

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Kitin dari Kulit Udang

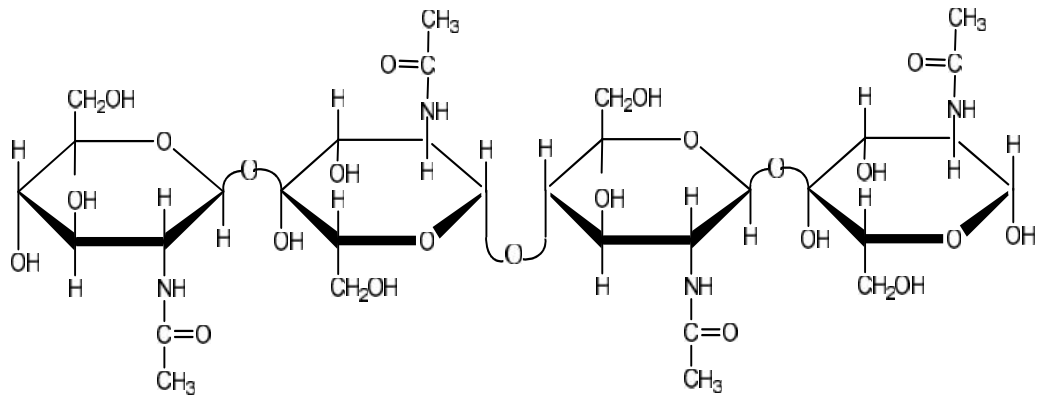
Kulit udang mengandung protein sekitar 25% - 40%, kalsium karbonat 45% - 50% , dan kitin 15% - 20%, tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udangnya. Kandungan kitin dalam kulit udang lebih rendah dari hewan segolongannya yaitu kulit kepiting, tetapi kulit udang tersedia dalam jumlah yang banyak dan lebih mudah didapat sebagai limbah (Focher *et al.*, 2009).

### B. Kitin

Kitin merupakan polimer berantai lurus yang memiliki berat molekul tinggi dan rumus empiris  $(C_6H_9O_4.NHCOCH_3)_n$ . Nama lain dari kitin adalah -(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa (N-asetil-D-Glukosamin), kitin ini berbentuk padatan yang tidak larut dalam air, pelarut organik, alkali pekat, asam mineral lemah tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat (Suryanto *et al.*, 2005).

Kitin memiliki persamaan dengan selulosa, dimana ikatan yang terjadi antar monomernya terangkai dengan ikatan glukosida pada posisi S-1,4. Tetapi terdapat juga perbedaan dengan selulosa yaitu gugus hidroksil yang terikat pada

atom karbon nomor 2, pada kitin digantikan oleh gugus asetamida ( $\text{NHCOCH}_3$ ) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin. Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kitin (Murray *et al.*, 2003).

Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya yaitu antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat, ikatan hidrogen ini yang menyebabkan kitin tidak dapat larut dalam air (Cabib, (1987) dalam Suryanto *a et al.*, (2005)).

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

### 1. Deproteinasi

Deproteinasi merupakan proses pemisahan protein dari kitin. Proses ini dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara enzimatik menggunakan enzim proteolitik dan secara kimia misalnya menggunakan NaOH atau KOH. Namun, lebih sering digunakan natrium hidroksida pada tahap deproteinasi, dikarenakan lebih mudah dan efektif (Austin *et al.*, 1995). Pemisahan protein menggunakan

NaOH berlangsung dengan proses protein diekstraksi sebagai Na-proteinat yang larut dalam air (Knorr, 1984), sedangkan pada enzim proteolitik akan mendegradasi protein sehingga terpisah dari kitin (Muzzarelli, 1984).

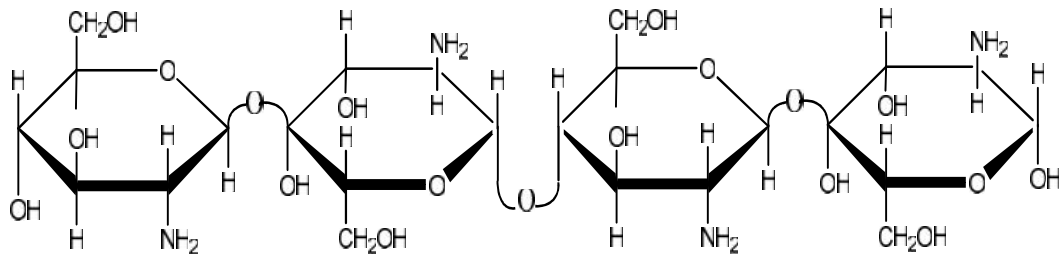
## **2. Demineralisasi**

Demineralisasi merupakan proses pemisahan mineral atau senyawa anorganik dari kitin. Mineral utama yang terkandung dalam kulit udang adalah kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) dan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ). Proses demineralisasi ini biasanya dilakukan menggunakan larutan asam klorida dengan merendam bahan hasil deproteinasi. Menurut Shimahara (1988), penggunaan asam klorida lebih efektif untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida, tetapi asam klorida juga menyebabkan kitin mengalami depolimerisasi. Agar tidak terjadi depolimerisasi terkadang digunakan EDTA dalam proses demineralisasi. Hanya saja EDTA tidak dapat mengeliminasi garam anorganik secara lengkap (Shimahara and Takiguci, 1988).

## **C. Kitosan**

Kitosan disebut juga dengan  $\beta$ -1,4-2 amino-2-dioksi-D-glukosa, senyawa ini memiliki bentuk seperti lembaran tipis dan berserat, berwarna putih atau kuning, tidak berbau dan memiliki sifat tidak larut dalam air, sedikit larut dalam HCl,  $\text{HNO}_3$ , dan  $\text{H}_3\text{PO}_4$  dan tidak larut dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Kitosan memiliki struktur yang mirip dengan kitin hanya saja gugus asetilnya dihilangkan dengan menggunakan

basa kuat. Adanya gugus amina dan hidroksil pada kitosan menjadikan sifatnya lebih aktif dan bersifat polikationik (Murray *et al.*, 2003).



Gambar 2. Struktur kitosan (Murray *et al.*, 2003).

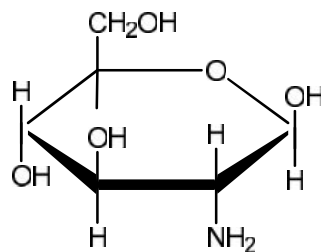
Banyak pemanfaatan kitosan yang dapat kita lihat diberbagai industri kimia, antara lain dipakai sebagai koagulan dalam pengolahan limbah air, pelapis benih yang akan ditanam, adsorben ion logam, bahan pelembab, komponen tambahan pakan ternak, sebagai lensa kontak, pelarut lemak, dan pengawet makanan (Hargono dan Djaeni, 2003).

Sedangkan pada metode enzimatik digunakan enzim spesifik misal: enzim kitosanase, sehingga tidak menyisakan limbah berbahaya. Jadi metode enzimatik ini lebih aman dan efektif dibandingkan metode konvensional. (Jayanti, 2002).

#### D. Glukosamin

Glukosamin ( $C_6H_{13}NO_5$ ) atau gula amino merupakan prekursor penting dalam sintesis biokimia dari protein glikosilasi dan lipid. Glukosamin sebagai komponen utama dari rangka luar *crustacea*, artropoda, dan cendawan juga merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai, misal dalam industri, glukosamin diproduksi dengan cara hidrolisis rangka luar *crustacea*.

Golongan *crustacea* yang memiliki kandungan glukosamin yaitu seperti rajungan, kepiting, udang dan cumi-cumi. Tidak hanya itu, terdapat juga pada invertebrate seperti *Artopoda*, *Molusca*, *Coelenterata*, dan *Nematoda* serta beberapa kelas serangga dan jamur. Rangka luar golongan hewan dan jamur tersebut tersusun atas kitin, kitin merupakan dasar pembentukan kitosan, dimana kitosan sendiri merupakan polimer dari glukosamin (D-glukosamin). Glukosamin berfungsi sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelet dan penebal emulsi (Anonim, 2007).



Gambar 3. Struktur D-glukosamin (Anonim, 2007)

## E. Enzim

Enzim merupakan protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di-luar sel. Enzim merupakan katalisator sejati yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik dengan nyata, suatu reaksi kimia akan berlangsung sangat lambat tanpa adanya enzim. Enzim tidak mampu mengubah titik keseimbangan dari reaksi yang dikatalisisnya dan enzim juga tidak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi tersebut (Lehninger, 2005).

Hubungan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks Enzim-Substrat ( ES ) yang aktif, bersifat sementara, dan akan terurai kembali

apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Secara sederhana penguraian suatu senyawa atau substrat oleh suatu enzim dapat dilihat sebagai berikut:



Keterangan: E = Enzim

P = Produk

S = Substrat

ES = Kompleks Enzim-Substrat

Fungsi terpenting dari suatu enzim yaitu kemampuannya menurunkan energi aktivasi dalam suatu reaksi kimia. Kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi substrat, suhu, konsentrasi enzim, serta pH (Lehninger, 2005).

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a) Substrat (reaktan)

Saat konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi yang terjadi akan rendah.

Sebaliknya kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Tetapi peningkatan substrat lebih lanjut akan menghasilkan suatu laju maksimum dan keadaan substrat yang berlebih akan menyebabkan kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga sebagian besar substrat tidak dapat diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi.

b) Suhu ( Temperatur )

Reaksi enzimatik sama seperti reaksi kimia pada umumnya dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu meningkat, maka laju reaksi pun akan meningkat. Karena enzim adalah protein, maka suhu yang semakin tinggi akan mengakibatkan meningkatnya

proses enzim yang tidak aktif. Umumnya enzim akan mengalami kerusakan atau denaturasi pada suhu di atas 50 °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 enzim.

d) Penghambat enzim ( inhibitor )

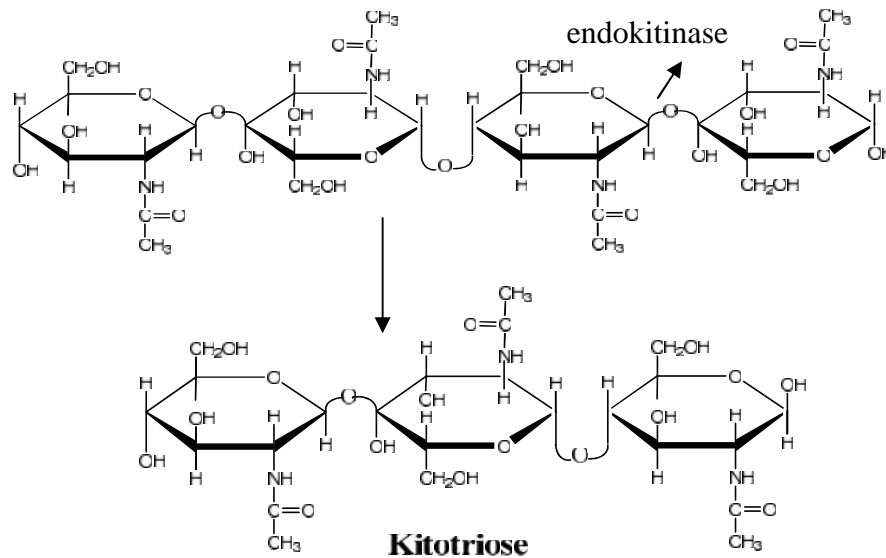
Inhibitor dapat menghambat kerja enzim karena akan mengganggu proses pembentukan dan kestabilan ikatan kompleks enzim substrat dengan membentuk ikatan dengan sisi aktif enzim. Ada beberapa jenis penghambatan enzim yaitu penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (feed back inhibitor), dan penghambat alosterik (Lehninger, 2005).

## **F. Enzim Kitinolitik**

Enzim kitinase merupakan enzim kitinolitik 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 menurut Suryanto *et al.*, (2005) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu :

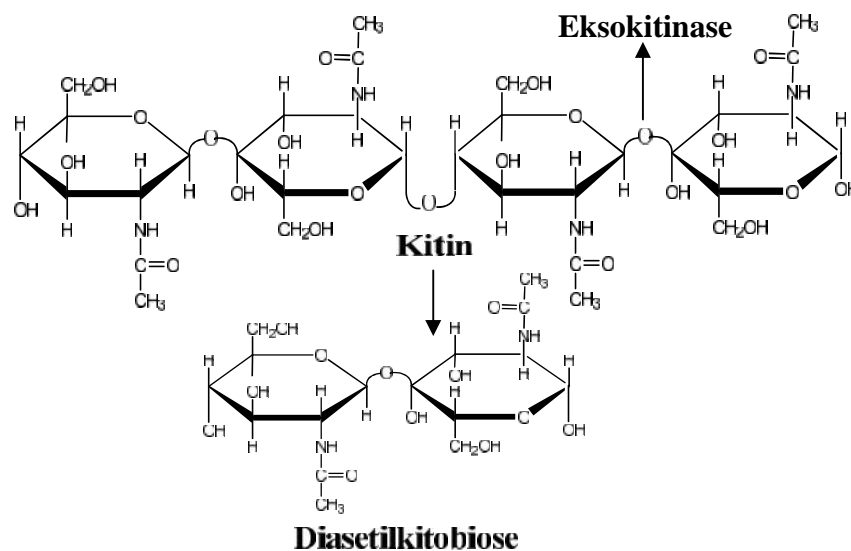
1. Endokitinase (EC 3.2.1.14) yaitu enzim kitinase yang memotong secara acak ikatan -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk

berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotriose yang sifatnya mudah larut.



Gambar 4. Reaksi pemutusan ikatan 1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin oleh endokitinase (Suryanto *et al.*, 2005).

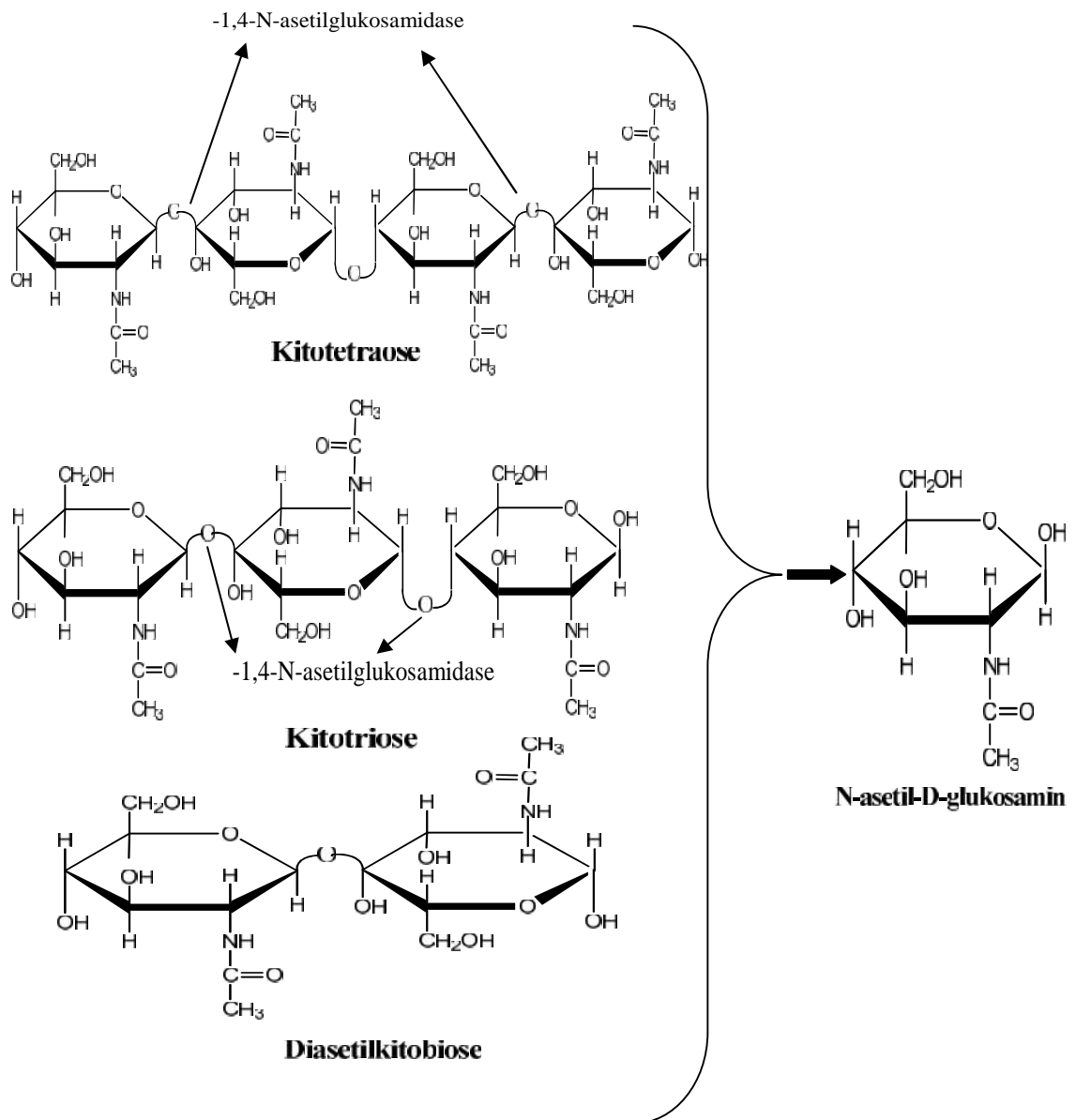
2. Eksokitinase (EC 3.2.1.14) disebut juga dengan kitobiodase atau kitin 1,4- -kitobiodase, yaitu enzim yang mengkatalisis secara aktif dari pembebasan unit-unit diasetilkitobiose tanpa adanya pembentukan unit-unit monosakarida atau polisakarida. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non-reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak.



Gambar 5. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase (Suryanto *et al.*, 2005).



3. -1,4-N-asetilglukosamidase (EC 3.2.1.30) merupakan suatu enzim kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose untuk menghasilkan monomer-monomer GICNAc.



Gambar 6. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GicNAc (Suryanto *et al.*, 2005).

Enzim kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida. Kitooligosakarida berperan sebagai pertahanan tanaman, juga digunakan dalam kesehatan manusia. Kitinase berperan dalam produksi protein sel tunggal dari limbah kitin untuk makanan hewan ((Shaikh *et al.*, (1993) *dalam* Suryanto *et al.*, (2005)). Selain itu kitinase juga dapat digunakan dalam bidang pertanian sebagai pengendalian jamur patogen tanaman dan hama serangga ((Patil *et al.*, (2000) *dalam* Suryanto *et al.*, (2005)). Selain dengan kitinase, polimer kitin juga bisa didegradasi oleh enzim kitin deasetilase dan kitosanase. Kitin deasetilase menghilangkan gugus asetil dari kitin menghasilkan kitosan. Kitosan akan dipotong-potong oleh kitosanase menghasilkan oligomer kitosan. Oligomer kitosan kemudian dipotong-potong lagi oleh  $\beta$ -D-glukosaminidase menghasilkan monomer glukosamin.

### **G. Jamur *Mucor***

Jamur adalah sekelompok organisme yang digabungkan dalam takson Kingdom Fungi berdasarkan system Whittaker. Kingdom fungi mempunyai ciri khas yaitu bersifat heterotrof yang mengabsorpsi nutrient dan memiliki kitin pada dinding selnya. Jamur benang atau kapang adalah golongan fungi yang membentuk lapisan jaringan miselium dan spora yang tampak. Misseliumnya terdiri dari filamen tubular yang tumbuh yaitu hifa (Singleton dan Sainsbury, 2006).

Jamur dapat bersifat saprotrop yaitu dengan mendapatkan nutrisi dari organisme lain yang mati, ada juga yang bersifat parasit dengan mengisap nutrisi dari organisme lain yang hidup, atau dengan bersimbiosis mutualisme dengan satu organisme (Purves dan Sadava, 2003).

Fungi mempunyai penggunaan kitin yang berbeda dengan hewan. Hewan hanya memproduksi kitin pada bagian tertentu, misalnya sebagai rangka luar, rambut atau kuku, sementara fungi memiliki kitin sebagai pembentuk dinding pada seluruh selnya. Adanya kitin juga membantu membedakan antara fungi dan eukariota lain, seperti protista (Purves dan Sadava, 2003).

*Mucor* adalah genus fungi yang berasal dari ordo Mucorales yang merupakan fungi tipikal saprotrop pada tanah dan serasah tumbuhan. Hifa vegetatifnya bercabang-cabang, bersifat coenositik dan tidak bersepta. *Mucor* berkembangbiak secara aseksual dengan membentuk sporangium yang ditunjang oleh batang yang disebut sporangiofor. Ciri khas pada *Mucor* adalah memiliki sporangium yang berkolom-kolom atau kolumela (Singleton dan Sainsbury, 2006).

#### **H. *Actinomyces***

*Actinomyces* memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh bakteri dan jamur. Secara fisik terlihat seperti jamur (eukariotik), tetapi organisme ini juga memiliki 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  $\mu\text{m}$ , dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Rao, 1994).

*Actinomyces* mirip dengan fungi yang 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* juga mempunyai kesamaan dengan bakteri yaitu struktur sel dan ukuran irisan yang melintang (Foth, 1991).

Menurut Rao (1994), *Actinomycetes* dapat dibedakan dari bakteri pada lempeng agar dengan mudah, koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *Actinomycetes* muncul perlahan dan berbubuk yang 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 temperatur 25–30 °C.

Medium yang baik untuk menumbuhkan *Actinomycetes* adalah medium yang mengandung sumber karbon seperti glukosa, gliserol atau tepung, sumber nitrogen seperti nitrat atau kasein dan mineral–mineral tertentu seperti NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Waktu 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).

## **I. Fermentasi**

Fermentasi merupakan suatu reaksi oksidasi reduksi yang memanfaatkan sumber energi, karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa dengan nilai ekonomi yang lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium. Proses fermentasi terjadi disebabkan oleh hasil metabolisme dari organisme (Rao, 2009). Medium dalam suatu fermentasi harus mengandung substrat yang kaya akan nutrisi.

Nutrisi utama yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen dan pospor.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan substrat untuk fermentasi adalah (Pujaningsih, 2005) :

- a). Ketersediaan yang kontinyu, yaitu substrat tersedia sepanjang tahun sehingga saat disimpan dalam beberapa bulan, mutu dan komposisi relatif tetap.
- b). Sifat substrat harus dapat difermentasikan, contoh pada *Tichoderma viridae* yang tumbuh baik hanya pada substrat selulosa (jerami padi), tetapi tidak dapat tumbuh pada bungkil kelapa.
- c). Harga substrat ekonomis atau terjangkau dan dapat digunakan sesuai kebutuhan.

#### **J. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)**

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan yang berupa medium padat, medium cair dan kultur terendam yang dilakukan dalam media cair menggunakan bioreaktor dapat berupa labu yang diberi aerasi atau labu yang digoyang dengan *shaker* atau *fermentor* (Ton *et al.*,2010).

Untuk menciptakan kondisi optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu mikroorganisme tertentu perlu dilakukan pengendalian faktor-faktor fermentasi. Fermentasi medium cair lebih memungkinkan dilakukan pengendalian faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi seperti suhu, pH, dan kebutuhan oksigen (Ton *et al.*,2010).

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan cara fermentasi tertutup (*batch culture*) dan fermentasi kontinyu (*fed batch*). Pada fermentasi tertutup, setelah inokulasi berjalan tidak dilakukan lagi penambahan medium kedalam *fermentor*, kecuali dalam pemberian oksigen (udara steril), antibiuh dan asam atau basa yang mengatur pH. Oleh karena itu pada sistem tertutup ini dengan sekian lamanya waktu fermentasi yang ditentukan maka laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme semakin menurun sampai akhirnya pertumbuhan terhenti. Hal ini disebabkan karena dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi nutrisi-nutrien esensial dalam medium semakin berkurang dan terjadi akumulasi autotoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan atau kombinasi dari keduanya. Dengan demikian pada fermentasi tertutup jumlah sel maksimum terletak pada saat fase *stationer* (Ton *et al.*,2010).

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

Menurut Mitchel *et al.* (2006) tahapan proses secara umum dalam fermentasi batch ini antara lain :

1. Persiapan substrat, substrat dapat dibuat menjadi butiran kecil. Untuk menambah ketersediaan gizi dilakukan penambahan air dan nutrisi yang disebut dengan pra-perawatan substrat.
2. Persiapan inokulum, persiapan inokulum tergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Proses fermentasi *batch* ini dapat melibatkan bakteri, jamur dan salah satunya *actinomycetes* maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuannya untuk menciptakan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.

3. Persiapan wadah, wadah harus benar-benar bersih dan steril sebelum penambahan substrat.
4. Inokulasi, pengerjaan tahap ini dengan penyebaran substrat pada media yang telah steril secara hati-hati.
5. Proses fermentasi *batch*, sebelum memulai proses ini hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi.
6. Kultivasi, tahap ini merupakan tahap pemisahan substrat padat dari medium yang dapat dilakukan dengan menggunakan kertas saring dan sentrifugasi.

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

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

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

## **3. Pemanfaatan Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)**

Pemanfaatan fermentasi *batch* secara tradisional antara lain (Holker *et al*, 2004) dan (Pandey, 2000) :

- a). Pembuatan minuman beralkohol seperti Bir dengan cara sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan.

- b). Pembuatan *Yoghurt* dengan cara memfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bakteri ini akan mengubah laktosa (gula susu) menjadi asam laktat pada kondisi anaerob yang bersifat menggumpalkan kasein.
- c). Keju, biasanya menggunakan bakteri dengan spesies *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung *cymosin* yang bersifat menggumpalkan casein.

Selain aplikasi di atas, masih banyak aplikasi yang menghasilkan produk-produk seperti enzim, pigmen, senyawa aromatik, senyawa kimia, antibiotik, agen pengontrol biologis dan banyak aplikasi penggunaan mikroorganisme dalam fermentasi *batch* sebagai bagian dari proses perantara, yaitu pewarnaan zat warna, *biobleaching*, *biopulping*, dan *bioremediation*.

#### **K. *Fourier Transform Infrared* (FTIR)**

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, gugus fungsi ini ditentukan berdasarkan ikatan dari tiap atom. Prinsip kerja dari metode ini adalah molekul organik yang disinari radiasi IR akan menyebabkan molekul dari senyawa tersebut tergetras dan energi getras diukur oleh detektor serta energi getras dari gugus fungsi tertentu akan menghasilkan frekuensi secara spesifik. Alat ini dapat digunakan pada daerah yang sangat sulit atau tidak mungkin dianalisis dengan alat



dispersi. Radiasi infra merah memiliki spektrum elektromagnetik pada bilangan gelombang  $13000-10\text{ cm}^{-1}$  atau panjang gelombang dari  $0,78-1000\text{ }\mu\text{m}$ .

Spektrum infra merah digunakan untuk menentukan gugus fungsi suatu struktur senyawa organik biasanya antara  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ( $2.5$  sampai  $25\text{ }\mu\text{m}$ ). Daerah di bawah frekuensi  $400\text{ cm}^{-1}$  ( $25\text{ }\mu\text{m}$ ) disebut daerah infra merah jauh sedangkan daerah di atas  $4000\text{ cm}^{-1}$  ( $2.5\text{ }\mu\text{m}$ ) disebut daerah inframerah dekat (Silverstein *et al.*, 1986).

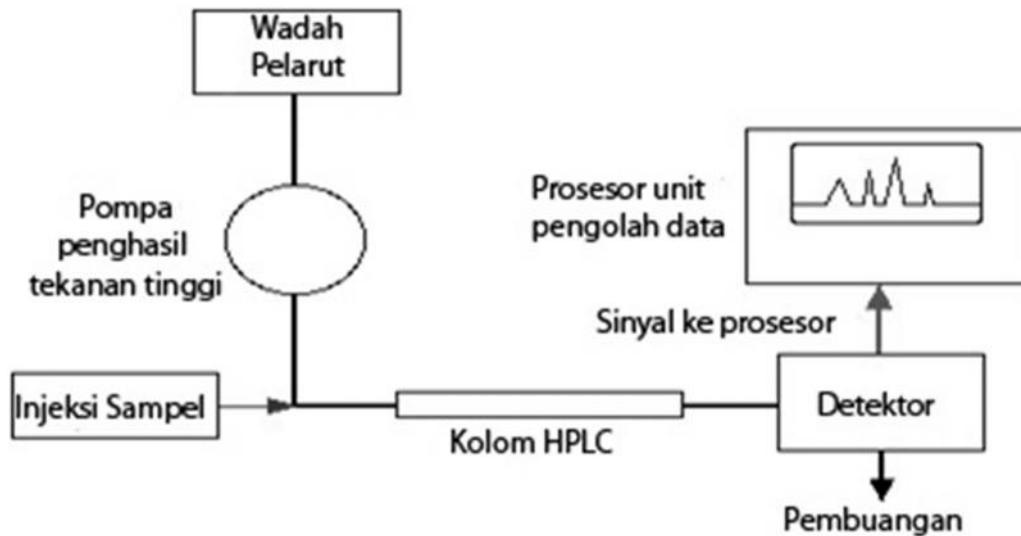
Spektrofotometer FTIR memiliki kesamaan dengan Spektrofotometer *Infra Red* dispersi hanya saja pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra merah melewati contoh. Spektrofotometer FTIR memiliki dasar pemikiran dari persamaan gelombang yang dirumuskan oleh seorang ahli matematika dari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

1. Dapat digunakan untuk semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga dapat dilakukan analisis lebih cepat.
2. Metoda Spektrofotometri FTIR memiliki sensitifitas lebih besar dibandingkan cara dispersi, karena radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak tanpa harus melalui celah (Hsu, 1994).

Sebagai contoh senyawa kitin memberikan data serapan IR :  $\bar{\nu} = 3448,5 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur NH amida (NH amina) dan OH;  $\bar{\nu} = 2920-2873,7 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur CH, CH<sub>2</sub>, dan CH<sub>3</sub>;  $\bar{\nu} = 1450,4 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan Vibrasi tekuk NH;  $\bar{\nu} = 1153,4 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur C N;  $\bar{\nu} = 1033,8 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur C-O; dan  $\bar{\nu} = 871,8 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi tekuk ke luar bidang N-H (Syahmani and Sholahuddin, 2009).

#### ***L. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

HPLC merupakan suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair 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 umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar sehingga fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam dan fasa terbalik yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa polar, menggunakan fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter dkk, 1991). Prinsip pemisahan senyawa menggunakan HPLC adalah perbedaan distribusi komponen diantara fasa diam dan fasa geraknya. Semakin lama terdistribusi dalam fasa diam maka semakin lama waktu retensinya (Clark, 2007).



Gambar 7. Diagram Alat HPLC (Clark, 2007).

Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom HPLC.

Metode yang dipakai untuk menganalisis glukosamin adalah penggunaan evaporasi detektor hamburan cahaya (ELSD) (Mulja and Suharman, 1995).

Glukosamin tidak dapat dianalisis dengan detektor UV secara langsung.

Glukosamin memiliki serapan sinar UV pada panjang gelombang dibawah 205 nm yang hampir sama dengan serapan pelarut polar seperti air dan metanol. Pada detektor ini sampel yang akan dideteksi harus melalui 3 tahap yaitu:

- Nebulisasi merupakan langkah pertama untuk mengubah seluruh fasa gerak yang mengalir dari kolom HPLC dengan bantuan gas Nitrogen menjadi butiran halus atau disebut dengan aerosol. Semakin besar ukuran aerosol, semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk menguapkan fasa gerak.
- Evaporasi (penguapan) merupakan langkah kedua setelah fasa gerak diubah menjadi aerosol yang dibawa oleh aliran gas ke daerah panas yang terletak sebelum ruang deteksi. Pelarut akan diuapkan untuk menghasilkan partikel zat terlarut murni.

- c. Deteksi dimana partikel-partikel sampel melewati sebuah sel aliran akan ditembakkan dengan sumber cahaya, jumlah cahaya yang tersebar yang diukur dengan menggunakan photomultiplier dan perangkat elektronik.

Cara yang praktis dan efisien untuk menganalisis glukosamin adalah dengan HPLC yang dilengkapi ELSD (Evaporative Light Scattering 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 ditembakkan dengan sinar pada semua panjang gelombang, 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  $10^{\circ}\text{C}$ , 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.
7. *Reprodusibilitas* super di bawah 2% memberikan hasil yang dapat diandalkan dan akurat.
8. Pemanasan dan pendinginan tabung *evaporator* cepat, meminimalkan waktu keseimbangan dan sampel yang lewat meningkat.

Kondisi HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detection) untuk identifikasi glukosamin menggunakan kolom C18, fasa gerak adalah asetonitril/H<sub>2</sub>O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas Nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40<sup>0</sup>C, suhu evaporasi 30<sup>0</sup>C, dan waktu run 12 menit. Pada proses elusi, digunakan metode isokratik, yaitu eluennya menggunakan perbandingan komponen yang tetap dari awal sampai dengan akhir pemeriksaan (Gritter *et al.*, 1991).