

II. TINJAUAN PUSTAKA

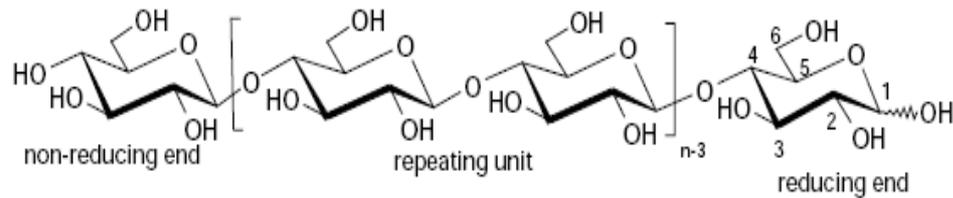
A. Selulosa

Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman. Kandungan selulosa pada dinding sel tanaman tingkat tinggi sekitar 35-50% dari berat kering tanaman (Saha, 2004). Selulosa merupakan polimer glukosa dengan ikatan β -1,4 glukosida dalam rantai lurus. Bangun dasar selulosa berupa suatu selobiosa yaitu dimer dari glukosa. Rantai panjang selulosa terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen dan gaya van der Waals (Perez *et al.* 2002).

Selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian berkrystal dan sisanya bagian amorf (Aziz *et al.*, 2002). Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain seperti lignin dan hemiselulosa. Selulosa terdapat dalam tumbuhan sebagai bahan pembentuk dinding sel dan serat tumbuhan. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang. Adanya lignin serta hemiselulosa di sekeliling selulosa merupakan hambatan utama untuk menghidrolisis selulosa (Sjostrom, 1995).

Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan dan mempunyai massa molekul relatif yang sangat tinggi, tersusun dari 2.000-3.000 glukosa.

Rumus molekul selulosa adalah $(C_6H_{10}O_5)_n$. Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman yaitu senyawa polimer glukosa yang tersusun dari unit-unit β -1,4-glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-D-glikosida (Han *et al.*, 1995).



Gambar 1. Struktur Kimia Selulosa (Sixta, 2006).

Ikatan β -1,4 glukosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis asam atau enzimatik. Kesempurnaan pemecahan selulosa pada saluran pencernaan ternak tergantung pada ketersediaan enzim pemecah selulosa yaitu selulase. Saluran pencernaan manusia dan ternak non ruminansia tidak mempunyai enzim yang mampu memecah ikatan β -1,4 glukosida sehingga tidak dapat memanfaatkan selulosa. Ternak ruminansia dengan bantuan enzim yang dihasilkan mikroba rumen dapat memanfaatkan selulosa sebagai sumber energi. Pencernaan selulosa dalam sel merupakan proses yang kompleks yang meliputi penempelan sel mikroba pada selulosa, hidrolisis selulosa dan fermentasi yang menghasilkan asam lemak.

Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tidak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yaitu selobiosa (Fan dkk, 1982). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan media air dan dibantu dengan katalis asam atau enzim.

Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi menjadi menjadi produk fermentasi yang nantinya dapat diolah lagi menjadi etanol.

B. Enzim

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

Menurut Poedjadi (1994), enzim merupakan protein dengan struktur tiga dimensi yang kompleks yang aktif di bawah kondisi khusus dan hanya dengan substrat spesifik. Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim merupakan produk protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel.

Enzim merupakan katalisator sejati yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik dengan nyata, tanpa enzim, suatu reaksi kimia akan berlangsung amat lambat. Enzim tidak dapat mengubah titik kesetimbangan reaksi yang dikatalisisnya; enzim juga tidak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi tersebut (Lehninger, 1982).

C. Enzim Selulase

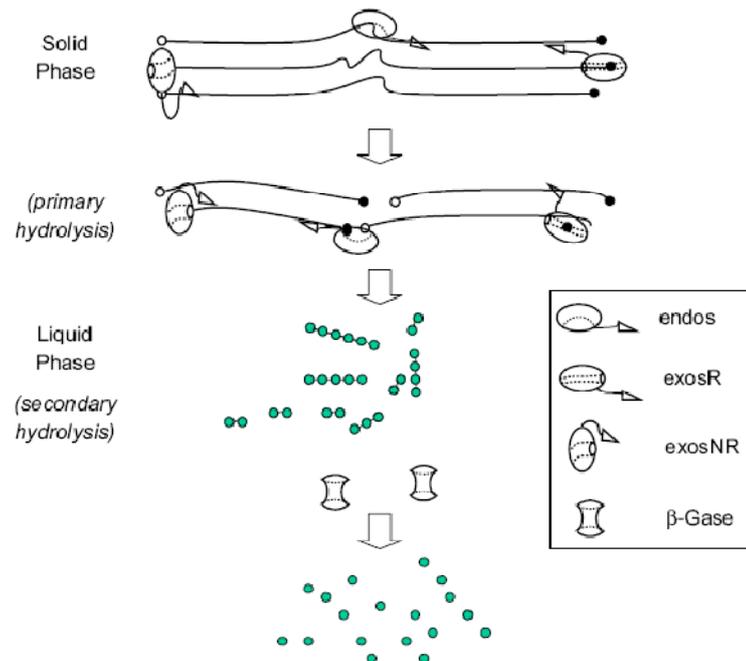
Enzim selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang bekerja bersama untuk hidrolisis selulosa. Mikroorganisme tertentu menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Partikel inilah yang akan terdisintegrasikan menjadi enzim-enzim, yang secara sinergis mendegradasi selulosa (Belitz dkk, 2008).

Menurut Salam dan Gunarto (1999), selulase merupakan enzim yang dapat memutuskan ikatan glukosida β -1,4 di dalam selulosa. Dalam menghidrolisis senyawa selulosa, kemampuan selulase sangat bergantung pada substrat yang digunakan.

Enzim selulase merupakan salah satu kelompok enzim yang termasuk dalam suatu sistem yang diproduksi mikroorganisme dalam degradasi material sel tumbuhan. Enzim ini termasuk dalam famili glikosil hidrolase. Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan β -1,4-D-glikosida untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Berdasarkan aktivitasnya terhadap berbagai substrat, selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe, yaitu endoglukanase (*endo- β -1,4-glucanase*, EC 3.2.1.4), β -glukosidase (*β -D-glucoside glucohydrolase*, EC 3.2.1.21) dan selobiohidrolase atau eksoglukanase (*exo- β -1,4-glucanase*, EC 3.2.1.91) (Zhang *et al.*, 2006; Doi *et al.*, 2003).

Endoglukanase menghidrolisis ikatan internal β -1,4-D-glikosida secara random pada situs amorf dari rantai polisakarida selulosa untuk menghasilkan oligosakarida dan menambah ujung rantai yang baru, eksoglukanase menghidrolisis selulosa dengan memotong rantai selulosa pada ujung untuk

menghasilkan selobiosa atau glukosa sebagai produk utama, dan glikosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa untuk mengeliminasi penghambatan selobiosa (Gambar 2).



Gambar 2. Skema hidrolisis selulosa oleh sistem selulase non-kompleks (Zhang *et al.* 2006).

Fungsi terpenting dari enzim adalah kemampuannya menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH serta temperatur (Lehninger, 1982).

D. Hidrolisis

Hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa, yaitu: selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya (glukosa & xilosa). Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentosa (C5) dan heksosa (C6). Secara umum teknik hidrolisis dibagi menjadi dua, yaitu: hidrolisis dengan enzim dan hidrolisis dengan asam.

1. Hidrolisis Enzim

Hidrolisis enzim merupakan proses penguraian suatu polimer yang kompleks menjadi monomer penyusunnya dengan menggunakan enzim (Perez *et al.*, 2002). Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral), berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Tahezadeh & Karimi, 2008) (Hamelinck *et al.*, 2005). Beberapa kelemahan dari hidrolisis enzimatis antara lain adalah membutuhkan waktu yang lebih lama, dan kerja enzim dihambat oleh produk. Di sisi lain harga enzim saat ini lebih mahal daripada asam sulfat, namun demikian pengembangan terus dilakukan untuk menurunkan biaya dan meningkatkan efisiensi hidrolisis maupun fermentasi (Sanchez *and* Cardona, 2007).

2. Hidrolisis asam

Di dalam metode hidrolisis asam, biomassa lignoselulosa dipaparkan dengan asam pada suhu dan tekanan tertentu selama waktu tertentu dan menghasilkan monomer gula dari polimer selulosa dan hemiselulosa. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat (H_2SO_4), asam perklorat, dan HCl. Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam (Taherzadeh *and* Karimi, 2008). Hidrolisis asam dapat dikategorikan melalui dua pendekatan umum, yaitu hidrolisis asam konsentrasi tinggi pada suhu rendah dan hidrolisis asam konsentrasi rendah pada suhu tinggi. Pemilihan antara dua cara tersebut pada umumnya didasarkan pada beberapa hal yaitu laju hidrolisis, hasil total hidrolisis, tingkat degradasi produk dan biaya total proses produksi (Kosaric *et al.*, 1983).

E. Actinomycetes

Actinomycetes merupakan mikroorganisme tanah yang umum dijumpai pada berbagai jenis tanah. Populasinya berada pada urutan kedua setelah bakteri, bahkan kadang-kadang hampir sama (Alexander, 1961; Elberson *et al.*, 2000).

Actinomycetes hidup sebagai saprofit dan aktif mendekomposisi bahan organik sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah (Nonomura *and* Ohara, 1969).

Actinomycetes merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa di samping bakteri, kapang, dan khamir (Abe *et al.*, 1979; Nakase *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1996).

Jenis *Actinomycetes* tergantung pada tipe tanah (Davies and Williams, 1970), karakteristik fisik, kadar bahan organik, dan pH lingkungan (Xu *et al.*, 1996). Jumlah *Actinomycetes* meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami dekomposisi (Nonomura and Ohara, 1971).

Actinomycetes merupakan genus bakteri yang filamentous yang membentuk miselia, bersifat gram positif, dan sebagian besar membentuk spora.

Actinomycetes adalah mikroorganisme peralihan antara bakteri dan jamur karena mikroorganisme ini mempunyai sifat-sifat seperti bakteri dan jamur. Oleh sebab itu, lingkungan yang menjadi habitat bagi bakteri dan jamur adalah lingkungan yang tepat bagi kelangsungan hidup *Actinomycetes*. Sehingga *Actinomycetes* tersebar luas di alam (Paul and Clark, 1989).

Walaupun *Actinomycetes* dikatakan sebagai mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi (Alexander, 1977), 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. 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.

Umumnya, *Actinomycetes* tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0 (Jiang dan Xu, 1985; Jiang *et al.*, 1988). Rentang pH yang cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* ini sekitar 6,5–8,0 dan 25-30⁰C (Nonomura and Ohara, 1971; Alexander, 1961). Temperatur yang cocok untuk pertumbuhan

Actinomycetes adalah 25-30°C, tetapi ada beberapa *Actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55–65⁰C seperti *Streptomyces* dan *Thermoactinomycetes* (Rao, 1994).

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, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCO₃, FeSO₄.7H₂O, inkubasi biasanya selama 2-7 hari (Fithria, 2007).

Berdasarkan klasifikasinya, *Actinomycetes* termasuk kelas *Schizomycetes*, ordo *Actinomycetales* yang dikelompokkan menjadi empat familia, yaitu:

Mycobacteriaceae, *Actinomycetaeaceae*, *Streptomyceae* dan *Actinoplanaceae*.

Genus yang paling banyak dijumpai adalah *Streptomyces* (hampir 70%), *Nocardia*, dan *Micronospora*. Koloni *Actinomycetes* muncul perlahan, menunjukkan konsistensi berbutuk dan melekat erat pada permukaan media. Pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan adanya miselium ramping bersel satu yang bercabang membentuk spora aseksual untuk perkembang biakannya (Lechevalier dan Lechevalier, 1967; Nonomura dan Ohara, 1971).

Beberapa spesies dari genus *Actinomycetes* memiliki peranan penting dalam mendekomposisi beberapa jenis polimer dan kemampuan kapasitas biodegradasi makromolekul ini didukung oleh produksi enzim ekstraseluler yang beragam (Wendishch dan Kutzner, 1992; Ramachandra *et al.*, 1987; Yamac dan Tamer, 2008).

F. Fermentasi Fase Padat (*Solid State Fermentation* / SSF)

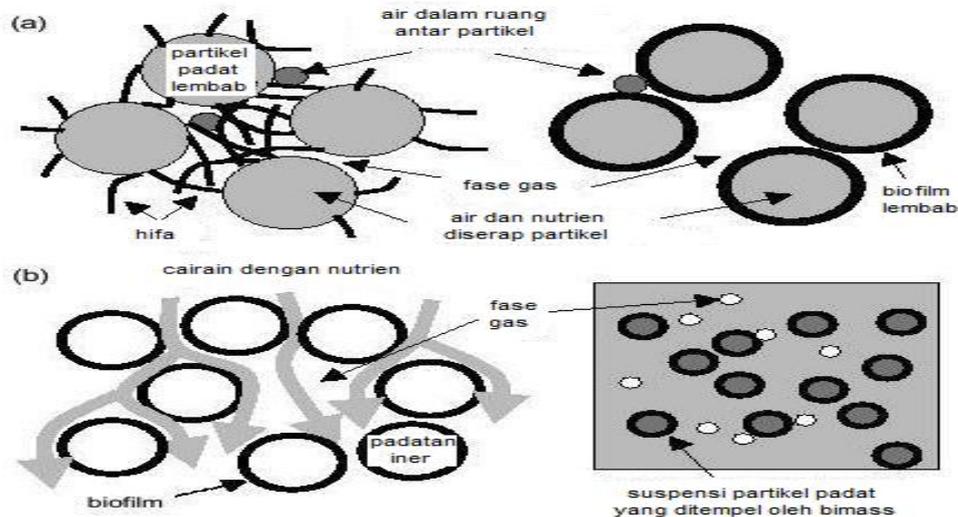
Fermentasi pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk bergantung dari permukaan pada substrat padat. Substrat tradisional yang dapat digunakan dalam fermentasi berupa hasil produk agrikultur seperti beras, tepung, maisena, tebu, dan lain-lain. Substrat tersebut mendukung organisme miselium untuk tumbuh pada konsentrasi nutrisi yang tinggi, dan menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler seperti sejumlah filamen jamur dan beberapa bakteri (*Actinomyces* dan satu strain dari *Bacillus*) (Pandey *et al.*, 2008).

Fermentasi fase padat atau sering disebut *Solid State Fermentation* (SSF) pertama kali dikenalkan oleh Takagi *et al.*, (1977), yang telah berhasil mengkombinasikan enzim selulase dan yeast *Sacharomyces cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol. Fermentasi fase padat dapat didefinisikan sebagai proses fermentasi yang melibatkan zat padat dalam suatu fasa cair (Moo-Young *et al.*, 1983). Proses SSF sebenarnya hampir sama dengan proses hidrolisis dan proses fermentasi, tetapi proses hidrolisis dan fermentasi pada SSF dilakukan dalam satu tempat. Proses SSF membutuhkan bahan mentah alami sebagai sumber karbon dan bahan inert sebagai matriks padatan. Substrat padat (matrik) harus cukup akan kelembaban dan memiliki area permukaan substrat yang lebar.

Berdasarkan dari sifat fisik Fermentasi Fase Padat dibagi menjadi dua kelompok, antara lain:

1. Fermentasi padatan dengan kelembaban rendah atau dengan agitasi berkala.

2. Fermentasi padatan tersuspensi dalam kolom dengan sirkulasi larutan. Jamur yang digunakan biasanya aerob obligat.



Gambar 3. Proses Fermentasi Fase Padat.

Konsentrasi air sebagai moisture (pelembab) sangat menentukan jalannya fermentasi padat. Perubahan partikel padat yang lembab dan fase gas dalam sistem Fermentasi Fase Padat melibatkan hifa dan organisme uniseluler yang di tunjukkan oleh Gambar 3a. Sedangkan sistem lain yang melibatkan pertumbuhan pada zat padat, tetapi tidak didefinisikan sebagai Fermentasi Fase Padat selama jumlah air antara partikel besar (Moo-Young *et al.*, 1983).

1. Proses Fermentasi Fase Padat

Mitchel *et al.* (2006) juga menjelaskan tahapan-tahapan proses Fermentasi Fase Padat secara umum, antara lain:

- 1.1. Persiapan Substrat, dimana substrat harus dipotong, digiling, dipecahkan, atau dibuat menjadi butiran kecil. Dengan penambahan air

dan nutrisi disebut dengan pra-perawatan substrat untuk menambah ketersediaan gizi.

- 1.2. Persiapan Inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses fermentasi fase padat melibatkan hifa khamir, maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.
- 1.3. Persiapan Wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu disterilkan sebelum penambahan substrat.
- 1.4. Inokulasi dan Pengerjaan, pengerjaan tahapan ini dengan menyebarkan substrat pada media yang telah disterilkan secara hati-hati untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.
- 1.5. Proses Fermentasi Fase Padat, pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi, kelembaban.
- 1.6. Kultivasi, pada tahapan ini memerlukan bantuan mekanis untuk memisahkan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

2. Keuntungan Fermentasi Fase Padat

Fermentasi fase padat memiliki beberapa keuntungan, 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.

3. Aplikasi Fermentasi Fase Padat

Holker *et al.*, (2004) dan Pandey (2000) menguraikan beberapa aplikasi dari SSF secara tradisional yang digunakan oleh banyak negara, antara lain :

- 1.1. Tempe, dimana tempe melibatkan kultivasi dari khamir *Rhizopus oligosporus* pada kedelai yang direbus, kemudian digoreng dan dimakan sebagai pengganti daging. Makanan fermentasi ini sangat terkenal di Indonesia.
- 1.2. Tahapan *koji* dalam pembuatan kecap yang melibatkan kultivasi dari khamir *Aspergillus oryzae* dalam kedelai rebus. Proses SSF 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.
- 1.3. “*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, lebih dari tiga dekade banyak ketertarikan pada proses teknologi SSF. Kebanyakan dari aplikasi tersebut menghasilkan produk-produk seperti enzim, pigmen, senyawa aromatik, senyawa kimia, antibiotik, dan agen pengontrol biologis. Selain itu banyak aplikasi penggunaan mikroorganisme

dalam SSF sebagai bagian dari proses perantara, yaitu pewarnaan zat warna, *biobleaching*, *biopulping*, dan *bioremediation*.

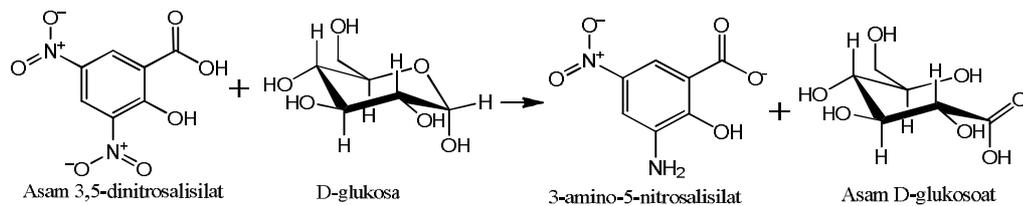
G. Analisis Gula Reduksi

Gula reduksi hasil hidrolisis asam dapat dianalisis secara kualitatif untuk mengidentifikasi apakah sampel mengandung gula reduksi atau tidak dan secara kuantitatif untuk menentukan kadar gula reduksi yang terbentuk. Untuk maksud tersebut, analisis gula reduksi secara kualitatif dapat dilakukan dengan uji Benedict, uji Fehling, uji Barfoed, uji Tollens, dan uji Molisch (Mathews, 2000).

Analisis gula reduksi secara kuantitatif dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain dengan metode Luff Schoorl (Kowalski *et al.*, 2013), Nelson-Somogyi (Woiciechowski *et al.*, 2002) dan DNS (Lone *et al.*, 2012). Metode DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi. Dalam metode DNS digunakan reagen dinitro salisilat (DNS). Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk membuat reagen DNS adalah asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan akuades. DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 540 nm (Adney *and* Baker, 2008). Semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Reaksi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Reaksi antara DNS dengan glukosa adalah sebagai berikut :



Gambar 4. Reaksi glukosa dengan DNS.

Sampel yang telah direaksikan dengan DNS selanjutnya ditentukan kadar gula reduksinya menggunakan spektrofotometer UV-vis. Spektrofotometer UV-vis adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV menggunakan lampu Hidrogen atau Deuterium dan sumber cahaya tampak menggunakan lampu Tungsten. Larutan sampel yang akan dianalisis diukur absorbansi sinar ultra violet atau sinar tampaknya. Konsentrasi larutan sampel yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis ini didasarkan pada Hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi zat dalam

larutan. Secara sistematis, Hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dengan persamaan berikut.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A = absorbansi

T = transmitansi

I_0 = intensitas cahaya masuk

I_t = intensitas cahaya yang diteruskan oleh larutan sampel

ϵ = absorbtivitas molar ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b = ketebalan lapisan larutan sampel (panjang jalur absorpsi) (cm)

c = konsentrasi sampel (mol L^{-1})

Agar dapat menentukan kadar gula reduksi pada sampel, terlebih dahulu dibuat kurva standar menggunakan larutan glukosa. Kurva standar dibuat dengan mengalurkan absorbansi pada panjang gelombang 540 nm dengan konsentrasi larutan standar (Adney *and* Baker, 2008). Dari kurva standar tersebut akan didapatkan persamaan garis, yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dengan persamaan umum:

$$y = ax + b, \text{ dimana } y \text{ merupakan absorbansi, } a \text{ merupakan slope, } x$$

merupakan konsentrasi sampel, dan b merupakan intersep. Dengan mensubstitusi nilai absorbansi sampel ke persamaan tersebut dan kemudian diplotkan terhadap kurva standar, maka dapat diketahui konsentrasi atau kadar gula reduksi pada sampel.

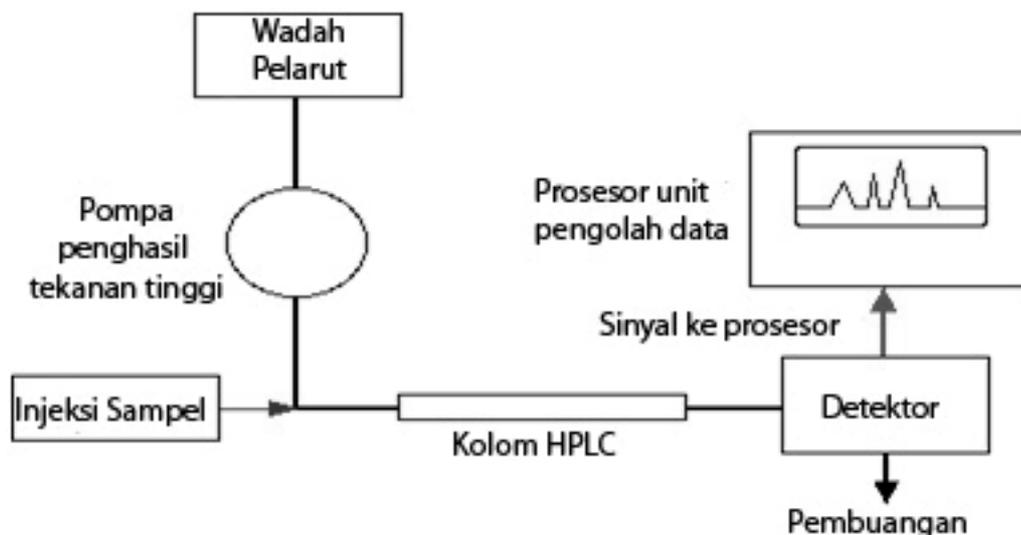
H. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Pressure Liquid*

Chromatography (HPLC) adalah salah satu metode kimia dan fisikokimia.

KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cairan dan fase diam cairan atau padat. KCKT merupakan suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair untuk pemisahan sekaligus untuk analisis senyawa berdasarkan kekuatan atau kepolaran fasa geraknya.

Berdasarkan polaritas relatif fasa gerak dan fasa diamnya, KCKT dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar sehingga fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam dan fasa terbalik yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa polar, menggunakan fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter dkk, 1991). Prinsip pemisahan senyawa menggunakan KCKT adalah perbedaan distribusi komponen diantara fasa diam dan fasa geraknya. Semakin lama terdistribusi dalam fasa diam maka semakin lama waktu retensinya (Clark, 2007).



Gambar 5. Diagram alat HPLC (Clark, 2007).

Pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) efisiensi waktu dan tingkat kemurnian senyawa yang akan diisolasi dapat dilakukan dengan cepat dan maksimal. Hal ini terkait dari beberapa kelebihan dari teknik KCKT yang digunakan (Johnson dan Stevenson, 1991; Snyder *and* Kirkland, 1979).

Kelebihan itu antara lain :

- a. Cepat : waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit, bahkan untuk analisis yang tidak rumit (uncomplicated) dapat dicapai waktu kurang dari 5 menit.
- b. Resolusi : berbeda dengan kromatografi gas (KG), kromatografi cair mempunyai dua fasa dimana interaksi selektif dapat terjadi. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fasa diam dan fasa gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.
- c. Sensitivitas detektor : detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari

bermacam-macam zat. Detektor-detektor Fluorosensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi sampai picogram (10⁻¹² gram). Dan beberapa detektor lain juga dapat digunakan dalam KCKT seperti spektrofotometer massa, Indeks refraksi, ELSD dan lain sebagainya.

- d. Kolom yang dapat digunakan kembali : Berbeda dengan kolom kromatografi klasik, kolom KCKT dapat digunakan kembali. Hal ini disebabkan karena keseluruhan sampel yang disuntikkan kedalam kolom dapat terdorong keluar oleh tekanan yang tinggi.
- e. Mudah rekoverti sampel : umumnya detektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) terhadap komponen sampel yang dianalisis, oleh karena itu sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Pelarutnya dapat dihilangkan dengan cara menguapkannya.

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan salah satu metode pemisahan yang memanfaatkan teknologi dalam proses pemisahan suatu senyawa campuran atau suatu analit.

Secara umum metoda kromatografi cair kinerja tinggi mempunyai prinsip kerja yang sama seperti kromatografi kolom, dimana proses pemisahan senyawa terjadi akibat adanya keseimbangan distribusi antara zat terlarut (sampel) yang di adsorpsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom. Hal yang membedakan sistem kromatografi ini adalah proses pemisahan komponen sampel di dalam kolom dilakukan pada sistem tekanan tinggi dengan tingkat ukuran partikel fasa diam yang diperkecil dan tingkat sensitifitas pemisahan dapat

menggunakan beberapa macam detektor yang dapat diganti. Metode kromatografi kinerja tinggi sangat efisien untuk memisahkan campuran senyawa yang memiliki sifat yang hampir sama.