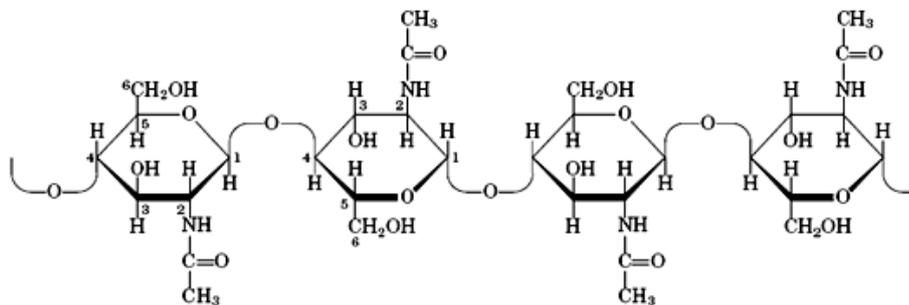


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Kitin

Kitin merupakan suatu polimer linier yang sebagian besar tersusun dari unit-unit  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-asetamida-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranososa dan sebagian dari  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranososa (Kumirska *et al.*, 2010). Kitin terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit crustacea (kepiting, udang, dan lobster), ubur-ubur, komponen struktur eksternal insekta, dinding sel fungi (22-40%), alga, nematoda ataupun tumbuhan (Gohel *et al.*, 2004). Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi melalui ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dengan gugus C=O dari rantai lain yang berdekatan. Ikatan hidrogen ini menyebabkan kitin tidak larut dalam air dan membentuk serabut (fibril) (Suryanto dan Yurnaliza, 2005).



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

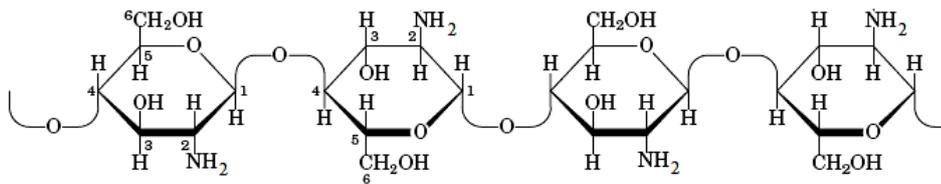
Kitin berbentuk padatan amorf atau kristal, berwarna putih, dan dapat terurai secara hayati (*biodegradable*). Kitin bersifat tidak larut dalam air, asam anorganik encer, asam organik, alkali pekat dan pelarut organik tetapi larut dalam asam pekat seperti asam sulfat, asam nitrit, asam fosfat, dan asam format anhidrat. Kitin dalam asam pekat dapat terdegradasi menjadi monomernya dan memutuskan gugus asetil (Einbu, 2007). Ketika derajat N-asetilasi (didefinisikan sebagai rata-rata jumlah unit N-asetil-D-glukosamin per 100 monomer yang dituliskan sebagai persentase) kurang dari 50%, maka kitin dapat larut dalam larutan asam dan kemudian disebut kitosan (Pillai *et al.*, 2009).

## **B. Kitosan**

Kitosan merupakan suatu heteropolimer dari residu N-asetil-D-glukosamin dan D-glukosamin yang dapat diperoleh dari kitin melalui proses deasetilasi sebagian. Nama kitosan berkaitan dengan rangkaian kesatuan polimer turunan kitin yang dapat digambarkan dan dikelompokkan berdasarkan fraksi residu N-asetil (FA) atau derajat N-asetilasi (DA), derajat polimerisasi (DP) atau bobot molekul dan pola N-asetilasi (PA) (Aam *et al.*, 2010).

Kitosan merupakan biomolekul non toksik dengan LD<sub>50</sub> setara dengan 16 g/kg BB (Tang *et al.*, 2007). Kitosan komersial memiliki bobot molekul rata-rata antara 3.800 dan 500.000 g/mol dan derajat deasetilasi 2% hingga 40% (Kumar, 2000). Semakin banyak gugus asetil yang hilang dari biopolimer kitosan, maka semakin kuat interaksi antar ion dan ikatan hidrogen dari kitosan (Tang *et al.*, 2007).

Kitosan tidak beracun dan mudah terbiodegradasi. Kitosan tidak larut dalam air, dalam larutan basa kuat, dalam  $H_2SO_4$ , dan dalam beberapa pelarut organik seperti alkohol dan aseton. Kitosan sedikit larut dalam asam klorida dan asam nitrat serta larut baik dalam asam lemah seperti asam formiat dan asam asetat (Sugita *et al.*, 2009). Struktur kitosan dapat dilihat pada Gambar 2.



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

Kitosan merupakan turunan kitin yang paling bermanfaat. Ini disebabkan karena berat molekul yang tinggi, sifat polielektrolit, keberadaan gugus fungsional, kemampuan untuk membentuk gel, dan kemampuan mengadsorpsi. Selanjutnya kitosan dapat dimodifikasi secara kimia dan enzimatik dan bersifat biodegradabel dan biokompatibel dengan sel dan jaringan manusia. Untuk pemanfaatannya, berat molekul dan tingkat deasetilasi sangat berperan, karena kedua parameter ini mempengaruhi kelarutan, sifat-sifat fisikokimia, dan sifat biokompatibilitas serta aktivitas immunitas. Kapasitas mengadsorpsi kitin dan kitosan meningkat dengan bertambahnya kandungan gugus amino yang bebas (Synowiecki *and* Al-Khateeb, 2003).

## C. Ekstraksi Kitin

Kulit udang mengandung protein (25-40 %), kalsium karbonat (45-50%), dan kitin (15-20%), namun besarnya kandungan tersebut bergantung pada jenis udangnya (Foucher *et al.*, 2009). Ekstraksi kitin dari kulit udang dilakukan melalui dua tahapan proses yaitu penyisihan protein (deproteinasi) dan penyisihan kalsium karbonat (demineralisasi) (Mahmoud *et al.*, 2007). Kedua tahapan proses dalam ekstraksi kitin tersebut dapat dilakukan secara kimia maupun biologi (Beaney *et al.*, 2005).

### 1. Deproteinasi

Protein yang terikat secara fisik dalam kulit udang dapat dihilangkan dengan perlakuan fisik seperti pengecilan ukuran dan pencucian dengan air. Adapun protein yang terikat secara kovalen dapat dihilangkan dengan perlakuan kimia yaitu pelarutan dalam larutan basa kuat atau dengan perlakuan biologis (Synowiecki *and* Al-Khateeb, 2003). Namun, deproteinasi menggunakan basa kuat NaOH lebih sering digunakan karena lebih mudah dan efektif. NaOH mampu memperbesar volume partikel bahan (substrat), sehingga ikatan antar komponen menjadi renggang, juga mampu menghidrolisis gugus asetil pada kitin sehingga kitin akan mengalami deasetilasi dan berubah menjadi kitosan yang menyebabkan kadar kitin berkurang (Winarti, 1992).

## 2. Demineralisasi

Kulit udang mengandung mineral 30-35% (berat kering), komposisi yang utama adalah kalsium karbonat. Komponen mineral ini dapat dilarutkan dengan penambahan asam seperti asam klorida, asam sulfat, atau asam laktat (Synowiecki *and* Al-Khateeb, 2003). Demineralisasi optimum dapat diperoleh dengan ekstraksi menggunakan HCl 1,0 M yang diinkubasi pada suhu 75°C selama 1 jam (Bahariah, 2005).

Proses demineralisasi sebaiknya dilakukan setelah proses ekstraksi protein karena penambahan larutan alkali pada proses sebelumnya akan memberikan efek penstabil pada kulit udang dan memaksimalkan produk dan kualitas protein yang dihasilkan. Kontaminasi protein pada cairan ekstrak mineral dapat terjadi apabila proses demineralisasi dilakukan sebelum proses deproteinasi (Angka dan Suhartono, 2000).

## D. Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup, dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme-perantara dari sel. Enzim dapat mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi bebas pengaktifan. Katalis bergabung dengan reaktan sedemikian rupa sehingga dihasilkan keadaan transisi yang mempunyai energi bebas pengaktifan yang lebih rendah dari pada keadaan transisi

tanpa katalis. Setelah reaksi terbentuk, katalis dibebaskan kembali ke keadaan semula (Lehninger, 2005).

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah (1) dapat meningkatkan produk lebih tinggi; (2) bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah; dan (3) bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu. Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi, dan industri kimia lainnya. Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme (Azmi, 2006).

### **1. Mekanisme kerja enzim**

Enzim dapat menyesuaikan diri dengan substrat (molekul yang akan dikerjakan) untuk membentuk suatu kompleks enzim substrat. Ikatan-ikatan substrat dapat menjadi tegang oleh gaya tarik antara substrat dan enzim. Ikatan tegang memiliki energi tinggi dan mudah terputus; oleh karena itu, reaksi yang diinginkan berlangsung lebih mudah dan menghasilkan suatu kompleks enzim-produk. Dalam banyak hal, produk dan substrat itu tidak sama bentuknya, jadi kesesuaian antara produk dan enzim tidak lagi sempurna. Bentuk yang diubah dari produk itu menyebabkan kompleks berdisosiasi, dan molekul enzim siap menerima molekul substrat lain. Teori aktivitas enzim ini disebut teori kesesuaian-terimbas (teori *induced fit*).

Enzim mempunyai bobot molekul mulai dari 12.000-120.000 dan lebih tinggi. Sebagian besar substrat (misalnya, suatu asam amino atau satuan glukosa) merupakan molekul yang jauh lebih kecil. Lokasi spesifik pada struktur enzim

besar dimana reaksi terjadi disebut sisi aktif. Pada sisi ini terdapat gugus prostetik (jika ada). Gugus prostetik logam diduga berfungsi sebagai zat elektrofilik, dan dengan jalan ini mengkatalisis reaksi yang diinginkan (Fessenden dan Fessenden, 1990).

## **2. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim**

Beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim adalah sebagai berikut :

### **a. Konsentrasi Enzim**

Seperti halnya katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

### **b. Konsentrasi Substrat**

Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Setelah konsentrasi substrat dinaikkan lebih lanjut akan tercapai suatu laju maksimum. Pada konsentrasi substrat yang menghasilkan laju reaksi maksimum enzim telah dalam keadaan jenuh dengan substrat.

### **c. Suhu**

Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Namun, enzim adalah suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, sisi aktif enzim akan

terganggu dan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinyapun akan menurun.

d. 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.

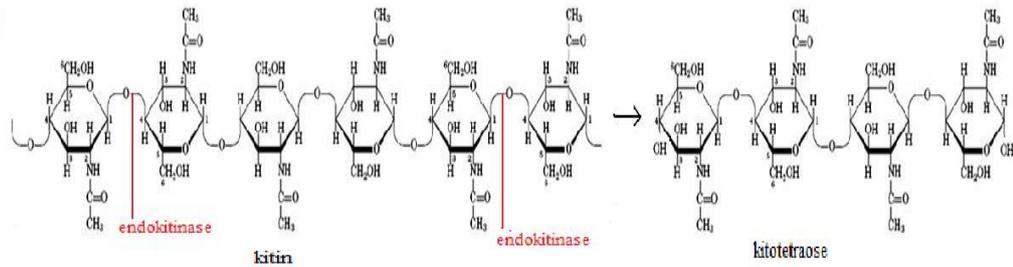
e. Penghambat enzim (Inhibitor)

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 proses inhibisi enzim, yaitu inhibisi kompetitif, inhibisi non-kompetitif, dan inhibisi umpan-balik (Lehninger, 2005).

## **E. Kitinase**

Kitinase merupakan glikosil hidrolase yang mengkatalisis degradasi kitin. Enzim ini ditemukan dalam berbagai organisme, termasuk organisme yang tidak mengandung kitin dan mempunyai peran penting dalam fisiologi dan ekologi (Tomokazu *et al.*, 2004). Suryanto *et al.*, (2005) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu :

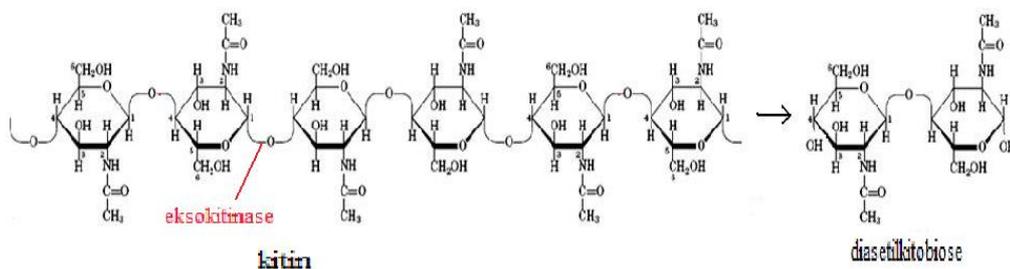
1. Endokitinase yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan  $\beta$ -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose.



Gambar 3. Reaksi pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin

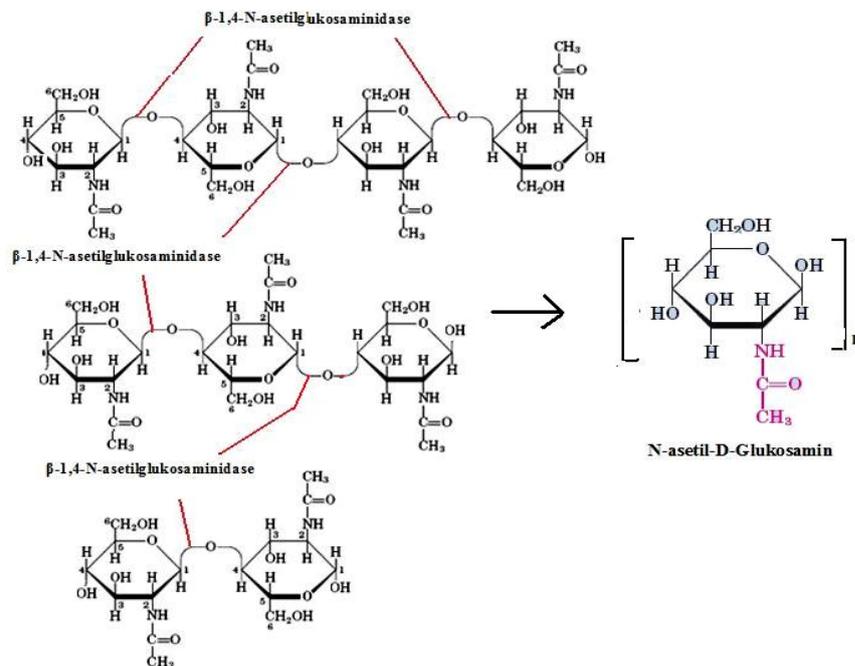
(Suryanto *et al.*, 2005)

2. Eksokitinase dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4- $\beta$ -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 4. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase (Suryanto *et al.*, 2005)

3.  $\beta$ -1,4-N-asetilglukosaminidase merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc.



Gambar 5. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc (Suryanto *et al.*, 2005)

Enzim kitinase banyak dihasilkan oleh organisme seperti bakteri, fungi, khamir, tumbuhan, insekta, protozoa, manusia, dan hewan (Gohel *et al.*, 2006). Kitinase oleh bakteri dihasilkan secara ekstraseluler dan digunakan untuk pengambilan nutrisi dan parasitisme (Patil *et al.*, 2000). Kitinase pada fungi berperan dalam pengaturan fisiologis saat pembelahan sel, diferensiasi, dan aktivitas mikoparasit. Khamir menggunakan kitinase untuk proses pembagian sel selama pertunasan dan untuk mekanisme perlawanan terhadap fungi lain. Tumbuhan menggunakan

kitinase untuk mendegradasi dinding sel fungi patogen. Insekta menggunakan kitinase untuk perkembangannya (Gohel *et al.*, 2006).

Sama seperti enzim pada umumnya, aktivitas kitinase juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti pH, suhu, serta faktor kimiawi tertentu yang secara khusus dapat mempengaruhi enzim tersebut (Campbell *et al.*, 2002). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2010), enzim kitinase ekstraselular yang diproduksi oleh *Actinomycetes* menunjukkan aktivitas optimum pada pH 7 dan dengan temperatur 30°C. Substrat yang digunakan merupakan koloidal kitin yang dicuci dengan NaOH. Berdasarkan pengamatan terhadap waktu inkubasi substrat kitin dengan enzim kitinase, diketahui bahwa enzim kitinase menunjukkan aktifitas paling tinggi pada menit ke 20.

Kitinase dalam mikroorganisme dapat dihambat secara kompetitif oleh beberapa senyawa. Peter (2005) menuliskan bahwa kitinase dihambat oleh alosamidin dan beberapa senyawa selain gula. Argifin dan argadin menghambat kitinase serangga *Lucilia curpina*. Yurnaliza (2002) melaporkan bahwa N-asetilglukosamin dan glukosa menghambat sintesis kitinase pada *Trichoderma harzianumm*.

#### **F. *Actinomycetes***

*Actinomycetes* merupakan kelompok bakteri gram positif (Remya and Vijayakumar, 2008) yang terdistribusi luas di alam dan berhabitat di tanah. *Actinomycetes* memiliki keberagaman yang tinggi di dalam tanah dan memainkan fungsi penting sebagai dekomposer dan penghasil senyawa bioaktif (Thakur *et al.*,

2007). *Actinomycetes* telah dieksploitasi secara komersil untuk produksi farmasi, enzim, agen antitumor, inhibitor enzim, dan sebagainya (Remya and Vijayakumar, 2008).

*Actinomycetes* memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh jamur dan bakteri. 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. 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 (Rao, 1994).

Walaupun *Actinomycetes* dikatakan sebagai bakteri 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.

Jenis *Actinomycetes* tergantung pada tipe tanah, karakteristik fisik, kadar bahan organik, dan pH lingkungan. Rentang pH yang paling cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* adalah antara 5-9. Sedangkan temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* adalah 25-50°C (Mangamuri, 2012).

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,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . Inkubasi biasanya selama 2-7 hari (Jutono, 1995).

### **G. Kitoooligosakarida**

Kitoooligosakarida seperti kitodiosa (G2), kitotriosa (G3), kitotetraosa (G4), kitopentosa (G5), kitoheksosa (G6), dan kitoheptosa (G7) banyak digunakan dalam aplikasi medis karena aktivitas biologisnya yang menarik, seperti antibakteri, penginduksi enzim lisozim, dan perangsang antibodi. Kitoooligomer yang besar (kitoheksosa dan kitoheptosa) dapat melawan aktivitas antitumor pada mencit dan juga dapat menimbulkan aktivitas kitinase pada tanaman.

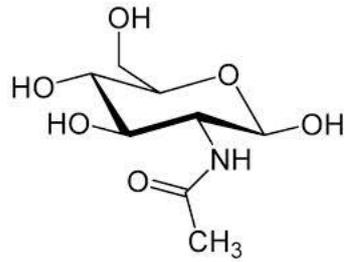
Kitoooligosakarida dapat diperoleh dengan metode kimiawi atau enzimatik dari kitin atau kitosan. Kitosanolisis yang dicapai oleh asam, sebagian besar dapat dilakukan menggunakan HCl atau  $HNO_2$ . Metode ini sangat sederhana dengan hasil yang baik, namun sulit untuk mengontrol metode ini dan sulit untuk menghilangkan asam kuat dan produk samping dari reaksi pencoklatannya. Kerugian lain dalam menggunakan  $HNO_2$  adalah modifikasi struktur produk akhirnya yang mengkhawatirkan. Mekanisme reaksi ini termasuk deaminasi dari 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranososa membentuk 2,5-anhidro-D-manosa pada akhir reduksi (Cabrerera *and* Cutsem, 2005).

Degradasi secara enzimatik telah diakui sebagai pendekatan yang paling menjanjikan untuk memperoleh oligomer kitosan. Hal ini dikarenakan kondisi reaksi yang moderat tanpa produk samping dan proses degradasinya mudah diamati (Xie *et al.*, 2011). Hidrolisis kitosan dengan enzim kitinase diikuti oleh pemutusan N-asetilasi kimiawi dari hidrolisat, sebaik hidolisis kitosan ter-N-asetilasi menggunakan enzim lisozim. Hal ini menunjukkan bahwa hidrolisis enzimatik dapat berguna untuk memperoleh beragam N-asetilkitoooligosakarida.

Bagaimanapun, semua metode degradasi ini, menghasilkan sedikit jumlah kitoooligosakarida, atau kitoooligosakarida tidak seluruhnya dapat diproduksi (Somchai *and* Duenpen, 2007).

#### **H. N-asetilglukosamin**

N-asetilglukosamin (GlcNAc) merupakan monomer dari kitin yang memiliki rumus molekul  $C_6H_{15}NO_6$  yang berisi campuran murni 6,9% nitrogen dengan struktur kimia yang sama dengan selulosa yang diganti oleh suatu unit asetil amino ( $CH_3COONH_2$ ) (Pasaribu, 2004). Pada umumnya, GlcNAc berbentuk bubuk putih dengan rasa manis dan memiliki fungsi sebagai bioregulator. GlcNAc mendapat perhatian besar dalam osteoarthritis dan digunakan sebagai pengganti gula (Sashiwa *et al.*, 2003).



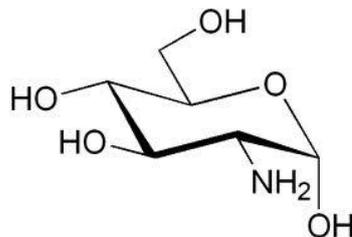
Gambar 6. Struktur N-asetilglukosamin (Anonim, 2013)

Senyawa GlcNAc pada umumnya dihasilkan melalui hidrolisis asam (HCl) dari kitin. Produksi GlcNAc paling baik dihasilkan dari hidrolisis  $\beta$ -kitin. Produksi GlcNAc dari kitin harus melalui dua tahap. Pada awalnya kitin dipecah secara perlahan oleh endokitinase menjadi oligosakarida, selanjutnya oligosakarida dipecah secara cepat oleh eksokitinase menjadi GlcNAc (Sashiwa *et al.*, 2003).

## I. Glukosamin

Glukosamin merupakan gula beramina dengan rumus molekul  $C_6H_{13}NO_5$ .

Glukosamin dalam bentuk murni berupa serbuk kristal putih dengan titik leleh 190-194°C. Glukosamin memiliki kelarutan tinggi dalam air dengan titik larut 100 mg/mL pada suhu 20°C (Kralovec *and* Barrow, 2008).



Gambar 7. Struktur glukosamin (Anonim, 2013)

Glukosamin telah dilaporkan memiliki potensi untuk mencegah perubahan struktur pada pasien osteoarthritis (OA) dan secara bersamaan dapat digabungkan menjadi suplemen (Richy *et al.*, 2003). Gula amino secara alami disintesis dalam tubuh manusia dan karena aplikasinya yang luas, maka muncul ketertarikan untuk memproduksi glukosamin secara komersil.

Glukosamin ditemukan dalam limbah kulit crustacea seperti udang, kepiting, dan lobster. Glukosamin dapat diperoleh dari pemecahan langsung substrat kitin dari limbah kerang-kerangan, tetapi dalam pemanfaatan kitin secara langsung, beberapa usaha di buat untuk menghasilkan glukosamin melalui proses fermentasi (Kuk *et al.*, 2005).

## **J. Fermentasi**

Ahli mikrobiologi industri memperluas pengertian fermentasi yaitu segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganisme (Rohmat, 2007). Produk yang dapat diperoleh dari proses fermentasi adalah enzim, sel mikroorganisme, metabolit primer, metabolit sekunder, dan senyawa kimia hasil proses biokonversi oleh mikroorganisme. Fermentasi juga merupakan suatu proses untuk menghasilkan energi dengan bantuan senyawa organik sebagai pemberi dan penerima elektron. Fermentasi mencakup aktivitas metabolisme mikroorganisme baik aerobik maupun anaerobik, sehingga terjadi perubahan kimiawi dari substrat organik (Rahman, 1992).

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam. Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat, atau cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam medium cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan *shaker* atau fermentor (Rahman, 1992). Menurut Rahman (1992), medium cair mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan medium padat, yaitu:

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

Kondisi yang optimum untuk fermentasi tergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Pengendalian faktor-faktor fermentasi bertujuan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu mikroorganisme tertentu. Fermentasi medium cair lebih memungkinkan adanya pengendalian faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi seperti suhu, pH, dan kebutuhan oksigen (Ton *et al.*, 2010).

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

Fermentasi *batch* merupakan proses fermentasi dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi. Prinsip pada sistem fermentasi *batch* merupakan

sistem tertutup, tidak ada penambahan media baru, ada penambahan oksigen dan aerasi, antifoam dan asam atau basa dengan cara mengontrol pH (Iman, 2008).

Bioreaktor tipe *batch* memiliki keuntungan lain yaitu dapat digunakan ketika bahan tersedia pada waktu-waktu tertentu dan bila memiliki kandungan padatan tinggi (25%). Bila bahan berserat atau sulit untuk diproses, tipe *batch* akan lebih cocok dibanding tipe aliran kontinyu, karena lama proses dapat ditingkatkan dengan mudah. Bila proses terjadi kesalahan, misalnya karena bahan beracun, proses dapat dihentikan dan dimulai dengan yang baru (Susanto, 2012).

### **1. Tahapan Proses Fermentasi *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 pra-perawatan substrat untuk menambah ketersediaan gizi.
- b. Persiapan inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses fermentasi *batch* melibatkan bakteri, jamur, dan salah satunya adalah *Actinomyces*, maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini adalah untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan mikroorganisme yang tinggi.
- c. Persiapan wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu distarilkan sebelum penambahan substrat.

- d. Inokulasi dan pengerjaan, pengerjaan tahapan ini adalah dengan menyebarkan substrat pada media yang telah disterilkan secara hati-hati untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.
- e. Pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi. Aerasi atau penambahan oksigen dapat dilakukan apabila diperlukan. *Actinomyces* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerobik, yaitu mikroorganisme yang memanfaatkan oksigen disekitarnya jika tersedia.
- f. Kultivasi, pada tahapan ini diperlukan bantuan mekanis untuk memisahkan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

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

Menurut Holker *et al.* (2004) dan Pandey *et al.* (2008), aplikasi dari fermentasi *batch* secara tradisional, antara lain :

- a. Yogurt, diproduksi dengan cara memfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bakteri mengubah laktosa pada kondisi anaerobik. Laktosa diubah menjadi asam laktat yang bersifat menggumpalkan kasein (protein susu).
- b. Keju, berbagai jenis bakteri dapat digunakan untuk fermentasi susu menjadi keju, tergantung dari keju yang dihasilkan. Biasanya digunakan spesies

*Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung *cymosin* yang bersifat menggumpalkan kasein.

- c. Bir, minuman beralkohol. Sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan, didapatkan minuman beralkohol.

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

*Fourier Transform Infrared (FTIR)* merupakan suatu teknik spektroskopi inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus fungsi suatu senyawa termasuk senyawa kalsium fosfat, namun tidak dapat mengidentifikasi unsur-unsur penyusunnya. Ada dua jenis energi vibrasi yaitu vibrasi *bending* dan vibrasi *stretching*. Vibrasi *bending* yaitu pergerakan atom yang menyebabkan perubahan sudut ikatan antara dua ikatan atom atau pergerakan dari seluruh atom terhadap atom lainnya. Sedangkan vibrasi *stretching* adalah pergerakan atom yang teratur sepanjang sumbu ikatan antara dua atom sehingga jarak antara dua atom dapat bertambah atau berkurang (Samsiah, 2009).

Prinsip kerja FTIR adalah sumber infra merah akan mengemisikan energi infra merah dan berjalan melalui bagian optik dari spektrofotometer. Kemudian gelombang sinar akan melewati interferometer dimana sinar tersebut dipisahkan dan digabungkan kembali untuk menghasilkan suatu pola interferensi. Lalu, intensitas dari frekuensi sinar ditransmisikan dan diukur oleh detektor. Hasil dari detektor adalah interferogram, yaitu suatu daerah waktu yang menggambarkan

pola interferensi. Dengan adanya ADC (*Analog to Digital Converter*) akan mengubah pengukuran tersebut menjadi suatu format digital yang dapat digunakan oleh komputer. Kemudian interferogram diubah menjadi suatu pita spektrum tunggal oleh FFT (*Fast Fourier Transform*) (Nurofik, 2008).

Identifikasi gugus fungsi biasanya dilakukan pada daerah bilangan gelombang 800-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Sebagai contoh, senyawa kitin memberikan data serapan IR :  $\nu = 3448,5 \text{ cm}^{-1}$  yang memberikan vibrasi ulur NH amida (NH amina) dan OH;  $\nu = 2920-2873 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur CH,  $\text{CH}_2$ , dan  $\text{CH}_3$ ;  $\nu = 1450,4 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi tekuk NH;  $\nu = 1153,4 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur C-N;  $\nu = 1033,8 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi ulur C-O; dan  $\nu = 871,8 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi tekuk ke luar bidang N-H (Syahmani dan Solahuddin, 2009).

Spektroskopi FTIR telah digunakan untuk membandingkan kemurnian kitin hasil isolasi dari pupa ulat sutera. Efisiensi dari produksi kitosan melalui N-deasetilasi dari kitin juga diinvestigasi menggunakan IR dalam pekerjaan ini. Selama N-deasetilasi kitin, pita pada  $1655 \text{ cm}^{-1}$  secara bertahap menurun, sedangkan pada  $1590 \text{ cm}^{-1}$  meningkat, pada umumnya hal ini mengindikasikan gugus  $\text{NH}_2$  (Paulino *et al.*, 2006).

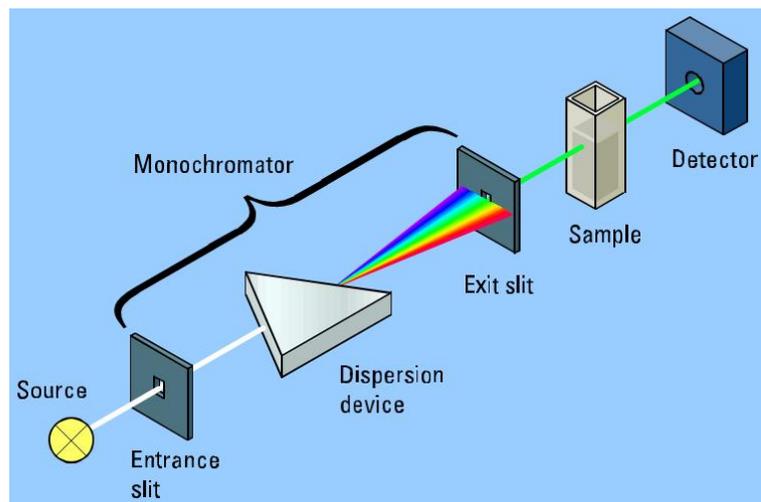
### **M. Spektroskopi UV-Visible**

Spektroskopi ultraviolet/visible (UV-Vis) merupakan teknik analisis yang penting karena dua alasan: pertama, teknik ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dalam molekul; kedua, dapat digunakan untuk pengukuran.

Spektroskopi UV-Vis melibatkan absorpsi radiasi elektromagnetik dari kisaran 200-800 nm dan kemudian eksitasi elektron ke tingkat energi lebih tinggi.

Absorpsi cahaya ultraviolet/tampak oleh molekul organik terbatas hanya untuk beberapa gugus fungsi (kromofor) yang mengandung elektron valensi dari energi eksitasi yang rendah. Spektrum UV-Vis merupakan spektrum yang kompleks dan nampak seperti pita absorpsi berlanjut, hal ini dikarenakan gangguan yang besar dari transisi rotasi dan vibrasi pada transisi elektronik memberikan kombinasi garis yang tumpang tindih (*overlapping*). Dewasa ini, deteksi individu dari transfer elektron tanpa gangguan yang besar oleh pita vibrasi yang berdekatan juga dapat direkam (Hunger *and* Weitkamp, 2001).

Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spektrum ini. Tetapi spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur basorban pada panjang gelombang tertentu menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).



Gambar 8. Skema komponen-komponen spektroskopi UV-Vis (Pangestu, 2011)

## 1. Komponen-komponen Spektrofotometer UV-Vis

Untuk mendapatkan hasil pengukuran yang optimum, setiap komponen dari instrumen yang dipakai harus berfungsi dengan baik. Komponen-komponen spektrofotometri UV-Vis meliputi sumber sinar, monokromatro, dan sistem optik.

- a. Sebagai sumber sinar; lampu deuterium atau lampu hidrogen untuk pengukuran UV dan lampu tungsten digunakan untuk daerah tampak (*visible*).
- b. Monokromator; digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen-komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih oleh celah (*slit*). Monokromator berputar sedemikian rupa sehingga kisaran panjang gelombang dilewatkan pada sampel sebagai *scan* instrumen melewati spektrum.

- c. Optik-optik; dapat didesain untuk memecah sumber sinar sehingga sumber sinar melewati 2 kompartemen, dan sebagai mana dalam spektrofotometer berkas ganda (*double beam*), suatu larutan blanko dapat digunakan dalam suatu kompartemen untuk mengoreksi pembacaan atau spektrum sampel. Yang paling sering digunakan sebagai blanko dalam spektrofotometri adalah semua pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel atau pereaksi (Rohman, 2007).

## 2. Pemilihan pelarut

Pelarut digunakan dalam metode spektrofotometri menimbulkan masalah dalam beberapa daerah spektrum. Pelarut tidak hanya harus melarutkan sampel, tetapi juga tidak boleh menyerap cukup banyak dalam daerah dimana penetapan itu dibuat. Air merupakan pelarut yang baik sekali dalam arti tembus cahaya di seluruh daerah tampak dan turun sampai panjang gelombang sekitar 200 nm didaerah ultraviolet. Tetapi karena air merupakan pelarut yang kurang baik bagi banyak senyawa organik, lazimnya pelarut organik yang digunakan digunakan. Titik batas transparansi dalam daerah ultraviolet dari sejumlah pelarut dipaparkan dalam Tabel 1. Hidrokarbon alifatik, metanol, etanol, dan dietil eter transparan terhadap radiasi ultraviolet dan seringkali digunakan sebagai pelarut untuk senyawa organik (Day dan Underwood, 2002).

Tabel 1. Pelarut-pelarut untuk daerah ultraviolet dan cahaya tampak (Day dan Underwood, 2002)

Pelarut	Perkiraan Tansparansi Minimum (nm)	Pelarut	Perkiraan Tansparansi Minimum (nm)
Air	190	Kloroform	250
Metanol	210	Karbon tetraklorida	265
Sikloheksana	210	Benzena	280
Heksana	210	Toluena	285
Dietil eter	220	Piridina	305
p-dioksana	220	Aseton	330
Etanol	230	Karbon disulfida	380

### 3. Analisis senyawa turunan kitin/kitosan

Spektra UV-Vis turunan kitin/kitosan biasanya direkam dalam larutan asam (asam asetat, asam posforat, asam perklorat, dan asam hidroklorida) dalam sel kwarsa 1 cm pada suhu kamar. Terkadang air, larutan basa, atau larutan DMSO digunakan. Spektra difusi refleksi UV-Vis dari sampel bubuk atau lapisan tipis diukur. Analisis dalam ultraviolet vakum melewati kisaran inframerah juga digunakan (Kumirska *et al.*, 2010).

Kitin dan kitosan termasuk rasio beragam dari dua gugus kromofor UV jauh, N-asetil glukosamin dan glukosamin; sebagai hasil, koefisien eksistensi mereka untuk panjang gelombang lebih pendek dari 225 nm bukan nol. Hal ini dikarenakan, residu N-asetil glukosamin dan glukosamin menunjukkan tidak adanya interaksi dengan rantai kitin/kitosan, unit-unit monomer berkontribusi dalam jalur tambahan, sederhana untuk total absorbansi polimer-polimer ini pada panjang gelombang khusus. Spektra UV dari campuran Nasetil glukosamin-glukosamin dan glukosamin hidroklorida cukup mirip dengan

spektra kitosan, dan  $\lambda$  maks adalah 201 nm dalam larutan HCl 0,1 M (Liu *et al.*, 2006).

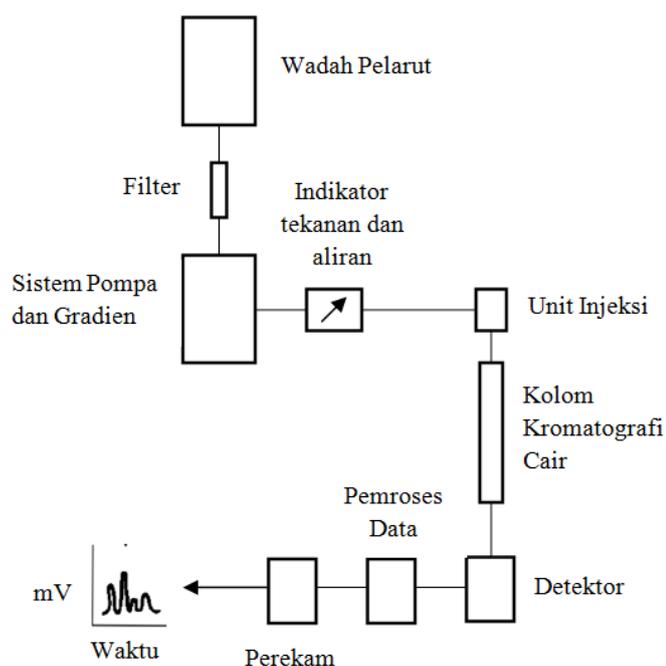
Gadgoli (2006) mengukur kadar glukosamin sulfat dalam tablet menggunakan spektrofotometri UV. Larutan berair dari tablet atau obat memperlihatkan absorpsi maksimal pada 190 nm, yang tidak dapat dimanfaatkan untuk penentuan kuantitatif. Pendekatan alternatif adalah mendrivatisasi obat ke dalam kromofor dalam molekul yang juga mampu untuk digunakan dalam penentuan spektrofotometri. Gugus amina dari obat direaksikan dengan fenil isotiosianat (PITC) untuk memperoleh turunan fenil tiourea (PTH), yang memperlihatkan absorpsi maksimal pada 240 nm. Metode tersebut kemudian dioptimalkan kondisi reaksinya dan diamati bahwa reaksi dipengaruhi oleh pemanasan sampel dalam medium basa dengan larutan metanol dari PITC. Lebih lanjut, obat tersebut, menjasi gula amino (glukosamin), membutuhkan waktu stabilisasi selama 24 jam dalam pH basa, dimana kondisi basa diberikan oleh natrium asetat. Kandungan glukosamin sulfat dalam formula tablet dihitung dengan menerapkan faktor pengenceran yang sesuai dan meramalkan kemungknan dari kurva kalibrasi.

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

HPLC merupakan 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 dengan fasa diam. Sedangkan pada fasa terbalik, fasa gerak lebih polar dibandingkan dengan fasa diam (Kupiec, 2004).

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 9. Diagram Blok Sistem Kromatografi Cair (Lindsay, 1992)

Beberapa metode telah digunakan untuk penentuan glukosamin, tetapi terdapat kesulitan dalam tiap-tiap metode tersebut. Masalah yang paling umum adalah sensitivitas, hal ini dikarenakan glukosamin tidak memiliki gugus kromofor.

Untuk itu, sebagian metode menggunakan derivat untuk menaikkan deteksi UV ataupun fluoresens. Derivat-derivat tersebut meliputi fenil isotiosianat (PITC), asam antranilat/natrium sianoborohidrida, dan 6-aminokuinolinil-N-hidroksisuksinimidil karbamat (AQC).

Metode lain yaitu menggunakan kolom C8 dengan deteksi UV pada panjang gelombang 195 nm. Metode ini cukup sederhana namun tetap saja memberikan respon yang relatif rendah dan HCl sendiri dapat memberikan kromatogram yang sama. Metode yang didasarkan pada deteksi indeks refraktif (RI) biasanya membutuhkan fasa kolom ikatan amino, yang telah diketahui memiliki stabilitas terbatas, dan hasil yang juga rendah sensitifitasnya.

Metode HPLC dengan menggunakan evaporasi detektor hamburan cahaya (ELSD) dapat meningkatkan sensitivitas, serta digunakan kolom HPLC yang sangat stabil, mudah, dan cepat (Jacyno *and* Dean, 2004). 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 ditembak 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 (Ball, 2012).