

Pengoptimalan Menggunakan Central Composite Design (CCD) untuk Depolimerisasi Kitosan secara Degradasi Oksidatif dengan NaNO_2

Dhian Eka Wijaya¹, Edwin Permana², Martina Asti Rahayu¹, Nur Ahniyanti Rasyid³, Ali Nurdin Hidayat⁴

¹Program Studi Analis Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi, Jl. Jambi – Muara Bulian No.KM. 15, Mendalo Darat, Kec. Jambi Luar Kota, Kabupaten Muaro Jambi, Jambi; ²Program Studi Kimia Industri, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi;

³Program Studi Ilmu Aktuaria, Fakultas Sains, Universitas Muhammadiyah Bulukumba

⁴Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi

Email: dhianekawijaya@unja.ac.id

ABSTRAK

Optimalisasi proses depolimerisasi kitosan melalui degradasi oksidatif dilakukan menggunakan natrium nitrit (NaNO_2) sebagai agen oksidator untuk menghasilkan *Low Molecular Weight Chitosan* (LMWC). Metode eksperimen menggunakan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD) berbasis *Response Surface Methodology* (RSM) untuk mengidentifikasi pengaruh berbagai faktor proses terhadap tingkat depolimerisasi kitosan. Depolimerisasi kitosan dilakukan untuk pengembangan manfaatnya melalui proses derivatisasi untuk memperluas jangkauan aplikasinya. LMWC hasil depolimerisasi memiliki sifat mudah larut dalam air/larutan berair dengan pH netral dan memiliki viskositas yang lebih rendah dalam kondisi fisiologis sehingga lebih mudah diaplikasikan di berbagai bidang, seperti biomedis dan pertanian. Faktor-faktor yang dimasukkan dalam eksperimen adalah suhu reaksi (A), konsentrasi NaNO_2 , dan waktu reaksi. Analisis statistika menunjukkan data eksperimen mengikuti model linier dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9219. Nilai optimal variabel independen pada 50 °C; 0,3 M NaNO_2 , dan 1,5 jam. Pengukuran Mv pada kondisi ini memiliki ketepatan 94.35% dengan penurunan bobot molekul sebesar 83.68%.

Kata kunci: kitosan, *Low Molecular Weight Chitosan* (LMWC), depolimerisasi, degradasi oksidatif, Central Composite Design

1. Pendahuluan

Kitosan merupakan biopolimer yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin, baik melalui proses reaksi kimia maupun reaksi enzimatik. Proses ini menghilangkan asetil pada gugus amida menjadi gugus amina. Struktur kitosan hampir sama dengan selulosa, yaitu dibedakan hanya pada gugus yang terikat pada atom C-2. Jika pada selulosa gugus yang terikat adalah gugus hidroksi, maka pada kitosan yang terikat adalah gugus amina. Kitosan merupakan suatu bahan kimia yang tidak toksik, biokompatibel, dan merupakan biopolimer yang dapat terdegradasi. Kitosan berbentuk padatan amorf berwarna putih kekuningan. Sifat kitosan bergantung pada sumber, derajat deasetilasi (DD), panjang rantai, dan bobot molekulnya. Sementara mutu kitosan ditentukan oleh nilai DD, kadar abu, kadar air, dan viskositas (Purwantiningsih *et. al.*, 2017).

Produksi turunan kitosan terus dilakukan dalam rangka memperluas jangkauan aplikasi polisakarida amino alami ini, terutama di bidang pertanian dan biomedis. Salah satu sifat kitosan yang menjadi perhatian khusus adalah

kelarutannya dalam air. Beberapa faktor yang mempengaruhi kelarutan kitosan dalam air adalah berat molekul, DD polimer, dan lokasi residu asetilasi dan deasetilasi dalam rantai polimer. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelarutan air dan aktivitas biologis kitosan dengan berat molekul rendah atau *Low Molecular Weight Chitosan* (LMWC) akan meningkat dibandingkan dengan kitosan dengan berat molekul tinggi (Kulikova *et. al.*, 2016).

LMWC merupakan kitosan yang memiliki berat molekul <150 kDa (Agirre *et. al.*, 2014), mudah larut dalam air/larutan berair dengan pH netral dan memiliki viskositas yang lebih rendah dalam kondisi fisiologis sehingga lebih mudah diaplikasikan (Blagodatskikh *et. al.*, 2017). Panjang rantai yang rendah dan gugus amino bebas pada LMWC akan membuatnya memiliki aktivitas biologis yang berharga pada level molekular atau selular. LMWC dianggap sebagai salah satu biopolimer yang paling berharga untuk aplikasi biomedis dan farmasi karena memiliki sifat biodegradabel, biokompatibel, antimikroba, non-toksik, anti-tumor, dan aktivitas biologis lainnya (Kulikov *et. al.*, 2014). Selain itu, LMWC juga dilaporkan berguna dalam pertanian sebagai biostimulan yang merangsang pertumbuhan akar dan peningkatan massa biji jagung (Kurchenko *et. al.*, 2019), serta pengendalian penyakit tanaman (Widiantini *et. al.*, 2016).

Saat ini, ada beberapa metode utama untuk mendepolimerisasi kitosan, yaitu hidrolisis asam, hidrolisis enzimatis, dan depolimerisasi degradasi oksidatif. Semua metode ini memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Depolimerisasi degradasi oksidatif kitosan memiliki kelebihan dapat dilakukan dalam rentang waktu yang jauh lebih cepat daripada hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis. Namun, metode ini memungkinkan terjadinya deaminasi parsial dan oksidasi (Bezrodnykh *et. al.*, 2018). Oleh karena itu, optimalisasi depolimerisasi degradasi oksidatif kitosan perlu dilakukan.

Metode optimalisasi adalah salah satu cara yang dapat digunakan untuk menekan efek yang ditimbulkan dari proses depolimerisasi degradasi oksidatif kitosan. Salah satu metode optimalisasi yang banyak digunakan adalah metode respon permukaan - *Central Composite Design* (CCD). Kelebihan utama dari design ini adalah dapat memberikan informasi yang maksimal, mencakup interaksi berbagai parameter, dengan jumlah percobaan eksperimental yang minimum (Kamboj *et. al.*, 2022). Dengan dasar ini maka perlu dilakukan optimalisasi proses depolimerisasi kitosan dengan NaNO_2 menggunakan metode CCD sehingga menghasilkan LMWC dengan rendemen yang baik dalam waktu yang relatif singkat.

2. Metode

Alat dan Bahan. Alat-alat yang digunakan diantaranya labu erlenmeyer, viskometer Ostwald, oven, labu bulat dua leher, kondensor, hot plate, buret, Fourier Transform Infrared (FTIR) Perkin Elmer spectrumOne, dan Design-Expert 13. Bahan-bahan yang digunakan diantaranya kitosan niaga, NaNO_2 , etanol 96%, NaOH, asam oksalat, dan air distilasi.

Derajat deasetilasi kitosan. Penentuan derajat deasetilasi kitosan dapat dilakukan spektrofotometri inframerah. Kitosan dibuat pelet dengan KBr 1%, kemudian dilakukan pemindaian pada daerah frekuensi antara 4000 cm^{-1} dan 400 cm^{-1} . Derajat deasetilasi ditentukan dengan metode garis dasar. Puncak tertinggi dicatat dan diukur dari garis dasar yang dipilih. Kitosan yang terdeasetilasi sempurna (100%) memiliki nilai $A_{1655} = 1.33$. Dengan membandingkan absorbans pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} (serapan pita amida I) dengan absorbans pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} (serapan gugus hidroksil), % derajat deasetilasi dapat dihitung dengan persamaan:

$$\%DD = 1 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1.33} \right] \times 100\%$$

Bobot molekul kitosan. Bobot molekul kitosan ditentukan dengan menggunakan metode viskometer. Sebanyak ± 0.25000 g kitosan dilarutkan dalam 250 mL asam asetat 0.5 M. Larutan ini dianggap sebagai larutan induk. Kemudian dari larutan tersebut dibuat larutan dengan ragam konsentrasi 0.2; 0.4; 0.6; dan 0.8 M. Diambil sebanyak 10 ml larutan dari pelarut, konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi dan dimasukkan ke dalam viskometer untuk ditentukan waktu alirnya.

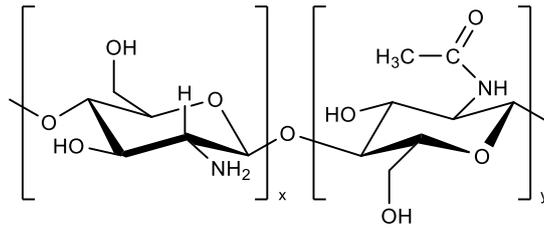
Depolimerisasi kitosan. Depolimerisasi kitosan dilakukan dengan degradasi oksidatif dengan NaNO_2 . Kitosan 1% (b/b) dilarutkan dalam larutan asam asetat 1%. Larutan diaduk dengan pengaduk magnet hingga larut sempurna. Larutan kitosan ditambahkan NaNO_2 tetes demi tetes, kemudian dilakukan proses pemanasan dengan pengadukan konstan selama waktu tertentu. Variasi konsentrasi NaNO_2 , waktu, dan suhu proses depolimerisasi mengikuti luaran dari optimalisasi CCD. Campuran reaksi selanjutnya dinetralkan dengan NaOH 1 N sampai pH 8,0. Hasil depolimerisasi dicuci beberapa kali dengan air deionisasi, dan dikeringkan.

Tabel 1. Perlakuan

No.	A: Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	B: Konsentrasi NaNO_2 (M)	C: Waktu (jam)
1.	40	0.2	1
2.	40	0.2	1
3.	50	0.1	0.5
4.	40	0.2	1
5.	23.2	0.2	1
6.	40	0.2	0.16
7.	40	0.0318	1
8.	30	0.1	1.5
9.	30	0.3	0.5
10.	40	0.2	1
11.	50	0.1	1.5
12.	50	0.3	0.5
13.	56.8	0.2	1
14.	30	0.3	1.5
15.	40	0.2	1
16.	40	0.2	1
17.	30	0.1	0.5
18.	40	0.2	1.84
19.	40	0.3682	1
20.	50	0.3	1.5

3. Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Kitosan. Kitosan merupakan biopolimer hasil dari proses deasetilasi yang merupakan kopolimer dari N-asetilgukosamina ($\beta(1\rightarrow4)$ -2-asetamida-2-deoksi-D-glukopiranososa (y) dan $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoksi-d-glukopiranososa (x) dengan kandungan GlcN lebih dari 50% (Sajomsanga *et. al.*, 2008). Struktur kitosan ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Struktur Kitosan ($x > 50\%$)

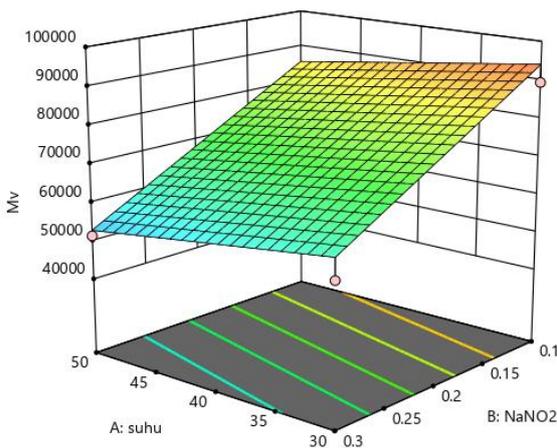
Kitosan akan memiliki karakteristik unik sendiri yang mempengaruhi sifatnya. Sifat ini sangat bergantung pada variabel-variabel identitasnya. Variabel awal yang perlu ditentukan adalah kadar air, kadar abu, bobot molekul, dan derajat deasetilasi.

Kadar air merupakan parameter yang penting untuk ditentukan karena berkaitan dengan masa simpan kitosan. Selain itu, parameter ini nantinya akan digunakan sebagai koreksi bobot kitosan dalam penimbangan. Sedangkan kadar abu merupakan gambaran seberapa besar jumlah mineral yang terdapat dalam kitosan. Kadar air dan kadar abu kitosan berturut-turut sebesar 8,45% dan 0,74%. Bobot molekul kitosan sangat berkaitan erat dengan derajat deasetilasi kitosan. Semakin besar derajat deasetilasi, maka semakin kecil bobot molekulnya. Semakin besar derajat deasetilasi, maka jumlah monomer x (bobot molekul lebih kecil dari monomer y) akan semakin banyak, sehingga bobot molekul kitosan keseluruhan akan menurun. Bobot molekul dan derajat deasetilasi kitosan yang didapat sebesar $2.6421 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ dan 67.56%.

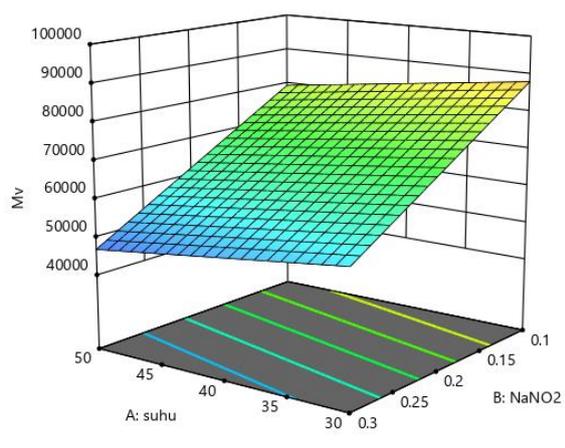
Depolimerisasi Kitosan. Depolimerisasi kitosan dilakukan secara degradasi oksidatif menggunakan NaNO_2 . Depolimerisasi ini dioptimalisasi menggunakan metode respon permukaan CCD dengan variabel suhu depolimerisasi (A), konsentrasi NaNO_2 (B), dan waktu (C). Metode ini telah banyak digunakan untuk proses optimalisasi, seperti optimalisasi parameter pelarut supramolekul berstruktur nano (Elik, 2022); model pelepasan nanopartikel obat (Luo *et. al.*, 2023); optimalisasi sintesis nanokomposit baru ([SBA-15)-(Cu(BTC))-[KZn(Fe(CN)₆)] (Amin *et. al.*, 2022); dan sebagainya.

Mv

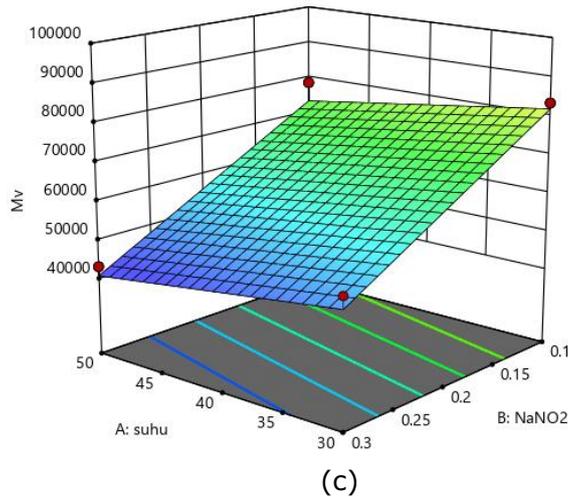
● Design Points
43112.1 98326.1



(a)



(b)



Gambar 2 Ilustrasi respon permukaan untuk variabel suhu dan konsentrasi NaNO₂ pada waktu (a) 0.5 jam, (b) 1 jam, dan (c) 1.5 jam.

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui bahwa semakin tinggi suhu reaksi dan konsentrasi NaNO₂, maka depolimerisasi akan menghasilkan LMWC yang semakin baik (bobot molekul kecil). Pengaruh waktu reaksi dapat dilihat dengan membandingkan Gambar 2a, 2b, dan 2c dimana semakin tinggi suhu, maka depolimerisasi juga akan menghasilkan LMWC yang semakin baik.

Tabel 2 Rangkuman model statistika

Source	Std. Dev.	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	4825.92	0.9219	0.9073	0.8661	Suggested
2FI	5336.60	0.9224	0.8866	0.7371	
Quadratic	5421.48	0.9384	0.8830	0.5351	Aliased
Cubic	2988.57	0.9888	0.9644	-1.3362	

Pada penelitian ini, 3 parameter, yaitu A, B, dan C dipilih sebagai variabel bebas, sedangkan bobot molekul LMWC (Mv) dipilih sebagai respon (variabel terikat). Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa model statistika linier merupakan model terbaik yang disarankan. Pemilihan model terbaik harus fokus pada model statistika yang memberikan nilai *adjusted R²* dan *predicted R²* maksimal. Model linier ini dapat dituliskan dengan persamaan:

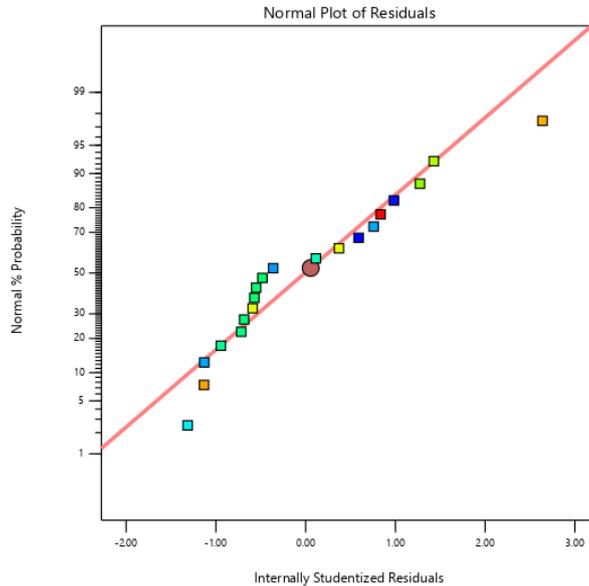
$$Mv = 129405.77 - 427.86 A - 163230.65 B - 12245.12 C$$

Persamaan di atas mengindikasikan bahwa interaksi antar variabel bebas tidak berpengaruh signifikan terhadap penurunan Mv.

Tabel 3 Analysis of variance (ANOVA) untuk model linier

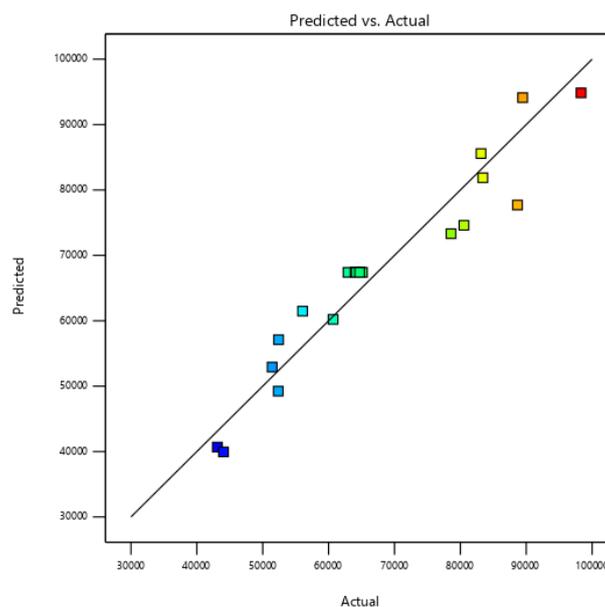
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4.401E+09	3	1.467E+09	62.99	< 0.0001	significant
A-suhu	2.500E+08	1	2.500E+08	10.73	0.0047	
B-NaNO2	3.639E+09	1	3.639E+09	156.24	< 0.0001	
C-waktu	5.119E+08	1	5.119E+08	21.98	0.0002	
Residual	3.726E+08	16	2.329E+07			
Lack of Fit	3.696E+08	11	3.360E+07	55.61	0.0002	significant
Pure Error	3.021E+06	5	6.043E+05			
Cor Total	4.773E+09	19				

Berdasarkan Tabel 3, nilai F model linier sebesar 62.99 menunjukkan bahwa model ini signifikan. Hanya ada kemungkinan 0,01% bahwa nilai F ini dapat terjadi *noise*. Nilai P yang <0,05 pada setiap variabel bebas menunjukkan bahwa model tersebut signifikan. Nilai p pada *lack of fit* sebesar 0.0002 menunjukkan bahwa hanya ada kemungkinan 0,02% bahwa nilai F pada *lack of fit* dipengaruhi oleh *noise*.



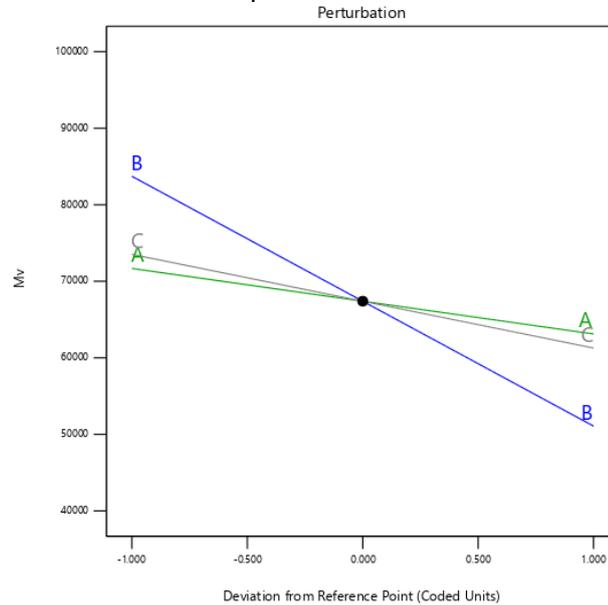
Gambar 3. Plot probabilitas normal dari residual.

Jumlah deviasi standar yang memisahkan nilai aktual dan prediksi dapat diukur dengan *internally studentized residual*. Batasan *internally studentized residual* adalah ± 3 sigma (Sadhukhan *et. al.*, 2016). Asumsi normalitas terpenuhi karena plot residual mendekati garis lurus yang ditunjukkan pada Gambar 3. Analisis statistik ini menunjukkan bahwa model tersebut cocok untuk mengoptimalkan variabel independen untuk depolimerisasi kitosan. Gambar 4 juga menunjukkan bahwa model statistika yang diberikan mampu memprediksi nilai Mv untuk depolimerisasi kitosan secara degradasi oksidatif menggunakan NaNO_2 dengan baik.



Gambar 4. Plot nilai Mv prediksi dan aktual.

Pengaruh variabel bebas, yaitu A, B, dan C terhadap Y dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan gambar tersebut diketahui bahwa variabel B, yaitu konsentrasi NaNO_2 , merupakan variabel yang memiliki pengaruh lebih besar terhadap penurunan Mv. Pengaruh ini dapat dilihat secara visual berdasarkan kemiringan plot perturbasi untuk setiap variabel.



Gambar 5. Plot perturbasi dari depolimerisasi kitosan.

Tabel 4 Nilai optimal variabel independen, eksperimen, dan prediksi CCD pada depolimerisasi kitosan.

Suhu (°C)	Konsentrasi NaNO_2 (M)	Waktu (jam)	Mv LMWC (Da)	
			Terukur	Prediksi
50	0.3	1.5	43112.1	40675.9

Nilai optimal variabel independen, eksperimen, dan prediksi CCD pada depolimerisasi kitosan ditampilkan pada Tabel 4. Pengukuran Mv pada kondisi optimum memiliki ketepatan 94.35% dengan penurunan bobot molekul sebesar 83.68%.

4. Simpulan

Depolimerisasi kitosan secara degradasi oksidatif dengan NaNO_2 menggunakan metode respon permukaan CCD dengan suhu depolimerisasi (A), konsentrasi NaNO_2 (B), waktu (C) sebagai variabel bebas dan bobot molekul LMWC (Mv) sebagai variabel terikat. Model statistika terbaik adalah model linier dengan persamaan $Mv = 129405.77 - 427.86 A - 163230.65 B - 12245.12 C$. Model ini memiliki nilai $R^2 = 92.19\%$ dan $R_{pred}^2 = 86.61\%$. Nilai optimal variabel independen pada A = 50 °C, B = 0.3 M, dan C = 1.5. Pengukuran Mv pada kondisi ini memiliki ketepatan 94.35% dengan penurunan bobot molekul sebesar 83.68%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada pihak-pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini, terutama kepada Universitas Jambi yang telah mendanai penelitian ini melalui skema PNPB Fakultas Sains dan Teknologi untuk skim Penelitian Dosen Pemula.

5. Daftar Rujukan

- Agirre, M., Zarate, J., Ojeda, E., Puras, G., Desbrieres, J., Pedraz, J. L. 2014. Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: from bench to bedside. *Polymers*. Vol. 6: 1727-1755. doi: 10.3390/polym6061727
- Amin, S., Alavi, S. S., Aghayan, H., Yousefnia, H. 2022. Synthesis and characterization of a novel nanocomposite ((SBA-15)-(Cu(BTC))-[KZn(Fe(CN)₆)]) for cesium removal from aqueous media and optimization condition using central composite design. *Microporous and Mesoporous Materials*. Vol. 345. doi: 10.1016/j.micromeso.2022.112250.
- Bezrodnykh, E. A., Blagodatskikh, I. V., Kulikov, S. N., Zelenikhin, P. V., Yamskov, I. A., Tikhonov, V. E. 2018. Consequences of chitosan decomposition by nitrous acid: Approach to non-branched oligochitosan oxime. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 195: 551-557. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.007.
- Blagodatskikh, I. V., Kulikov, S. N., Vyshivannaya, O. V., Bezrodnykh, E. A., Tikhonov, V. E. 2017. N-Reacetylated oligochitosan: pH dependence of self-assembly properties and antibacterial activity. *Biomacromolecules*. Vol. 18 (5): 1491-1498. doi: 10.1021/acs.biomac.7b00039.
- Elik A. 2022. Application of central composite design in parameters optimization of nano-structured supramolecular solvent based on liquid-liquid microextraction for determination of total lead in food, vegetables, grilled meat products, and water samples. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. Vol. 29. doi: 10.1016/j.scp.2022.100801.
- Kamboj, A., Chopra, R., Singh, R., Saxena, V., Kumar, P. 2022. Effect of pulsed electric field parameters on the alkaline extraction of valuable compounds from perilla seed meal and optimization by central composite design approach. *Applied Food Research*. Vol. 2 (2). doi: 10.1016/j.afres.2022.100240.
- Kulikov, S. N., Bayazitovaa, L. T., Tyupkinaa, O. F. Zelenikhinb, P. V., Salnikovab, M. M., Bezrodnykhc, E. A., Tikhonovc, V. E. 2016. Evaluation of a method for the determination of antibacterial activity of chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Vol. 52 (5): 502-507. doi: 10.1134/S0003683816050100.
- Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V., Tikhonov, V. E. 2014. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 74: 169-178. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.12.017.
- Kurchenko, V. P., Kapustin, M. A., Sushinskaya, N. V., Chudnovskaya, E. V., Mayorova, K. I., Tikhonov, V. E. 2019. Elicitor activity of oligochitosanes with different molecular mass and degree of acetylation when treating seeds of corn. *AIP Conference Proceedings*. Vol. 2063. doi: 10.1063/1.5087318.
- Luo, J., Wan, L., Zhang, Q., Cui B., Li, C., Jiang, Y., Jiang, M., Wang, K. 2023. Constructing a drug release model by central composite design to investigate the interaction between drugs and temperature-sensitive controlled release nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 183: 24-32. doi: 10.1016/j.ejpb.2022.12.009.
- Sadhukhan, B., Mondal, N. K., Chatteraj, S. 2016. Optimisation using central composite design (CCD) and the desirability function for sorption of methylene blue from aqueous solution onto *Lemna major*. *Karbala Int J of Modern Sci*. doi: 10.1016/j.kijoms.2016.03.005
- Sajomsanga, W., Tantayanon, S., Tangpasuthadol, V., Thatte, M., Daly, W. H. 2008. Synthesis and characterization of N-aryl chitosan derivatives. *Int Bio Macromolecules*. Vol 43:79-87. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.03.010.

- Sugita, P., Wijaya, D. E., Syahbirin, G., Dewi, R. M. 2017. Antimalarial drugs based on chitosan nanoparticles of *Cassia fistula* L. and *Duranta repens* L. fruits methanol extract. *Der Pharma Chemica*. Vol. 9(18):58-63.
- Widiantini, F., Purnama, A., Yulia, E., Formanda, D. 2016. Keefektifan oligochitosan dalam menekan pertumbuhan jamur patogen *Rigidoporus lignosus* [(klotzsch) imazeki] penyebab penyakit jamur akar putih pada tanaman cengkeh secara *in vitro*. *Jurnal Agrikultura*. Vol. 27 (1): 59-64.

