitosanase dari *Klebsiella sp* untuk tiap waktu inkubasi bersifat toksik berdasarkan nilai LC₅₀, sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat anti kanker. Dalam hal ini Oligomer kitosan yang dihasilkan diuji lebih lanjut ke sitotoksitasnya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan oligomer kitosan (*crude*) hasil hidrolisis kitosan dari kulit udang windu (DD 60 %) dengan enzim kitosanase untuk tiap waktu inkubasi memiliki sifat toksisitas kuat dengan nilai LC₅₀ 36,90 ppm (inkubasi 1 jam); 47,43 ppm (inkubasi 2 jam) dan 104,86 ppm (inkubasi 3 jam)

DAFTAR PUSTAKA

- Chasanah E., 2010. Pengembangan Produk Oligomer kitosan dari Limbah Industri Perikanan Udang Secara Enzimatis Prospek dan Kendala. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. *J. Squalen* Vol 5 (2).
- Choi J.Y., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C., 2004. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. American Society for Microbiology, *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (8) : 4522-4531
- El-Sayet, S., El-Sayat, M., Shousha, W.G., Shehata, A.N., Omar, N.I., 2012. Production of Novel Antitumor Chitooligosaccharides by Using Purified Chitosanases from *Capsium annuum* Leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4):1-15
- Hotmatua, A., 2004. *Potensi Antimikroba Oligomer Kitosan yang Dihasilkan Dengan Menggunakan Enzim Termotabil Kitosanase LH 28.38*, Skripsi tidak Diterbitkan. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Jeon Y.J. & Kim S.K., 2000. Production of Chitooligosaccharides Using Ultrafiltration Membran Reactor and Their Antibacterial Activity. *Carb. Polymer* 41: 133-141.
- Julianti S., Agusnar H., Alfian z., 2012. Pembuatan Kitosan Oligomer Melalui Metode Degradasi Oksidatif dan Pengaruhnya Terhadap Viskositas dan Berat Molekul. Universitas Sumatera Utara, Medan, *J. Saintia Kimia* Vol.1(1)
- Liu B. , Wan-Shun Liu, Bao-Qin Han, Yu-Ying Sun, 2007. Anti diabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *World J. Gastroenterol* 13 (5): 725–731.
- Marwati D., 2012. *Sintesis Senyawa Potensial Anti Kanker Turunan Sinamat*. Tesis tidak dipublikasikan. Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Meidina, 2005. *Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan yang Diproduksi menggunakan Kitosanase dari Isolat B. Licheniformis MB-2*, Tesis tidak Diterbitkan. Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Meyer, F., Putnam, Jacobsen N., & Mc L., 1982, *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Lant Constituents*, Plant Medika 45.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudari, Y.M., 2011. Chitooligosaccharides : Synthesis, Characterization and Applications. Government Pharmacy Collage, Osmanpura, Aurangabad, India. *Polimer Science. Ser. A* 53 (7): 583 – 612.
- Natalia, D., 2013, *Kloning dan Ekspresi Gen Pengkode Kitosanase dalam Rangka Produksi Kitoooligosakarida Untuk Keperluan Medis*, Program Riset Desentralisasi DIKTI, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Pae, Ho, 2001. Introducton of Granulocytic Differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia Cell (HL-60) by Water-Soluble chitosan oligomer. *Leukemia Res.* 25: 339 – 346.
- Prastitis, 2006. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim kitosanase dari Bakteri Laut Yang Berasosiasi Dengan Spons*, Skripsi tidak Diterbitkan., Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Qin Caiqin, Du Yumin, Xiao Ling, Li Zhan, Gao Xiao hai, 2002. Enzymic Preparation Of Water-Soluble Chitosan and Their Antitumor Activity. Wuhan University, China. *Int. J. Biological Macromolecules* 31(2002):111-117.
- Sarni, Natsir, H., Dali, S., 2016. Production and Characterization Chitosanase Of Sponge Symbiont Bacteria *Klepsiella* sp To Hydrolyze Chitosan Be Chitooligosaccarides *Int. Journal Marina Chimica Acta* Vol. 17 No. 1 (April 2016)ISSN 1441-2132.

- Srijanto B., Paryanto I., Masduki, Purwatiningsih, 2006. Pengaruh Derajat Deasetilasi Bahan Baku Pada Depolimersasi Kitosan. Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika-BPPT, Bogor, *Akta Kimia Indonesia* Vol.1 (2) : 67-72.
- Wahyuni S., Zakaria F., Witarto A.B., Syah D., Suhartono M.T., 2006. Aktivitas Anti Kanker Senyawa-Senyawa Kito oligomer. *J. Teknologi dan Industri Pangan* Vol XVII (1).
- Xu, Q., Dou, J., Wei, P., Tan, C., Yun, X., Wu, Y., Bai, X., Ma, X., Du, Y., 2007. Chitooligosaccharides Induce Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell via Up-regulation of Bax. Elsevier Science Direct. *Carbohydrat Polimers* 71