

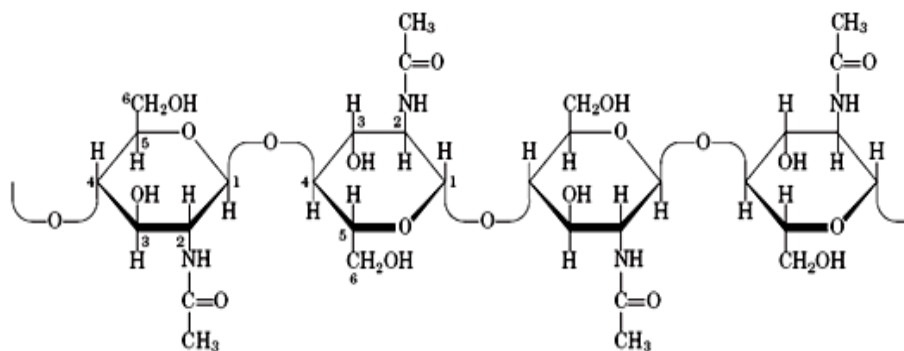
## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Kitin

Kitin pertama kali ditemukan oleh Henry Bracantot (1811) dalam residu ekstrak jamur yang dinamakan fungi. Kemudian Odiers (1823), mengisolasi suatu zat dari sari kutikula serangga jenis elytra dan mengusulkan nama kitin. Kata kitin berasal dari bahasa Yunani, yaitu “kiton” yang berarti baju rantai besi (Yurnaliza, 2002). Penamaan ini sesuai dengan fungsinya sebagai jaket pelindung untuk hewan-hewan golongan invertebrata. Kitin merupakan polimer alam terbanyak di dunia setelah selulosa (Yanming *et al.*, 2001), yang banyak terdapat di eksoskeleton atau kurtikula pada kelompok hewan *crustacea*, serangga, fungi, dan moluska (Kusumaningsih, 2004). Keberadaan kitin di alam umumnya tidak berdiri sendiri tetapi bergabung dengan senyawa lain seperti protein, mineral dan pigmen.

Kitin adalah kelompok karbohidrat yang tergolong *structural homoglycans* yang tersusun atas monomer-monomer N-asetil glukosamin (2-asetamida-2-deoksi-D-Glukosa) (Horton, 2002). Monomer-monomer kitin ini terikat oleh ikatan glikosida pada posisi  $\beta$  (1-4). Struktur molekul kitin berupa rantai lurus panjang yang mirip dengan selulosa dan hanya berbeda pada gugus yang terikat di posisi atom karbon nomor 2. Pada selulosa, gugus yang terikat pada atom karbon nomor

2 adalah gugus hidroksil (OH), sedangkan pada kitin adalah gugus asetamida (NHOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N – asetilglukosamin. Adanya kitin dapat dibuktikan dengan reaksi warna *Van Wesslink* yaitu dengan mereaksikan kitin dengan I<sub>2</sub>–KI yang memberikan warna coklat, yang akan berubah menjadi violet apabila ditambahkan dengan asam sulfat. Perubahan warna dari coklat menjadi violet menunjukkan reaksi positif adanya kitin.



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

Kitin membentuk kristal berwarna putih atau kekuningan, tidak berasa, tidak berbau dan tidak dapat larut dalam air (Rahayu *and* Purnavita 2007), yang disebabkan adanya ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H satu dengan gugus C=O dari rantai lain yang berdekatan. Selain itu, kitin juga tidak larut dalam asam anorganik, asam organik, alkali pekat dan pelarut organik seperti alkohol, aseton, heksana serta dalam basa encer dan pekat. Kitin dapat larut dalam asam mineral pekat, misalnya asam klorida, asam nitrat, asam sulfat dan asam format anhidrat (Savitri dkk., 2010).

Kitin dapat diproduksi secara komersial dari limbah kulit udang dan cangkang kepiting (No *et al.*, 2000). Kulit udang mengandung protein 25- 40 %, kalsium

karbonat 45-50 %, dan kitin 15-20 %, tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udang dan tempat hidupnya. Cangkang kepiting mengandung protein 15,60-23,90 %, kalsium karbonat 53,70- 78,40 %, dan kitin 18,70-32,20 % yang juga tergantung pada jenis kepiting dan tempat hidupnya (Marganov, 2003). Untuk memperoleh kitin, pada umumnya dapat dilakukan dengan ekstraksi kitin menggunakan reaksi kimia sederhana.

Kitin dapat diekstraksi melalui dua tahapan yaitu tahapan deproteinasi dan tahapan demineralisasi. Kedua tahapan ini, tidak hanya dapat dilakukan secara kimia melainkan dapat pula dilakukan secara biologi yaitu dengan memanfaatkan bakteri proteolitik pada proses deproteinasi dan bakteri asam laktat untuk proses demineralisasi.

### 1. Deproteinasi

Deproteinasi merupakan tahap awal dari isolasi kitin. Deproteinasi bertujuan mengurangi kadar protein dengan menggunakan larutan alkali encer dan pemanasan yang cukup (Yunizal dkk., 2001). Larutan alkali encer yang digunakan seperti NaOH dan KOH. Namun lebih sering digunakan NaOH karena lebih mudah dan efektif. Larutan NaOH digunakan untuk melarutkan protein yang terkandung di dalam kulit udang (Eka, 2007) Efektifitas prosesnya tergantung pada suhu dan konsentrasi NaOH yang digunakan.

### 2. Demineralisasi

Demineralisasi dimaksudkan untuk mengurangi kadar mineral ( $\text{CaCO}_3$ ) dengan menggunakan asam konsentrasi rendah seperti asam klorida, untuk mendapatkan

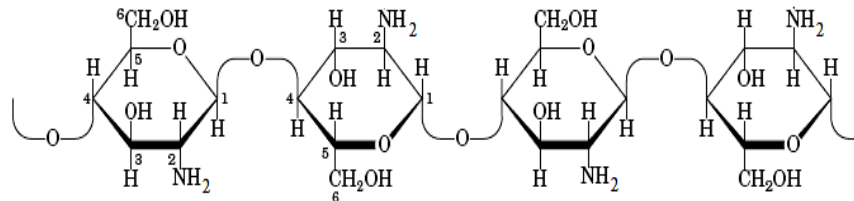
kitin (Yunizal dkk., 2001). Mineral organik yang terikat pada bahan dasar, yaitu  $\text{CaCO}_3$  sebagai mineral utama dan  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$  dalam jumlah minor. Menurut Hartati (2002), pada proses demineralisasi perbandingan antara pelarut dan cangkang udang adalah 6 : 1. Selanjutnya diaduk sampai merata dan didiamkan selama 13 jam. Kemudian dipanaskan pada suhu  $90^\circ\text{C}$  selama satu jam. Larutan lalu disaring dan didinginkan sehingga diperoleh residu padatan yang kemudian dicuci dengan air sampai pH netral dan dikeringkan pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 24 jam atau dijemur sampai kering. Kitin dari hasil isolasi berbentuk serbuk maupun serpihan (Hartati, 2002).

## **B. Kitosan**

Kitosan merupakan salah satu turunan kitin, yaitu suatu senyawa yang mempunyai rumus kimia  $\beta$  (1,4)-2-amino-2-dioksi-D-glukosa. Kitosan dapat dihasilkan dari proses hidrolisis kitin menggunakan basa kuat (proses deasetilasi) (Srijanto *and* Imam, 2005). Kitosan termasuk polisakarida yang bersifat basa (Kumar, 2000), berbentuk lapisan tipis seperti film, berwarna putih atau kuning, dan tidak berbau. Kitosan merupakan senyawa yang tidak larut dalam air dan larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl dan  $\text{HNO}_3$  dan tidak larut dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pelarut kitosan yang baik adalah asam asetat (Widodo, 2006).

Struktur kitosan mirip dengan kitin, hanya saja gugus asetilnya dihilangkan menggunakan basa kuat. Sifat-sifat kitosan dihubungkan dengan adanya gugus amina, gugus hidroksi primer dan hidroksi sekunder, yang menyebabkan kereaktifan kimianya lebih tinggi dibandingkan kitin. Gugus-gugus fungsi

tersebut menyebabkan kitosan dapat berinteraksi dengan zat-zat organik seperti protein, sehingga kitosan relatif lebih banyak digunakan pada berbagai bidang industri terapan dan kesehatan. Selain itu, kitosan dapat dimodifikasi strukturnya melalui gugus-gugus fungsi tersebut.

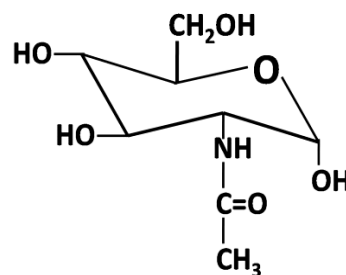


**Gambar 2.** Struktur kitosan (Murray *et al.*, 2003)

Kitosan merupakan polimer alami yang bersifat non toksis, lebih ramah lingkungan dan mudah terdegradasi secara alami sehingga banyak digunakan pada berbagai industri kimia, misalnya sebagai bahan pelembab, pelapis benih yang akan ditanam, bidang farmasi, pelarut lemak, dan sebagai koagulan dalam pengolahan limbah air karena kitosan bersifat tidak dapat larut dalam air sehingga akan menggumpalkan logam menjadi flok-flok yang akan bersatu dan dapat dipisahkan dari air limbah ( Marganov, 2003 ; Widodo *et al.*, 2005 ). Kitosan juga berperan sebagai adsorben ion logam bersifat polielektrolit kation yang dapat mengikat logam berat yang dihasilkan oleh limbah industri. Selain itu, kitosan berperan sebagai pengawet makanan karena kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri yang disebabkan kitosan memiliki polikation bermuatan positif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan kapang (Mekawati dkk., 2000).

### C. N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin (GlcNAc) merupakan monomer-monomer penyusun kitin yang tersusun linear dengan ikatan glikosida  $\beta$  (1,4). Hidrolisis kitin menggunakan asam klorida (HCl) menghasilkan senyawa N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang berbentuk bubuk berwarna putih dan memiliki rasa manis. N-asetilglukosamin (GlcNAc) bersama-sama dengan glukosamin, dapat disintesis dalam tubuh dari glukosa yang dapat bertindak sebagai prekursor untuk biosintesis beberapa makromolekul, seperti glikolipid, glikoprotein, glukosaminoglikan (mukopolisakarida) dan proteoglikan.



**Gambar 3.** Struktur N-asetilglukosamin

Senyawa GlcNAc dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi, diantaranya dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, antiinflamasi dan sebagainya. Sebagai contoh, penderita osteoarthritis yang salah satunya disebabkan oleh kerusakan atau penurunan cairan sinovial yang melumasi sendi (Conaghan, 2008) dapat diturunkan resikonya menggunakan senyawa GlcNAc. Selain itu, untuk kosmetik dapat mengurangi aktivitas enzim

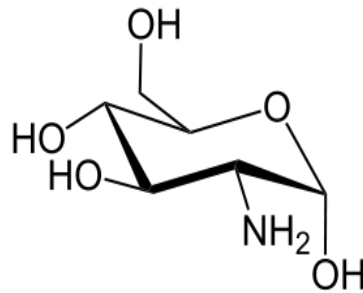
tirosinase yang berperan dalam produksi melanin sehingga mengurangi hiperpigmentasi.

#### **D. Glukosamin**

Glukosamin ( $C_6H_{13}NO_5$ ) adalah gula mengandung amina yang diperoleh dari hasil hidrolisis kitin. Di alam, glukosamin tersebar luas sebagai komponen utama dari rangka luar *Crustacea*, *Antropoda*, dan cendawan. Glukosamin juga ditemukan di matriks tulang rawan sendi dan cairan sendi manusia, bahkan di hampir semua jaringan lunak dalam tubuh manusia, konsentrasi tertinggi di tulang rawan ( Miller, 2011). Pada manusia, glukosamin sebagai salah satu komponen biosintesis glikosaminoglikan (GAG). GAG ini akan berikatan secara kovalen pada inti protein proteoglikan, salah satu komponen matriks jaringan kartilago yang akan menjaga integritas struktur dan fungsi jaringan kartilago. Glukosamin yang diproduksi oleh tubuh berada dalam bentuk glukosamin-6-fosfat dan dihasilkan dari glukosa yang mengikuti jalur biosintesis heksosamin (Oegema *et al.*, 2002). Keberadaan glukosamin di dalam tubuh memiliki peranan penting untuk kesehatan dan kelenturan sendi (EFSA, 2009).

Glukosamin merupakan prekursor utama untuk biosintesis berbagai makromolekul seperti asam hialuronat, proteoglikan, glikosaminoglikan (GAGs), glikolipid, dan glikoprotein. Secara struktural glukosamin adalah basa lemah sehingga sediaan glukosamin yang beredar harus distabilkan dalam bentuk garam. Glukosamin ditemukan dalam berbagai bentuk seperti glukosamin sulfat, hidroklorida, N-asetilglukosamin atau garam klorohidrat, dan isomer dekstraoratorik

(Persiani *et al.*, 2005). Glukosamin juga ditemukan dipasaran dalam bentuk glukosamin hidroklorida (HCl), *cocrystals* atau *coprecipitates glukosamin sulfat* dan kalium atau natrium klorida (Dahmer, 2008).



**Gambar 4.** Struktur glukosamin (Anonim, 2013)

### *E. Mapping*

*Mapping* berasal dari “*mapp*” yang artinya pemetaan atau visualisasi. Dalam kamus bahasa Indonesia, pemetaan atau visualisasi adalah pengungkapan suatu gagasan atau perasaan dengan menggunakan gambar, tulisan, peta, dan grafik. Pemetaan merupakan sebuah proses yang memungkinkan seseorang mengenali elemen pengetahuan serta konfigurasi, dinamika, ketergantungan timbal balik dan interaksinya. Pemetaan pengetahuan digunakan untuk keperluan manajemen teknologi, mencakup definisi program penelitian, keputusan menyangkut aktivitas yang berkaitan dengan teknologi, desain, struktur berbasis pengetahuan serta pemrograman pendidikan dan pelatihan. Output dari kegiatan pemetaan adalah gambar, tulisan, peta, dan grafik yang menunjukkan hubungan antar elemen pengetahuan.



Menurut Ristiyono (2008), peta ilmu pengetahuan menggambarkan suatu hubungan ruang antara batas penelitian dalam bidang kegiatan yang signifikan, juga dimana bidang penelitian itu didistribusikan serta dapat memberikan makna dari hubungan tersebut. Peta ilmu pengetahuan tidak hanya merupakan suatu alat yang praktis untuk menyampaikan informasi mengenai aktivitas ilmiah, tetapi juga dapat dijadikan sebagai suatu dasar untuk mengkaji atau memahami aktivitas ilmiah dengan menggambarkannya secara tersusun dan terstruktur. Dalam penelitian ini pemetaan digunakan untuk mengkaji aktivitas ilmiah, yaitu menelusuri aktivitas dari enzim tertentu dalam mendegradasi suatu senyawa polimer menjadi monomer-monomer produk.

Visualisasi ilmu pengetahuan dapat diwujudkan dalam bentuk peta, sehingga muncul bidang pemetaan ilmu pengetahuan atau *knowledge mapping*. Pemetaan pengetahuan dapat dilakukan dengan bentuk pemetaan kronologis, pemetaan berbasis *co-word*, pemetaan kognitif dan pemetaan konseptual (Sulistyo-Basuki, 2002).

## **F. Enzim**

Kata enzim berasal dari bahasa Yunani “*enzyme*” yang berarti “di dalam sel”. Willy Kuchne (1876) mendefinisikan enzim sebagai fermen (ragi) yang bentuknya tidak tertentu dan tidak teratur, yang dapat bekerja tanpa adanya mikroba. Selanjutnya definisi ini berubah setelah dilakukan penelitian lanjutan oleh Buchner pada tahun 1897. Enzim dapat diproduksi oleh mikroba atau bahan

lainnya seperti hewan dan tumbuhan. Enzim juga dapat diisolasi dalam bentuk murni.

Enzim merupakan molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim juga merupakan biokatalisator yang terdapat dalam semua sistem hidup. Enzim dapat digunakan untuk mengaktifkan, mengkatalis dan mengendalikan reaksi kimia yang penting untuk mempertahankan keberadaan organisme itu sendiri. Katalis enzim berbeda dengan katalis kimia, yaitu memiliki karakteristik yang spesifik dan menghasilkan produk serta substrat yang spesifik (Voet *et al.*, 2006).

Enzim adalah senyawa protein yang dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana sampai reaksi yang sangat rumit. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi sehingga mempercepat proses reaksi. Percepatan reaksi terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan terurai membentuk enzim bebas dan produknya. Kerja enzim dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor sebagai berikut :

a. Konsentrasi enzim

Kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai katalisator dalam suatu reaksi. Pada suatu reaksi dengan konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi akan bertambah dengan semakin bertambahnya konsentrasi enzim.

b. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat juga dapat mempengaruhi kecepatan suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Apabila konsentrasi substrat ditambahkan secara terus menerus hingga mencapai suatu laju maksimum, maka keadaan substrat akan menjadi jenuh.

c. Temperatur

Enzim merupakan senyawa protein yang sangat peka terhadap perubahan temperatur. Pada temperatur yang tinggi enzim akan mengalami perubahan struktur yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim. Pada beberapa enzim akan mengalami denaturasi pada temperatur yang rendah. Pembekuan akibat suhu yang terlalu rendah juga dapat menyebabkan perubahan struktur dan aktivitasnya.

d. Derajat Keasaman (pH)

Kerja enzim juga dipengaruhi oleh perubahan pH, karena perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim. Hal ini karena terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Enzim akan menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum yaitu antara pH 4,5-8,0.

e. Inhibitor

Enzim dapat dihambat sementara atau tetap oleh inhibitor, yaitu berupa zat kimia tertentu. Inhibitor merupakan senyawa selain substrat yang biasa terikat pada sisi aktif enzim (substrat normal), sehingga antara substrat dan inhibitor terjadi persaingan untuk mendapatkan sisi aktif. Persaingan dapat terjadi karena inhibitor memiliki kemiripan kimiawi dengan substrat normal.

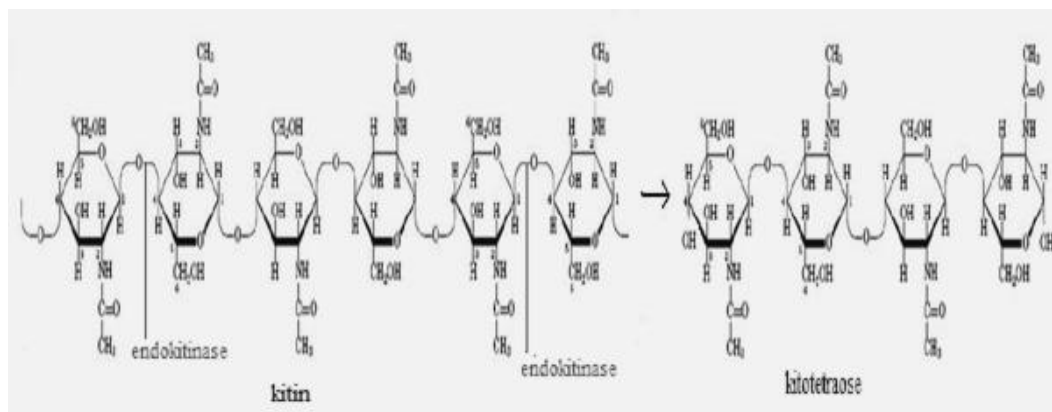
Enzim sebagai biokatalisator memiliki keunggulan sifat, seperti aktivitas yang tinggi, efektif, spesifik dan ramah lingkungan (Lidya *and* Djenar, 2000). Menurut Saktiwansyah (2001), enzim memiliki sifat yang khas, yaitu sangat aktif walaupun konsentrasinya amat rendah, sangat selektif dan bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*), yaitu tanpa temperatur atau tekanan tinggi dan tanpa logam yang umumnya beracun. Hal inilah yang menyebabkan reaksi yang dikatalisis secara enzimatik menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalis kimia (August, 2000).

### **G. Enzim Kitinase**

Kitinase adalah enzim yang dapat mendegradasi kitin dengan memotong ikatan glikosidik dari polimer  $\beta$ -1,4 N-asetil-D-glukosamin. Proses degradasi ini menghasilkan monomer-monomer N-asetilglukosamin. Di alam, proses degradasi kitin dilakukan oleh mahluk hidup penghasil kitinase seperti jamur, bakteri, *Actinomycetes*, tumbuhan (Matsumoto, 2006), vertebrata, moluska, arthropoda, alga dan beberapa jenis cendawan (Funkhouser *and* Aronson 2007). Pada jamur, kitinase berperan dalam pengaturan fisiologis saat pembelahan sel, diferensiasi, dan aktivitas mikoparasit (Gohel *et al.*, 2006). Bakteri memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Wu *et al.*, 2001). Selain itu, kitinase juga digunakan hewan untuk mengkonversi kitin menjadi monomer dan oligomernya, dan tumbuhan untuk mendegradasi dinding sel fungi patogen (Gohel *et al.*, 2006).

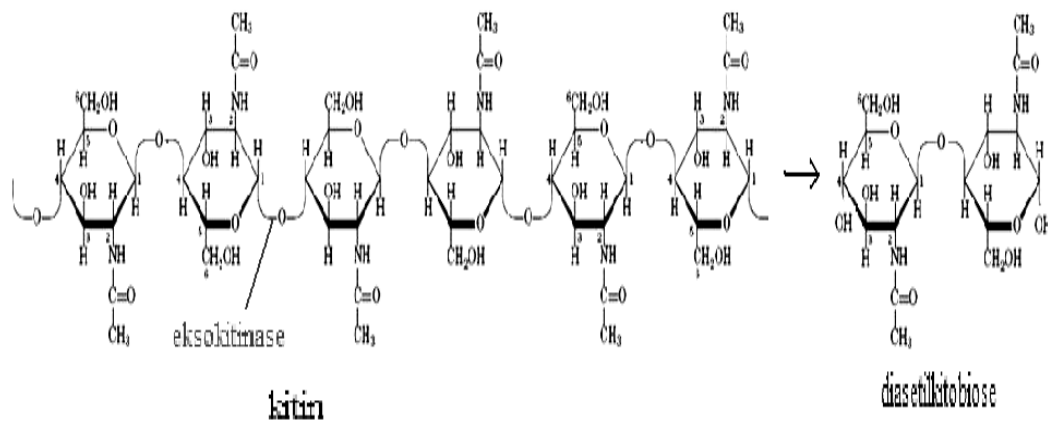
Kitinase merupakan enzim kompleks terdiri dari beberapa jenis enzim yang dibedakan berdasarkan kerjanya yaitu endokitinase dan eksokitinase.

Endokinase (E.C 3.2.1.14) merupakan enzim yang memotong secara acak ikatan  $\beta$ -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah kitotetraose dan kitotriose. Produk yang dihasilkan oleh endokinase bersifat mudah larut.



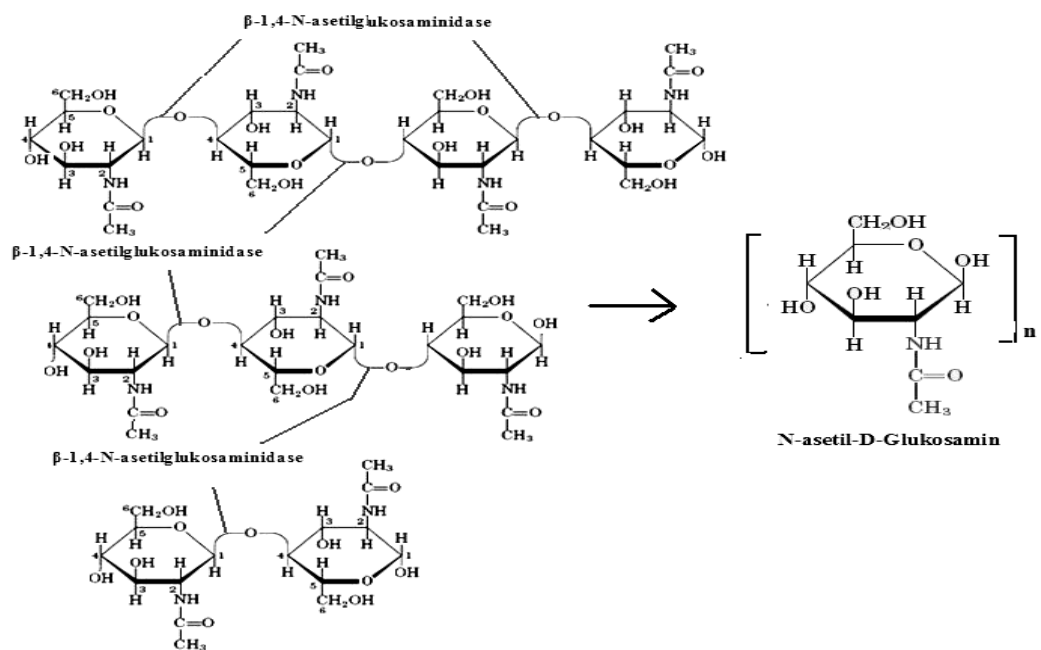
**Gambar 5.** Reaksi pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin

Eksokinase (E.C 3.2.1.14) merupakan enzim yang mengkatalisis 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 6.** Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase

$\beta$ -1,4-N-asetilglukosaminidase (EC 3.2.1.30) merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc.



**Gambar 7.** Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc

Kitinase yang dihasilkan mikroorganisme memiliki berat molekul berkisar antara 20.000-120.000 kDA. Pada bakteri, dihasilkan kitinase dengan berat molekul 60.000-110.000 kDA, sedangkan *Actinomycetes* menghasilkan kitinase paling rendah yaitu 30.000 kDA. Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan menghasilkan kitinase adalah *Clostridium* sp, *Enterobacter liquefaciens*, *Flavobacterium indoltheticum*, *Klebsiella* sp, *Micrococcus colpogenes*, *Pseudomonas* sp, *Serratia marcencens*, *Vibrio parahaemoliticus*, *V.alginoliticus*, *Bacillus* dan *pyrococcus* (Gao *et al.*, 2003). Kitinase yang diproduksi oleh mikroorganisme ini berperan penting dalam kontrol fungi patogen tanaman secara mikoparasitisme. Kitinase dapat menghidrolisis senyawa kitin, senyawa utama penyusun dinding sel tabung kecambah spora dan dan miselia sehingga jamur tidak mampu menginfeksi tanaman (Priyatno *et al.*, 2000).

#### **H. Enzim Kitin Deasetilase (CDA)**

Kitin deasetilase (CDA) merupakan salah satu enzim pendegradasi kitin selain kitinase. Perbedaannya yaitu, kitinase adalah enzim yang dapat menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya, sedangkan kitin deasetilase adalah enzim yang dapat mengkonversi kitin menjadi kitosan. Degradasi kitin untuk menghasilkan kitosan dapat dilakukan secara termokimia dengan menggunakan alkali kuat pada suhu tinggi. Dengan menggunakan proses ini, hasil yang diperoleh belum memuaskan karena mutu kitosan yang dihasilkan masih beragam. Selain itu, proses termokimia juga menghasilkan limbah dan produk samping yang berpotensi menjadi toksikan bagi lingkungan (Tsigos *et al.*, 2000).

Degradasi kitin untuk menghasilkan kitosan juga dapat dilakukan secara enzimatis yaitu menggunakan enzim kitin deasetilase (CDA). Keunggulan dari teknik ini yaitu lebih mudah dikendalikan, terurai secara biologis (*biodegradable*), sesuai lingkungan (*biocompatible*) dan dapat membentuk oligomer atau polimer (Tsigos *et al.*, 2000).

Enzim kitin deasetilase (CDA) dapat ditemukan pada bakteri, kapang, kamir, cacing dan serangga yang mempunyai kandungan kitosan pada dinding sel atau eksoskeletonnya. Proses enzimatis diharapkan akan lebih mudah dikendalikan, lebih efisien, spesifik dan meminimalkan produk samping. Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengisolasi, mempurifikasi dan mengkarakterisasi kitin deasetilase dari sejumlah mikroba. Aplikasi enzim ini pada berbagai jenis dan kondisi substrat masih memberikan hasil yang beragam dengan parameter hasil yang belum memuaskan (Tsigos *et al.*, 2000).

Menurut Copeland (2000), kultur bakteri difermentasi dalam media produksi enzim selama 2 hari pada 55°C. Enzim dipanen dengan cara sentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C untuk memisahkan dari sel bakteri dan sisa media. Supernatan ditambahkan amonium sulfat sampai kejenuhan 80 % sambil distirrer. Selanjutnya campuran diendapkan selama semalam pada suhu 4 °C, lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit. Filtrat dilarutkan dalam 0,02 M buffer borat pH 8 dan disimpan pada suhu 4 °C. Kadar protein enzim diuji dengan metode *Lowry* (Copeland, 2000), menggunakan standar BSA dan ditentukan aktivitas enzim.



## I. *Actinomycetes*

*Actinomycetes* berasal dari kata Yunani, yaitu *aktino* dan *mykes* yang berarti ray fungi. *Actinomycetes* merupakan mikroorganisme bersel satu yang termasuk dalam klasifikasi prokariotik. Mikroorganisme ini banyak dijumpai pada berbagai jenis tanah. Populasinya berada pada urutan kedua setelah bakteri, bahkan kadang-kadang hampir sama (Elberson *et al.*, 2000). *Actinomycetes* tumbuh secara perlahan membentuk cabang-cabang seperti benang, sehingga dapat digolongkan sebagai jamur. Namun, *Actinomycetes* juga memiliki sifat gram positif yang dapat digolongkan sebagai bakteri. Oleh karena itu, *Actinomycetes* digolongkan dalam kelompok peralihan antara jamur dan bakteri.

*Actinomycetes* dikenal sebagai bakteri penghasil antibiotik, yaitu sekitar dua pertiga dari 10.000 antibiotik yang telah ditemukan, dihasilkan oleh bakteri ini (Miyadoh *and* Misa, 2004). Berbagai jenis antibiotik yang dihasilkan bakteri ini telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kedokteran (Behal, 2000; Lezin *et al.*, 2001). *Actinomycetes* juga hidup sebagai saprofit dan aktif mendekomposisi bahan organik, sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah. Selain itu, *Actinomycetes* juga mampu mensekresi berbagai senyawa lain yang berguna dalam bidang pertanian seperti zat pengatur tumbuh (Lezin *et al.*, 2001; Donadio *et al.*, 2002), enzim pendegradasi dinding sel seperti kitinase dan  $\beta$ -glukanase (El-Tarabily *et al.*, 2000; Fogliano, 2002) serta siderophore (El-Tarabily, 2000).

## J. Ketooligosakarida

Ketooligosakarida adalah potongan kitin dan kitosan yang memiliki rantai 20 atau kurang dengan berat molekul lebih besar dari 3900 Dalton. Strategi memotong kitosan menjadi potongan yang lebih pendek menghasilkan kitosan oligomer atau ketooligosakarida merupakan salah satu strategi untuk mendapatkan kitosan larut air. Ketooligosakarida dapat diproduksi secara kimiawi maupun iradiasi dan enzimatis. Produksi secara kimiawi dan iradiasi bersifat acak dan tidak terkontrol menghasilkan monomer kitosan, yaitu berupa glukosamin (Won Seok *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007). Sedangkan secara enzimatis, enzim bersifat spesifik dan terkontrol sesuai dengan spesifisitas masing-masing enzim yang digunakan. Selain itu, penggunaan enzim dapat lebih diandalkan dan bersifat lebih ramah lingkungan.

Ketooligosakarida dapat diaplikasikan di bidang kesehatan misalnya, ketooligosakarida dengan panjang rantai 4 (tetramer) memiliki aktivitas antibakteri terkuat dibandingkan polimer kitosan dan ketooligosakarida dengan panjang lebih dari 4 (Guo-Jane *et al.*, 2000; Sagoo *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004; Chasanah *et al.*, 2008). Ketooligosakarida juga berpotensi sebagai antidiabetes (Hyeon-Woo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007) karena dapat meningkatkan toleransi glukosa, sekresi insulin dan menurunkan trigliserida. Dalam bidang peternakan, ketooligosakarida ketika diberikan sebagai bagian dari pakan ayam broiler, dapat meningkatkan performansi kualitas daging ayam broiler dengan meningkatkan sel darah merah dan lipoprotein densitas tinggi dalam darah serta menginduksi penurunan kadar lemak (Zhou *et al.*, 2009). Di bidang

pertanian, ketoooligosakarida yang memiliki rantai 2-8 unit monomer memiliki aktivitas mencegah beberapa kapang atau jamur (fungi) penyebab penyakit dan juga membantu pertumbuhan tanaman.

## **K. Fermentasi**

Fermentasi merupakan suatu proses yang melibatkan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk. Mikroorganisme yang biasa digunakan dalam proses fermentasi yaitu bakteri, khamir dan kapang. Fermentasi pada bahan makanan, dapat meningkatkan nilai gizi bahan yang berkualitas rendah dan berfungsi dalam antinutrisi atau racun yang terkandung dalam suatu bahan makanan. Menurut Rusmana (2008), fermentasi dibedakan menjadi dua berdasarkan cara operasinya, yaitu :

### **1. Fermentasi media cair**

Fermentasi media cair merupakan fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinyu dari sistem pertumbuhan sel yang bersangkutan atau substrat baik sumber karbon maupun mineral terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair. Contoh produk dari fermentasi media cair, seperti etanol, sel tunggal, antibiotik, pelarut organik, kultur *starter*, dekomposisi selulosa, beer, glukosa isomerase, pengolahan limbah cair dan sebagainya.

### **2. Fermentasi media padat**

Fermentasi media padat merupakan proses fermentasi yang berlangsung dalam substrat yang tidak terlarut dan tidak mengandung air. Contoh produk fermentasi

media padat yaitu tape, tempe, oncom, koji, berbagai olahan ikan fermentasi dan sebagainya.

#### **L. Fermentasi Fasa Cair Sistem Tertutup (*Batch*)**

Fermentasi *batch* merupakan fermentasi yang dilakukan dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi (Rusmana, 2008). Contoh produk yang menggunakan fermentasi *batch* adalah pembuatan bioetanol dengan bantuan ragi *Saccharomyces uvariun*, dan tanpa penambahan bahan kimia, urea dan NPK (Tri dkk., 2010). Pada sistem *batch* ini, jumlah bakteri akan terus bertambah sedangkan substrat yang ditambahkan dalam reaktor semakin berkurang, sehingga glukosa yang terkonveksi menjadi etanol akan semakin besar (Hana dkk., 2010).

Reaktor yang digunakan dalam sistem *batch* adalah reaktor *batch* anaerob dengan volume operasional sebesar 4 ml. Pada penutup reaktor, terdapat 2 buah selang silikon yang digunakan untuk sampling gas dan penambahan substansi (penetralan pH dengan basa), termometer serta *magnetic*. Substrat yang telah dicampurkan dengan inokulum dimasukkan ke dalam reaktor, ditutup dan dialirkan nitrogen untuk mengeluarkan oksigen sehingga dihasilkan suasana anaerob. Reaktor dioperasikan selama 65 hari.

Keuntungan menggunakan bioreaktor tipe *batch* yaitu dapat digunakan ketika bahan tersedia pada waktu tertentu dan bila memiliki kandungan padatan tinggi (25 %). Apabila bahan sulit diproses, tipe *batch* ini akan lebih cocok

dibandingkan dengan tipe aliran *kontinyu* karena lama proses dapat ditingkatkan dengan mudah. Apabila proses mengalami kesalahan, misalnya karena bahan beracun, proses dapat dihentikan dan mulai dengan yang baru (Rommy dkk., 2010).

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

*Fourier Transform Infra Red (FTIR)* merupakan suatu teknik spektroskopi inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus fungsi suatu senyawa (Samsiah, 2009). FTIR memberikan puncak-puncak maksimal yang sama jelas sebaik puncak minimumnya. Spektrum absorpsi dibuat dengan bilangan gelombang pada sumbu x dan persentase transmittan (T) pada sumbu y (Khopkar, 2003). Spektroskopi inframerah digunakan untuk menentukan struktur molekul melalui sederetan gugus fungsi berdasarkan perubahan amplitudo vibrasi yang diawali oleh terjadinya aksi antara molekul dengan radiasi infra merah yang medan listriknya memiliki frekuensi sama. Prinsip dasar dari spektrofotometri inframerah adalah perubahan amplitudo radiasi IR dari gugus dalam molekul pada energi (bilangan gelombang) yang sesuai. Analisis secara FTIR memiliki beberapa keuntungan, yaitu relatif cepat, sampel tidak perlu murni, dan tingkat ketelitian tinggi (Pavia *et al.*, 2009).

Cara kerja FTIR, yaitu suatu sinar dilewatkan melalui sampel dan larutan pembanding, kemudian dilewatkan pada monokromator untuk menghilangkan sinar yang tidak diinginkan. Selanjutnya berkas didispersikan melalui prisma atau grating, dengan melewatkannya melalui slit dan difokuskan pada detektor.

Sumber radiasi yang paling umum digunakan adalah nernerst atau lampu glower. Monokromator yang digunakan dalam FTIR terbuat dari berbagai macam bahan, tetapi biasanya NaCl untuk daerah  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  dan prisma KBr untuk  $400\text{ cm}^{-1}$ , sedangkan detektor yang digunakan adalah detektor termal (Khopkar, 2003).

Identifikasi gugus fungsi biasanya dilakukan pada daerah bilangan gelombang  $800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Serapan pita amida I memiliki bilangan gelombang  $1655\text{ cm}^{-1}$  dan gugus hidroksil memiliki bilangan gelombang  $3450\text{ cm}^{-1}$  (Sugita *et al.*, 2009). Serapan gugus hidroksi O-H memiliki bilangan gelombang pada  $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  (H terikat) dan pada  $3650\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  (gugus hidroksi bebas). Gugus amina N-H memiliki bilangan gelombang  $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  (vibrasi ulur) dan  $1640\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  (vibrasi tekuk). Gugus amin C-N memiliki bilangan gelombang  $1350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ . Gugus C-O berada pada bilangan gelombang  $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ . Gugus C-H berada pada daerah bilangan gelombang  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  (Pavia *et al.*, 2009).

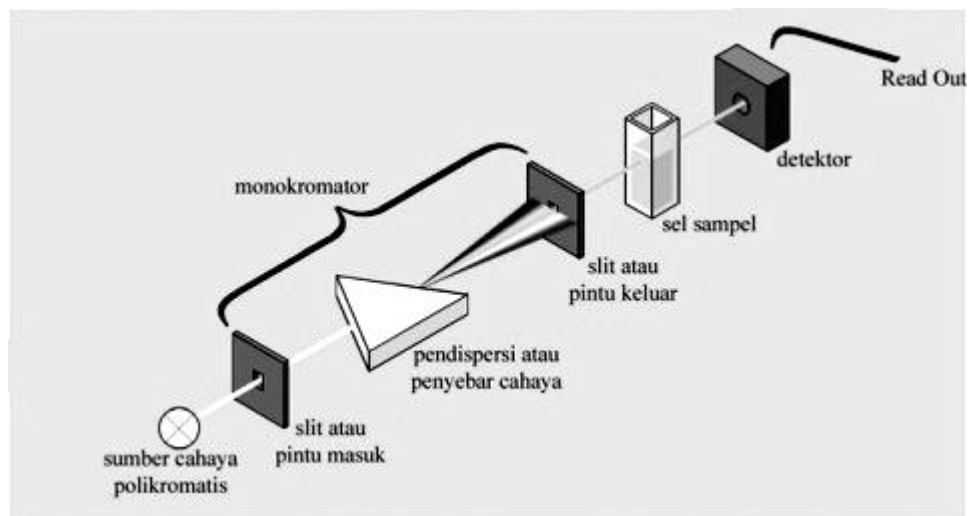
#### **N. Spektrofotometri UV-Vis**

Spektrofotometri merupakan pengukuran absorpsi energi cahaya oleh suatu atom atau molekul pada panjang gelombang tertentu (Day *and* Underwood, 2002). Berdasarkan daerah serapannya, spektrofotometri dibedakan menjadi dua yaitu spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri sinar tampak. Rentang spektrum untuk spektrofotometri UV-Vis atau ultraviolet yaitu pada panjang gelombang  $200\text{-}400\text{ nm}$ , sedangkan untuk spektrofotometri sinar tampak yaitu pada panjang gelombang  $400\text{-}750\text{ nm}$  (Rohman, 2007).

Spektrofotometri UV-Vis merupakan penyerapan sinar tampak atau ultraviolet oleh suatu molekul yang dapat menyebabkan eksitasi elektron dalam orbital molekul tersebut dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrum UV-Vis berbentuk spektrum yang kompleks dan tampak seperti pita absorpsi berlanjut, karena adanya gangguan yang besar dari transisi rotasi dan vibrasi pada transisi elektronik memberikan kombinasi garis yang tumpang tindih (*overlapping*).

Menurut Rohman (2007), dalam analisis secara spektrofotometri UV-Vis setiap komponen yang dipakai harus berfungsi dengan baik agar diperoleh hasil pengukuran yang optimum. Komponen-komponen ini meliputi sumber sinar, monokromator, dan sistem optik.

- 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 blangko dapat digunakan dalam satu kompartemen untuk mengkoreksi pembacaan atau spektrum sampel. Yang paling sering digunakan sebagai blangko dalam spektrofotometri adalah semua pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel atau pereaksi.



**Gambar 8.** Skema alat spektrofotometer UV-Vis (Owen, 2000)

Analisis kuantitatif kitin dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan larutan baku N-asetil glukosamin dan uji gugus fungsinya dengan metode spektrofotometri inframerah (Kumar, 2000). Namun, terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak terutama untuk senyawa yang tidak berwarna yang akan dianalisis yaitu :

1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Cara yang digunakan adalah dengan merubahnya menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu sehingga dapat menyerap sinar UV-Vis.

2. Waktu kerja (*operating time*)

Tujuannya ialah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu kerja ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.



### 3. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal.

### 4. Pembuatan kurva baku

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian absorbansi tiap konsentrasi diukur lalu dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi.

### 5. 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 pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling maksimal.