

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis Jacq*) adalah tumbuhan industri penting penghasil minyak goreng, minyak industri maupun bahan bakar (biodiesel). Buah sawit mempunyai warna bervariasi dari hitam, ungu, hingga merah tergantung bibit yang digunakan. Minyak dihasilkan oleh buah. Kandungan minyak bertambah sesuai kematangan buah. Setelah melewati fase matang, kandungan asam lemak bebas (FFA) akan meningkat dan buah akan rontok dengan sendirinya. Buah terdiri dari tiga lapisan:

- a. Eksokarp, bagian kulit buah berwarna kemerahan dan licin.
- b. Mesokarp, serabut buah.
- c. Endokarp, cangkang pelindung inti. Inti sawit (kernel, yang sebetulnya adalah biji) merupakan endosperma dan embrio dengan kandungan minyak inti berkualitas tinggi

Buah sawit berukuran kecil antara 12-18 g/butir yang duduk pada bulir. Setiap bulir terdiri dari 10-18 butir tergantung pada kesempurnaan penyerbukan. Beberapa bulir bersatu membentuk tandan. Buah sawit yang dipanen dalam bentuk tandan disebut dengan tandan sawit. Hasil utama yang diperoleh tandan buah sawit adalah minyak sawit yang terdapat pada daging buah dan minyak inti

sawit yang terdapat pada kernel. Kedua jenis minyak ini berbeda dalam komposisi asam lemak dan sifat fisiko-kimianya. Kandungan karoten dapat mencapai 1000 ppm atau lebih, tetapi pada minyak jenis tenera lebih kurang 500-700 ppm, kandungan tokoferol bervariasi dan dipengaruhi oleh penanganan selama produksi (Ketaren, 2005).

2.1.1. Minyak sawit mentah (CPO)

Minyak sawit mentah (CPO) mengandung sekitar 500-700 ppm karoten dan merupakan bahan pangan sumber karoten alami terbesar. Oleh karena itu CPO berwarna merah jingga dan jumlahnya juga cukup tinggi. Minyak sawit ini diperoleh dari mesokarp buah kelapa sawit melalui ekstraksi dan mengandung sedikit air serta serat halus yang berwarna kuning sampai merah dan berbentuk semi solid pada suhu ruang. Dengan adanya alur dan serat halus tersebut menyebabkan minyak sawit mentah tidak dapat langsung digunakan sebagai bahan pangan maupun non-pangan (Naibaho, 1988).

Bentuk semi solid sawit mentah disebabkan oleh kandungan jenuh yang tinggi. Sekitar 50% asam lemak yang ada merupakan asam lemak jenuh dengan komponen utama asam palmitat, sekitar 40% asam lemak tidak jenuh tunggal (asam oleat) dan sekitar 10% asam lemak tidak jenuh jamak (asam linoleat). Asam palmitat bentuk bebas dan bentuk terikat sebagai monopalmitin, dipalmitin dan tripalmitin memiliki titik leleh yang relatif tinggi (di atas 60 °C), sehingga suhu ruang senyawa tersebut berbentuk padat. Warna kuning sampai merah minyak sawit mentah disebabkan oleh kandungan pigmen karotenoid. PTPN XIII

menghasilkan produk minyak sawit CPO rata-rata 1000-1100 ton/hari dengan norma kualitas sebagai berikut yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas CPO yang dihasilkan PTPN XIII

Uraian	Nilai
Asam Lemak Bebas (ALB)	<3,5%
Air	0,15%
Kotoran	0,020%
Bilangan Peroksida	5,00%
Bilangan Iodium Min	51,00%
Fe (Besi) Maks	3,00 ppm
Cu (tembaga) Maks	0,30 ppm
Titik Cair	39-41°C

Sumber : (PUSINFO, 2011)

Sifat-sifat minyak kelapa sawit dipengaruhi oleh ikatan kimia unsur C dan jumlah atom C yang membangun asam lemak tersebut, sedangkan sifat-sifat fisik dipengaruhi oleh sifat-sifat kimianya. Minyak merupakan gliserida yang terdiri dari berbagai asam lemak, sedangkan titik cair gliserida tersebut tergantung pada kejenuhan asam. Semakin jenuh asam lemaknya semakin tinggi titik cair dari minyak sawit tersebut. Minyak sawit murni mempunyai titik cair (24,4 – 40) °C dan komposisi CPO dan PKO dapat dilihat pada Tabel 2 dan adapun sifat-sifat kimia dan fisika CPO dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 2. Komposisi asam lemak minyak sawit mentah (CPO)

Komposisi asam lemak	Persen (%)
Laurat (C12:0)	0 – 0,4
Meristat (C14:0)	0,6 – 1,7
Palmitat (C16:0)	41,1 – 47,0
Stearat (C18:0)	3,7 – 5,6
Oleat (C18:1)	38,2 – 43,6
Linoleat (C18:2)	6,6 – 11,9
Linolenat (C18:3)	0,0 – 0,6

Sumber: (May, 1994)

Tabel 3. Sifat kimia minyak sawit mentah

Parameter	Batas Nilai
Bilangan iodin (mg I ₂ /1000 g)	52-54
Bilangan penyabunan (mg KOH/g)	198-205
Asam lemak bebas (%)	2,5-4,5
Kelembaban (%)	0,1
Pengaruh indeks pemutihan (%)	2,3-2,4
Bersifat hidrolisi	
Tidak stabil pada suhu kamar	
Mengandung zat warna alfa dan beta karotenoit (0,05-0,2%)	
Kandungan karoten 297-313	

Sumber: (Ketaren, 1986)

Tabel 4. Sifat fisika minyak sawit mentah

Parameter	Batas Nilai
<i>Specific gravity</i> (25 °C/15,5 °C)	0,917-0,919
<i>Density</i> (g/ml)	0,8910
Massa jenis	0,9
Indeks bias	1,4565-1,0445
Berat molekul	200,31
<i>Melting point</i> (°C)	33-39
<i>Boiling point</i> (°C), P =10 mm Hg	170

Sumber : (Ketaren, 1986)

Kegunaan minyak sawit mentah CPO selain minyak goreng kelapa sawit, dapat dijadikan *margarine, shortening, vanaspati (vegetable ghee), ice creams, bakery fats, instans noodle, sabun dan detergent, cocoa butter extender, chocolate* dan *coatings, specialty fats, dry soap mixes, sugar confectionary, biskuit cream fats, filled milk, lubrication, textiles oils* dan *bio diesel*. Khusus untuk biodiesel, permintaan akan produk ini pada beberapa tahun mendatang akan semakin meningkat, terutama dengan diterapkannya kebijaksanaan di beberapa negara Eropa dan Jepang untuk menggunakan *renewable energy* (Anonim, 2010).

CPO mengandung asam palmitat dan oleat yang tinggi (sekitar 86%) yang diharapkan akan berkontribusi pada penguatan sifat emulsifier serta kandungan asam laurat dan miristat (sekitar 65%) yang telah terbukti sebagai substansi antibakteri dan antikhmir. Produk etanolisis dari campuran PKO dan CPO (berbasis sawit) dimungkinkan sebagai produk baru Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang berperan fungsional, baik sebagai pengemulsi maupun sebagai pengawet pangan bagi beberapa produk pangan hasil pabrik.

2.1.2. Minyak inti sawit (PKO)

Minyak inti sawit atau *palm kernel oil* (PKO) terdiri dari asam lemak, esterifikasi dengan gliserol sama seperti minyak biasa. Minyak inti sawit bersifat padat pada suhu ruang, lebih jenuh daripada minyak kelapa sawit namun setara dengan minyak kelapa. Minyak inti sawit memiliki kandungan asam lemak essensial yang rendah dan kandungan asam lemak jenuh yang cukup tinggi yakni sekitar 80-82%. Kandungan asam lemak minyak inti sawit didominasi oleh asam laurat (12:0) dan asam miristat (14:0) yang disebut *lauric-range oils* masing-masing sebanyak

48.2% dan 16,2%. Bilangan iod minyak inti sawit adalah 35-40 g/100g minyak dengan titik leleh sekitar 35°C (Weiss, 1985). PKO ini berupa minyak putih kekuning-kuningan yang diperoleh dari proses ekstraksi inti buah tanaman kelapa sawit. Standar mutu PKO di Indonesia tercantum di dalam Standar Produksi (SP 10-1975). Adapun syarat mutu PKO adalah kadar minyak minimum 48%; kadar air maksimum 8,5%; kontaminan maksimum 4,0%; kadar inti pecah maksimum 15%, warna maksimum 40%, dan asam lemak bebas maksimum 0,1% (Liang, 2009). PTPN XIII menghasilkan produk inti sawit/palm kernel rata-rata 210-220 ton/hari dengan norma yang disajikan pada Tabel 5 dan adapun sifat-sifat fisika PKO seperti terlihat pada Tabel 6.

Tabel 5. Kandungan inti sawit di PTPN XIII

Spesifikasi	Nilai (%) Max
Kadar Air	7,0
Kadar Kotoran	6,0
Kernel Pecah	15,0
Kernel Berubah Warna	40,0
ALB Minyak Kernel	2,0

Sumber : (PUSINFO, 2011)

Tabel 6. Sifat-sifat fisik PKO

Parameter	Nilai
Titik didih	251 °C
Titik nyala	242 °C
Titik leleh	25 °C
Titik api	251 °C
Titik asap	450 °F
Density	0,952 g/cm ³

Sumber : (Herlianti, 2010)

Asam oleat dapat dihasilkan dari fraksinasi asam lemak yang diperoleh dari proses pengubahan minyak menjadi asam lemak. Asam oleat dapat dihasilkan dari fraksinasi asam lemak yang diperoleh dari hidrolisis lemak. Dalam industri asam oleat banyak digunakan sebagai *surface active*, *emulsifier*, dan dalam produk-produk kosmetika. Kegunaan produk ini (asam oleat) adalah sebagai berikut: industri minuman, seperti pembuatan susu; industri sabun dan detergen; industri kosmetik; industri minyak goreng, dan industri bahan makanan. Adapun komposisi asam lemak asam lemak lainnya pada PKO disajikan pada Tabel 7 dan Tabel 8.

Tabel 7. Komposisi asam lemak jenuh PKO

Jenis Asam Lemak	Persen (%)
Kaprilat (C8:0)	3,87
Kaprat (C10:0)	3,50
Laurat (C12:0)	49,39
Miristat (C14:0)	15,35
Palmitat (C16:0)	8,16
Stearat (C18:0)	0,55
Arasidat (C20:0)	0,08
Dodekanoat (C22:0)	0,00

Sumber: (Murhadi, 2010a)

Tabel 8. Komposisi asam lemak tidak jenuh PKO

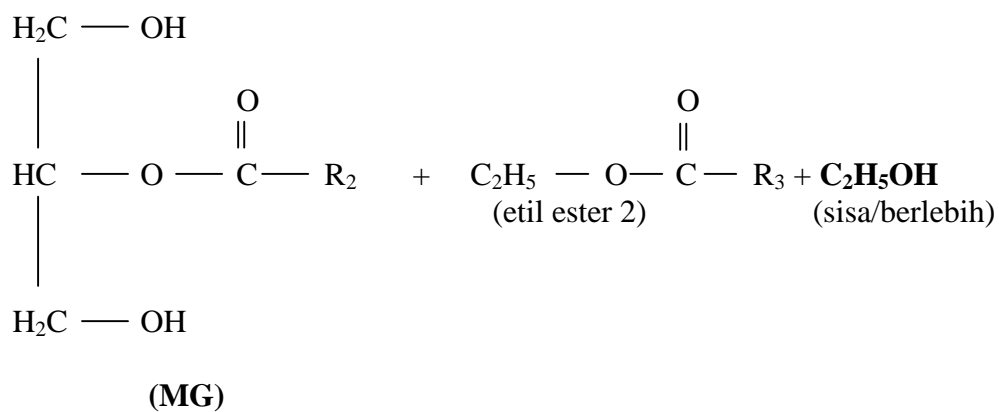
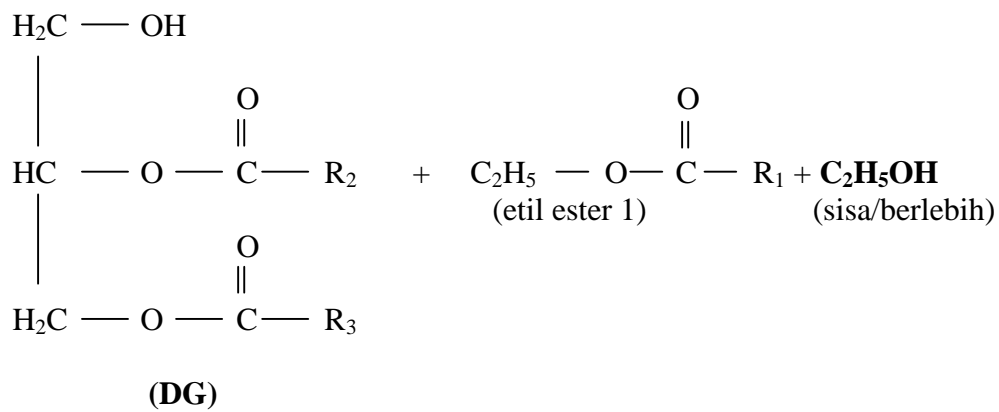
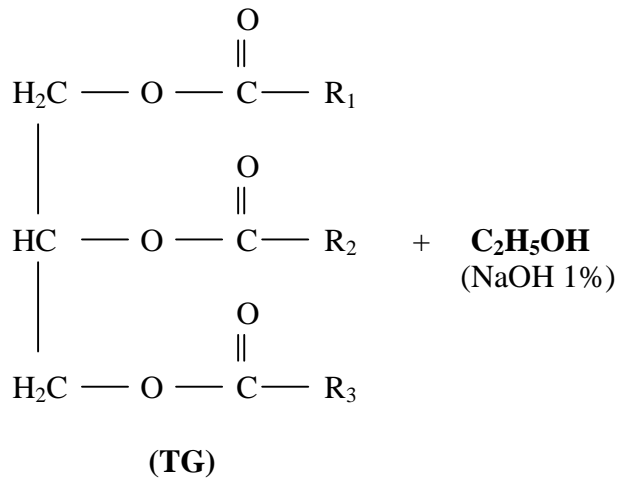
Jenis Asam Lemak	Persen (%)
Miristoleat (C14:1)	0,00
Palmitoleat (C16:1, n-7)	0,00
Oleat (C18:1, n-9)	15,35
Linoleat (C18:2, n-6)	3,10
A-Linoleat (C18:3, n-3)	0,00
11-Eikosanoat (C20:1, n-9)	0,00
Arasidonoat (C20:4, n-6)	0,00
EPA (C20:5, n-3)	0,00
DHA (C22:6, n-3)	0,00

Sumber: (Murhadi, 2010a)

2.2. Etanolisis Triglisierida

Etanolisis merupakan salah satu metode reaksi yang digunakan untuk menghasilkan produk monoglisierida (MG) dan diglisierida (DG) dari triglisierida (TG) minyak nabati. Reaksi etanolisis pada minyak nabati khususnya triglisierida (TG) melalui tiga tahapan reaksi, yaitu: (1) Triglisierida bereaksi dengan etanol dalam suasana basa menghasilkan diglisierida dan etil ester pertama dari posisi asam lemak ke-1/ sn-1, (2) diglisierida selanjutnya bereaksi dengan sisa etanol berlebih dalam suasana basa menghasilkan monoglisierida dan etil ester kedua dari posisi asam lemak ke-3/ sn-3, dan (3) jika reaksi berlanjut, monoglisierida akan bereaksi dengan sisa etanol berlebih dalam suasana basa menghasilkan gliserol dan etil ester dari posisi asam lemak ke-2/sn-2 (Hassanudin *et al.*, 2003).

Hasil penelitian Hassanudin *et al.* (2003) menunjukkan bahwa reaksi etanolisis terhadap triglisierida jauh lebih mudah dan cepat untuk menghasilkan diglisierida dan etil ester pertama, dibandingkan dengan reaksi etanolisis terhadap diglisierida untuk menghasilkan monoglisierida dan etil ester kedua. Khususnya pada waktu reaksi antara 1-5 menit dengan ratio etanol/CPO 0,25 (v/b), sebaliknya pada waktu reaksi 5-8 menit diglisierida untuk menghasilkan monoglisierida dan etil ester ketiga, jauh lebih tinggi daripada etanolisis triglisierida. Tahapan reaksi etanolisis triglisierida (TG) menghasilkan diglisierida (DG), monoglisierida (MG), dan etil ester asam lemak (Hasanuddin *et al.*, 2003 dengan modifikasi) seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tahapan reaksi etanolisis trigliserida (TG) menghasilkan digliserida (DG), monogliserida (MG), dan etil ester asam lemak (Hasanuddin *et al.*, 2003).

Menurut Murhadi (2005), minyak disusun oleh turunan karboksilat dari ester gliserol yang disebut gliserida. Gliserida terdiri dari sebagian besar trigliserida (TG) yang ketiga gugus OH^{-} dari gliserol diesterkan oleh asam karboksilat berantai panjang C12 sampai C24). TG merupakan senyawa ester 3 asam lemak dengan gliserol yang disebut minyak netral dan merupakan komponen utama dari *storage lipid* pada hewan dan tumbuhan yang bersifat hidrofobik atau nonpolar. TG terdiri dari TG sederhana (tristearin, tripalmitin, dan triolein) dan TG campuran.

Digliserol merupakan senyawa 2 ester asam lemak dengan gliserol. Digliserol (DG) dihasilkan dari hasil hidrolisis TG oleh panas dan katalis atau enzim lipase. DG bersifat relatif semipolar dan dapat berfungsi sebagai emulsifier, karena memiliki gugus polar dan nonpolar. Monogliserol (MG) merupakan senyawa 1 ester asam lemak dengan gliserol. MG dihasilkan dari hidrolisis TG atau DG atau dari reaksi re-esterifikasi antara ALB dengan gliserol. MG bersifat semipolar atau polar, dapat berfungsi sebagai antimikroba terutama jika asam lemak yang teresterkan merupakan asam lemak laurat (Murhadi, 2005).

2.3. Fraksinasi

Menurut Gunstone (1997), fraksinasi merupakan proses termomekanikal dimana bahan dasar (raw material) dipisahkan menjadi dua atau lebih fraksi. Pada dasarnya fraksinasi merupakan suatu teknik pemisahan minyak berdasarkan titik leleh minyak dimana tiap jenis minyak memiliki karakteristik titik leleh yang berbeda-beda. Fraksinasi tersebut menyangkut kristalisasi minyak menjadi beberapa fraksi. Fraksinasi juga digunakan untuk memisahkan asam lemak, mono

dan digliserida, dan turunan minyak lainnya, untuk menghasilkan fraksi dengan sifat yang diinginkan untuk aplikasinya dalam industri pangan, industri sabun, industri oleokimia dan farmasi (O'Brien *et al.*, 2000)

Secara umum proses fraksinasi dilakukan dalam dua tahap yaitu proses kristalisasi dengan cara mengatur kondisi suhu, dan tahap kedua memisahkan fraksi tersebut dengan cara penyaringan (filtrasi). Menurut Breeding dan Marshal (1995), proses kristalisasi biasanya menggunakan suhu rendah dan proses filtrasinya menggunakan membran press filter. Menurut Winarno (1997), bila suatu lemak didinginkan, hilangnya panas akan memperlambat gerakan partikel-partikel dalam molekul, sehingga jarak antara molekul lebih kecil.

Minyak sawit kasar berbentuk semipadat pada suhu 25 °C. Minyak sawit yang disimpan di tempat dingin pada suhu 5-7 °C dapat terpisah menjadi fraksi padat (stearin) dan fraksi cair (olein). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan fraksi stearin dan olein berdasarkan titik beku kedua fraksi tersebut. Proses ini dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap pertama proses kristalisasi dengan cara mengatur suhu dan tahap kedua yaitu pemisahan fraksi cair dan padat (Hamilton, 1995).

Menurut Choo *et al.*, (1989), fraksinasi minyak kelapa sawit dapat menghasilkan olein sebesar 70-80% dan stearin 20-30%. Olein merupakan triasilgliserol yang bertitik cair rendah dan mengandung asam oleat dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan stearin. Menurut Gunstone (1997), fraksinasi suatu minyak/lemak biasanya dilakukan dengan berbagai alasan, antara lain menghilangkan komponen minor yang tidak diinginkan dalam aplikasi pada minyak, misalnya penghilangan lilin pada minyak bunga matahari, pengkayaan

trigliserida tertentu, dan pemisahan menjadi dua fraksi untuk aplikasi yang lebih luas, misalnya fraksinasi minyak kelapa sawit menjadi fraksi olein dan stearin. Menurut O'Brien *et al.*, (2000), ada tiga prinsip dasar yang berbeda dalam fraksinasi antara lain fraksinasi kering (*dry fractionation*), fraksinasi dengan pelarut (*solvent fractionation*), dan fraksinasi menggunakan deterjen atau bahan kimia lain (*detergent fractionation*).

Fraksinasi kering (*dry fractionation*) biasa dilakukan secara semi kontinyu pada minyak yang dimurnikan. Proses ini tidak membutuhkan bahan kimia tetapi minyak dihomogenkan pada suhu 70 °C sehingga kemungkinan akan terjadi kerusakan karotenoid. *Dry fractionation* biasanya menghasilkan olein sebanyak 70-75%. Fraksinasi dengan pelarut (*Solvent fractionation*) merupakan fraksinasi menggunakan pelarut. Proses ini relatif mahal karena terjadi penyusutan jumlah pelarut, memerlukan perlengkapan untuk *recovery* pelarut, membutuhkan suhu rendah, dan membutuhkan penanganan untuk mencegah bahaya pelarut yang digunakan. Pelarut yang biasanya digunakan adalah heksana atau aseton. Minyak harus dilarutkan dalam pelarut diikuti dengan pendinginan sehingga suhu yang diinginkan tercapai untuk mendapatkan kristal yang diinginkan. Proses ini biasanya digunakan untuk mendapatkan produk bernilai tinggi, seperti mentega coklat atau mendapatkan lemak tertentu berdasarkan titik cairnya. Fraksinasi deterjen (*Lanza fractionation*) biasanya dilakukan pada minyak sawit kasar. Minyak didinginkan pada *crystallizer* dengan pendingin air untuk mendapatkan kristal dari gliserida dengan titik leleh tinggi. Ketika suhu yang diinginkan tercapai, massa yang mengkristal dicampur dengan larutan deterjen yang mengandung 0.5% natrium lauril sulfat dan MgSO₄ sebagai elektrolit. Pemisahan

berlangsung dalam suspensi cair. Kemudian dilakukan sentrifugasi agar fraksi olein dan stearin terpisah. Fraksi olein kemudian dicuci dengan air panas untuk menghilangkan sisa deterjen lalu dikeringkan dengan *vacuum dryer*. Olein yang diperoleh mencapai 80% (Moran dan Rajah, 1994).

Penurunan suhu, fraksi stearin yang memiliki titik leleh tinggi (48-50 °C) lebih mudah membeku, sedangkan fraksi olein yang memiliki titik leleh rendah (18-20 °C) tetap berbentuk cair dan sebagian besar karotenoid yang larut minyak ikut terlarut ke dalam fraksi olein (Gunstone dan Noris, 1983). Fraksi olein berwarna merah sedangkan fraksi stearin berwarna kuning pucat. Warna merah pada olein disebabkan kandungan karotenoid yang terlarut di dalamnya sedangkan fraksi stearin hanya sedikit mengandung karotenoid.

2.4. Antimikroba

Senyawa antimikroba didefinisikan sebagai senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba (Pelzcar dan Reid, 1979). Beberapa jenis senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba adalah sodium benzoate, senyawa fenol, asam-asam organik, asam lemak rantai medium dan esternya, sorbet, sulfur dioksida, sulfat, nitrit, surfaktan, dimetil karbonat dan metal askorbat (Davidson dan Branen, 1993).

Zat antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh baketeri), barakriastik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistati (menghambat pertumbuhan kapang, dan germasidal menghambat germinasi spora bakteri) (Fardiaz, 1992). Mekanisme senyawa antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba adalah merusak dinding sel yang dapat mengakibatkan

lisis, penghambatan system metabolisme dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler, dan merusak membran sel (Pelzcar dan Reid, 1979). Kerusakan membran sel oleh senyawa antimikroba mengakibatkan terjadinya kebocoran sel yang ditandai dengan keluarnya berbagai komponen penting dalam sel bakteri, seperti proten, asam nukleat, nukleutida dan lain-lain (Vincent, 1987).

Aktivitas antimikroba asam-asam lemak dari sumber minyak/lemak tanaman. Lemak (trigliserida) tidak memiliki penghambatan terhadap mikroba, kecuali yang mengandung asam-asam lemak berantai karbon rendah-sedang terutama dalam bentuk monogliserida. Secara umum, asam lemak jenuh yang paling efektif sebagai senyawa antibakteri adalah asam laurat (12:0) dalam bentuk monolaurin, sedangkan untuk asam lemak tidak jenuh tunggal dan asam lemak tidak jenuh ganda, masing-masing adalah asam palmitoleat (16:1) dan asam linolenat (18:3) relatif tidak memiliki sifat antimikroba. Jumlah ikatan rangkap pada asam lemak C12-C22 lebih mempengaruhi aktivitas antimikroba asam lemak tersebut. Konfigurasi geometri stuktur asam lemak yang aktif sebagai antimikroba adalah bentuk *cis*, sedangkan bentuk isomer *trans* tidak aktif. Asam lemak dalam bentuk ester alkohol monohidrat mengakibatkan inaktivasi antibakteri, sementara itu dalam bentuk ester polizol dan gliserol dapat meningkatkan aktivitas bakterinya (Kabara, 1984)

2.5. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan pemisah terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa

larutan yang di totolkan baik berupa bercak ataupun pita. Setelah plat atau lapisan dimasukkan ke dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl, 1985).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna cara yang paling sederhana adalah dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluoresensi jika disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dengan pemanasan (Gritter *et al.*, 1991).

2.5.1 Fase diam (lapisan penjerap)

Pada kromatografi lapis tipis, fase diam berupa lapisan tipis yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, dapat pula terbuat dari plat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum (pati). Penjerap yang umum dipakai untuk kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, kieselgur, dan selulosa (Gritter *et al.*, 1991).

Dua sifat yang penting dari fase diam adalah ukuran partikel dan homogenitasnya, karena adhesi terhadap penyokong sangat tergantung pada kedua sifat tersebut.

Ukuran partikel yang biasa digunakan adalah 1-25 mikron. Partikel yang butirannya sangat kasar tidak akan memberikan hasil yang memuaskan dan salah satu cara untuk memperbaiki hasil pemisahan adalah dengan menggunakan fase diam yang butirannya lebih halus. Butiran yang halus memberikan aliran pelarut yang lebih lambat dan resolusi yang lebih baik (Sastrohamidjojo, 1985).

2.5.2. Fase gerak (pelarut pengembang)

Fase gerak ialah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Jika diperlukan sistem pelarut multi komponen, harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga komponen (Stahl, 1985). Dalam pemisahan senyawa organik selalu menggunakan pelarut campur. Tujuan menggunakan pelarut campur adalah untuk memperoleh pemisahan senyawa yang baik. Kombinasi pelarut adalah berdasarkan atas polaritas masing-masing pelarut, sehingga dengan demikian akan diperoleh sistem pengembang yang cocok. Pelarut pengembang yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis antara lain: *n*-heksana, karbontetraklorida, benzena, kloroform, eter, etilasetat, piridian, aseton, etanol, metanol dan air (Gritter *et al.*, 1991).

2.5.3. Nilai R_f

Dalam mengidentifikasi noda-noda dalam kromatografi sangat lazim menggunakan harga R_f (*Retention Factor*) yang didefinisikan sebagai Jarak yang ditempuh senyawa terlarut dibagi dengan jarak yang ditempuh pelarut. Harga R_f beragam mulai dari 0 sampai 1. Faktor-faktor yang mempengaruhi harga R_f adalah struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat penjerap, tebal

dan kerataan dari lapisan penjerap, pelarut dan derajat kemurniannya, derajat kejenuhan uap pengembang dalam bejana, teknik percobaan, jumlah cuplikan yang digunakan, suhu, dan kesetimbangan (Sastrohamidjojo, 1985).

2.5.4. Kromatografi lapis tipis preparatif

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif merupakan salah satu metode pemisahan dengan menggunakan peralatan sederhana. Ketebalan penjerap yang sering dipakai adalah 0,5-2 mm. ukuran plat kromatografi biasanya 20x20 cm. Pembatasan ketebalan lapisan dan ukuran plat sudah tentu mengurangi jumlah bahan yang dapat dipisahkan dengan KLT preparatif. Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel.

Penotolan cuplikan dilakukan dengan melarutkan cuplikan dalam sedikit pelarut. Cuplikan ditotolkan berupa pita dengan jarak sesempit mungkin karena pemisahan tergantung pada lebar pita. Penotolan dapat dilakukan dengan pipet tetapi lebih baik dengan penotol otomatis. Pelarut yang baik untuk melarutkan cuplikan adalah pelarut yang atsiri. Pengembangan plat KLT preparatif dilakukan dalam bejana kaca yang dapat menampung beberapa plat. Bejana dijaga tetap jenuh dengan pelarut pengembang dengan bantuan kertas saring yang diletakkan berdiri disekeliling permukaan bagian dalam bejana (Hostettmann *et al.*, 1995).

Kebanyakan penjerap KLT preparatif mengandung indikator fluoresensi yang membantu mendeteksi letak pita yang terpisah pada senyawa yang menyerap sinar ultraviolet. Untuk mendeteksi senyawa yang tidak menyerap sinar ultraviolet yaitu

dengan cara menutup plat dengan sepotong kaca lalu menyemprot kedua sisi dengan penyemprot (Hostettmann *et al.*, 1995).

Setelah pita ditampakkan dengan cara yang tidak merusak maka senyawa yang tidak berwarna dengan penjerap dikerok dari plat kaca. Cara ini berguna untuk memisahkan campuran beberapa senyawa sehingga diperoleh senyawa murni (Gritter *et al.*, 1991).

2.6. Karakteristik Bakteri Uji

2.6.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif dan jika diamati di bawah mikroskop akan tampak dalam bentuk bulat tunggal atau berpasangan, atau berkelompok seperti buah anggur. *S. aureus* termasuk dalam famili *Staphylococcaceae*, berukuran diameter 0,5-1,5 μm dan membentuk pigmen kuning keemasan. Bakteri ini tidak membentuk spora, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, non-motil, koagulase dan katalase positif, mampu memfermentasi manitol seta mampu menjalankan dua macam metabolisme respirasi maupun fermentasi.

S. aureus termasuk ke dalam kelompok bakteri mesofilik. Namun terdapat beberapa galur *S.aureus* yang mampu tumbuh pada suhu rendah 6-7 $^{\circ}\text{C}$. Pada umumnya, *S. aureus* tumbuh pada kisaran suhu 7-48,5 $^{\circ}\text{C}$ dengan suhu optimum pertumbuhan 30-37 $^{\circ}\text{C}$. Kisaran pH pertumbuhan antara 4,5-9,3 dengan pH optimum 7,0-7,5 (Bennet dan Monday, 2003).

Keberadaan *S. aureus* dalam bahan pangan erat kaitannya dengan sanitasi pekerja serta kebersihan lingkungan dan peralatan pengolahan. Pangan yang dilaporkan dalam berbagai kejadian luar biasa *S. aureus* umumnya diolah dengan proses pemotongan, pamarutan, dan penggilingan yang melibatkan pekerja yang terkontaminasi. *S. aureus* terdapat luas di alam dan pada bahan baku pangan sehingga penganan yang kurang tepat dapat meningkatkan risiko keracunan pangan akibat *S. aureus* (Robinson *et al.*, 2000).

S.aureus memiliki beberapa jenis faktor virulensi yang mendukung terjadinya penyakit pada tubuh manusia, salah satunya adalah protein permukaan yang membantu kolonisasi pada jaringan inang. Untuk mendukung penyebarannya pada jaringan, bakteri ini menghasilkan invasin, seperti leukosidin, kinase dan hyarulonidase. Leukosidin adalah sitotoksin yang dapat membunuh leukosit, sedangkan hyarulonidase adalah enzim yang dapat mendegradasi asam hyaluronat sehingga meningkatkan permeabilitas jaringan (Todar, 2008).

Kontaminasi *S.aureus* pada makanan dapat menyebabkan keracunan (intoksikasi). Hal ini disebabkan karena bakteri tersebut mampu menghasilkan toksin yang berupa enterotoksin di dalam saluran pencernaan. Enterotoksin dapat diproduksi apabila kondisi lingkungan mendukung untuk pertumbuhan dan perkembangan bakteri tersebut, seperti pH dan suhu (Miliotis dan Bier, 2003).

2.6.2. *Escherichia coli*

Escherecia coli merupakan bakteri gram negatif dan termasuk dalam kelompok koliform bersama dengan *Enterobacter* dan *Klebsiella* yang semuanya tergabung

dalam famili *Enterobacteriaceae* (Fardiaz, 1989). *E. coli* adalah bakteri berbentuk batang dengan ukuran panjang 2,0–6,0 mikron dan lebar 1,1-1,5 mikron, terdapat dalam bentuk *Flagela peritikous*, tumbuh pada suhu 10-40 °C dengan suhu optimum 37 °C dan pH optimum 7,0-7,5 dengan nilai aktivitas air (Aw) minimum adalah 0,96 (Fardiaz, 1983).

E. coli enteropatogenik merupakan bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia dan hewan melalui dua cara, yaitu dengan cara memproduksi enterotoksi (tidak bersifat invasif atau menembus) dengan gejala diare tanpa demam, dan dengan cara invasif atau penetrasi pada sel-sel mukosa usus disertai gejala infeksi seperti menggigil, demam dan diare (Fardiaz, 1983).

2.6.3. *Sacharomyces cerevisiae*

Saccharomyces crevisiae termasuk ke dalam kelas *Ascomycetes*, selnya berbentuk bulat panjang 6-8 µm (Pelzcar *et al.*, 1993). *S. cerevisiae* merupakan jenis khamir yang memiliki suhu pertumbuhan optimum 33-35 °C, suhu minimum 4-13 °C dan suhu pertumbuhan maksimum adalah 38-39 °C, sedangkan Aw pertumbuhan 0,89.

S. cerevisiae umumnya bermanfaat dalam pertumbuhan roti, anggur dan produk makanan lainnya, tetapi jika berlebihan *S. cerevisiae* dapat merusak produk makanan. Khamir dapat tumbuh pada nilai aktivitas air lebih rendah daripada bakteri, maka bahan-bahan yang lebih kering cenderung untuk mengalami kerusakan akibat organisme tersebut. Sehubungan dengan hal tersebut bahan pangan dengan kadar gula yang tinggi seperti selai, manisan, madu, sari buah dan ihsirup seringkali dirusak oleh khamir (Buckle *et al.*, 1987).