

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang

Udang termasuk hewan kelas Crustacea yang terdiri atas tiga bagian tubuh, yaitu kepala, dada, dan perut (Darmono, 1995). Sebagian besar udang yang dihasilkan, diekspor ke luar negeri dalam bentuk udang beku yang telah dihilangkan kulitnya. Selama ini kulit udang tersebut hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak mengingat kandungan proteinnya masih cukup tinggi (Elsawati, 1994).

Kulit udang mengandung protein (25% - 40%), kalsium karbonat (45% - 50%), dan kitin (15% - 20%), tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udangnya (Foucher *et al.*, 2009). Hal ini menyebabkan limbah kulit udang berpotensi sebagai bahan baku dalam memproduksi kitin. Selain itu, besarnya kandungan protein dan mineral ini dapat menurunkan kualitas dari kitin, sehingga dalam pemurnian kitin komponen tersebut perlu dihilangkan.

Komponen-komponen tersebut perlu dihilangkan untuk menghasilkan produk kitin yang bermutu tinggi sehingga molekul-molekulnya menjadi lebih halus (Rohani, 2000).

B. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan organisme tanah yang 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 mitokondrin, mengandung ribosom 70s, tidak mempunyai pembungkus nukleus, garis tengah selnya berkisar dari 0,5-2,0 μm , dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Volk dan Wheeler, 1993; Rao, 1994).

Actinomycetes tersebar luas di lingkungan dan memegang peranan penting dalam proses siklus karbon karena kemampuannya tumbuh pada konsentrasi senyawa berkarbon rendah (Rifaat, 2003). *Actinomycetes* memiliki habitat yang cukup luas antara lain ditemukan pada tanah, kompos, padang rumput, tanah hutan, sedimen, lumpur (Augustine *et al.*, 2006; Lee dan Hwang, 2002; Xu *et al.*, 1996; Badji *et al.*, 2006)); pada daerah perakaran tanaman (Nishimura *et al.*, 2002); atau di perairan laut (Takizawa *et al.*, 1993). *Actinomycetes* dapat berkembang biak dengan spora, khlamidospora, tunas, secara fragmentasi dan segmentasi. Cara hidupnya ada yang bersifat saprofit, simbiosis, dan beberapa sebagai parasit. Pada media agar, koloni *Actinomycetes* dapatdapat dibedakan dari koloni bakteri yang biasanya tumbuh cepat dan berlendir. Koloni *Actinomycetes* tumbuh lambat, berbukuk yang melekat pada permukaan agar dan penampakannya berbeda dari jamur yang berserabut seperti kapas. Pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan adanya miselium panjang yang bercabang dengan diameter hifa kurang dari 1 μm (Subbarao, 1994).

Actinomycetes memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer gula, asam amino dan asam gula seperti dinding sel bakteri Gram positif. Sedangkan dinding sel fungsi terdiri dari selulosa dan kitin. Walaupun *Actinomycetes* dikatakan sebagai mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi, 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 (Alexander, 1997).

Actinomycetes menyerupai fungi karena mempunyai hifa bercabang dengan membentuk miselium. Miselium tumbuh menjulang ke udara, dan memisah dalam fragmen-fragmen yang pendek sehingga terlihat cabang pada bakteri (Sutedjo *et.al* 1991). *Actinomycetes* mempunyai kesamaan dengan bakteri yaitu struktur sel dan ukuran irisan melintang (Foth, 1991).

Menurut Rao (1994), pada lempeng agar, *Actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dari bakteri, dimana koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *Actinomycetes* muncul perlahan dan berbubuk serta melekat erat pada permukaan agar. Koloni *Actinomycetes* biasanya keras, kasar, dan tumbuh tinggi diatas permukaan medium. Umumnya, *Actinomycetes* tidak toleransi terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0. Rentang pH dan temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* ini sekitar 6,5-8,0 dan 25-30°C. Namun, ada beberapa *Actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55-65°C seperti *Thermoactinomycetes* dan *Streptomyces*.

Medium yang baik untuk menumbuhkan *Actinomycetes* adalah medium yang mengandung glukosa, gliserol atau tepung sebagai sumber karbon; nitrat atau kasein sebagai sumber nitrogen dan mineral-mineral tertentu seperti NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$, dan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Inkubasi biasanya selama 2-7 hari (Jutono, 1995). Populasi *Actinomycetes* di alam dipengaruhi oleh beberapa factor seperti kandungan organik, pH, kelembapan, temperatur, musim, dan lain-lain (Suwandi, 1989).

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

1. Miselium vegetatif

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

2. Miselium udara (*aerial*)

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

Actinomyces ialah salah satu mikroorganisme kitinolitik yang dapat menghasilkan enzim kitinase. Enzim ini dapat menghidrolisis kitin menghasilkan monomernya dengan reaksi enzimatik. Penelitian Anggraini (2010) menguji isolat *Actinomyces* yang memiliki indeks kitinolitik terbesar dari beberapa isolat *Actinomyces* yang lain (Tabel 1) ialah *Actinomyces* ANL-4, ini ditentukan berdasarkan rasio diameter zona bening yang dihasilkan terhadap diameter koloni. Berikut ini indeks kitinolitik isolat *Actinomyces* yang memiliki aktivitas kitinolitik :

Tabel 1. Indeks kitinolitik *Actinomyces* yang diisolasi dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (cm)	Diameter Koloni (cm)	Indeks Kitinolitik
ANL-12	2,3	1,2	1,9
ANL-9	1,0	0,5	2,0
ANLd-2b-3	0,7	0,3	2,3
ANL-4	0,5	0,1	5,0

C. Enzim

Enzim adalah protein yang mengkatalisa reaksi kimiawi spesifik. Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim-substrat yang bersifat sementara, yang terurai membentuk enzim bebas dan produknya. Bekerja dengan urutan yang teratur, enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul

nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi, dan yang membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana. Diantara sejumlah enzim yang berpartisipasi didalam metabolisme, terdapat sekelompok khusus yang dikenal sebagai enzim pengatur, yang dapat mengenali berbagai isyarat metabolik dan mengubah kecepatan katalitiknya sesuai dengan isyarat yang diterima.

Melalui aktivitasnya, sistem enzim terkoordinasi dengan baik, menghasilkan suatu hubungan yang harmonis di antara sejumlah aktivitas metabolik yang berbeda, yang diperlukan untuk menunjang kehidupan (Lehninger, 1982). Enzim akan terdenaturasi pada suhu tinggi dan kondisi ekstrim lainnya seperti tinggi rendahnya pH atau tekanan, (Suhartono, 1989).

Enzim berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel (Poedjiadi, 1994). Lehninger (1982) menambahkan bahwa enzim adalah katalisator sejati. Molekul ini meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik yang tanpa enzim akan berlangsung amat lambat. Enzim tak dapat mengubah kesetimbangan reaksi yang dikatalisisnya; enzim juga tak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi ini.

Menurut Manitto (1981), bahwa tiga sifat utama dari biokatalisator yaitu : dapat menaikkan kecepatan reaksi, memiliki kekhususan dalam reagen dan produk, dapat mengontrol kinetika reaksi.

Enzim yang diperoleh dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, tidak memerlukan lahan yang luas, biaya produksi relatif murah dan mudah dikontrol (Maggy, 1989).

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

Protein adalah bagian utama enzim yang dihasilkan sel, maka semua yang dapat mempengaruhi protein dan sel akan berpengaruh terhadap reaksi enzimatik.

Beberapa faktor penting yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a) Substrat (reaktan)

Pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi yang terjadi rendah. Kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi setelah peningkatan substrat lebih lanjut akan tercapai suatu laju maksimum.

Pada keadaan substrat yang berlebih akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga sebagian besar substrat tidak diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi.

b) Suhu

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu meningkat, maka laju reaksi juga akan meningkat. Karena enzim adalah protein, maka semakin tinggi suhu mengakibatkan proses enzim tidak aktif meningkat. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu di atas 50°C.

c) Derajat keasaman (pH)

Reaksi suatu enzim dipengaruhi oleh perubahan pH karena akan berakibat langsung terhadap sifat ion dari gugus-gugus amino dan karboksilat, sehingga akan mempengaruhi bagian aktif enzim dan konformasi dari enzim. pH yang

terlalu rendah atau terlalu tinggi akan mengakibatkan denaturasi dari protein enzim.

d) Penghambat enzim (inhibitor)

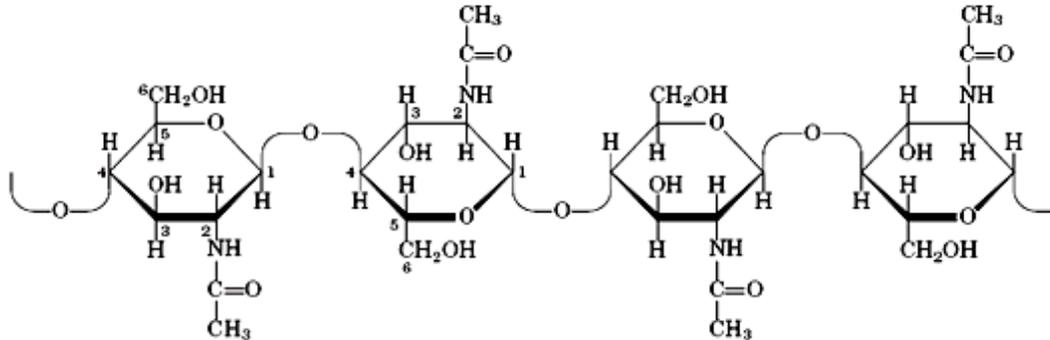
Inhibitor dapat meminimalkan kerja enzim karena akan membentuk ikatan dengan sisi aktif enzim sehingga mengganggu proses pembentukan dan kestabilan ikatan kompleks enzim substrat. Ada beberapa cara penghambatan enzim, seperti penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (feed back inhibitor), dan penghambat alosterik (Lehninger, 1982).

D. Kitin

Kitin merupakan senyawa biopolimer berantai panjang dan tidak bercabang. Tiap rantai polimer terdiri dari 2000 hingga 5000 unit monomer yang terpaut melalui ikatan β -1,4 glikosida. Unit monomer kitin mempunyai rumus molekul $C_{18}H_{12}O_5$ dengan kadar C, H, N, O berturut-turut 47%, 6%, 7% dan 40% (Bastaman, 1989). Kitin mempunyai rumus empiris $(C_6H_9O_4.NHCOCH_3)_n$ dan merupakan zat padat yang tidak larut dalam air, pelarut organik, alkali pekat, asam mineral lemah tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat. Polisakarida ini mempunyai berat molekul tinggi dan merupakan polimer berantai lurus dengan nama lain β -(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa (N-asetil-D-Glukosamin) (Suryanto *et al.*, 2005).

Struktur kitin sama dengan selulosa, yaitu ikatan yang terjadi antara monomernya terangkai dengan glukosida pada posisi β -1,4. Perbedaannya dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua, pada kitin

digantikan dengan gugus asetamina (- COCH₃), sehingga kitin dapat menjadi polimer berunit N-Asetil glukosamin.



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

Menurut Stephen (1995), kitin merupakan padatan amorf berwarna putih, dapat terurai secara hayati (*biodegradable*), terutama oleh bakteri penghasil enzim lisozim dan kitinase. Sifat kitin yang dapat terdegradasi secara ilmiah menunjukkan bahwa kitin bersifat ramah lingkungan, dapat didaur ulang menjadi sumber nitrogen dan karbon, dan juga dalam produksinya sangat berguna sebagai pereaksi bahan kimia (Gooday *et al.* 1992).

Kitin merupakan homopolimer dari β -1,4 N-asetil-D-glukosamin dan merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Senyawa ini dapat ditemukan pada cangkang udang, kepiting, moluska, serangga, annelida, dan beberapa dinding sel jamur dan alga. Kitin dapat dihidrolisis secara enzimatik oleh enzim kitinase menghasilkan monomer β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (Yurnaliza, 2002).

Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai

yang berdekatan. Ikatan hidrogen menyebabkan kitin tidak dapat larut dalam air dan membentuk formasi serabut (fibril) (Cabib, (1987).

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

1. Deproteinasi

Deproteinasi merupakan proses pemisahan protein yang ada pada kulit udang dari kitin. Proses ini dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara kimia misalnya menggunakan NaOH atau KOH dan secara enzimatik menggunakan enzim proteolitik. Namun, deproteinasi menggunakan natrium hidroksida lebih sering digunakan, karena lebih mudah dan efektif (Austin *et al.*, 1981). Pada pemisahan protein menggunakan NaOH, protein diekstraksi sebagai Na-proteinat yang larut, dan jika menggunakan KOH akan diperoleh K-proteinat yang mengendap (Knorr, 1984), sedangkan enzim proteolitik akan mendegradasi protein sehingga terpisah dari kitin (Muzzarelli, 1984).

2. Demineralisasi

Demineralisasi merupakan proses pemisahan mineral atau senyawa anorganik yang ada pada kulit udang dari kitin. Mineral utama yang terkandung dalam kulit udang adalah kalsium karbonat (CaCO_3) dan kalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Proses demineralisasi ini biasanya dilakukan dengan merendam bahan hasil deproteinasi dalam larutan asam klorida.

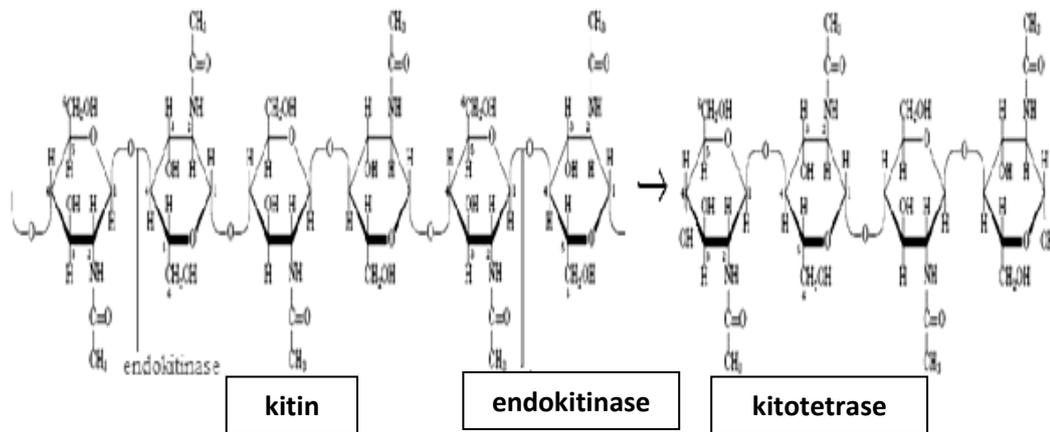
Menurut Shimahara dan Takiguci (1988), asam klorida efektif untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida, namun asam klorida juga menyebabkan kitin

mengalami depolimerisasi. Hal ini yang menjadi alasan mengapa terkadang digunakan EDTA dalam proses demineralisasi. Hanya saja, EDTA tidak dapat mengeliminasi garam anorganik secara lengkap (Shimahara and Takiguci, 1988).

E. Kitinase

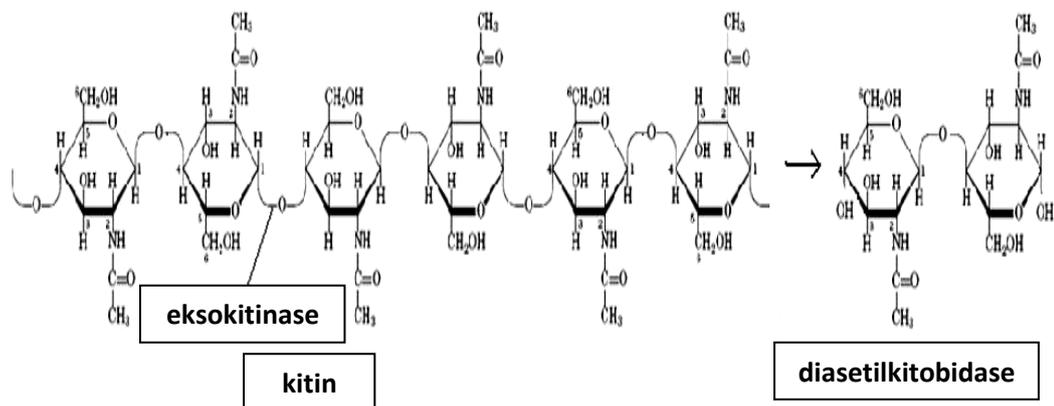
Kitinase merupakan glikosil hidrolase yang mengkatalisis degradasi kitin yaitu senyawa polimer dari N-asetilglukosamin yang membentuk ikatan linier β -1,4. Enzim ini ditemukan dalam berbagai organisme, termasuk organisme yang tidak mengandung kitin dan mempunyai peran penting dalam fisiologi dan ekologi. Berdasarkan kesamaan urutan asam amino, kitinase diklasifikasikan dalam famili 18 dan 19 glikosida hidrolase (Tomokazu *et al*, 2004). Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Salah satu mikroorganisme penghasil enzim kitinase ini ialah *Actinomycetes*. Harman *et al.*, (1993) dan Sahai *et al.*, (1993) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu :

1. Endokitinase (EC 3.2.1.14) yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan β -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.



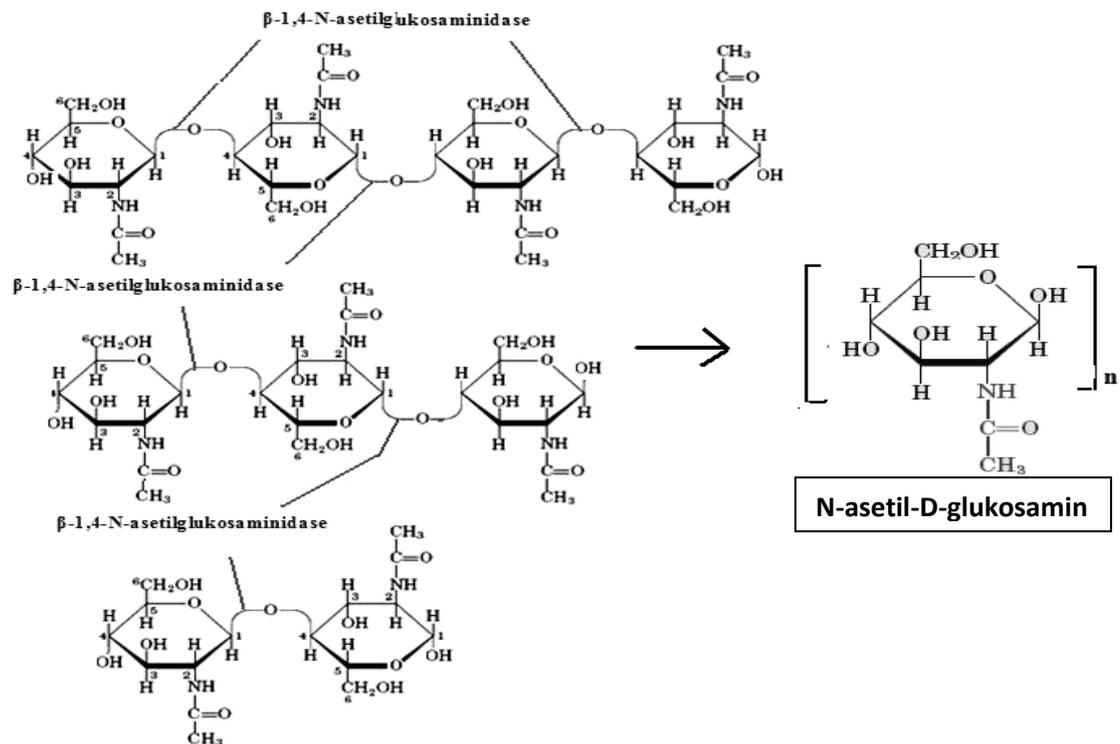
Gambar 2. Reaksi pemutusan ikatan β -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin

2. Eksokitinase (EC 3.2.1.14) dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4- β -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 3. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase

3. β -1,4-N-asetilglukosaminidase (EC 3.2.1.30) merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer N-asetilglukosamin.



Gambar 4. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer N-asetilglukosamin.

Kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida. Kitooligosakarida berperan sebagai pertahanan tanaman, juga digunakan dalam kesehatan manusia. Sebagai contoh, kitoheksosa dan kitoheptosa memperlihatkan aktivitas anti tumor.

N-asetilglukosamin berguna sebagai obat anti inflamasi. Senyawa ini dalam tubuh manusia disintesis dari glukosa dan digabungkan dengan glikoprotein dan glikosaminoglikan (Patil *et al.*, (2000). Kitinase juga berperan dalam produksi protein sel tunggal dari limbah kitin untuk makanan hewan (Shaikh *et al.*, 1993).

Kitinase juga dapat digunakan dalam pertanian sebagai pengendalian jamur patogen tanaman dan hama serangga. Kombinasi σ -toksin dan kitinase dilaporkan lebih efektif dalam membunuh hama serangga (Patil *et al.*, (2000).

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).

Pengukuran aktivitas kitinase dalam memecah kitin dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti yang disebutkan dalam Cabib (1987) yaitu :

a). Berdasarkan pengurangan substrat

1. Metode viskosimetri yaitu aktivitas kitinase terhadap kitosan, glikol kitin atau karboksimetil kitin yang ditunjukkan oleh terjadinya pengurangan viskositas substrat.
2. Metode turbidimetri (nephelometri) yaitu pengukuran variasi kekeruhan suspensi koloidal kitin selama kitinolisis. Pengukuran ini bersifat cepat dan akurat tapi tidak cocok untuk enzim dengan aktivitas rendah. Contoh pada pengukuran aktivitas enzim endokitinase. Unit aktivitas enzim endokitinase diukur sebagai persen pengurangan kerapatan atau turbiditas relatif dari suspensi yang sama antara yang berisi enzim dengan akuades. Satu unit

endokitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mereduksi turbiditas suspensi kitin 5 %.

b). Berdasarkan pembentukan produk akhir yaitu N-asetilglukosamin.

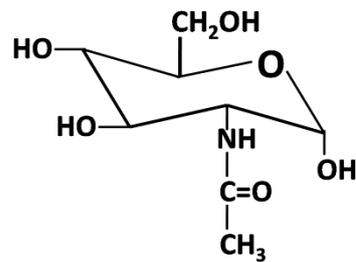
N-asetilglukosamin yang dibebaskan dari kitin ditentukan secara kolometrik dengan penambahan p-dimetilaminobenzaldehida. Satu unit aktivitas kitinase dinyatakan sebagai μmol N-asetilglukosamin yang dibebaskan selama 1 jam dalam kondisi yang ditetapkan.

c). Pengujian spektrofotometri yaitu menggunakan kromogen 3,4-dinitrophenil-tetra- N-asetilkitotetraose sebagai substrat.

d). Pengujian sensitifitas kitinase menggunakan radiometri yaitu substrat diberi label ^{14}C atau ^3H . Kadar produk diuji dengan radioaktifitasnya setelah penghilangan kitin yang belum dipecah dengan penyaringan atau dengan cara disentrifugasi.

F. N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin adalah suatu bagian monosakarida dari glukosa. Secara kimia merupakan amida antara glukosamin dan asam asetat. Struktur molekulnya adalah $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$, massa molar 221,21 g/mol dan zat ini merupakan bagian penting dalam sistem biologi.



Gambar 5. Struktur N-asetilglukosamin

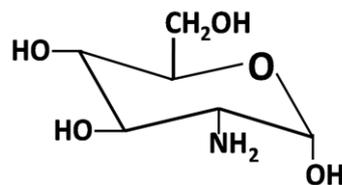
N-asetilglukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan di negara maju telah diproduksi secara komersial mengingat manfaatnya di berbagai industri, seperti bidang kesehatan, farmasi, biokimia, bioteknologi, kosmetika, biomedika, pangan, tekstil, kertas, dan lain-lain. Pemanfaatan tersebut didasarkan atas sifat-sifatnya yang dapat digunakan sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelet, dan penebal emulsi. Berbeda dengan kitin, N-asetilglukosamin bersifat mudah larut dalam air, sedikit larut dalam metanol yang dipanaskan dan tidak larut dalam dietileter. N-asetilglukosamin sering ditemukan sebagai komponen utama pada rangka luar *Crustacea*, *Arthropoda*, dan cendawan (Horton, 1980).

G. Glukosamin

Glukosamin (2-amino-2-deoxyglucose, chitosamin) adalah gula amino yang diperoleh dari proses hidrolisis kitin (Shantosh *et al.* 2007). Glukosamin pertama kali diidentifikasi oleh Dr. Georg Ledderhose pada tahun 1876, tetapi struktur stereokimia tidak sepenuhnya diketahui sampai ditemukan oleh Walter Haworth pada tahun 1939 (Horton *et al.*, 2009). Glukosamin merupakan salah satu senyawa gula amino yang 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 (OA). Oleh karena itu, pemberian glukosamin sulfat secara oral dapat membantu produksi cairan sinovial sehingga dapat mencegah serta mengobati penyakit osteoarthritis (OA) (Williams, 2004). Glukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan prekursor penting dalam sintesis biokimia dari protein glikosilasi dan lipid. Glukosamin ditemukan sebagai komponen utama dari rangka luar *Crustacea*, *Arthropoda*, dan cendawan. Glukosamin merupakan salah satu monosakarida yang banyak dijumpai. Dalam industri, glukosamin diproduksi dengan cara hidrolisis rangka luar *Crustacea*.



Gambar 6. Struktur D-glukosamin

Glukosamin terdapat pada golongan *Crustacea* seperti rajungan, kepiting, udang dan cumi-cumi. Selain itu juga terdapat pada invertebrata seperti *Artopoda*,

Molusca, *Coelenterata*, dan *Nematoda* serta beberapa kelas serangga dan jamur. Golongan hewan dan jamur tersebut tersusun atas kitin, dimana kitin merupakan prekursor kitosan, dan kitosan sendiri merupakan polimer dari glukosamin (D-glukosamin). Glukosamin dapat berfungsi sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelet dan penebal emulsi (Anonim, 2007).

H. Fermentasi

Fermentasi merupakan reaksi oksidasi reduksi yang menggunakan sumber energi dan sumber karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa yang mempunyai nilai ekonomi lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium. Proses fermentasi disebabkan oleh organisme atau hasil metabolisme (Rao, 2009).

Produk yang dapat dihasilkan dari proses fermentasi ialah enzim, sel mikroorganisme, metabolit primer, metabolit sekunder, dan senyawa hasil proses biokonversi (Rahman, 1989).

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

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

I. Fermentasi Fase cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Fermentasi merupakan proses dimana komponen-komponen kimiawi dihasilkan sebagai akibat adanya pertumbuhan maupun metabolisme mikroba yang mencakup proses aerob dan anaerob. Fermentasi dapat meningkatkan nilai gizi bahan yang berkualitas rendah sehingga berfungsi dalam pengawetan bahan dan merupakan suatu cara untuk menghilangkan zat antinutrisi atau racun yang terkandung dalam suatu bahan makanan. Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (*submerged*). Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat maupun medium cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam media cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan *shaker* atau *fermentor*.

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.*, 2001).

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu fermentasi tertutup (*batch culture*) dan fermentasi kontinu (*fed batch*). Pada fermentasi tertutup, setelah inokulasi tidak dilakukan lagi penambahan medium kedalam *fermentor*, kecuali pemberian oksigen (udara steril), antibiuh dan asam atau basa yang mengatur pH. Karena itu pada sistem tertutup ini, dengan sekian lamanya

waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme semakin menurun sampai akhirnya pertumbuhan terhenti. Penurunan dan berhentinya pertumbuhan disebabkan karena dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi nutrisi-nutrien esensial dalam medium semakin berkurang atau terjadi akumulasi autotoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan atau kombinasi dari keduanya. Dengan demikian pada fermentasi tertutup jumlah sel pada fase *stationer* merupakan jumlah sel maksimum.

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

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

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.
2. Persiapan inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses fermentasi *batch* melibatkan bakteri, jamur dan salah satunya *Actinomycetes* maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.
3. Persiapan wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu disterilkan sebelum penambahan substrat.
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.

5. Proses fermentasi *batch*, pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi.
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 Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

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

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

3. Aplikasi Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Menurut Holker *et al.* (2004) dan Pandey (2000) dapat menguraikan aplikasi dari fermentasi *batch* secara tradisional, antara lain :

- a). Bir, minuman beralkohol. Sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan didapatkan minuman beralkohol.
- b). *Yoghurt*, diproduksi dengan cara memfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bakteri mengubah laktosa (gula susu) pada kondisi anaerobik. Laktosa diubah menjadi asam laktat yang bersifat menggumpalkan kasein (protein susu).

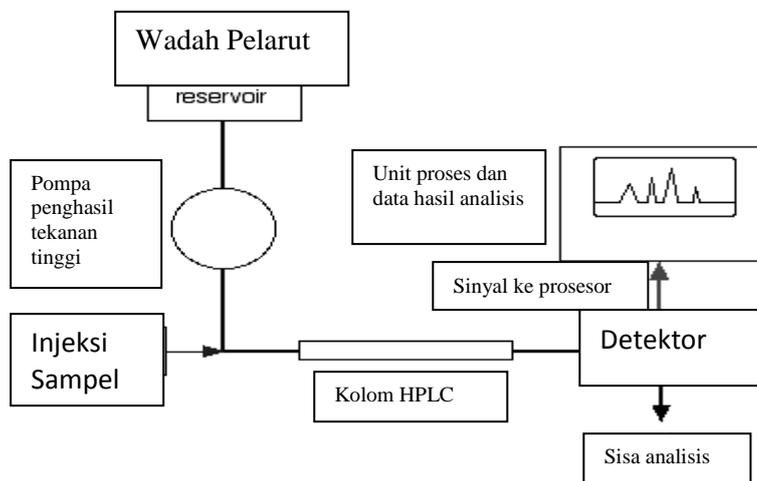
- c). Keju, berbagai jenis bakteri dapat digunakan untuk fermentasi susu menjadi keju, tergantung dari jenis keju yang dihasilkan. Biasanya digunakan spesies *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung *cymosin* yang bersifat menggumpalkan casein.

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

J. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC adalah suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair. HPLC dapat digunakan untuk pemisahan sekaligus untuk analisis senyawa berdasarkan kekuatan atau kepolaran fasa geraknya. Berdasarkan polaritas relatif fasa gerak dan fasa diamnya, HPLC dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar dan fasa terbalik yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa polar. Pada fasa normal, fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam. Sedangkan pada fase terbalik, fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter *et al.*, 1991).

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



Gambar 7. Diagram Alir HPLC

Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom HPLC. Metode yang dipakai untuk menganalisis N-asetilglukosamin adalah penggunaan evaporasi detektor hamburan cahaya (ELSD) (Mulja and Suharman, 1995). N-asetilglukosamin tidak dapat dianalisis dengan detektor UV secara langsung. N-asetilglukosamin memiliki serapan sinar UV pada panjang gelombang dibawah 205 nm, yang hampir sama dengan serapan pelarut polar seperti air dan metanol.

Cara yang praktis dan efisien untuk menganalisis N-asetilglukosamin adalah dengan HPLC yang dilengkapi ELSD (Detektor Evaporasi Hamburan Cahaya). 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.

Adapun keunggulan dari ELSD yaitu:

1. Sensitivitas tinggi memberikan respon yang luar biasa untuk semua senyawa, sampai ke tingkat nanogram rendah.
2. Operasi Sub-ambien menggunakan tabung penguapan berpendingin *Peltier* memberikan suhu rendah sampai 10°C, mencegah degradasi dari senyawa labil panas yang tidak terdeteksi oleh ELSD lain.
3. *Real-time* kontrol selama injeksi melalui *Software* dimensi yang diprogram untuk mempertahankan sensitivitas maksimum pada pengoperasian alat.
4. *Real-time* pemrograman gas yang menghilangkan efek peningkatan pelarut selama elusi gradien, sangat baik untuk analisis kation.
5. Dispersi rendah dan kecepatan data output-tingkat tinggi adalah pasangan yang cocok untuk aplikasi LC Cepat.
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 meningkat.

Kondisi HPLC untuk identifikasi N-asetilglukosamin menggunakan kolom C18 yang bersifat nonpolar, fasa gerak adalah asetonitril/H₂O/H₃PO₄ (10/90/0,1) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 1,5 mL/menit, dan waktu run 20 menit. Pada proses elusi, digunakan metode isokratik, yaitu eluennya menggunakan perbandingan komponen yang tetap dari awal sampai dengan akhir pemeriksaan (Gritter *et al.*, 1991).

K. *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

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

1. Dapat digunakan pada semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat.

2. Sensitifitas dari metoda Spektrofotometri FTIR lebih besar daripada cara dispersi, sebab radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak karena tanpa harus melalui celah (Hsu, 1994).

Spektroskopi FTIR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik, gugus fungsi ini dapat ditentukan berdasarkan ikatan dari tiap atom. Prinsip kerja dari metode ini adalah sinar yang terserap menyebabkan molekul dari senyawa terdistribusi dan energi vibrasi diukur oleh detektor serta energi vibrasi dari gugus fungsi tertentu akan menghasilkan frekuensi yang spesifik. Alat ini mempunyai kemampuan lebih sensitif dibanding dengan alat dispersi dan dapat digunakan pada daerah yang sangat sulit atau tidak mungkin dianalisis dengan alat dispersi. Radiasi infra merah mempunyai spektrum elektromagnetik pada bilangan gelombang $13000-10\text{ cm}^{-1}$ atau panjang gelombang dari $0,78-1000\ \mu\text{m}$. Penggunaan spektrum infra merah untuk menentukan gugus fungsi suatu struktur senyawa organik biasanya antara $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ($2,5$ sampai $25\ \mu\text{m}$). Daerah di bawah frekuensi 400 cm^{-1} ($25\ \mu\text{m}$) disebut daerah infra merah jauh, dan daerah di atas 4000 cm^{-1} ($2,5\ \mu\text{m}$) disebut daerah inframerah dekat (Silverstein *et al.*, 1986).

Sebagai contoh senyawa kitin memberikan data serapan IR : $\nu = 3448,5\text{ cm}^{-1}$ 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 ke luar bidang N-H (Syahmani and Sholahuddin, 2009).