

## **II. TINJAUAN PUSTAKA**

### **A. Udang**

Udang di Indonesia pada umumnya di konsumsi dalam bentuk daging murni yang mana kepala, ekor dan kulitnya telah dibuang. Namun sampai saat ini limbah tersebut belum diolah secara efisien sehingga menimbulkan pencemaran lingkungan khususnya baunya dan estetika lingkungan yang buruk. Sebagian besar limbah udang yang dihasilkan oleh usaha pengolahan udang berasal dari kepala, kulit dan ekor yang kulit udang mengandung protein (25% - 40%), kitin(15% - 20%) dan kalsium karbonat (45% - 50%) (Marganof, 2003).

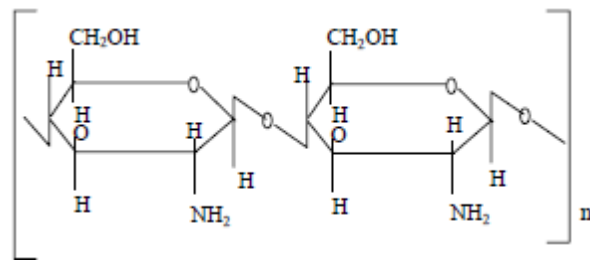
Kandungan kitin dari kulit udang lebih sedikit dibandingkan dari kulit atau cangkang kepiting. Kandungan kitin pada limbah kepiting mencapai 50% - 60% sementara limbah udang menghasilkan 42% - 57% sedangkan cumi-cumi dan kerang masing-masing 40% dan 14% -15% (Mukhlis Siregar, 2009). Dengan pengolahan lebih lanjut limbah udang dapat dimanfaatkan menjadi senyawa kitosan.

### **B. Kitosan**

Kitosan yang disebut juga dengan  $\beta$ -1,4-2 amino-2-dioksi-D-glukosa merupakan turunan dari kitin melalui proses deasetilasi. Kitosan juga merupakan suatu polimer multifungsi karena mengandung tiga jenis gugus fungsi yaitu asam

amino, gugus hidroksil primer dan sekunder. Adanya gugus fungsi ini menyebabkan kitosan mempunyai kreatifitas kimia yang tinggi (Tokura, 1995).

Kitosan merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl, HNO<sub>3</sub>, dan H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>, dan tidak larut dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kitosan tidak beracun, mudah mengalami biodegradasi dan bersifat polielektrolitik (Hirano, 1986). Disamping itu kitosan dapat dengan mudah berinteraksi dengan zat-zat organik lainnya seperti protein. Oleh karena itu, kitosan relatif lebih banyak digunakan pada berbagai bidang industri terapan dan industri kesehatan (Muzzarelli, 1986).



Gambar 1. Struktur Kitosan

Secara umum proses pembuatan kitosan meliputi 3 tahap, yaitu deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Proses deproteinasi bertujuan mengurangi kadar protein dengan menggunakan larutan alkali encer dan pemanasan yang cukup. Proses demineralisasi dimaksudkan untuk mengurangi kadar mineral (CaCO<sub>3</sub>) dengan menggunakan asam konsentrasi rendah untuk mendapatkan khitin, sedangkan proses deasetilasi bertujuan menghilangkan gugus asetil dari khitin melalui pemanasan dalam larutan alkali kuat dengan konsentrasi tinggi (Yunizal dkk., 2001).

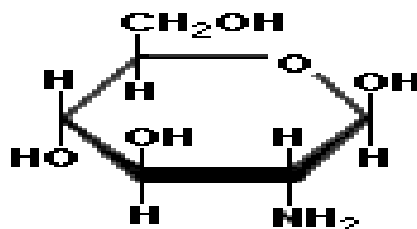
### C. Glukosamin

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 krustasea, artropoda, dan cendawan.

Glukosamin merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai.

Glukosamin ( $C_6H_{13}NO_5$ ) 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, pengkhelet, dan penebal emulsi.

Glukosamin sering ditemukan sebagai komponen utama pada rangka luar krustacea, antropoda, dan cendawan. Glukosamin merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai. Dalam industri, glukosamin diproduksi dengan cara rangka luar krustacea dihidrolisis. Penggunaan glukosamin umumnya digunakan untuk meringankan gejala osteoarthritis walaupun efek terapisnya masih diperdebatkan (Drovanti, *et al*, 1998).



Gambar 2. Struktur Glukosamin

#### **D. Enzim Kitinase**

Secara umum enzim sering digunakan dalam proses produksi. Enzim yang digunakan pada umumnya berasal atau diisolasi dari bakteri. Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian meningkatkan jumlah produksi. Bidang bioteknologi industri mengembangkan teknologi dan bioproses dengan segala ilmu pendukungnya, seperti mikrobiologi, rekayasa genetika, biokimia atau ilmu pendukungnya. Bioproses, yang didalamnya meliputi bidang produksi antara lain antibiotika, asam amino, pengendalian limbah, ataupun enzim (Poernomo, 2004).

Enzim adalah kelompok protein yang berperan dalam proses aktifitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator di dalam sel dan sifatnya sangat khas. Dalam jumlah yang kecil, enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Karena enzim mengkatalisator reaksi-reaksi di dalam sistem biologis, maka enzim disebut sebagai biokatalisator (Murray, 2003).

Di bidang industri, enzim yang digunakan sebagian besar diisolasi dari mikroorganisme. Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan yang diisolasi dari tanaman maupun dari hewan. Antara lain adalah sel mikroorganisme relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki skala produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif lebih rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh

adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek (Poernomo dan Poerwanto, 2003).

Enzim kitinase mampu mendegradasi kitin. Kitinase banyak dihasilkan oleh berbagai organisme seperti bakteri, fungi, tumbuhan tingkat tinggi dan hewan. Organisme ini biasanya memiliki beragam gen kitinase yang ekspresinya diinduksi oleh ekstraseluler kitin dan derivatnya. Pada hewan, kitinase digunakan untuk mengkonversi kitin menjadi monomer atau oligomernya. Kitinase juga dimanfaatkan oleh bakteri untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Tsujiro et al, 1999). Sejumlah besar organisme memiliki enzim yang mampu menurunkan kitin fibril dan dikenal secara kolektif sebagai kitinase (Inbar dan Chet, 1991).

Kitinase menjadi perhatian yang besar, terutama karena peranannya dalam morfogenesis jamur dan parasitisme. Pemanfaatan enzim ini telah banyak dilakukan dalam aplikasi pengendalian hayati (Sahai dan Manoca, 1993). Kitinase yang dihasilkan mikroorganisme memiliki berat molekul berkisar antara 20.000-120.000 kDa. Pada bakteri, berat molekul antara 60.000-110.000 kDa, sedangkan pada *actinomycetes* yaitu 30.000 atau lebih rendah (Wang *et al*, 1997).

### **E. *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  $\mu\text{m}$ , dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Wesley dan Wheeler, 1993 dan Rao, 1994).

Menurut Alexander, 1997, *Actinomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer-polimer gula, asam amino dan asam gula seperti dinding sel bakteri Gram positif. Sedangkan dinding sel fungi terdiri dari selulosa dan kitin. Hal tersebut sejalan dengan Lay dan Hastowo (1992), yang mengatakan bahwa *actinomycetes* merupakan kelompok mikroba bersifat Gram positif.

Walaupun *actinomycetes* dikatakan sebagai mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi (Alexander, 1997), tetapi *actinomycetes* mempunyai ciri yang khas, yang cukup membatasinya menjadi satu kelompok yang jelas berbeda. Pada medium cair, pertumbuhan *actinomycetes* ditandai dengan keruhnya medium dan terbentuk lapisan tipis di permukaan medium.

*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<sup>0</sup>C. Namun, ada beberapa *actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55– 65<sup>0</sup>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<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. 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).

Menurut Sutedjo (1991), *actinomycetes* dapat membentuk dua tipe miselium, yaitu :

1. Miselium vegetatif

Miselium vegetatif merupakan miselium yang tumbuh di atas medium. Pada beberapa spesies miselium vegetatif berbentuk lurus dan panjang, sedang pada spesies lain berbentuk pendek, bercabang, atau bengkok. Diameter miselium vegetatif antara 0,2-0,8 mikron. Miselium vegetatif juga dapat membentuk pigmen.

2. Miselium udara (*aerial*)

Miselium udara (*aerial*) merupakan miselium yang tumbuh pada permukaan medium dan terbentuk konidia. Banyak *actinomycetes* khususnya yang termasuk dalam *Streptomyces* dapat membentuk miselium udara. Miselium udara berbentuk pendek dan lurus, atau berulir–ulir (spiral) dan bercabang, dapat membentuk spora yang lurus, serta beberapa hifa udara bersifat steril. Miselium udara memiliki pigmen putih, kelabu, lembayung, merah, kuning, hijau, atau warna lainnya.



A B (Anggraini, 2010)

Gambar 3. A. Isolat *actinomycetes* ANL-4, B. Isolat *actinomycetes* ANL-4  
secara mikroskopik

## F. Fermentasi

Menurut Saono (1974) fermentasi adalah segala macam proses metabolik dengan bantuan enzim dari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa dan reaksi kimia lainnya, sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu, dan menyebabkan terjadinya perubahan sifat bahan tersebut (Winarno, dkk., 1980). Selanjutnya Shurleff dan Aoyagi (1979) menyatakan bahwa proses fermentasi adalah suatu aktivitas mikroorganisme terhadap senyawa molekul organik kompleks seperti



protein, karbohidrat, dan lemak yang mengubah senyawa-senyawa tersebut menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana, mudah larut dan kecernaannya tinggi. Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai (Winarno, dkk. 1980).

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

Adatiga sistem fermentasi yang dikenal saat ini, yaitu fermentasi sistem *batch*, kontinu dan *fed-batch*, dimana perbedaan dari ketiganya terletak pada pengaturan suplai media dan sistem pemanenan kultur. Pada sistem *batch*, setelah media diinokulasikan tidak ada lagi penambahan media kedalam fermentor. Pemanenan pada sistem ini dilakukan sekaligus pada akhir fermentasi yang biasanya ditandai dengan menurun atau terhentinya pembentukan produk, yang merupakan akibat dari habisnya sumber nutrisi dalam media atau menumpuknya metabolit lain yang bersifat menghambat. Dalam sistem kontinu baik pemanenan maupun penambahan media steril ke dalam reaktor dilakukan secara terus menerus selama proses fermentasi berlangsung, dengan laju pengenceran yang sesuai dengan laju pertumbuhan maksimum dari sel yang digunakan. Sehingga pada sistem ini konsentrasi substrat maupun densitas mikroba relatif konstan. Sementara itu pada sistem *fed-batch*, selama fermentasi berlangsung dilakukan penambahan media steril, tetapi pemanenan dilakukan hanya sekali, yaitu pada akhir fermentasi (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Untuk fermentasi pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk bergantung dari permukaan pada substrat padat. Substrat tradisional yang digunakan berupa hasil produk agrikultur seperti beras, tepung, maizena, tebu, dan lain-lain. Substrat

tersebut dapat bermanfaat bagi organisme miselium untuk tumbuh pada konsentrasi nutrisi yang tinggi, dan menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler seperti sejumlah filamen jamur dan beberapa bakteri, *actinomycetes* dan satu strain dari *Bacillus* (Pandey, 2008).

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

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

- a) 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.
- b) Persiapan inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses fermentasi batch melibatkan hifa khamir, maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.
- c) Persiapan wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu disterilkan sebelum penambahan substrat.
- d) 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.
- e) Proses fermentasi *batch*, pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi, kelembapan.

- f) 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)**

Keuntungan dari fermentasi *batch*, antara lain biaya lebih murah, media produksi dapat menggunakan residu agroindustri, menggunakan sedikit air, limbah yang dihasilkan sedikit, proses sederhana, menggunakan wadah dalam jumlah kecil tetapi menghasilkan konsentrasi produk tinggi, tidak diperlukan penambahan substrat selama proses fermentasi berlangsung dan proses aerasi lebih mudah.

## **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) Proses pembuatan bioetanol. Dimana pada proses ini substrat difermentasikan *Saccharomyces cerevisiae*.
- b) Tahapan *koji* dalam pembuatan kecap yang melibatkan kultivasi dari khamir *Aspergillus oryzae* dalam kedelai rebus. Proses fermentasi miselium khamir menutupi kedelai dan menginjeksikan ke dalam campuran enzim. Kedelai hasil fermentasi kemudian dipindahkan ke dalam air asin selama beberapa bulan sehingga akan menghasilkan saus yang berwarna coklat tua.

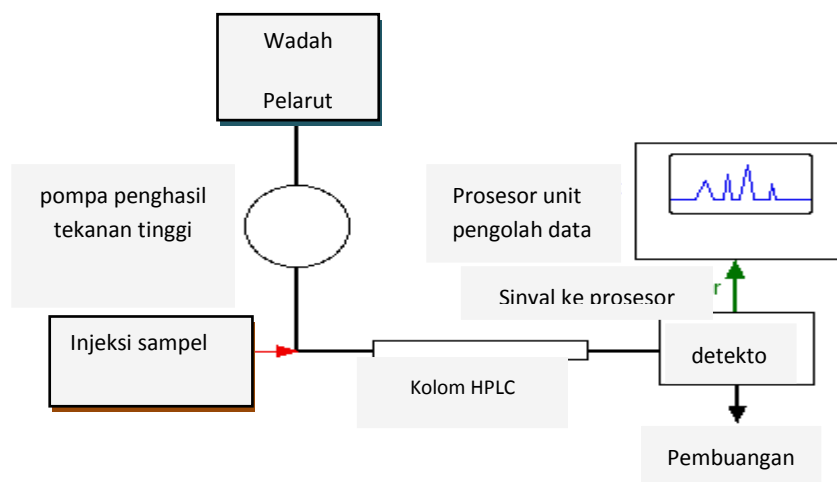
- c) “*ang-kak*” atau anggur merah melibatkan kultivasi dari khamir *Monascus purpureus* pada beras yang direbus. Produksi khamir menghasilkan pigmen berwarna merah gelap, pada tahap akhir fermentasi beras hasil fermentasi dikeringkan dan dihaluskan menjadi bubuk yang akan digunakan sebagai pewarna saat memasak.

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

#### **H. 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 dkk, 1991).

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



Gambar 4. Diagram Alir HPLC

Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom HPLC. Metode yang dipakai untuk pengukuran glukosamin adalah penggunaan detektor ELSD (Evaporative Light Scattering Detector). Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) adalah suatu HPLC dengan teknik pendeteksian berdasar pada kemampuan partikel unsur/butir untuk menyebar ketika mereka menerobos suatu berkas cahaya. Detektor akan bereaksi terhadap campuran yang lebih mudah menguap dibanding fasa gerak. ELSD oleh karena itu menawarkan suatu strategi pendeteksian alternatif untuk campuran yang tidak mempunyai suatu gugus pembawa warna UV (kromofor), dan, tidak sama dengan detektor indeks-refraksi, ELSD kompatibel dengan analisa gradien.

Kondisi HPLC untuk identifikasi glukosamin menggunakan kolom C18 yang bersifat nonpolar, fasa gerak adalah asetonitril/H<sub>2</sub>O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, 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 dkk, 1991).

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

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, gugus fungsi ini dapat ditentukan berdasarkan energi ikatan dari tiap atom. Sampel menyerap radiasi elektromagnetik di daerah infra merah yang menyebabkan terjadinya vibrasi ikatan kovalen. Karena senyawa organik memiliki ikatan kovalen yang berbeda-beda, sehingga menghasilkan jenis vibrasi dan serapan yang berbeda-beda pada suatu spektrum IR. Suatu spektrum infra merah merupakan grafik antara panjang gelombang ( $\mu\text{m}$ ) atau bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dan transmisi-persen (%T) atau absorbansi (A) (Silverstein et al., 1986).

Pada umumnya spektrum IR dibedakan menjadi tiga daerah. Daerah bilangan gelombang tinggi antara  $4000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  ( $2\text{-}7,7\text{ }\mu\text{m}$ ) yang disebut daerah gugus fungsi karakteristik frekuensi tarik untuk gugus fungsi penting seperti C=O, OH, dan NH termasuk dalam daerah ini. Daerah frekuensi menengah, yakni antara  $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  ( $7\text{-}11\text{ }\mu\text{m}$ ) yang diketahui sebagai daerah fingerprint, yang mengabsorpsi secara lengkap dan umumnya kombinasi dari interaksi vibrasi, setiap molekul memberikan *fingerprint* yang unik. Spektrum pada daerah ini menunjukkan nilai khusus dan merupakan referensi untuk daerah lain. Daerah antara  $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  ( $11\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$ ) menunjukkan klasifikasi umum dari molekul yang terbentuk dari absorbansi seperti cincin benzen tersubstitusi. Adanya absorbansi pada daerah bilangan gelombang rendah dapat memberikan data yang

baik akan adanya senyawa aromatik. Selain itu adanya intensitas absorbansi di daerah frekuensi rendah juga menunjukkan adanya karakteristik senyawa dimer karboksilat, amina, atau amida (Coates, 2000).