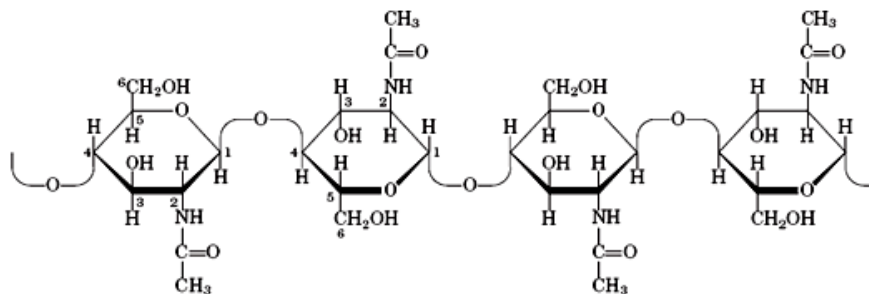


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kitin

Kitin merupakan polimer alam terbanyak di dunia setelah selulosa (Yanming, *et al.* 2001). Struktur molekul kitin juga mirip selulosa. Persamaan antara selulosa dengan kitin adalah ikatan antara monomernya yaitu ikatan glikosida pada posisi β -(1,4). Perbedaan antara kitin dengan selulosa terletak pada atom C nomor 2 setiap monomernya. Pada selulosa terikat gugus hidroksil ($-\text{OH}$), sedangkan pada kitin berupa gugus asetamida ($-\text{NHCOCH}_3$). Kitin merupakan biopolimer alam paling melimpah kedua setelah selulosa. Senyawa kitin atau ((1-4)-N-asetil-D-glukosamin) dapat dipertimbangkan sebagai suatu senyawa turunan selulosa, dimana gugus hidroksil pada atom C-2 digantikan oleh gugus asetamido (Pujiastuti, 2001). Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar 1.



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

Dalam hal kelarutan kitin berbeda dengan selulosa karena kitin merupakan senyawa yang stabil terhadap pereaksi kimia. Kitin bersifat hidrofobik, tidak larut dalam air, alkohol dan hampir semua pelarut organik. Kitin dapat larut dalam asam klorida, asam sulfat dan asam fosfat pekat. Aplikasi kitin yang utama adalah sebagai senyawa pengkelat logam dalam instalasi pengolahan air bersih atau limbah, kosmetik sebagai fungisida dan fungistatik penyembuh luka. Kitin bersifat *biodegradable*, *biocompatible*, *citocompatible*, dan mempunyai bioaktivitas serta daya adsorpsi yang ditentukan oleh sifat biologi dan fisikokimiawinya (Kumirska, *et al.*, 2011).

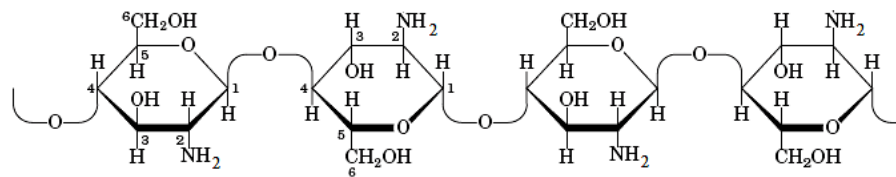
Proses isolasi kitin biasanya terdiri dari demineralisasi, deproteinisasi dan pemutihan (*bleaching*). Dua tahap pertama dapat dilakukan dengan urutan yang sebaliknya atau saling dipertukarkan tergantung kepada pemisahan karotenida dan protein dan penggunaan kitin yang dihasilkan. Kitin yang akan digunakan untuk absorben atau penjerat enzim harus didahului oleh didemineralisasi, karena pemisahan garam akan mengisi dan melindungi struktur materi kitin menjamin deasetilasi polisakarida pada penambahan alkali selama deproteinisasi. Akan tetapi deproteinisasi harus dilakukan lebih dulu untuk memproses cangkang yang sebelumnya telah diekstraksi dengan minyak untuk memisahkan karotenoidnya (Synoweiecky *and* Al-Khateeb, 2003).

B. Kitosan

Kitosan disebut juga dengan β -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, HNO₃, dan H₃PO₄ serta tidak larut dalam H₂SO₄. Kitosan memiliki struktur yang mirip dengan kitin, hanya saja gugus asetilnya telah dihilangkan dengan menggunakan basa kuat. Adanya gugus amina dan hidroksil pada kitosan menjadikan sifatnya lebih aktif dan bersifat polikationik (Murray *et al.*, 2003).

Di alam kitosan banyak terdapat pada dinding sel jamur, terutama pada ordo Mucorales, dimana sebagian besar penyusun komponen dinding selnya adalah kitosan dan pada *Saccharomyces cerevisiae*, kitosan merupakan penyusun utama pada askospora. Struktur kitosan dapat dilihat pada Gambar 2.



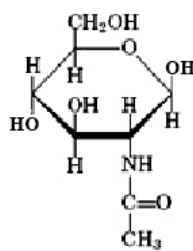
Gambar 2. Struktur kitosan (Murray *et al.*, 2003)

Dewasa ini, kitosan telah banyak digunakan dalam banyak bidang, dalam kosmetik, farmasi, tambahan makanan, dan pertanian (Kannan *et al.*, 2010). Kitosan berfungsi menyerap zat racun, mencegah plak dan kerusakan gigi, membantu mengontrol tekanan darah, membantu menjaga pengayaan kalsium (Ca) atau memperkuat tulang, dan bersifat anti tumor (Shahidi *et al.*, 1999).

C. N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin merupakan komponen dari glikoprotein, proteoglikan, glikosaminoglikan dan komponen penyusun jaringan penghubung lainnya.

Glikosaminoglikan dan glikoprotein berperan sebagai substrat untuk perbaikan jaringan dan reaksi anti-inflamasi (Chen *et al.*, 2010). N-asetilglukosamin atau nama lainnya adalah 2-asetamino-2-deoksi- β -D-glukosa atau 2-(asetilamino)-2-deoksi-D-glukosa memiliki rumus molekul $C_8H_{15}NO_6$ dan bobot molekulnya $221,21 \text{ g mol}^{-1}$. Secara umum, berbentuk serbuk berwarna putih dengan rasa sedikit manis. Titik leleh nya $221 \text{ }^\circ\text{C}$, larut dalam air dan membentuk larutan 1% jernih (Chen *et. al.*, 2010). N-asetilglukosamin atau GlcNac berisi campuran murni 6,9% nitrogen dengan struktur kimia yang sama dengan selulosa yang diganti oleh suatu unit asetil amino ($\text{CH}_3\text{COONH}_2$) (Pasaribu, 2004). Struktur N-asetilglukosamin dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur N-asetilglukosamin (Anonim, 2014)

Produksi GlcNAc dari kitin 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.*, 2002).

Aplikasi N-asetilglukosamin tidak hanya pada terapi osteoarthritis dan anti-inflamasi saja, namun juga pada kosmetik untuk mencegah berpigmentasi, penuaan, dan menjaga elastisitas kulit (Bisset *et al.*, 2007). N-asetilglukosamin berperan penting dalam struktural dan hidrasi pada matriks ekstraseluler beberapa jaringan seperti persendiaan dan kulit baik dermis maupun epidermis. N-

asetilglukosamin juga digunakan sebagai agen pemutih wajah berdasarkan mekanisme penghambatan aktivitas tirosinase, yaitu enzim utama dalam pembentukan melanin di melanosit. Sifatnya yang stabil dibandingkan glukosamin menjadikan N-asetilglukosamin berpotensi untuk dibuat dalam sediaan topikal (Shatalebi *et al.*, 2010).

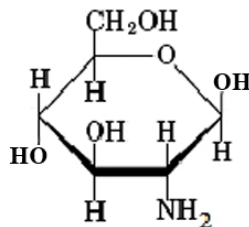
D. Glukosamin

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 *Crustaceae*, *Artropoda*, dan cendawan juga merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai, misalnya dalam industri, glukosamin diproduksi dengan cara hidrolisis rangka luar *crustaceae* atau hirolisis kitin (Shantosh *et al.*, 2007).

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

Glukosamin ditemukan secara luas pada tulang rawan dan memiliki peranan yang sangat penting untuk kesehatan dan kelenturan sendi (EFSA, 2009). Glukosamin

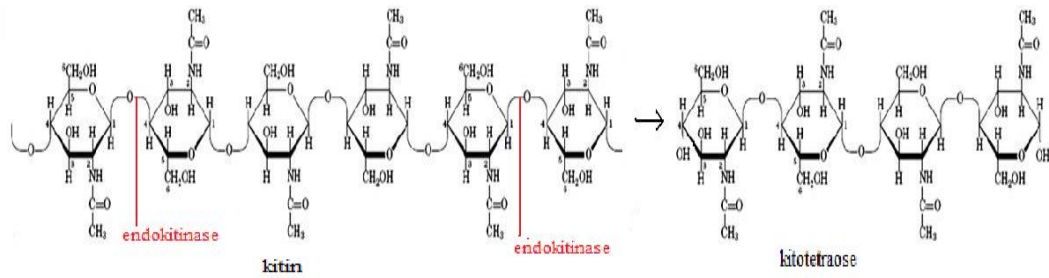
merupakan senyawa alami yang terdapat dalam tubuh manusia yang terdiri dari glukosa dan asam amino glutamin. Selain itu glukosamin adalah unsur pokok dari GAG pada tulang rawan kartilago dan cairan sinovial. Fungsi glukosamin dalam tubuh adalah untuk memproduksi cairan sinovial yang berfungsi sebagai pelumas pada tulang rawan, sehingga pergerakan tulang menjadi baik. Kekurangan cairan sinovial dalam tubuh akan menyebabkan terjadinya gangguan sendi, seperti gerakan sendi yang kaku sehingga akan berakibat terkena penyakit osteoarthritis (Williams, 2004). Struktur glukosamin dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur D-glukosamin (Anonim, 2014)

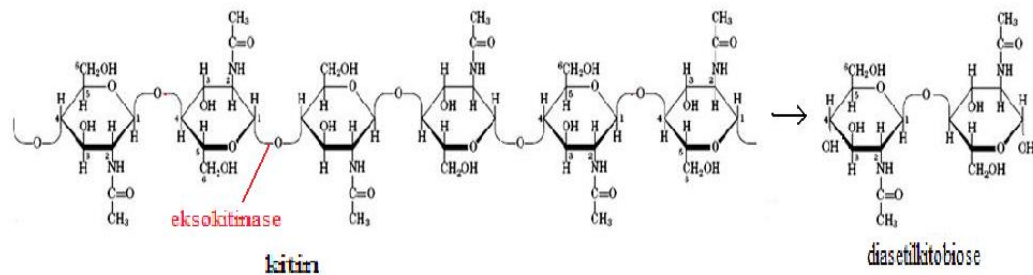
E. Enzim Kitinase

Kitinase (EC 3.2.1.14) merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Atas dasar cara kerjanya dalam mendegradasi substrat, kitinase dibedakan ke dalam 2 kelompok utama, yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin dan menghasilkan dimer, trimer, tetramer dan atau oligomer gula.



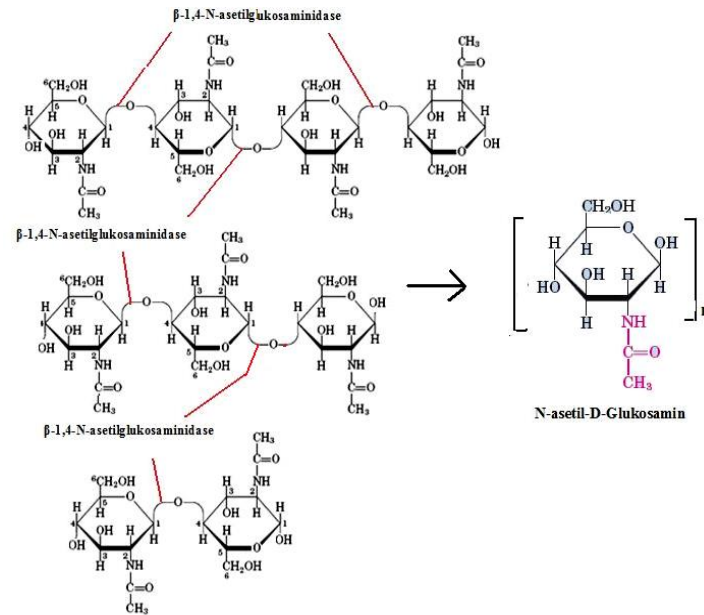
Gambar 5. Reaksi pemutusan ikatan β -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin oleh endokitinase (Suryanto *et al.*, 2005)

Eksokitinase disebut juga kitobiodase atau kitin β -1,4-kitobiodase yang memotong kitin hanya dari ujung non reduksi dan tidak secara acak serta tanpa adanya pembentukan unit-unit monosakarida atau polisakarida.



Gambar 6. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase (Suryanto *et al.*, 2005)

Bila hasil potongan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan β -1,4-N-acetylheksosaminidase, namun bila potongan yang dihasilkan berupa dimer maka enzim tersebut disebut sitobiosidase dan keduanya menghasilkan monomer-monomer GlcNAc (Cohen-Kupiec and Chet, 1998).

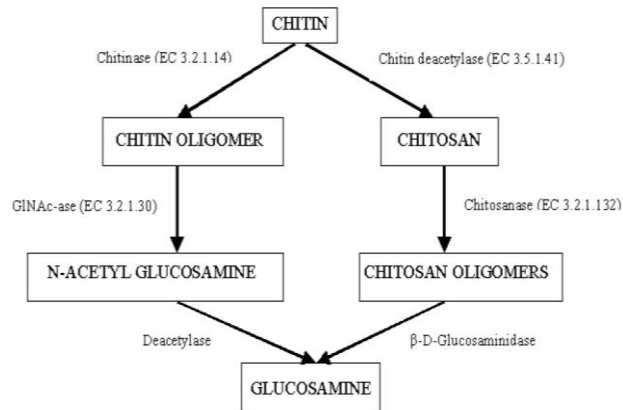


Gambar 7. Reaksi pemutusan diasetilkitobiodase, kitotriose, dan kitotetraose oleh β -1,4-N-acetylheksosaminidase menghasilkan N-asetil-D-glukosamin (Suryanto *et al.*, 2005)

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).

Selain oleh kitinase, polimer kitin juga bisa didegradasi oleh enzim kitin deasetilase dan kitosanase. Kitin deasetilase (EC 3.5.1.41) menghilangkan gugus asetil dari kitin menghasilkan kitosan. Kitosan akan dipotong-potong oleh kitosanase (EC 3.2.1.1.32) menghasilkan kitosan oligomer kitosan. Oligomer

kitosan kemudian dipotong-potong lagi oleh β -D-glukosaminidase menghasilkan monomer glukosamin (Patil *et al.*, 2000).



Gambar 8. Jalur degradasi kitin secara enzimatik (Gooday, 1994)

Actinomycetes, bakteri, dan jamur merupakan organisme yang mampu memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pyrococcus* (Suryanto *et al.*, 2005).

Koloidal kitin merupakan salah satu substrat yang dapat digunakan untuk menginduksi kitinase pada bakteri, jamur, dan *actinomycetes*. Substrat ini mampu menginduksi enzim hidrolitik seperti β -1,4-N-asetilglukosamidase, endokitinase dan kitobiosidase pada *Aeromonas caviae*, *Enterobacter agglomeras*, *Bacillus cereus* (Suryanto *et al.*, 2005).

F. Enzim Kitindeasetilase

Enzim kitin deasetilase terdapat bakteri laut, beberapa jamur dan beberapa serangga, yang mengkatalisis proses deasetilasi kitin, suatu biopolimer struktural yang ditemukan mikroorganisme laut, sel jamur dan dinding spora serta kutikula dan peritrofik matriks serangga (Zhao *et al.*, 2010). Kitin deasetilase pertama kali ditemukan dari ekstrak jamur *Mucor rouxii* (Araki *et al.*, 1975) dan lebih lanjut diketahui bahwa enzim tersebut dikaitkan dengan sintesis dinding sel dengan mengubah kitin menjadi kitosan.

Sampai saat ini sudah banyak dilakukan penelitian mengenai enzim kitin deasetilase. Penelitian ini pada umumnya bertujuan untuk mempelajari sifat-sifat yang dimiliki oleh enzim kitin deasetilase (Zhao *et al.*, 2010), antara lain yaitu:

1. Masa Molekular

Massa molekul untuk sebagian besar kitin deasetilase adalah dalam kisaran 25 sampai 80 kDa.

2. Suhu dan pH Optimum

Menurut hasil yang dilaporkan, pH optimum untuk kitin deasetilase ekstraseluler adalah netral atau dalam kisaran basa 7-12, sementara sebagian kitin deasetilase intraseluler yang nilai pH optimal berada dalam kisaran 4,5-

6. Suhu optimal adalah 50-60 °C.

3. Substrat Spesifik

Caufrier *et al.* (2003) menguji asetil xilan, peptidoglikan dan kitin sebagai substrat untuk kitin deasetilase dari *M. rouxii* dan asetil xilan esterase dari *Streptomyces lividans*. Semua enzim diuji untuk menentukan aktif tidaknya

pada asetil xilan, peptidoglikan, dan kitin. Hasil menunjukkan bahwa enzim kitin deasetilase tidak aktif pada peptidoglikan tetapi aktif pada asetil xilan. Hal ini menjelaskan bahwa baik kitin deasetilase dan asetil xilan esterase memiliki domain katalitik yang sama.

G. Jamur *Mucor miehei*

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

Jamur dapat bersifat sapotrof yaitu dengan mendapatkan nutrisi dari organisme lain yang telah mati, ada juga yang bersifat parasit dengan mengisap nutrisi dari organisme lain yang hidup, atau dengan bersimbiosis mutualisme dengan satu organisme (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 lainnya, seperti protista (Sadava, 2003).

Mucor adalah genus fungi yang berasal dari ordo Mucorales yang merupakan fungi tipikal saprotrop pada tanah dan serasah tumbuhan yang mampu menghasilkan enzim kitindeasetilase pada substrat kitin atau kulit *Crustaceae* dan media cair yang mengandung nutrisi yang diperlukan (Ratledge, 1993). *Mucor* berkembang biak secara aseksual dengan membentuk sporangium yang ditunjang oleh batang yang disebut sporangiofor. Hifa vegetatifnya bercabang-cabang, bersifat senositik dan tidak bersepta. Ciri khas pada *Mucor* adalah memiliki sporangium yang berkolom-kolom atau kolumela (Singleton dan Sainsbury, 2006).

Mucor miehei sebagai salah satu anggota ordo Mucorales mempunyai talus yang berupa miselium yang lebat. Pemiakkan aseksual dilakukan dengan spora tak berflagel (Aplanospora). Aplanospora terbentuk dalam sporangium dan sporangium terletak pada ujung sporangiofor atau pada ujung cabang-cabangnya. Pemiakkan seksual pada Mucorales berlangsung dengan bersatunya dua gametangium yang berinti banyak. Gametangium terbentuk pada ujung hifa atau ujung cabang hifa (Dwidjoseputro, 1976). Berikut ini merupakan taksonomi *Mucor miehei* (Singleton dan Sainsbury, 2006).

Kingdom : Fungi
Divisi : Zygomycota
Kelas : Zygomycetes
Ordo : Mucorales
Famili : Mucoraceae
Genus : *Mucor*
Spesies : *Mucor miehei*

H. Fermentasi Fasa Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

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

- 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 *Trichoderma 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.

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (*submerged*). Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat, atau cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam media cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyangkan dengan *shaker* atau fermentor (Rahman, 1992). Dibandingkan dengan medium padat, medium cair mempunyai beberapa kelebihan (Weites *et al.*, 2001), yaitu sebagai berikut.

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 suatu proses fermentasi tergantung pada jenis organismenya. Pengendalian faktor-faktor fermentasi bertujuan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu organisme tertentu. Fermentasi medium cair lebih memungkinkan untuk mengendalikan faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi, seperti suhu, pH, dan kebutuhan oksigen (Rahman, 1992).

Pada fermentasi skala laboratorium yang menggunakan labu goyang (*shake flask*), pengendalian suhu dapat dilakukan melalui penggunaan inkubator yang dilengkapi dengan *thermostat* pengatur suhu atau menggunakan penangas air (*waterbath*). Penambahan asam atau basa untuk mengatur pH medium pada fermentasi yang menggunakan labu goyang, dilakukan secara manual. Ke dalam medium ditambahkan larutan indikator pH yang akan menunjukkan pada saat diperlukannya penambahan asam atau basa ke dalam medium (Ton *et al.*, 2010).

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan cara fermentasi tertutup (*batch culture*), fermentasi kontinyu, dan fermentasi “*fed batch*”. Pada fermentasi tertutup, setelah inokulasi berjalan tidak dilakukan lagi penambahan medium ke dalam *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, nutrien-nutrien esensial dalam medium semakin berkurang dan terjadi akumulasi autotoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan dan kombinasi dari keduanya. Dengan demikian pada fermentasi tertutup jumlah sel maksimum terletak pada saat fase stationer (Ton *et al.*, 2010).

Menurut Mitchel *et al.* (2006), tahapan proses umum dalam fermentasi *batch* ini antara lain sebagai berikut.

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 dan jamur dengan spora merupakan hasil inokulasi. Tujuannya untuk menciptakan inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.

3. Persiapan wadah

Wadah harus benar-benar bersih dan steril sebelum penambahan substrat dilakukan.

4. Inokulasi

Pengerjaan tahap ini dilakukan dengan penyebaran substrat pada media yang telah steril secara hati-hati.

5. Proses fermentasi *batch*

Sebelum memulai proses ini, hal yang harus diperhatikan adalah 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.

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

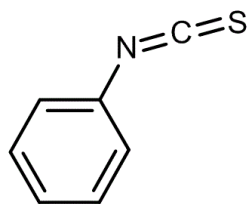
1. Pembuatan minuman beralkohol seperti bir dengan cara sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan.
2. Pembuatan *Yoghurt* dengan cara menfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermopillus*. Bakteri ini akan mengubah laktosa (gula susu) menjadi asam laktat pada kondisi anaerob yang bersifat menggumpalkan kasein.
3. Keju, biasanya menggunakan bakteri dengan spesies *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermopillus*. Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung *cymosin* yang bersifat menggumpalkan kasein.

Selain aplikasi di atas, masih banyak aplikasi yang menghasilkan produk-produk, seperti enzim, pigmem, 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*.

I. *Phenylisothiocyanate (PITC)*

Rumus Kimia	: C ₇ H ₅ NS
Formulasi Kimia	: C ₆ H ₅ NCS
Massa molar	: 135,18 g/mol
Kelarutan dalam air	: 20 °C (tidak larut, penguraian)
Titik leleh	: -21 °C
Densitas	: 1,13 g/cm ³ (20 °C)
Titik didih	: 221 °C
Tekanan uap	: 10 hPa (20 °C)
Titik nyala	: 87 °C
Indeks refraktif	: 1,6497 (20 °C, 589 nm) (Anonim, 2014)



Gambar 9. Struktur fenil isotiosianat (Anonim, 2014)

J. *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

Fourier Transform Infra Red (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. Prinsip kerja dari metode ini adalah sinar yang diserap menyebabkan molekul dari senyawa tergetras dan energi getras diukur oleh detektor serta energi getras dari gugus fungsi tertentu akan menghasilkan frekuensi secara spesifik. Ada dua jenis energi getras yaitu getras *bending* dan getras *stretching*. Getras *bending* yaitu pergerakan atom yang menyebabkan perubahan sudut ikatan antara dua ikatan atom atau pergerakan dari seluruh atom terhadap atom lainnya. Sedangkan getras *stretching* adalah pergerakan atom yang teratur sepanjang sumbu ikatan antara dua atom sehingga jarak antara dua atom dapat bertambah atau berkurang (Samsiah, 2009).

Spektrofotometer FTIR memiliki kesamaan dengan spektrofotometer *Infrared* dispersi hanya saja pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar inframerah 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 frekuensi atau daerah waktu. Perubahan gambaran intensitas gelombang radiasi elektromagnetik dari daerah frekuensi ke daerah waktu atau sebaliknya disebut Transformasi Fourier (*Fourier Transform*). Pada sistem optik peralatan instrumen *Fourier Transform Infrared* memiliki dasar daerah waktu yang non dispersif. Secara keseluruhan, analisis menggunakan spektrofotometer ini lebih unggul dibandingkan spektrofotometer *infrared* dispersi (Hsu, 1994), yaitu:

1. dapat digunakan untuk semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga dapat dilakukan analisis lebih cepat, dan

2. metode spektrometri FTIR memiliki sensitifitas lebih besar dibandingkan cara dispersi, karena radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak tanpa harus melalui celah.

Sebagai contoh, senyawa kitin memberikan data serapan IR pada $\nu = 3448,5 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi ulur NH amida (NH amina) dan OH; $\nu = 2920-2873,7 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi ulur CH, CH₂, dan CH₃; $\nu = 1450,4 \text{ cm}^{-1}$ 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 keluar bidang N-H (Syahmani and Sholahuddin, 2009).

K. Spektrofotometri *Ultraviolet-Visible*

Spektrofotometer terdiri atas spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditranmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blangko ataupun pembandingan (Khopkar, 2002).

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

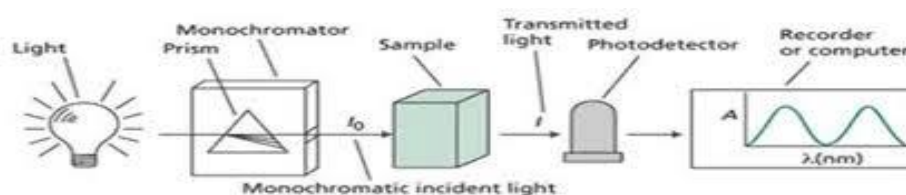
nampak seperti pita absorpsi berlanjut, hal ini dikarenakan gangguan yang besar dari transisi rotasi dan vibrasi pada transisi elektronik memberikan kombinasi garis yang tumpang tindih (*overlapping*) (Hunger and Weitkamp, 2001).

Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. 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 absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).

Untuk mendapatkan hasil pengukuran yang optimum, setiap komponen dari instrumen yang dipakai harus berfungsi dengan baik. Komponen-komponen spektrofotometri UV-Vis meliputi sumber sinar, monokromator, dan sistem optik (Rohman, 2007).

- a. Sebagai sumber sinar; lampu deuterium atau lampu hidrogen untuk pengukuran UV dan lampu tungsten digunakan untuk daerah cahaya 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 dua kompartemen, dan sebagai mana dalam spektrometer berkas ganda (*double beam*), suatu larutan blanko dapat digunakan dalam satu 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.



Gambar 10. Skema kerja spektrofotometri UV-Vis (Anonim, 2014)

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet (Rohman, 2007), yaitu:

1. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum. Untuk memperoleh panjang gelombang serapan maksimum dapat diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara absorpsi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu.

2. Pembuatan kurva kalibrasi

Dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian absorpsi tiap konsentrasi diukur lalu dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorpsi dengan konsentrasi. Kurva kalibrasi yang lurus menandakan bahwa hukum Lambert-Beer terpenuhi.

3. Pembacaan absorbansi sampel

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Hal ini disebabkan karena pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal.

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet dan visibel tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Serapan ultraviolet dan visibel dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Disebabkan karena hal ini, maka serapan radiasi ultraviolet atau terlihat sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi tersebut biasanya antara orbital ikatan antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital yang bersangkutan. Spektrum ultraviolet adalah gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmitasi atau absorbansi). Sering juga data ditunjukkan sebagai gambar grafik atau tabel yang menyatakan panjang gelombang lawan serapan molar atau log dari serapan molar, E_{\max} atau $\log E_{\max}$ (Sastrohamidjojo, 2001).

Spektrofotometer UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan pelarut yang dipakai (Mulja dan Suharman, 1995), antara lain:

1. Pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna.

2. Tidak berinteraksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
3. Kemurniannya harus tinggi untuk analisis.

L. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Kromatografi dapat didefinisikan sebagai pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi antara dua atau lebih fase terlarut. Contoh beberapa fase terlarut diantaranya adalah gas-cair, gas-padat, cair-cair, cair-padat, gas-cair-padat, dan cair-cair-padat. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas (*gas chromatography*) dan kromatografi cair (*liquid chromatography*) (Harmita, 2006).

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 (Gritter *et al.*, 1991).

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

Cara yang praktis dan efisien untuk menganalisis glukosamin adalah dengan HPLC yang dilengkapi dengan ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*). Metode HPLC dengan menggunakan evaporasi detektor hamburan cahaya (ELSD) dapat meningkatkan sensitifitas, 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 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 (Gritter *et al.*, 1991). Adapun keunggulan dari ELSD, yaitu:

1. Sensitivitas tinggi yang memberikan respon 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* pemograman 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. *Reproducibilitas* 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.

Kondisi HPLC untuk identifikasi glukosamin menggunakan detektor ELSD, kolom karbohidrat ES, 5m, 150 x 4,6 mm, fasa gerak adalah asetonitril:air (65:35) yang merupakan campuran pelarut polar, dan laju alir 1,0 mL/menit (Jacyno and Dean, 2004).