II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang

Udang merupakan hewan *Crustacea* yaitu hewan akuatik yang terdapat di air laut dan air tawar. Udang memiliki tubuh sedikit melengkung dan dibagi menjadi tiga bagian yaitu kepala, dada, dan perut (Darmono, 1995). Limbah udang dalam suatu proses industri dapat berupa kepala dan kulit. Kedua limbah tersebut dihasilkan dari proses pembekuan atau pengalengan udang (Elsawati, 1994).

Kulit udang mengandung protein (25% - 40%), kalsium karbonat (45% - 50%), dan kitin (15% - 20%), tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udangnya. Sedangkan kulit kepiting mengandung protein (15,60% - 23,90%), kalsium karbonat (53,70% – 78,40%), dan kitin (18,70% - 32,20%), hal ini juga tergantung pada jenis dan tempat hidup kepiting. Meskipun kandungan kitin dalam kulit udang lebih sedikit dibandingkan dengan kulit kepiting (*crab*), tetapi kulit udang lebih mudah diperoleh dan tersedia dalam jumlah yang banyak (Foucher *et al*., 2009).

B. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan organisme tanah yang memiliki sifat–sifat yang umum dimiliki oleh bakteri dan jamur. Terlihat dari luar seperti jamur (eukariotik), namun organisme ini sesuai dengan semua kriteria untuk sel prokariotik, yaitu dinding selnya mengandung asam muramat, tidak mempunyai mitokondrion, mengandung ribosom 70s, tidak mempunyai pembungkus nukleus, garis tengah selnya berkisar dari 0,5-2,0 µm, dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Wesley dan Wheeler, 1993; Rao, 1994).

Menurut Alexander (1997) *Actinomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer gula, asam amino dan asam gula seperti dinding sel bakteri gram positif. Sedangkan dinding sel fungi terdiri dari selulosa dan kitin.

Actinomycetes menyerupai fungi karena mempunyai hifa bercabang dengan membentuk miselium. Miselium tumbuh menjulang ke udara, dan memisah dalam fragmen–fragmen yang pendek sehingga terlihat seperti cabang pada bakteri (Sutedjo *et al*., 1991). *Actinomycetes* mempunyai kesamaan dengan bakteri yaitu struktur sel dan ukuran irisan melintang (Foth, 1991).

Menurut Rao (1994), pada lempeng agar, *Actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dari bakteri, dimana koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *Actinomycetes* muncul perlahan dan berbubuk serta melekat erat pada permukaan agar. Koloni *Actinomycetes* biasanya keras, kasar, dan tumbuh tinggi di atas permukaan medium. Umumnya,

Actinomycetes tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0. Rentang pH dan temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* ini sekitar 6,5–8,0 dan 25–30^{0}C. Namun, ada beberapa *Actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55– 65^{0}C seperti *Thermoactinomycetes* dan *Streptomyces.*

Medium yang baik untuk menumbuhkan *Actinomycetes* adalah medium yang mengandung glukosa, gliserol atau tepung sebagai sumber karbon; nitrat atau kasein sebagai sumber nitrogen dan mineral–mineral tertentu seperti NaCl, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCO_3$, dan $FeSO_4.7H_2O$. Inkubasi biasanya selama 2–7 hari (Jutono dalam Fithria, 2007). Populasi *Actinomycetes* di alam dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan organik, pH, kelembapan, temperatur, musim, dan lain- lain (Suwandi, 1989).

C. *Mucor meihei*

Istilah jamur berasal dari bahasa Yunani, yaitu fungus yang berarti tumbuh dengan subur. Istilah ini kemudian ditujukan kepada jamur yang memiliki tubuh buah serta tumbuh atau muncul di atas tanah atau pepohonan (Tjitrosoepomo, 1991). Organisme yang disebut jamur bersifat heterotrof, dinding sel spora mengandung kitin, tidak berplastid, tidak berfotosintesis, tidak bersifat fagotrof, umumnya memiliki hifa yang berdinding yang dapat berinti banyak (multinukleat), atau berinti tunggal (mononukleat), dan memperoleh nutrien dengan cara absorpsi (Gandjar, *et al.*, 2006).

Mucor miehei merupakan jamur dari ordo *Mucorales* yang merupakan kelompok *Zygomycetes* dan terkadang disebut sebagai “jamur rendah” yang dicirikan dengan hifa tidak bersekat (*coneocytic*), dan berkembang biak dengan zigospora secara aseksual. Kebanyakan anggota kelompok ini adalah saprofit. *Mucor miehei* berkembang biak juga melalui hifa yang koneositik dan juga berkonjugasi dengan hifa lain. *Mucor miehei* juga mempunyai sporangiospora. Ketika sporangium pecah, sporangiospora tersebar, dan jika mereka jatuh pada medium yang cocok akan berkecambah dan tumbuh menjadi individu baru. Spora seksual pada kelompok jamur ini disebut zigospora (Tortora *et al*., 2001).

D. Enzim

Enzim merupakan produk protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel (Poedjiadi, 1994). Enzim merupakan katalisator sejati yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik dengan nyata, tanpa enzim, suatu reaksi kimia akan berlangsung sangat lambat. Enzim tidak dapat mengubah titik keseimbangan reaksi yang dikatalisisnya, enzim juga tidak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi tersebut (Lehninger, 1982).

Enzim adalah protein yang diproduksi oleh sel-sel hidup. Protein yang diproduksi ini berbeda dengan protein lain seperti albumin, gelatin dan kasein karena protein enzim yang diproduksi oleh sel hidup dapat berfungsi sebagai

katalis dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia spesifik yang terjadi di dalam sel. Enzim yang diperoleh dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, tidak memerlukan lahan yang luas, biaya produksi relatif murah dan mudah dikontrol (Maggy, 1989).

Fungsi terpenting dari enzim adalah kemampuannya menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Kemampuan enzim mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, serta temperatur (Lehninger, 1982). Protein adalah bagian utama enzim yang dihasilkan sel, maka semua yang dapat mempengaruhi protein dan sel akan berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Beberapa faktor penting yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a). Substrat (reaktan)

Pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi yang terjadi rendah. Kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi setelah peningkatan substrat lebih lanjut akan tercapai suatu laju maksimum. Pada keadaan substrat yang berlebih akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga sebagian besar substrat tidak diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi.

b). Suhu

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu meningkat, maka laju reaksi juga akan meningkat. Karena enzim adalah protein, maka semakin tinggi suhu mengakibatkan

proses enzim tidak aktif meningkat. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu di atas 50 ^{o}C.

c). Derajat keasaman (pH)

Reaksi suatu enzim dipengaruhi oleh perubahan pH karena akan berakibat langsung terhadap sifat ion dari gugus–gugus amino dan karboksilat, sehingga akan mempengaruhi bagian aktif enzim dan konformasi dari enzim. pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi akan mengakibatkan denaturasi dari protein enzim.

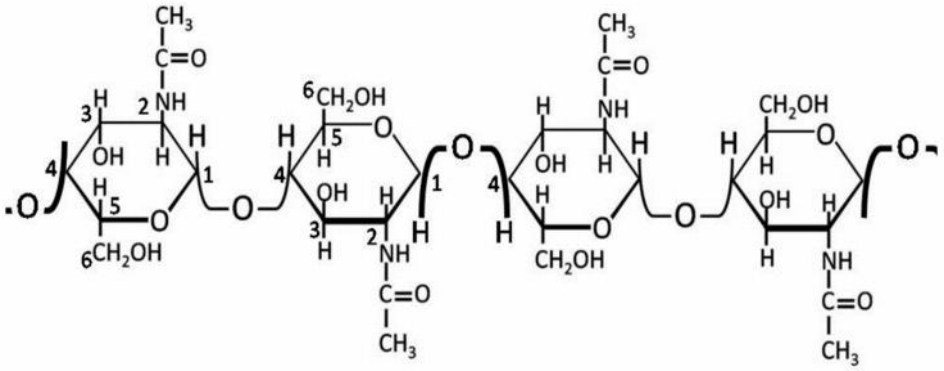
d). Penghambat enzim (inhibitor)

Inhibitor dapat meminimalkan kerja enzim karena akan membentuk ikatan dengan sisi aktif enzim sehingga mengganggu proses pembentukan dan kestabilan ikatan kompleks enzim substrat. Ada beberapa cara penghambatan enzim, seperti penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non–kompetitif), penghambat umpan balik, dan penghambat alosterik (Lehninger, 1982).

E. Kitin

Kitin merupakan zat padat yang tidak larut dalam air, pelarut organik, alkali pekat, asam mineral lemah tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat dan mempunyai rumus empiris $(C_6H_9O_4.NHCOCH_3)_n$. Polisakarida ini mempunyai berat molekul tinggi dan merupakan polimer berantai lurus dengan nama lain β-(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa (N-asetil-D-Glukosamin) (Suryanto *et al.*, 2005).

Kitin memiliki struktur yang mirip selulosa. Selulosa tersusun atas monomer glukosa, sedangkan kitin tersusun dari monomer N–asetilglukosamin. Keduanya memiliki kelarutan sangat rendah dalam air serta mengalami biodegradasi melalui mekanisme yang hampir serupa dengan melibatkan komplek enzim.



Gambar 1. Struktur kitin

Kitin merupakan homopolimer dari β-1,4 N-asetil-D-glukosamin dan merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Senyawa ini dapat ditemukan pada cangkang udang, kepiting, moluska, seranggga, annelida, dan beberapa dinding sel jamur dan alga. Kitin dapat dihidrolisis secara enzimatis oleh enzim kitinase, menghasilkan monomer β-1,4-N-asetil-D-glukosamin (Yurnaliza, 2002).

Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan. Ikatan hidrogen menyebabkan kitin tidak dapat

larut dalam air dan membentuk formasi serabut (fibril) ((Cabib, (1987) dalam Suryanto *et al.*, (2005)).

Adapun proses isolasi kitin dari kulit udang meliputi dua tahap, yaitu deproteinasi dan demineralisasi.

1. **Deproteinasi**

   Deproteinasi merupakan proses pemisahan protein yang ada pada kulit udang dari kitin. Proses ini dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara kimia misal menggunakan NaOH atau KOH dan secara enzimatik menggunakan enzim proteolitik. Namun, deproteinasi menggunakan natrium hidroksida lebih sering digunakan, karena lebih mudah dan efektif (Austin *et al*., 1981). Pada pemisahan protein menggunakan NaOH, protein diekstraksi sebagai Na-proteinat yang larut, dan jika menggunakan KOH akan diperoleh K-proteinat yang mengendap (Knorr, 1984), sedangkan enzim proteolitik akan mendegradasi protein sehingga terpisah dari kitin (Muzzarelli, 1984).

2. **Demineralisasi**

   Demineralisasi merupakan proses pemisahan mineral atau senyawa anorganik yang ada pada kulit udang dari kitin. Mineral utama yang terkandung dalam kulit udang adalah kalsium karbonat ($CaCO_3$) dan kalsium fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$). Proses demineralisasi ini biasanya dilakukan dengan merendam bahan hasil deproteinasi dalam larutan asam klorida.

Menurut Shimahara (1988), asam klorida efektif untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida, namun asam klorida juga menyebabkan kitin mengalami depolimerisasi. Hal ini yang menjadi alasan mengapa terkadang digunakan EDTA dalam proses demineralisasi. Hanya saja EDTA tidak dapat mengeliminasi garam anorganik secara lengkap (Shimahara and Takiguci,1988).

F. Kitosan

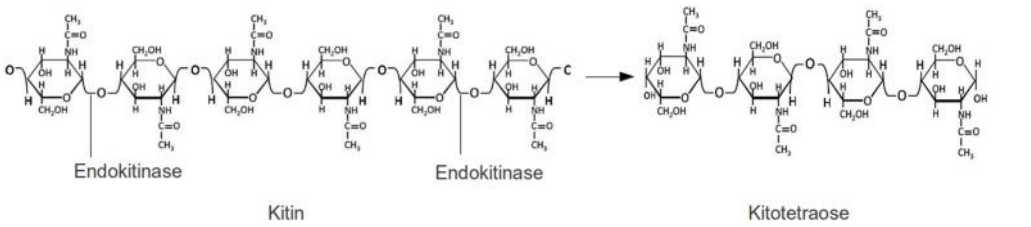
Kitosan merupakan senyawa hasil deasetilasi kitin, terdiri dari unit N-glukosamin (Muzzarelli *et al*., 1997; Shahidi *et al*., 1999). Kitosan atau ß-1,4-poli-D-glukosamin, merupakan biopolimer yang didapatkan melalui proses deasetilasi kitin, mengandung lebih dari 5000 unit glukosamin (Rabea *et al*., 2003). Kitosan dibedakan dari kitin karena adanya gugus amino bebas. Kitin alami memiliki berat molekul 1-2 juta dan terdiri atas 6000-12000 unit monosakarida. Sedangkan berat molekul kitosan relatif lebih rendah, sebab terjadi pemisahan rantai selama proses transformasi.

Adanya gugus amina menyebabkan kitosan bermuatan positif dan sangat mudah berikatan dengan permukaan yang bermuatan negatif seperti membran mukosa. Kitosan bersifat biokompetibel dan biodegradabel, bahkan termasuk senyawa biodegradabel paling melimpah di bumi, hasil biodegradasinya terdapat di air dan tanah. Kitosan dikarakterisasi menggunkan FTIR. Semakin tinggi derajat deasetilasi, semakin tinggi kualitas dan harga jualnya (Coma, 2002).

G. Kitinase

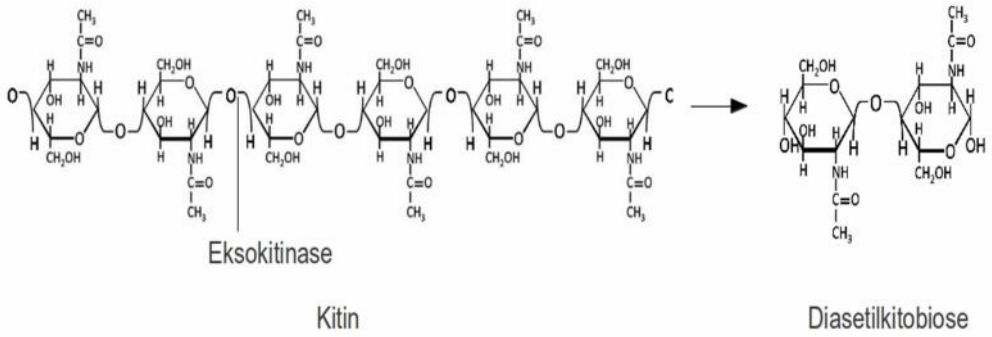
Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Harman *et al.*, (1993) dan Sahai *et al.*, (1993) *dalam* Suryanto *et al.*, (2005) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu :

1. Endokitinase (EC 3.2.1.14) yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan β-1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GIcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose.



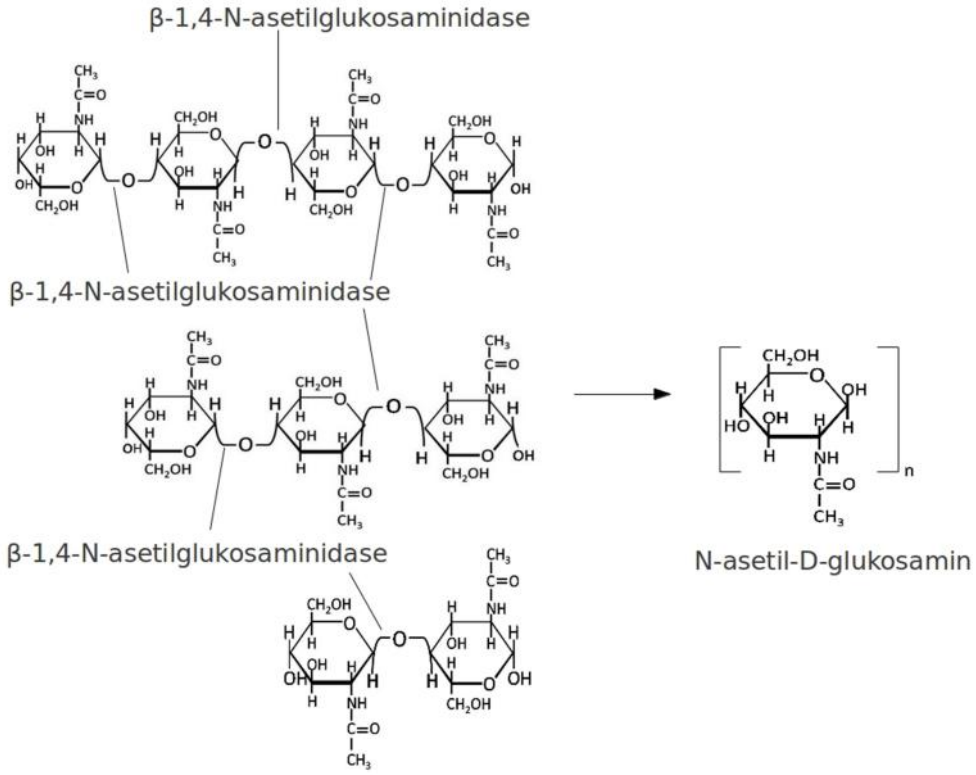
Gambar 2. Reaksi pemutusan ikatan β-1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin

2. Eksokitinase (EC 3.2.1.14) dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4-β-kitobiodase, yaitu enzim yang mengatalisis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitobiose tanpa ada unit-unit monosakarida atau polisakarida yang dibentuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak.



Gambar 3. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase

3. β-1,4-N-asetilglukosaminidase (EC 3.2.1.30) merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GIcNAc.



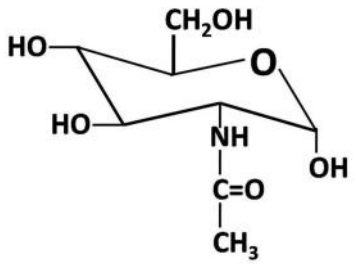
Gambar 4. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GIcNAc

Kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida. Kitooligosakarida berperan sebagai pertahanan tanaman, juga digunakan dalam kesehatan manusia. Sebagai contoh, kitoheksosa dan kitoheptosa memperlihatkan aktivitas anti tumor. N-asetilglukosamin berguna sebagai obat anti inflamasi. Senyawa ini dalam tubuh manusia disintesis dari glukosa dan digabungkan dengan glikoprotein dan glikosaminoglikan ((Patil *et al.,* (2000) *dalam* Suryanto *et al.,* (2005)). Kitinase juga berperan dalam produksi protein sel tunggal dari limbah kitin untuk makanan hewan ((Shaikh *et al.,* (1993) *dalam* Suryanto *et al.,* (2005)). Kitinase juga dapat digunakan dalam pertanian sebagai pengendalian jamur patogen tanaman dan hama serangga. Kombinasi σ-toksin dan kitinase dilaporkan lebih efektif dalam membunuh hama serangga ((Patil *et al.,* (2000) *dalam* Suryanto *et al.,* (2005)).

Berdasarkan homologi sekuen asam aminonya, kitinase dibedakan atas famili 18 dan 19. Famili 18 meliputi kitinase dari bakteri, fungi, serangga, tanaman (kelas III dan V), hewan (Gijzen *et al.,* 2001) dan satu kitinase dari *Streptomyces griseus* (Ohno *et al*., 1996). Kitinase tanaman kelas I tersusun atas sekuen yang *conserved* pada struktur utamanya, serta domain kaya sistein pada ujung N. Kitinase kelas II secara struktural homolog dengan kelas I, tetapi tidak memiliki domain kaya sistein. Sementara, kitinase kelas III dan V tidak memiliki homologi dengan kitinase kelas I, II dan IV (Fukamizo, 2000).

H. N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin adalah suatu bagian monosakarida dari glukosa. Secara kimia merupakan amida antara glukosamin dan asam asetat. Struktur molekulnya adalah $C_8H_{15}NO_6$, massa molar 221,21 g/mol dan zat ini merupakan bagian penting dalam sistem biologi.



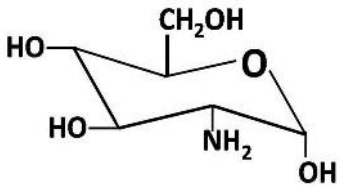
Gambar 5. Struktur N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin merupakan gula amino dan di negara maju telah diproduksi secara komersial mengingat manfaatnya di berbagai industri, seperti bidang kesehatan, farmasi, biokimia, bioteknologi, kosmetika, biomedika, pangan, tekstil, kertas, dan lain-lain. Pemanfaatan tersebut didasarkan atas sifat-sifatnya yang dapat digunakan sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelat, dan penebal emulsi. Berbeda dengan kitin, N-asetilglukosamin bersifat mudah larut dalam air, sedikit larut dalam methanol yang dipanaskan dan tidak larut dalam dietileter (Reagents, Chemicals, Diagnostic, 2007). Temperatur yang baik untuk menyimpan N-asetilglukosamin adalah 2-8 ^{o}C.

N-asetilglukosamin sering ditemukan sebagai komponen utama pada rangka luar *Crustacea*, *Arthropoda*, dan cendawan (Horton, 1980).

I. Glukosamin

Glukosamin pertama kali diidentifikasi oleh Dr. Georg Ledderhose pada tahun 1876, tetapi struktur stereokimia tidak sepenuhnya diketahui sampai ditemukan oleh Walter Haworth pada tahun 1939. Glukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan prekursor penting dalam sintesis biokimia dari protein glikosilasi dan lipid. Glukosamin ditemukan sebagai komponen utama dari rangka luar *Crustacea*, *Arthropoda*, dan cendawan. Glukosamin merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai. Dalam industri, glukosamin diproduksi dengan cara hidrolisis rangka luar *Crustacea*.



Gambar 6. Struktur D-glukosamin

Glukosamin terdapat pada golongan *Crustacea* seperti rajungan, kepiting, udang dan cumi-cumi. Selain itu juga terdapat pada invertebrata seperti *Artopoda*, *Molusca*, *Coelenterata*, dan *Nematoda* serta beberapa kelas serangga dan jamur. Golongan hewan dan jamur tersebut tersusun atas kitin, dimana kitin merupakan prekusor kitosan, dan kitosan sendiri merupakan polimer dari

glukosamin (D-glukosamin). Glukosamin dapat berfungsi sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelat dan penebal emulsi (Anonim, 2007).

J. Fermentasi

Fermentasi merupakan proses untuk menghasilkan berbagai produk yang melibatkan mikroorganisme. Produk yang dapat diperoleh dari proses fermentasi antara lain yaitu enzim, sel mikroorganisme, metabolit primer, metabolit sekunder, dan senyawa kimia hasil proses biokonversi. Fermentasi juga merupakan suatu proses untuk menghasilkan energi dengan bantuan senyawa organik yang bertindak sebagai pemberi dan penerima elektron. Dalam suatu fermentasi berlangsung aktivitas metabolisme mikroorganisme baik aerobik maupun anaerobik, sehingga substrat organik mengalami perubahan secara kimiawi (Rachman, 1989).

K. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Fermentasi merupakan reaksi oksidasi reduksi yang menggunakan sumber energi dan sumber karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa bernilai ekonomi lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium (Rao, 2009). Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (*submerged*). Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat maupun medium cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam media cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan *shaker* atau *fermentor*.

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu fermentasi tertutup (*batch culture*), fermentasi *fed batch* dan fermentasi kontinu (*continuous batch*). Pada fermentasi tertutup, setelah inokulasi tidak dilakukan lagi penambahan medium kedalam *fermentor*, kecuali pemberian oksigen (udara steril), antibuih dan asam atau basa yang mengatur pH. Karena itu pada sistem tertutup ini, dengan sekian lamanya waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme semakin menurun sampai akhirnya pertumbuhan terhenti. Penurunan dan berhentinya pertumbuhan disebabkan karena dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi nutrien-nutrien esensial dalam medium semakin berkurang atau terjadi akumulasi autotoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan atau kombinasi dari keduanya. Dengan demikian pada fermentasi tertutup jumlah sel pada fase *stationer* merupakan jumlah sel maksimum. Pada fermentasi *fed bacth* setelah inokulasi dilakukan penambahan medium baru tetapi tidak dilakukan pengambilan produk yang dihasilkan. *Yield* yang dihasilkan pada fermentasi *fed batch* lebih besar dibandingkan pada fermentasi *batch*. Sedangkan fermentasi *continuous batch* merupakan suatu fermentasi dimana secara terus menerus dilakukan penambahan medium kultur dan pengambilan produk.

1. Proses Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Menurut Mitchel *et al.* (2006) tahapan–tahapan proses secara umum, antara lain :

1. Persiapan substrat, dimana substrat harus dipotong, digiling, dipecahkan, atau dibuat menjadi butiran kecil. Dengan penambahan air dan nutrisi

disebut dengan pra-perawatan substrat untuk menambah ketersediaan gizi.

2. Persiapan inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses fermentasi *batch* melibatkan bakteri, jamur dan salah satunya *Actinomycetes* maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikoorganisme yang tinggi.
3. Persiapan wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu disterilkan sebelum penambahan substrat.
4. Inokulasi dan pengerjaan, pengerjaan tahapan ini dengan menyebarkan substrat pada media yang telah disterilkan secara hati–hati untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.
5. Proses fermentasi *batch*, pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi. Aerasi atau penambahan oksigen dapat dilakukan apabila diperlukan. *Actinomycetes* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerobik, yaitu mikroorganisme yang dapat memanfaatkan oksigen disekitarnya jika tersedia.
6. Kultivasi, pada tahapan ini memerlukan bantuan mekanis untuk memisahkan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

2. Keuntungan Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Dibandingkan dengan medium padat, medium cair memiliki beberapa kelebihan, yaitu (Weites *et al*.,2001):

1. Jenis dan konsentrasi komponen-komponen dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan.
2. Dapat memberikan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan.
3. Pemakaian medium lebih efisien.

3. Aplikasi Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Menurut Holker *et al.* (2004) dan Pandey (2000) dapat menguraikan aplikasi dari fermentasi *batch* secara tradisional, antara lain :

a). Bir, minuman beralkohol. Sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan didapatkan minuman beralkohol.

b). *Yoghurt*,diproduksi dengan cara memfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophillus*. Bakteri mengubah laktosa (gula susu) pada kondisi anaerobik. Laktosa diubah menjadi asam laktat yang bersifat menggumpalkan kasein (protein susu).

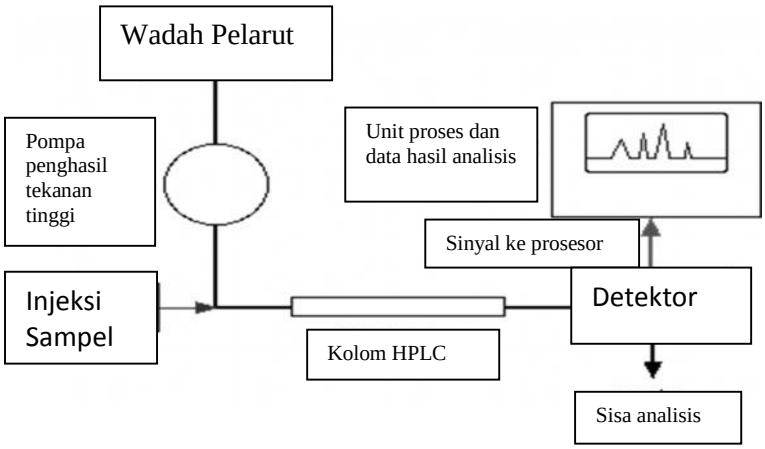
c). Keju, berbagai jenis bakteri dapat digunakan untuk fermentasi susu menjadi keju, tergantung dari jenis keju yang dihasilkan. Biasanya digunakan spesies *Streptococcus thermophillus* dan *Lactobacillus bulgaricus.* Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung *cymosin* yang bersifat menggumpalkan casein.

Selain aplikasi di atas, kebanyakan dari aplikasi tersebut menghasilkan produk-produk seperti enzim, pigmen, senyawa aromatik, senyawa kimia, antibiotik, dan agen pengontrol biologis.

L. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

HPLC adalah suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair. HPLC dapat digunakan untuk pemisahan sekaligus untuk analisis senyawa berdasarkan kekuatan atau kepolaran fasa geraknya. Berdasarkan polaritas relatif fasa gerak dan fasa diamnya, HPLC dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar dan fasa terbalik yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa polar. Pada fasa normal, fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam. Sedangkan pada fase terbalik, fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter *et al*., 1991).

Prinsip pemisahan senyawa menggunakan HPLC adalah pebedaan distribusi komponen diantara fasa diam dan fasa geraknya. Semakin lama terdistribusi dalam fasa diam semakin lama waktu retensinya (Clark, 2007).



Gambar 7. Diagram Alir HPLC

Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom HPLC. Metode yang dipakai untuk menganalisis N-asetilglukosamin adalah penggunaan evaporasi detektor hamburan cahaya (Mulja and Suharman, 1995). N-asetilglukosamin tidak dapat dianalisis dengan detektor UV secara langsung.

N-asetilglukosamin memiliki serapan sinar UV pada panjang gelombang dibawah 205 nm, yang hampir sama dengan serapan pelarut polar seperti air dan metanol.

Cara yang praktis dan efisien untuk menganalisis N-asetilglukosamin adalah dengan HPLC yang dilengkapi ELSD (*Evaporative Light Scaterring Detection*). Detektor evaporasi hamburan cahaya ideal untuk mendeteksi analit tanpa gugus kromofor UV, karena analisis tidak bergantung pada sifat optik dari suatu senyawa. Prinsip kerja dari detektor evaporasi hamburan cahaya adalah sampel yang berasal dari HPLC dalam bentuk cair mengalami nebulisasi menjadi bentuk aerosolnya. Kemudian pelarut yang digunakan akan

mengalami evaporasi (penguapan) sehingga terpisah dari sampel. Sampel yang telah terpisah ditembaki dengan sinar pada semua panjang gelombang (LS), kemudian jumlah cahaya yang dipantulkan kembali akan memberikan sinyal untuk detektor. Sinyal yang terdeteksi akan memberikan data output berupa kromatogram.

Adapun keunggulan dari ELSD yaitu:

1. Sensitivitas tinggi memberikan respon yang luar biasa untuk semua senyawa, sampai ke tingkat nanogram rendah.
2. Operasi Sub-ambien menggunakan tabung penguapan berpendingin *Peltier* memberikan suhu rendah sampai 10°C, mencegah degradasi dari senyawa labil panas yang tidak terdeteksi oleh ELSD lain.
3. *Real-time* kontrol selama injeksi melalui *Software* dimensi yang diprogram untuk mempertahankan sensitivitas maksimum pada pengoperasian alat.
4. *Real-time* pemrograman gas yang menghilangkan efek peningkatan pelarut selama elusi gradien, sangat baik untuk analisis kation.
5. Dispersi rendah dan kecepatan data output-tingkat tinggi adalah pasangan yang cocok untuk aplikasi LC Cepat.
6. *Reprodusibilitas* super di bawah 2% memberikan hasil yang dapat diandalkan dan akurat.
7. Pemanasan dan pendinginan tabung *evaporator* cepat, meminimalkan waktu keseimbangan dan sampel yang lewat meningkat.

Kondisi HPLC untuk identifikasi N-asetilglukosamin menggunakan kolom C18 yang bersifat nonpolar, fasa gerak adalah asetonitril/H_2O/H_3PO_4 (10/90/0,1) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 1,5 mL/menit, dan waktu run 20 menit. Pada proses elusi, digunakan metode isokratik, yaitu eluennya menggunakan perbandingan komponen yang tetap dari awal sampai dengan akhir pemeriksaan (Gritter *et al.*, 1991).

M. *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Pada dasarnya Spektrofotometer FTIR adalah sama dengan Spektrofotometer *Infra Red* dispersi, perbedaannya adalah pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra merah melewati contoh. Dasar pemikiran dari Spektrofotometer FTIR adalah dari persamaan gelombang yang dirumuskan oleh Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) seorang ahli matematika dari Perancis. Dari deret Fourier tersebut intensitas gelombang dapat digambarkan sebagai daerah waktu atau daerah frekuensi. Perubahan gambaran intensitas gelombang radiasi elektromagnetik dari daerah waktu ke daerah frekwensi atau sebaliknya disebut Transformasi Fourier (*Fourier Transform*). Selanjutnya pada sistem optik peralatan instrumen *Fourier Transform Infra Red* dipakai dasar daerah waktu yang non dispersif. Secara keseluruhan, analisis menggunakan spektrofotometer ini memiliki dua kelebihan utama dibandingkan Spektrofotometer *Infra Red* dispersi yaitu :

1. Dapat digunakan pada semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat.

2. Sensitifitas dari metoda Spektrofotometri FTIR lebih besar daripada cara dispersi, sebab radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak karena tanpa harus melalui celah (Hsu, 1994).

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, gugus fungsi ini dapat ditentukan berdasarkan ikatan dari tiap atom. Prinsip kerja dari metode ini adalah sinar yang terserap menyebabkan molekul dari senyawa tervibrasi dan energi vibrasi diukur oleh detektor serta energi vibrasi dari gugus fungsi tertentu akan menghasilkan frekuensi yang spesifik. Radiasi infra merah mempunyai spektrum elektromagnetik pada bilangan gelombang 13000-10 cm^{-1} atau panjang gelombang dari 0,78-1000 µm. Penggunaan spektrum infra merah untuk menentukan gugus fungsi suatu struktur senyawa organik biasanya antara 4000-400 cm^{-1} (2.5 sampai 25 µm). Daerah di bawah frekuensi 400 cm^{-1} (25 µm) disebut daerah infra merah jauh, dan daerah di atas 4000 cm^{-1} (2.5 µm) disebut daerah inframerah dekat (Silverstein *et al.*, 1986).

Sebagai contoh senyawa kitin memberikan data serapan IR : ν = 3448,5 cm^{-1} yang menunjukan vibrasi ulur NH amida (NH amina) dan OH; ν = 2920-2873,7 cm^{-1} yang menunjukan vibrasi ulur CH, CH2, dan CH3; ν = 1450,4 cm^{-1} yang menunjukan Vibrasi tekuk NH; ν = 1153,4 cm^{-1} yang menunjukan vibrasi ulur C-N; ν = 1033,8 cm^{-1} yang menunjukan vibrasi ulur C-O; dan ν = 871,8 cm^{-1} yang menunjukan vibrasi tekuk ke luar bidang N-H (Syahmani dan Sholahuddin, 2009).