

John Hendri
Aspita Laila

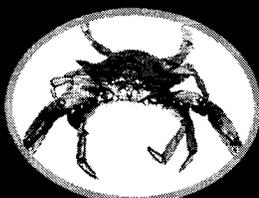
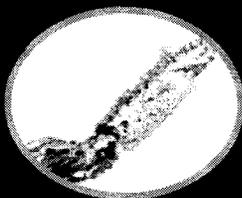
Kitin Kitosan



Penerbit Lembaga Penelitian
Universitas Lampung 2013

**John Hendri
Aspita Laila**

Kitin Kitosan



Penerbit:
**LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG**



Kitin Kitosan

John Hendri & Aspita Laila © Oktober 2013

Perpustakaan Nasional: Katalog Dalam Terbitan (KDT)

John Hendri

Aspita Laila

Kitin Kitosan

Cetakan pertama, Oktober 2013

xii + 112 hlm. ; 15,5 x 23 cm

ISBN : 978-979-8510-60-1

Penerbit:

LEMBAGA PENELITIAN

UNIVERSITAS LAMPUNG

Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro No. 1

Bandar Lampung 35145

Telp. (0721) 705173, 701609 ext. 138 fax. 773798

e-mail: lemlit@unila.ac.id

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

All Rights Reserved.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian

atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit

Isi diluar tanggung jawab percetakan.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena hanya berkat rahmat-Nya, buku ini dapat hadir di hadapan para pembaca budiman .

Buku ini bertujuan meluaskan wawasan dan nuansa berpikir para penelitian dalam bidang biopolimer khususnya Kitin dan Kitosan dalam segala aspek dan bidangnya, seperti peneliti, mahasiswa ataupun dosen di perguruan tinggi. Buku ini di harapkan dapat memberikan sumbangan pikiran dari penulis untuk untuk mengetahui lebih dalam tentang kekayaan sumber alam Indonesia, secara khusus pada bidang Kitin dan Kitosan yang merupakan sumber yang cukup besar.

Secara umum transfer penguasaan penerapan ilmu pengetahuan dan teknologi kepada masyarakat merupakan suatu hal yang utama, karena sesungguhnya proses eksplorasi sumber daya alam akan dilaksanakan oleh masyarakat sebagai pengguna teknologi. Proses ini harus dilakukan dengan memahami potensi unggulan dari setiap daerah memiliki jenis dan karakteristik sumber daya alamnya, sehingga penentuan terhadap teknologi mana yang tepat untuk ditransfer dan diterapkan disuatu daerah merupakan suatu hal yang penting didalam perencanaan pembangunan yang bersendikan kekuatan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Proses penyusunan buku ini berawal dari penelitian yang dilakukan oleh peneliti, teman-teman peneliti dan para mahasiswa di Jursan Kimia FMIPA Universitas Lampung dari tahun 2000 sampai dengan sekarang, melalui berbagai dana hibah penelitian dari Lembaga Penelitian Universitas Lampung, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Dirjen Dikti, Kemendikbud, dan Kementrian Riset dan Teknolgi .

Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Lampung, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Dirjen Dikti, Kemendikbud, dan Kementrian Riset dan Teknolgi, teman sejawat di Jurusan Kimia dan para mahasiswa yang telah meberikan sumabangan pikiran dan dana sehingga akhirnya buku ini dapat diterbitkan.

Akhir kata penulis menharapkan masukan positif dari para pembaca untuk dapat disempurnakan dikemudian hari.

Bandar Lampung, Desember 2013

Penulis

DAFTAR ISI

Prakata.....	iii
Daftar Isi	v
Daftar Tabel.....	viii
Daftar Gambar	ix
BAB. I. PENDAHULUAN	1
BAB. II. KITIN.....	7
2.1. Sifat Kimia Fisika Kitin	9
2.2. Isolasi Kitin.....	10
2.3. Deproteinasi	10
2.3.1. Deproteinasi secara kimiawi	11
2.3.2. Deproteinasi Secara Enzimatik.....	11
2.4. Demineralisasi	13
1. Kalsium (Ca).....	15
2. Magnesium (Mg)	16
2.5. Depigmentasi	16
2.6. Sumber-Sumber Kitin.....	18
1. Udang	19
2. Kepiting.....	20
3. Cumi-Cumi (<i>Loligo pealii</i>).....	22

BAB. III KITOSAN.....	25
3.1. Sifat Kimia Fisika Kitosan	26
3.2. Isolasi Kitosan.....	27
3.2.1. Isolasi Kitosan Secara Kimiawi	27
3.2.2. Isolasi Kitosan Secara Enzimatik.....	27
3.3. Bagan Isolasi Kitosan.....	29
BAB. IV. GLUKOSAMIN	31
4.1. Hasil Isolasi dari kulit udang.....	32
4.1.1. Glukosamin dari Kitin dan Kitosan	32
4.1.2. N-asetilglukosamin	32
4.1.3. Enzim Kitinase.....	33
4.1.4. Jamur <i>Mucor</i>	35
4.1.5. <i>Actinomycetes</i>	36
4.1.6. Lisozim.....	37
4.2. Fermentasi.....	41
4.2.1. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>)	41
4.2.2. Proses Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>).....	43
BAB. V. ANALISIS DAN KARAKTERISASI.....	45
5.1. Kadar Air	45
5.2. Kadar Abu	48
5.3. Pengukuran Berat Molekul Kitin-Kitosan	46
1. <i>Difference Scanning Calorimetry</i> (DSC).....	50
2. Spektroskopi <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR).....	52
3. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	60
5.4. Penentuan Derajat Deasetilasi.....	65
5.4.1. Penentuan Derajat Deasetilasi Kitosan dengan metoda FTIR.....	65
5.4.2. Penentuan Derajat Deasetilasi Kitosan dengan metoda DSC.....	67

BAB. VI. KEGUNAAN KITIN KITOSAN	71
6.1. Amobilisasi Enzim α -amilase dengan Kitin.....	71
6.2. Amobilisasi Enzim Protease Dengan Bahan Pendukung Polimer Kitosan	74
6.3. Studi Adsorpsi Asam Amino Glisin($C_2H_5NO_2$) dan Lisin mono hidroklorida ($C_6H_{15}ClN_2O_2$) Menggunakan Polimer Kitosan(<i>Desy Pratiwi</i>)	78
6.4. Adsorpsi Ion logam Pb dan Cd oleh kitosan	86
6.5. Pengikatan Kitosan Pada Polietilen Tergrafting Asam Akrilat.....	88
 DAFTAR PUSTAKA	 93
 GLOSARIUM.....	 101

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kualitas Standar Kitin.....	17
Tabel 3.1. Kualitas Standar Kitosan	28
Tabel 5.1. Luas puncak, dan suhu puncak yang digunakan dalam penentuan derajat deasetilasi kitosan.....	68
Tabel. 6.1. Hasil perhitungan plot kinetika Langmuir.....	84

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Udang, Cumi dan Kepiting	2
Gambar 1.2.	Kulit Udang yang sudah dikeringkan	3
Gambar 1.3.	Struktur Selulosa, Alginat, Karaginan dan Kitin	4
Gambar 2.1.	Struktur Kitin	7
Gambar 2.2.	Kitin Standar WAKO Jepang	8
Gambar 2.3.	Hasil Pembuatan Kitin	8
Gambar 2.4.	Uji Filtrat dengan CuSO_4	12
Gambar 2.5.	Kurva Hubungan Waktu Fermentasi Kitin Vs Berat Produk yang larut dalam N,N- dimetilasetamida dan LiCl 10%	13
Gambar 2.6.	Uji Filtrat dengan Amonium Oksalat	15
Gambar 2.7.	Tambak Pembudidayaan Udang	19
Gambar 2.8.	Udang	20
Gambar 2.9.	Hutan Bakau, daerah perkembangan biaknya Kepiting	21
Gambar 2.10.	Kepiting	22
Gambar 2.11.	Cumi-cumi	23
Gambar 3.1.	Struktur Kitosan	25
Gambar 3.2.	Standar Kitosan WAKO Jepang	26
Gambar 3.3.	Kitosan Hasil Isolasi	26
Gambar 4.1.	Struktur D-glukosamin	31
Gambar 4.2.	Glukosamin Standar WAKO Jepang dan	31
Gambar 4.3.	Struktur N-asetilglukosamin	32
Gambar 4.4.	N-asetilglukosamin Standar WAKO Jepang	33
Gambar 4.5.	Reaksi pemutusan ikatan β -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin	33
Gambar 4.6.	Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase	34

Gambar 4.7.	Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan Kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc Kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida.....	34
Gambar 4.8.	<i>Mucor miehei</i>	36
Gambar 4.9.	<i>Actinomyces</i> ANL-4	37
Gambar 4.10.	Sumber Enzim Lisozim	39
Gambar 4.11.	Kurva aktivitas enzim hasil fraksinasi ammonium sulfat.....	40
Gambar 4.12.	Fermentor.....	42
Gambar 4.13.	Shaker Inkubator.....	43
Gambar 5.1.	Desikator.....	46
Gambar 5.2.	Oven	46
Gambar 5.3.	Furnace.....	48
Gambar 5.4.	Viskometer	49
Gambar 5.5.	Pipa Kapiler Viskometer.....	50
Gambar 5.6.	DSC.....	51
Gambar 5.7.	Kurva DSC Kitosan Standar.....	51
Gambar 5.8.	Pita serapan IR dapat dituliskan dalam bentuk Absorbansi atau % Transmisi.....	54
Gambar 5.9.	FTIR.....	58
Gambar 5.10.	Diagram Alat HPLC	60
Gambar 5.11.	HPLC	63
Gambar 5.12.	ELSD.....	63
Gambar 5.13.	Kromatogram HPLC-ELSD <i>Phenyl thiourea</i> glukosamin hasil fermentasi kitin dengan <i>Actinomyces</i> ANL-4	65
Gambar 5.14.	Kurva DSC kitosan hasil isolasi dengan massa 2,5 mg dan kecepatan kalor masing-masing	67
Gambar 5.15.	Grafik hubungan kecepatan kalor dan derajat deasetilasi kitosan	68
Gambar 6.1.	Reaksi <i>crosslinking</i> dengan reagen glutaraldehid.....	76
Gambar 6.2.	Morfologi permukaan matriks kitosan	77

Gambar 6.3.	Morfologi permukaan adsorpsi enzim protease oleh matriks kitosan pada pH pengikatan 6,5 sebelum reaksi <i>crosslinking</i>	77
Gambar 6.4.	Morfologi permukaan adsorpsi enzim protease oleh matriks kitosan pada pH pengikatan 6,5 setelah reaksi <i>crosslinking</i> dengan glutaraldehid	78
Gambar 6.5.	Pemaparan terdispersinya polimer kitosan dalam larutan asam amino	81
Gambar 6.6.	Tarik menarik antara kutub yang berlawanan pada larutan asam amino dan polimer kitosan ...	82
Gambar 6.7.	Plot Langmuir untuk adsorpsi glisin oleh kitosan	83
Gambar 6.8.	Plot Langmuir untuk adsorpsi lisin oleh kitosan .	83
Gambar 6.9.	Reaksi pertukaran ion antara asam amino dengan kitosan	85
Gambar 6.10.	Reaksi Pengikatan Ion antara Asam Amino dengan Kitosan	85
Gambar 6.11.	Grafting antara PE dengan Asam Akrilat dengan Menggunakan radiasi sinar gamma	90

Pendahuluan

Kekayaan sumber daya alam yang dimiliki oleh Indonesia, belum banyak dimanfaatkan, hal ini dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya adalah keterbatasan kemampuan dibidang ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) dalam transfer dan penerapan IPTEK yang tepat pada masyarakat pengguna. Hal ini merupakan penyebab utama dalam bangkitnya Indonesia untuk mendapatkan manfaat yang besar atas kepemilikan sumber daya alam yang melimpah.

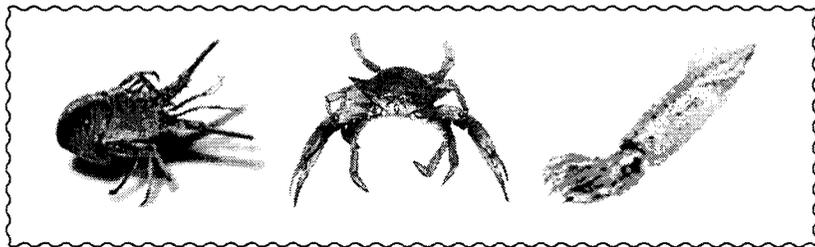
Keterbatasan kemampuan penguasa bidang iptek umumnya disebabkan oleh minimnya pelaku bisnis dan pemerintah untuk melakukan usaha-usaha transfer dan penyerapan perkembangan kemajuan IPTEK dari Negara maju. Kondisi ini terjadi akibat besarnya ketergantungan bangsa ini terhadap barang yang sudah jadi dan atau tidak disertai dengan proses transfer dan penyerapan teknologi dalam pelaksanaan pembangunan termasuk dalam hal eksplorasi serta eksploitasi sumber daya alam yang dimiliki.

Kurang produktifnya sumber daya manusia (SDM) dalam hal ini peneliti untuk menghasilkan inovasi-inovasi teknologi, umum akibat kurangnya penghargaan dari pemerintah atau pelaku bisnis seperti dukungan dana dan fasilitas untuk melakukan inovasi penelitian sehingga banyak penelitian yang tidak fokus pada inovasi teknologi dan hanya sebagai bagian rutinitas peneliti dalam mengejar karir (pangkat).

Transfer penguasaan penerapan teknologi kepada masyarakat pengguna merupakan suatu hal yang utama karena sesungguhnya

proses eksplorasi sumber daya alam akan dilaksanakan secara dominant oleh masyarakat pengguna teknologi. Proses ini harus dilakukan dengan memahami potensi unggulan dari setiap daerah memiliki jenis dan karakteristik sumber daya alamnya, sehingga penentuan terhadap teknologi mana yang tepat untuk ditransfer dan diterapkan disuatu daerah merupakan suatu hal yang penting didalam perencanaan pembangunan yang bersendikan kekuatan IPTEK. Perkembangan industri IPTEK dimasa yang akan datang dicirikan oleh suatu pemanfaatan material yang bersumber dari bahan baku terbarukan (*renewable resources*). Untuk itu kelompok polimer berusaha untuk memberdayakan sumber daya alam yang banyak terdapat di Indonesia.

Beberapa penelitian diarahkan pada pengolahan bahan-bahan lokal bahkan limbah yang dapat dipertimbangkan sebagai alternatif untuk bahan dasar produk biopolimer, misalnya alginat yang berasal dari olahan rumput laut, kitin dari cangkang krustaseae (Hendri 2005).



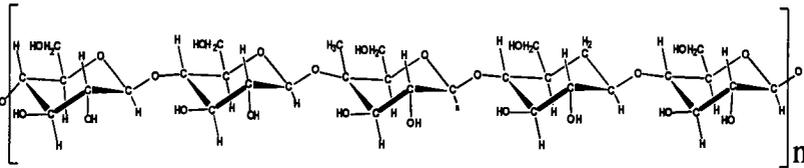
Gambar 1.1 Udang, Cumi dan Kepiting

Indonesia merupakan salah satu negara kepulauan yang besar dan banyak mendapatkan sumbangan devisa dari hasil lautnya. Hasil laut yang umumbanyak diekspor ke manca negara seperti Eropa, Amerika, dan Jepang adalah produksi makanan kaleng dari hewan laut seperti udang, kepiting, dan rajungan. Pada proses pengolahan ketiga biota laut tersebut banyak menyisakan limbah yang belum dimanfaatkan secara optimal. Pada proses pembekuan udang untuk ekspor sekitar 60 - 70 % dari berat total udang menjadi limbah (kulit udang), sehingga diperkirakan akan dihasilkan limbah udang sekitar 30-35% dari berat udang (Anonim, 2010 dan Hendri 2005).

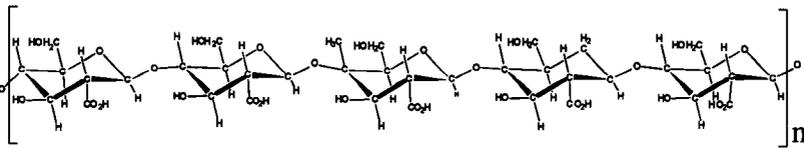


Gambar 1.2. Kulit Udang yang sudah dikeringkan

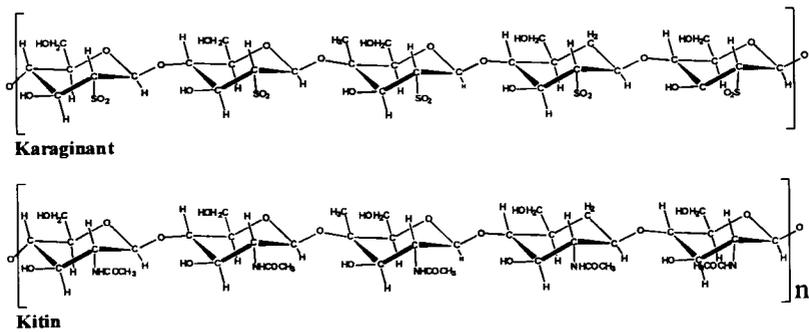
Pada pengolahan kepiting umumnya diambil hanya daging saja sedangkan cangkangnya dibuang, padahal cangkang kepiting mengandung senyawa kitin yang cukup tinggi yaitu, sekitar 20-30 % dari berat kulit keringnya. Sementara itu cumi-cumi umumnya dijual dalam dua bentuk utama, segar dan kering asin. Hasil samping pengolahan daging cumi-cumi berupa tulang rawan yang mengandung senyawa kimia berupa kitin dan kitosan. Tulang rawan cumi-cumi memiliki kandungan kitin sebanyak 97,20% (Agusnar 2006).



Selulosa



Alginat



Gambar 1.3. Struktur Selulosa, Alginat, Karaginan dan Kitin

Kitin terdapat di alam sebagai komponen struktural dari kerangka luar insekta dan krustasea, juga dinding sel ragi dan jamur. Kitin merupakan polimer yang tersusun atas monomer N-asetilglukosamin yang terikat secara β -1,4 dengan tingkat terasetilasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan turunannya yang memiliki tingkat terasetilasi lebih rendah yaitu kitosan (Muzarelli, 1984a).

Kitin dan kitosan telah diproduksi secara komersial di negara maju mengingat manfaatnya diberbagai industri, seperti bidang farmasi, biokimia, bioteknologi, kosmetika, biomedika, industri kertas, industri pangan, industri tekstil, dan lain-lain. Pemanfaatan tersebut didasarkan atas sifat-sifatnya yang dapat digunakan sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkelat, dan penebal emulsi (Austin et.al., 1984 and 1995).

Glukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan di negara maju telah diproduksi secara komersial mengingat manfaatnya di berbagai industri, seperti bidang farmasi, biokimia, bioteknologi, kosmetika, biomedika, pangan, tekstil, kertas, dan lain-lain. Pemanfaatan tersebut didasarkan atas sifat-sifatnya yang dapat digunakan sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkelat, dan penebal emulsi (Muzarelli, 1984b).

Salah satu enzim yang dapat digunakan pada metode enzimatik adalah enzim lisozim dan golongan mikroba seperti *Mucor* dan *Actyno*. Enzim ini mampu menghidrolisis ikatan β -(1,4) antara N-asetilmuramat (NAM) dan N-asetilglukosamin (NAG) yang

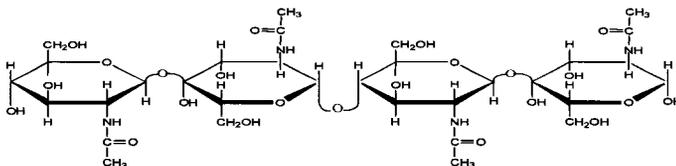
terdapat dalam dinding sel bakteri (Winarno, 1995). Perbedaan kitosan dengan dinding sel bakteri, terletak pada jenis gula penyusunnya, kitosan hanya terdiri atas satu jenis gula, yaitu residu D-glukosamin yang dihubungkan dengan ikatan β -(1,4) (AspitaLaila dkk. 2010, Dinter, S et all. 2000).

Kitin

Kitin ditemukan pertama kali pada tahun 1811 oleh Braconot dalam residu ekstrak jamur dan dinamakan *fungine*, istilah kitin baru diperkenalkan pada tahun 1823 oleh Odier (Muzarelli 1984a).

Kitin merupakan polimer glukosa yang paling banyak di alam setelah selulosa. Kitin tersebar luas di alam sebagai bahan pendukung eksoskeleton bagi krustasea, insekta, dan fungi yang bergabung dengan protein, pigmen, dan garam anorganik.

Kitin merupakan polimer berantai lurus yang memiliki berat molekul tinggi dan rumus empiris $(C_6H_9O_4.NHCOCH_3)_n$, komponen penyusunnya yaitu N-asetilglukosamin, dimana komponen ini terangkai oleh ikatan glukosida pada posisi β -1,4 sama seperti monomer glukosa dalam selulosa, perbedaan dengan selulosa terletak pada gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor 2, pada kitin digantikan oleh gugus asetamida ($NHCOCH_3$) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Kitin juga disebut dengan β -(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa (N-asetil-D-Glukosamin) (Bastaman. 1989). Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar.

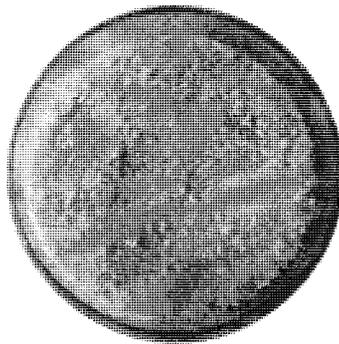


Gambar 2.1. Struktur Kitin

Kitin merupakan bagian kerangka penunjang dari selulosa kelompok Arthropoda, Crustacea, Insecta, Mollusca, dan kelompok hewan lain, karena kitin adalah komponen utama dinding sel dari kelompok fungi besar (Bacidiomycetes, Ascomycetes, dan Zygomycetes). Sebagai material pendukung kelompok hewan krustacea, kitin terdapat sebagai mukopolisakarida yang berasosiasi dengan kalsium karbonat dan berikatan secara kovalen dengan protein. Selain ketiga komponen tersebut juga terdapat lemak, pigmen dan logam dalam jumlah yang sangat sedikit (Hirano 1986, Holker et. al., 2004).



Gambar 2.2. Kitin Standar WAKO Jepang



Gambar 2.3. Hasil Pembuatan Kitin

2.1. Sifat Kimia Fisika Kitin

Kitin termasuk golongan homopolisakarida yang mempunyai berat molekul tinggi dan merupakan polimer linier dari anhidro-N-asetil-D-glukosamin. Struktur kitin mirip dengan selulosa, perbedaannya adalah gugus hidroksi yang terikat pada atom karbon nomor 2. Pada kitin gugus karbonnya digantikan oleh gugus asetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin (Cabib 1987).

Berdasarkan struktur kitin dapat dilihat rantai kitin antara satu dengan yang lainnya yaitu antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat, ikatan hidrogen ini yang menyebabkan kitin tidak dapat larut dalam air.

Senyawa kitin tidak larut dalam air, larutan basa encer dan pekat, larutan asam encer, dan pelarut organik. Tetapi, senyawa ini larut dalam asam mineral pekat seperti HCl, H_2SO_4 , HNO_3 , dan H_3PO_4 . Sistem pelarut yang efektif dalam melarutkan kitin adalah campuran N,N-dimetilasetamida dan LiCl 5%, metil-2-pirolidone (Hirano, S. 1986).

Berbeda dengan polisakarida lainnya yang umumnya bersifat netral atau sedikit asam, kitin bersifat basa karena adanya gugus asetamida. Adanya kitin dapat dideteksi dengan reaksi warna menggunakan larutan $\text{I}_2 - \text{KI}$ yang akan memberikan warna coklat, kemudian jika ditambahkan asam sulfat berubah warna menjadi violet. Perubahan warna ini menunjukkan reaksi positif adanya kitin (Florkin, 1963).

Sebagai material pendukung krustacea, kitin terdapat sebagai mukopolisakarida yang berasosiasi dengan CaCO_3 dan berikatan secara kovalen dengan protein. Umumnya, kulit krustacea terkandung 30-50% mineral dimana 8-10%-nya merupakan CaCO_3 . Pemisahan CaCO_3 dari protein lebih mudah dilakukan karena garam anorganik ini terikat secara fisik (Hendri dkk, 2007). Menurut Knorr (1982), HCl dengan konsentrasi lebih dari 10% dapat secara efektif melarutkan Ca menghasilkan CaCl_2 .

Selain ketiga komponen tersebut, pada kulit krustacea juga terdapat lemak, pigmen, dan logam dalam jumlah sangat sedikit. Komposisi kitin pada kulit krustacea bervariasi menurut jenisnya. Diketahui bahwa tidak semua protein terikat secara kovalen dengan kitin,

sebagian terikat secara fisik. Jumlah protein yang terikat secara kovalen dengan kitin tidak sama pada setiap krustacea.

Perbedaan jumlah protein yang terikat secara kovalen tersebut mempengaruhi mudah atau tidaknya proses pemisahan protein dalam isolasi kitin (Austin, 1984). Menurut Knor D (1984), sampah biologis udang windu pada daerah tropis mengandung 8-10% kitin, 30-35% protein, dan 10-20% kalsium.

2.2. Isolasi Kitin

Kitin mempunyai potensi yang dapat digunakan dalam industri makanan dan minuman, bidang kesehatan, pertanian, pengolahan limbah, dan sebagainya. Pemanfaatan kitin dibatasi oleh sifat-sifatnya yang tidak larut dan sulit dipisahkan dengan bahan lain yang terikat, sehingga untuk pemanfaatannya kitin perlu diubah terlebih dahulu menjadi turunannya. N-asetilglukosamin merupakan unit penyusun kitin yang dimanfaatkan dalam bidang farmasi (Hendri dkk 2007).

Ada dua cara degradasi kitin, yaitu secara kimia dan fermentasi. Degradasi secara kimia menggunakan larutan NaOH pekat 40-50% (1 : 15w/v) pada suhu 115°C (Haryanto, 1995). Sedangkan degradasi secara fermentasi menggunakan mikroba yang dapat menghasilkan enzim atau dengan menggunakan enzim murni untuk mengubah kitin menjadi turunannya. Degradasi secara fermentasi merupakan metode alternatif untuk menggantikan metode konvensional yang lebih mahal dan menyebabkan masalah lingkungan.

2.3. Deproteinasi

Deproteinasi merupakan proses penghilangan protein dari kitin. Secara umum proses deproteinasi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara kimia dan enzimatik, Proses ini dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara kimia terutama dengan menggunakan larutan alkali seperti sodium hidroksida (NaOH) atau potasium hidrosida (KOH) dan secara enzimatik menggunakan enzim proteolitik seperti bakteri *Pseudomonas malthophila* LC 102 (Hendri dkk. 2005 dan 2007).

2.3.1. Deproteinasi secara kimiawi

Deproteinasi secara kimiawi merupakan proses penghilangan protein dari sampel dengan memakai bahan kimia. Proses deproteinasi secara kimiawi menggunakan larutan alkali konsentrasi rendah seperti NaOH 20% dan KOH 20%. Larutan alkali yang digunakan dalam proses deproteinasi harus dengan konsentrasi rendah dibawah 40%, karena jika digunakan konsentrasi diatas 40% maka kulit udang akan mengalami deasetilasi sebagian (Hendri dkk 2007).

Deproteinasi bertujuan untuk menghilangkan protein dari kitin dengan menggunakan larutan NaOH 3,5% selama dua jam pada suhu 65°C. Apabila digunakan larutan NaOH dengan konsentrasi dan suhu lebih tinggi akan menyebabkan kitin terdeasetilasi. Protein ini terekstrak dalam bentuk Na-proteinat. Ion Na⁺ dari NaOH akan mengikat ujung rantai protein yang bermuatan negatif dan mengendap (Hendri dkk 2007)..

Untuk mengetahui apakah protein telah terpisah dari kitin dilakukan pengujian dengan menambahkan CuSO₄ ke dalam filtrat. Dengan CuSO₄ protein akan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Untuk menghilangkan protein yang telah diikat oleh Na⁺, residu yang diperoleh dicuci dengan aquades hingga menunjukkan tes negatif terhadap CuSO₄ dari filtrat pencucian dan pH telah netral yang dapat dilihat dengan menggunakan kertas lakmus universal. Proses pencucian juga bertujuan untuk menghilangkan NaOH yang mungkin masih terdapat dalam residu.

Rendemen yang dihasilkan dari proses deproteinasi adalah 101,28 gram dari sampel awal 150 gram kulit udang (67,52%). Dengan demikian protein yang dapat dipisahkan sebesar 32,48% dari sampel awal. Hasil ini cukup baik mengingat kandungan protein dalam kulit udang windu (*Penaeus monodon fab.*) di daerah tropis berkisar antara 30 - 35 % dari berat kering (Peter, 1995).

2.3.2. Deproteinasi Secara Enzimatik

Deproteinasi secara enzimatik merupakan proses penghilangan protein dari kitin melalui proses fermentasi menggunakan mikroorganisme (bakteri). Proses ini dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

dalam medium cair NB pada suhu ruang dan konsentrasi substrat 5%. Dengan proses fermentasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan menghasilkan enzim protease. Enzim protease ini mempunyai kemampuan untuk memutuskan ikatan peptida dari residu asam amino dalam molekul protein (Nurhasanah 2003).

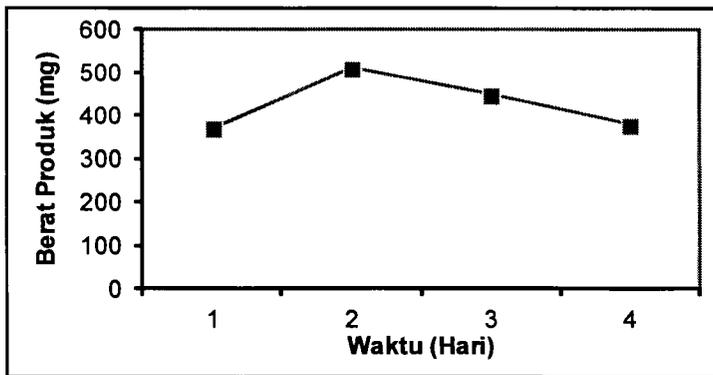


Gambar 2.4. Uji Filtrat dengan CuSO_4 ;
A. Larutan setelah deproteinasi
B. Larutan deproteinasi ditambah CuSO_4

Beberapa percobaan telah dilakukan oleh Nurhasanah Z.A. (2003) untuk menguji proses fermentasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Pada tahap deproteinasi dilakukan variasi waktu panen dan pH untuk mendapatkan waktu panen optimum dan pH optimum. Pada tahap ini mula-mula dilakukan pembuatan medium fermentasi untuk variasi waktu panen 1, 2, 3, dan 4 hari. Media fermentasi yang telah dimasukkan starter kemudian diukur pHnya dengan menggunakan larutan buffer fosfat, larutan buffer ini berfungsi untuk menjaga agar pH tidak berubah. Setelah dilakukan pengukuran pH, media fermentasi diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm. Setiap waktu panen pada media fermentasi yang telah diinkubasi, ditambahkan larutan asam trikloro asetat (TCA) yang berfungsi untuk menginaktifkan enzim protease. Untuk

mendapatkan produk dilakukan proses penyaringan, setiap filtrat yang diperoleh dilakukan pengukuran pH. Setelah produk didapatkan lalu dicuci dengan aquades sampai pH netral dan dilakukan uji kelarutan serta uji protein untuk filtrat. Uji kelarutan menggunakan campuran N,N-dimetilasetamida dan LiCl 10%, sedangkan uji protein dengan menggunakan *follin cialcateu*.

Hasil penelitian Nurhasanah (2003) pada waktu dan pH optimum deproteinasi kitin adalah 2 hari dengan pH 8. Uji kelarutan dari kitin dengan menggunakan larutan LiCl 10 % dan uji protein pada filtrat dengan menggunakan *follin cialcateu* yang memberikan warna kuning kehijauan, hal ini menunjukkan bahwa dalam filtrat sudah tidak ada protein. Untuk menguji media fermentasi ditambahkan dengan *follin cialcateu* memberikan warna yang sama, yaitu kuning kehijauan. Hal ini dapat dilihat pada kurva dibawah ini (Gambar 2.5.) menunjukkan hubungan waktu fermentasi kitin dengan berat produk yang larut dalam campuran N,N-dimetilasetamida dan LiCl 10%, dimana waktu fermentasi kitin optimum mampu menghasilkan berat produk terbesar pada hari ke-2.



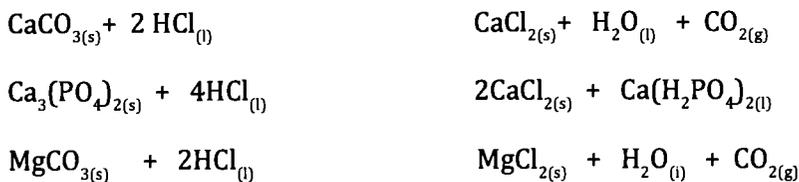
Gambar 2.5. Kurva Hubungan Waktu Fermentasi Kitin Vs Berat Produk yang larut dalam N,N-dimetilasetamida dan LiCl 10%

2.4. Demineralisasi

Demineralisasi merupakan proses penghilangan mineral dari sampel. Proses demineralisasi dapat dilakukan dengan larutan asam klorida (HCl) dan larutan Etylen Diamin Tetra Asetat

(EDTA). Mineral utama yang terkandung dalam sampel umumnya adalah kalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kalsium karbonat (CaCO_3) dan magnesium karbonat (MgCO_3). Proses demineralisasi ini biasanya menggunakan larutan asam klorida (HCl) 1,25 N (Hendri dkk. 2007). Penggunaan asam klorida lebih efektif untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida (CaCl_2), tetapi asam klorida juga menyebabkan kitin mengalami depolimerisasi. Agar tidak terjadi depolimerisasi terkadang digunakan EDTA dalam proses demineralisasi. Hanya saja EDTA tidak dapat mengeliminasi garam anorganik secara lengkap.

Reaksi pelepasan mineral sebagai berikut :



Sampel yang akan melalui tahap demineralisasi adalah kitin hasil deproteinasi, kitin hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan termometer dan batang pengaduk lalu diletakkan dalam penangas air. Pada saat penambahan larutan HCl kedalam sampel terdapat gelembung-gelembung udara yang merupakan bentuk dari gas CO_2 , ini menunjukkan bahwa terjadi pemisahan mineral. Kemudian sampel ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan dipanaskan pada penangas selama 1 jam pada suhu 90°C .

Setelah itu, dilakukan penyaringan dan diperoleh residu dan filtrat. Untuk membuktikan bahwa melalui proses demineralisasi ini mineral kalsium berhasil dilepaskan dari sampel dilakukan uji amonium oksalat pada filtrat. Ion oksalat dengan kalsium akan membentuk endapan putih. Kemudian residunya dicuci dengan akuades sampai pH akuades yaitu pH 5 yang diukur dengan indikator universal. Pencucian dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan. Kemudian residu dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitin berwarna kuning kemerahan.



Gambar 2.6. Uji Filtrat dengan Amonium Oksalat

Tahap demineralisasi berikutnya adalah dengan cara pemurnian mineral Ca dan Mg setelah deproteinasi karena garam anorganik yang terikat secara fisika dengan kitin lebih mudah dipisahkan dibandingkan dengan protein. Pada proses pemisahan mineral dapat dilakukan dengan larutan asam atau senyawa pengkelat. Penggunaan larutan asam merupakan proses demineralisasi secara kimiawi yang lebih efektif melarutkan mineral dibandingkan dengan penggunaan senyawa pengkelat seperti EDTA yang digunakan pada proses demineralisasi, hal ini dikarenakan EDTA tidak mampu mengeliminasi mineral secara sempurna. Namun penggunaan pelarut asam menyebabkan degradasi kitin terutama pada suhu dan konsentrasi asam yang tinggi. Proses demineralisasi dengan menggunakan EDTA dilakukan dengan pemisahan mineral utama kitin yaitu Ca dan Mg, dengan sifat-sifat Ca dan Mg sebagai berikut :

1. Kalsium (Ca)

Kalsium tersebar luas di alam dengan kelimpahan sebesar 3,63%. Bentuk senyawa yang bersumberkan Ca adalah $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*gypsum*), CaF_2 (*Fluospar*), $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$ (*dolomite*). Hampir seluruh tubuh orang dewasa meliputi tulang dan gigi mengandung lebih dari 1 kg Ca yang terdiri dari mineral Ca-hidroksiapatit dan sisanya berada dalam darah dan cairan ekstra sel (Mantgomery, et all 19930).

Secara umum Kalsium adalah unsur logam lunak kelabu dengan nomor atom 20, berat atom 40,08 gram per mol, titik leleh 840°C , dan titik didih 1484°C . Dalam bentuk senyawa, Ca berada dalam keadaan oksidasi $2+$ yang sangat sulit direduksi menjadi logam. Garam-garam Ca yang tidak larut dalam air adalah CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaC_2O_4 , dan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang umumnya berwarna putih. Seperti halnya Ba, Ca tidak membentuk banyak ion kompleks. Di dalam air, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kurang larut dibandingkan $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Garam Ca dapat menghasilkan warna merah muda pada uji nyala pembakar Bunsen (Tyrre S. et al. 1961)

2. Magnesium (Mg)

Kelimpahan Mg di alam kira-kira sebesar 21% sedangkan dalam tumbuhan, Mg terikat sebagai ion pusat pada ligan makrosiklik yang berupa klorofil. Mg juga terdapat dalam makanan berupa tanaman, biji-bijian dan buah-buahan. Tubuh manusia mengandung kira-kira 25 mg Mg terutama terdapat dalam tulang dan semua sel. Mg adalah logam keenam terbesar keenam di alam, umumnya ditemukan dalam bentuk $\text{MgCl}_2 \cdot \text{KCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (*karnalit*), $\text{MgCO}_3 \cdot \text{CaCO}_3$ (*dolomit*) dan *magnesit* (Mantgomery, et al 19930).

Sifat sifat Magnesium adalah logam keperakan, dengan nomor atom 12, berat atom 24, 312 gram per mol, titik leleh 651°C , dan titik didih 1100°C . Senyawa Mg berwarna putih kecuali yang mengandung anion berwarna dalam air. Dalam bentuk garam, seperti $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 dan $\text{Mg}_3(\text{BO}_3)_2$ dan MgNH_4PO_4 yang tidak larut dalam air.

Mg berfungsi dalam metabolisme terutama reaksi yang melibatkan ATP dalam tubuh manusia (Tyrre S. et al. 1961).

2.5. Depigmentasi

Tahap depigmentasi ini bertujuan untuk menghilangkan zat warna (pigmen) yang terdapat pada bahan baku (kulit udang). Proses depigmentasi sesungguhnya telah berlangsung saat pencucian residu setelah proses deproteinasi dan demineralisasi.

Proses depigmentasi dilakukan dengan menggunakan aseton dengan perbandingan 1:15 (w/v) secara sokletasi hingga warna pigmen dari sampel hilang. Aseton yang semula berwarna jernih mengalami perubahan warna menjadi kuning. Hal ini menunjukkan

bahwa zat warna yang terdapat pada sampel (kulit udang), yaitu astakantin dan karotenoid dapat dipisahkan dengan aseton. Setelah sampel dikeringkan, dilakukan pemutihan dengan NaOCl 0,5% selama 10 menit pada suhu kamar (Hendri dkk 2005).

Kitin memiliki potensi yang besar untuk digunakan pada berbagai bidang industri. Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas kitin secara umum yaitu seperti berat molekul, kadar air, kadar abu, kelarutan, warna, dan derajat deasetilasi. Besarnya nilai parameter standar yang dikehendaki untuk kitin dalam dunia industri dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Hendri dkk. 2007):

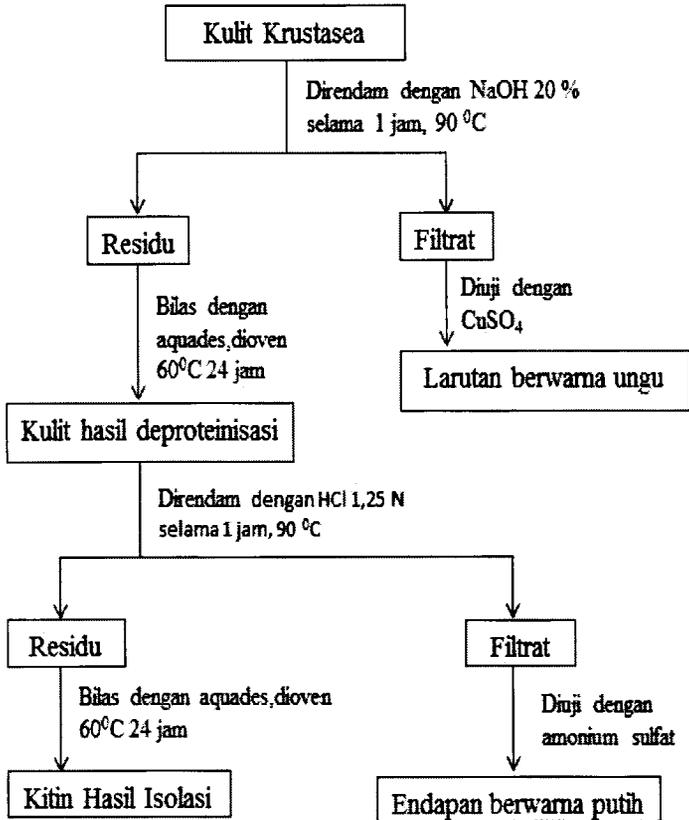
Tabel 2.1. Kualitas Standar Kitin

No.	Sifat	Karakteristik
1.	Ukuran partikel	Serpihan sampai serbuk
2.	Kadar air (%w/v)	10
3.	Kadar abu (%w/v)	2
4.	Derajat deasetilasi	15%
5.	Kelarutan dalam	
	- Air	Tidak larut
	- Asam encer	Tidak larut
	- Pelarut organic	Tidak larut
	- LiCl/Dimetilasetamida	Larut

Bagan Isolasi Kitin

Secara umum isolasi kitin dapat digambarkan sebagai berikut :

Bagan tahap-tahap Deproteinasi dan Demineralisasi



2.6. Sumber-Sumber Kitin

Kitin merupakan kerangka penunjang dari rangka luar kelompok hewan *Arthropoda*, *Annelida*, *Moluska*, *Coelentrata*, *Nematoda*, beberapa kelas serangga, jamur, bakteri dan sebagian besar disusun oleh kitin yang berkonjugasi dengan protein. Kitin tersebar luas di alam dan dijumpai sebagai bahan pembentuk kerangka luar (eksoskeleton) insekta, krustacea, fungi, moluska dan ragi. Kitin tidak hanya ditemukan pada bagian kulit luar atau kerangka saja, tetapi juga terdapat pada trakea, insang, dinding usus, dan bagian kulit dalam cumi-cumi. Sekalipun telah banyak dikenal

sumber kitin, hanya kulit krustasea khususnya udang, kepiting, dan cumi-cumi yang telah dimanfaatkan secara komersial. Kulit-kulit *crustaceae* seperti kulit udang mengandung 20 – 30% kitin dan kulit kepiting mengandung 15 – 20% kitin dan juga kulit cumi-cumi 97,20 %. Kitin merupakan polimer kedua terbesar di bumi setelah selulosa dan merupakan konstituen utama dari kulit luar binatang air *crustaceae* (Wang S.L. et al. 1997).

1. Udang

Tubuh udang terdiri dari dua bagian, yaitu bagian depan yang disebut *cephalothorax* (merupakan bagian kepala dan dada yang menyatu) dan bagian belakang yang disebut *abdomen* (bagian perut dan ekor). Tubuh udang beruas-ruas, bagian kepala ada lima ruas, bagian dada ada delapan ruas, dan bagian ekor ada enam ruas. Seluruh tubuh tertutup oleh kerangka luar yang terbuat dari zat kitin. Kerangka luar tersebut mengeras, kecuali pada sambungan-sambungan antar ruas, hal ini memudahkan untuk bergerak. Bagian *cephalothorax* tertutup oleh cangkang kepala yang disebut *carapace*, memanjang kedepan dan bergerigi yang disebut *rostrum*. (Suyanto, S.R dkk 2001 dan Pareira, B.M. 2004)

Anggota tubuh yang lain adalah sepasang mata majemuk, mulut, rahang, insang, sungut kecil, sungut besar, *maxilliped*, dan lima pasang kaki jalan. Pada *abdomen* terdapat lima pasang kaki renang, ekor kipas (*uropode*), dan ujung ekor (*telson*). Dibawah pangkal ujung ekor terdapat lubang ekskresi.



Gambar 2.7. Tambak Pembudidayaan Udang

Sifat udang antara lain adalah daya tahan terhadap perubahan salinitas yang tinggi, sifat ini disebut *euryhalin*. Sifat inilah yang memungkinkan udang dibudidayakan ditambak dengan berbagai tingkatan salinitas. Sifat lain yang menguntungkan

adalah ketahanan terhadap suhu, sifat demikian dikenal dengan *eurythermal*. Pada pengolahan udang limbah yang dihasilkan selain mengandung kitin juga mengandung protein sebesar 30 – 35% dan kalsium sebesar 10 – 20%.

Adapun klasifikasi udang adalah sebagai berikut (Murray et al. 2003 Desi Indriani. 2003) :

Phylum	: <i>Arthropoda</i>
Classis	: <i>Crustacea</i>
Sub-classis	: <i>Malacrostaca</i>
Ordo	: <i>Decapoda</i>
Sub-ordo	: <i>Natantia</i>
Super-Famili	: <i>Penaeididae</i>
Famili	: <i>Penaeidae</i>
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus monodon fabricius</i>



Gambar 2.8. Udang

2. Kepiting

Jumlah genus kepiting yang tergolong famili portunidae di perairan Indonesia diperkirakan melebihi 100 genus. Portunidae adalah salah satu famili kepiting yang memiliki pasangan kaki jalan dan kaki kelimanya berbentuk pipih dan

melebar pada ruas yang terakhir (distal). Famili portunidae sebagian besar hidup di laut, perairan bakau atau perairan payau. Famili portunidae mempunyai beberapa spesies, jenis yang paling banyak ditemukan dipasaran adalah rajungan (*Portunus pelagious*) dan kepiting bakau (*Scylla serrata*) (Soim, 1994 dan Desi Indriani. 2003).



Gambar 2.9. Hutan Bakau, daerah perkembangan biaknya Kepiting

Klasifikasi kepiting rajungan secara lengkap adalah :

- Phylum : *Arthropoda*
- Klas : *Crustacea*
- Ordo : *Decapoda*
- Familia : *Portunidae*
- Genus : *Portunus*
- Spesies : *Portunus pelagious*



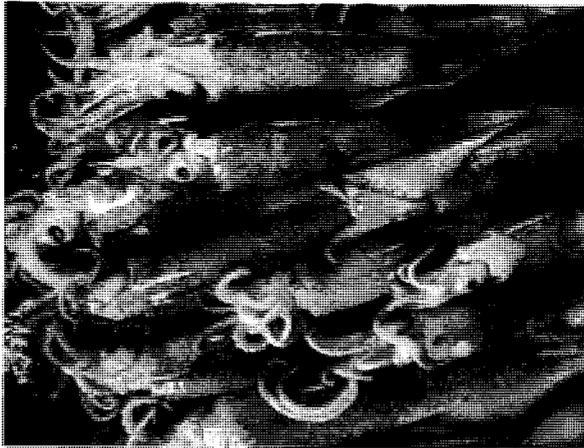
Gambar 2.10. Kepiting

3. Cumi-Cumi (*Loligo pealii*)

Cumi-cumi (*Loligo pealii*) termasuk binatang lunak (*Phylum Mollusca*) dengan cangkang yang sangat tipis pada bagian punggung. Cumi-cumi tubuhnya lunak tetapi bisa dapat membentuk cangkang (*Shell*) dari kapur. Cumi-cumi cangkangnya hanya berupa kepingan kecil dan terdapat di dalam tubuhnya. Deskripsi mengenai cumi-cumi (*Loligo pealii*) yaitu memiliki badan bulat dan panjang, bagian belakang meruncing dan dikiri kanan terdapat sirip berbentuk segitiga yang panjangnya kurang lebih $\frac{2}{3}$ badan, sekitar mulut terdapat 8 tangan yang agak pendek dengan 2 baris lobang penghisap ditiap tangan dan 2 tangan yang agak panjang dengan 4 baris lobang penghisap. Terdapat tulang di bagian dalam dari badan, warna putih dengan bintik-bintik merah kehitam-hitaman sehingga kelihatan berwarna kemerah-merahan, panjang tubuh dapat mencapai 12-16 inchi atau 30-40 cm. Badan cumi-cumi licin dan tidak bersisik sehingga praktis seluruh tubuhnya dapat dimakan.

Pada saat berenang cumi-cumi menggunakan sistem populasi jet yaitu menyemburkan air laut dari rongga mantel melalui pipa corong yang disebut siphon. Cumi-cumi menangkap mangsa dengan menggunakan tentakel. Selain itu juga dapat mengelabui musuhnya dengan menyembrotkan cairan tinta atau merubah warna kulitnya. Zat tinta yang dihasilkan cumi-cumi ini berwarna gelap.

Tubuh cumi-cumi dibedakan atas kepala, leher dan badan. Di depan kepala terdapat mata yang besar dan tidak berkelopak. Mata ini berfungsi sebagai alat untuk melihat. Masih di dekat kepala terdapat sifon atau corong berotot yang berfungsi sebagai kemudi. Jika ia ingin bergerak ke belakang, sifon akan menyempurnakan air ke arah depan, sehingga tubuhnya bertolak ke belakang. Sedangkan gerakan maju ke depan menggunakan sirip dan tentakelnya (Sutrisna S. 2011).



Gambar 2.11. Cumi-cumi

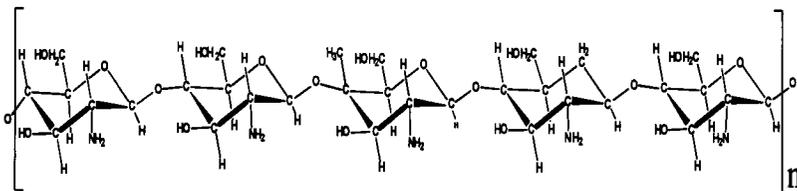
(Sumber:<http://civicara.com/wp-content/uploads/2012/12/Cumi-cumi-segar.jpg>)

Klasifikasi cumi-cumi :

Phylum : *Moluska*
Kelas : *Cephalopoda*
Ordo : *Teuhoidea*
Famili : *Loginidae*
Genus : *Loligo*
Species : *Loligo pealii*

Kitosan

Kitosan sendiri merupakan turunan dari kitin yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin memakai senyawa alkali kuat. Kitosan merupakan yaitu b-(1,4) glukosamin dengan derajat N-asetilasi rendah (dibawah 40 %). Kitosan pertama kali dibuat dengan pencampuran kitin dan KOH pada suhu 180°C oleh Hoppe dan Seyler pada tahun 1894. Senyawa kitosan dikenal pertama kali sebagai polimer pengkelat alami. Menurut terjadinya, kitosan berasal dari sebagian besar gugus asetil dari amida pada kitin yang disubstitusi oleh hidrogen dengan penambahan larutan basa kuat konsentrasi tinggi menjadi amino. Kitosan mengandung lebih dari 5000 unit glukosamin. Kitosan dibedakan dari kitin karena adanya gugus amino bebas. Kitin alami memiliki berat molekul 1-2 juta dan terdiri atas 6000-12000 unit monosakarida (Muzarelli 1984b).



Gambar 3.1. Struktur Kitosan



Gambar 3.2. Standar Kitosan WAKO Jepang



Gambar 3.3. Kitosan Hasil Isolasi

3.1. Sifat Kimia Fisika Kitosan

Kitosan tidak larut dalam air, larutan basa kuat, dan asam sulfat. Sedangkan dalam asam klorida dan asam nitrat, asam fosfat 0,5 % sedikit larut. Kitosan juga tidak larut dalam beberapa pelarut organik, seperti alkohol, aseton, dimetil formamida, dan dimetil sulfoksida, tetapi kitosan larut baik dalam asam format 0,2-100 %. Kitosan tidak beracun dan mudah terbiodegradasi. Berat molekul kitosan adalah $1,2 \times 10^6$ dalton tergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Kitosan mudah larut dalam asam asetat encer. Pelarut lain yang dapat melarutkan kitosan adalah asam sitrat, asam piruvat, dan asam laktat, tetapi kitosan tidak larut dalam larutan basa maupun asam mineral (Murazelli, 1984).

3.2. Isolasi Kitosan

Kitosan dapat diperoleh dengan cara deasetilasi kitin yaitu proses penghilangan gugus asetil dari kitin. Saat ini kitosan komersial diproduksi secara termokimiawi. Cara ini mudah dilakukan tetapi dalam banyak hal tidak menguntungkan diantaranya tidak ramah lingkungan, prosesnya tidak mudah dikendalikan, dan kitosan yang dihasilkan memiliki berat molekul dan derajat deasetilasi tidak seragam. Hal ini karena proses deasetilasi rantai kitin yang berlangsung secara acak menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi bervariasi.

Teknologi alternatif yang dapat digunakan adalah deasetilasi kitin secara enzimatik. Proses enzimatik diharapkan akan lebih mudah dikendalikan, spesifik dan meminimalkan produk samping (Aspita Laila 2007, dan Sari, I. M. 2010.).

3.2.1. Isolasi Kitosan Secara Kimiawi

Deasetilasi atau penghilangan gugus asetil secara kimiawi biasanya dilakukan dengan menggunakan basa kuat berkonsentrasi tinggi (NaOH). Perlakuan yang diberikan adalah pemberian larutan NaOH konsentrasi tinggi pada suhu tinggi, yang dapat menghasilkan produk yang hampir seluruhnya mengalami deasetilasi. Kitosan secara komersial diproduksi secara kimiawi dengan melarutkan kitin dalam 60% larutan NaOH (Hendri dkk 2007).

Penggunaan larutan basa konsentrasi tinggi pada proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dimaksudkan untuk memutuskan ikatan antara gugus asetil dengan atom nitrogen menjadi gugus amina (-NH₂). Larutan basa dengan konsentrasi tinggi ini digunakan karena kitin tahan terhadap proses deasetilasi. Hal ini disebabkan karena unit sel kitin berstruktur kristalin dan adanya ikatan hidrogen yang meluas antar atom nitrogen dan gugus karboksil tetangganya. Transformasi kitin menjadi kitosan adalah reaksi hidrolisis (Hendri dkk 2005).

3.2.2. Isolasi Kitosan Secara Enzimatik

Pembuatan kitosan secara enzimatik dilakukan dengan cara fermentasi yaitu proses pembebasan energi dari gula atau molekul organik oleh mikroorganisme dengan enzim yang dihasilkannya. Mikroorganisme membutuhkan nutrisi utama

seperti karbon dalam bentuk gula dan nitrogen dalam berbagai bentuk seperti amonium, nitrat atau protein untuk kelangsungan hidupnya. Selain itu diperlukan juga beberapa mineral yang berfungsi sebagai vitamin baik makro ataupun mikro seperti natrium, besi, zinc, kalsium dan lain-lain.

Fermentasi kitin untuk mendapatkan kitosan dilakukan dengan membiakkan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim kitin deasetilase pada substrat kitin atau kulit Crustasea. Kitin deasetilase (CDA : EC 3.5.1.41) adalah enzim kitinolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis gugus asetamida dari N-asetil glukosamin dalam kitin yang menghasilkan kitosan, yaitu polimer dari glukosamin. Enzim kitindeasetilase dapat diperoleh dari kapang seperti *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* atau bakteri seperti *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus K29-14*, *Vibrio harveyi* (Mardiana 2002, Patil et al 2000, Sari 2010).

Kitosan memiliki potensi yang besar untuk digunakan pada berbagai bidang industri. Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas kitosan secara umum yaitu seperti berat molekul, kadar air, kadar abu, kelarutan, warna, dan derajat deasetilasi. Besarnya nilai parameter standar yang dikehendaki untuk kitosan dalam dunia industri dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3.1. Kualitas Standar Kitosan

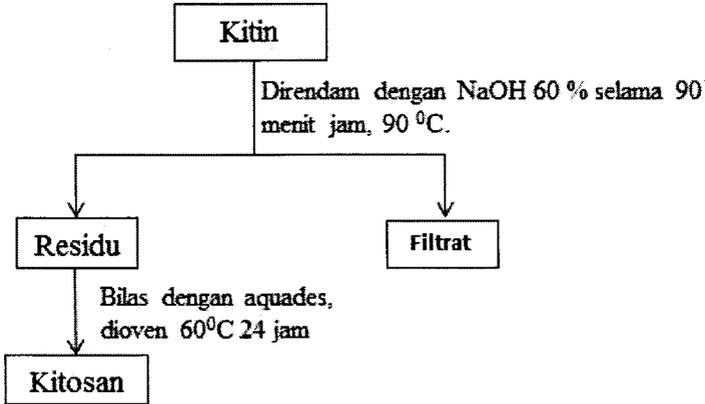
NO.	SIFAT	KARAKTERISTIK
1.	Ukuran partikel	Butiran-serbuk
2.	Kadar air (%w/v)	10
3.	Kadar abu (%w/v)	2
4.	Derajat deasetilasi	70%

(Hendri 2005)

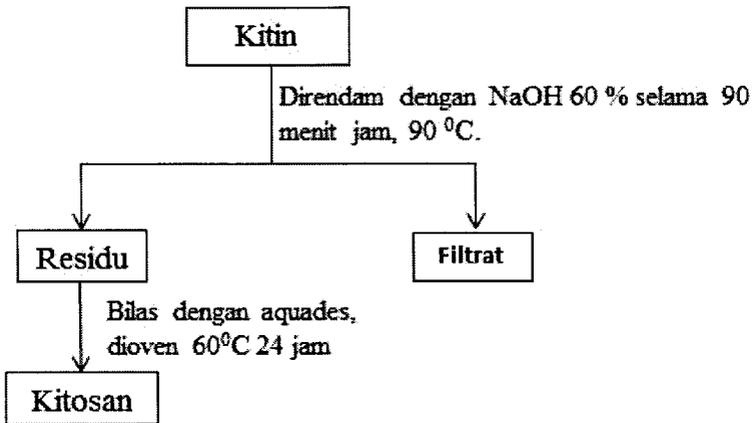
3.3. Bagan Isolasi Kitosan

Secara umum bagan isolasi kitosan dapat digambarkan sebagai berikut :

Isolasi Kitosan secara Kimiawi

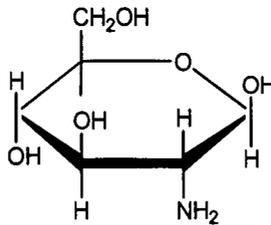


Isolasi Kitosan secara Enzimatik

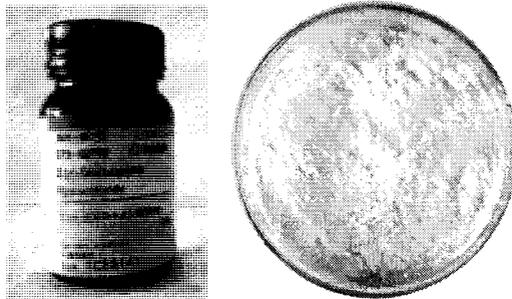


Glukosamin

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. Glukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan prekursor penting dalam sintesis biokimia dari protein glikosilasi dan lipid. Struktur glukosamin dapat dilihat pada gambar berikut (Dinter S., et al 2000, Muzarelli 1984b, Gadgoli, C. 2006 dan Martin, C.W. 2004):



Gambar 4.1. Struktur D-glukosamin



Gambar 4.2. Glukosamin Standar WAKO Jepang dan

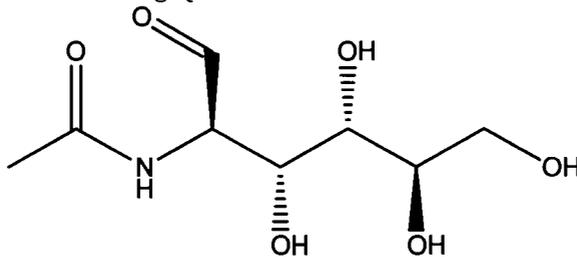
4.1. Hasil Isolasi dari kulit udang

4.1.1. Glukosamin dari Kitin dan Kitosan

Terdapat dua jalur degradasi kitin di alam oleh enzim kitinase menjadi glukosamin. Jalur degradasi kitin yang pertama dimulai dengan hidrolisis ikatan β -(1,4) glikosida oleh enzim endokitinase membentuk oligomer kitin. Oligomer kitin kemudian dipecah menjadi dimer N-asetilglukosamin oleh enzim kitobiosidase, sehingga dihasilkan monomer N-asetilglukosamin oleh enzim N-asetilglukosaminidase (kitobiase). Selanjutnya monomer N-asetilglukosamin mengalami deasetilasi menjadi glukosamin oleh enzim N-asetilglukosamin-deasetilase. Jalur degradasi kitin yang kedua yaitu deasetilasi kitin menjadi kitosan oleh enzim kitindeasetilase. Kitosan terdegradasi menjadi oligomer kitosan oleh enzim kitosanase. Setelah itu oligomer kitosan akan didegradasi oleh enzim glukosaminidase menghasilkan glukosamin (Aspita Laila dkk. 2010, Hendri dkk. 2007, dan Harman, G.E., et al 1993).

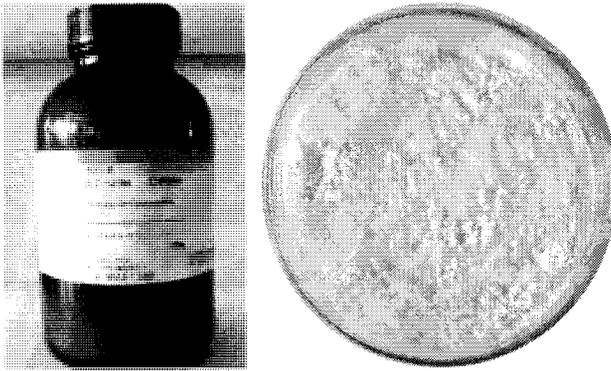
4.1.2. N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin adalah suatu bagian monosakarida dari glukosa. Secara kimia merupakan amida antara glukosamin dan asam asetat. Struktur molekulnya adalah $C_8H_{15}NO_6$, massa molar 221,21 g/mol dan zat ini merupakan bagian penting dalam sistem biologi (Muzarelli 1984b dan Martin C.W. 2004).



Gambar 4.3. Struktur N-asetilglukosamin

N-asetilglukosamin bersifat mudah larut dalam air, sedikit larut dalam metanol yang dipanaskan dan tidak larut dalam dietileter. Suhu yang baik untuk menyimpan N-asetilglukosamin adalah 2-8°C.

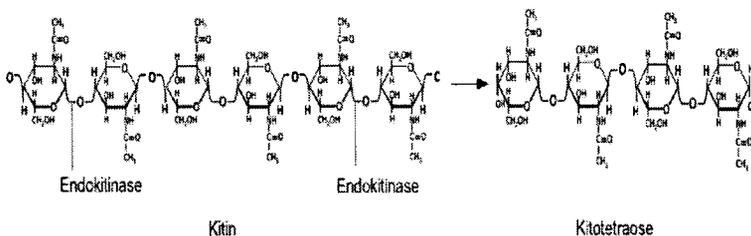


Gambar 4.4. N-asetilglukosamin Satndar WAKO Jepang

4.1.3. Enzim Kitinase

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Kitinase dibagi dalam tiga tipe yaitu :

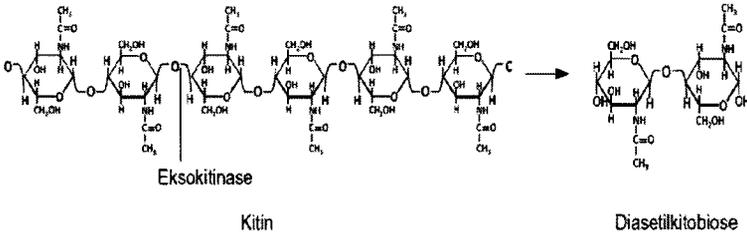
1. Endokitinase (EC 3.2.1.14) yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose (Suryanto dkk 2005 dan Martinou A, et all 1995).



Gambar 4.5. Reaksi pemutusan ikatan β -1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin

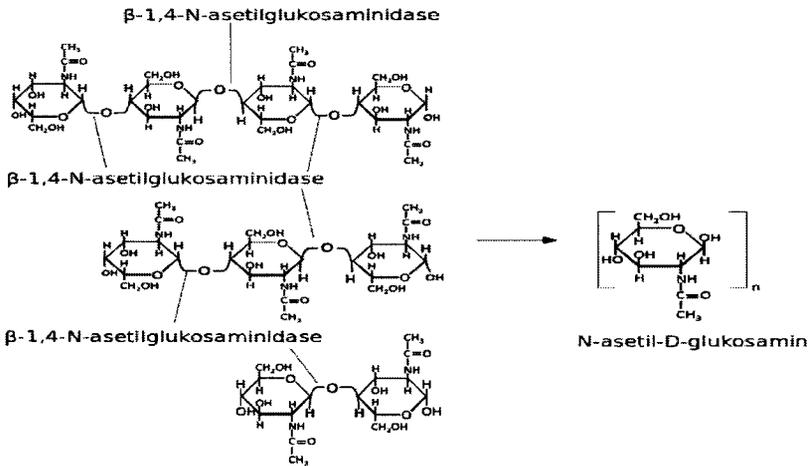
2. Eksokitinase (EC 3.2.1.14) dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4- β kitobiodase, yaitu enzim yang mengkatalisis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitobiose tanpa ada unit-unit monosakarida atau polisakarida yang

dibentuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak (Harman, G. E. et al 1993 dan Martinou A, et all 1995)..



Gambar 4.6. 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 GlcNAc.



Gambar 4.7. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan Kitotetraosedan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc Kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida.

Kitooligosakarida berperan sebagai pertahanan tanaman, juga digunakan dalam kesehatan manusia. Sebagai contoh, kitohexosa dan kitohexosa memperlihatkan aktivitas anti tumor (Knorr D 1984 dan Martin C.W., 2004).

N-asetilglukosamin berguna sebagai obat anti inflamasi. Senyawa ini dalam tubuh manusia disintesis dari glukosa dan digabungkan dengan glikoprotein dan glikosaminoglikan. Kitinase juga berperan dalam produksi protein sel tunggal dari limbah kitin untuk makanan hewan. 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 Rabea, E.E, et al 2003).

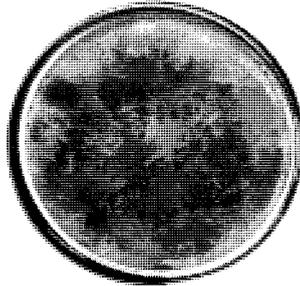
Untuk membuat glukosamin dari substrat kitin dan kitosan dapat dilakukan dengan bantuan mikroorganisme kitinolitik penghasil enzim kitinase atau enzim hidrolase yang dapat mendegradasi substrat kitin ataupun kitosan sehingga menghasilkan glukosamin. Mikroorganisme dan enzim hidrolase yang dapat digunakan untuk pembuatan glukosamin dari substrat kitin atau kitosan (Shimahara K., et al 1988 dan Shimahara K, et al 1982) adalah sebagai berikut :

4.1.4. Jamur *Mucor*

Jamur adalah sekelompok organisme yang digabungkan dalam takson Kingdom Fungi berdasarkan system Whittaker. Kingdom fungi mempunyai ciri khas yaitu bersifat heterotrof yang mengabsorpsi nutrient dan memiliki kitin pada dinding selnya. Jamur benang atau kapang adalah golongan fungi yang membentuk lapisan jaringan miselium dan spora yang tampak. Misseliumnya terdiri dari filamen tubular yang tumbuh yaitu hifa (Mardiana 2002).

Jamur dapat bersifat saprotrop yaitu dengan mendapatkan nutrisi dari organisme lain yang mati, ada juga yang bersifat parasit dengan mengisap nutrisi dari organisme lain yang hidup, atau dengan bersimbiosis mutualisme dengan satu organisme. Fungi mempunyai penggunaan kitin yang berbeda dengan hewan. Hewan hanya memproduksi kitin pada bagian tertentu, misalnya sebagai rangka luar, rambut atau kuku, sementara fungi memiliki kitin sebagai pembentuk dinding pada seluruh selnya. Adanya kitin juga membantu membedakan antara fungi dan eukariota lain, seperti protista (Ratledge, C. 1993 dan Sadava, P. 2003).

Mucor adalah genus fungi yang berasal dari ordo Mucorales yang merupakan fungi tipikal saprotrop pada tanah dan serasah tumbuhan. Hifa vegetatifnya bercabang-cabang, bersifat coenositik dan tidak bersepta. *Mucor* berkembangbiak secara aseksual dengan membentuk sporangium yang ditunjang oleh batang yang disebut sporangiofor. Ciri khas pada *Mucor* adalah memiliki sporangium yang berkolom-kolom atau kolumela (Rao, K. 2009).



Gambar 4.8. *Mucor miehei*

Jamur *Mucor* merupakan organisme kitinolitik yang mampu menghasilkan enzim kitinase pada substrat kitin. Jenis jamur *Mucor* yang mampu menghasilkan aktivitas kitinase yang dapat mendegradasi substrat kitin adalah *Mucor miehei*, dengan bantuan *Mucor miehei* ini dapat dilakukan pembuatan glukosamin dari substrat kitin melalui proses fermentasi *batch* dengan waktu fermentasi yang ditentukan (Mardiana 2002).

4.1.5. Actinomycetes

Actinomycetes memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh bakteri dan jamur. Dari luar terlihat seperti jamur (eukariotik), tetapi organisme ini juga memiliki semua kriteria untuk sel prokariotik, yaitu dinding selnya mengandung asam muramat, tidak mempunyai mitokondrion, 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 (Abbas I.H. 2006. Dan Mugianto Puji, 2012)

Actinomycetes mirip dengan fungi yang mempunyai hifa bercabang dengan membentuk miselium. Miselium tumbuh menjulang ke udaradan memisah dalam fragmen-fragmen

yang pendek sehingga terlihat seperti cabang pada bakteri. *Actinomyces* juga mempunyai kesamaan dengan bakteri yaitu struktur sel dan ukuran irisan yang melintang.

Actinomyces dapat dibedakan dari bakteri pada lempeng agardengan mudah, koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *Actinomyces* muncul perlahan dan berbubuk yang melekat erat pada permukaan agar. Koloni *Actinomyces* biasanya keras, kasar, dan tumbuh tinggi di atas permukaan medium (Mugianto Puji, 2012).



Gambar 4.9. *Actinomyces*ANL-4

Actinomyces terdiri dari banyak jenis, jenis *Actinomyces* yang merupakan mikroorganisme kitinolitik penghasil enzim kitinase adalah *Actinomyces* ANL-4. *Actinomyces* ANL-4 akan menghasilkan enzim kitinase pada substrat kitin dalam proses fermentasi sehingga dapat mendegradasi substrat kitin menjadi glukosamin dengan waktu fermentasi yang ditentukan (Mugianto Puji, 2012).

4.1.6. Lisozim

Lisozim adalah enzim yang ditemukan secara kebetulan oleh Flemming pada tahun 1922. Enzim ini berukuran relatif kecil, yaitu terdiri atas 129 asam amino dengan BM 14.600, memiliki residu terminal amino lisin dan residu terminal karboksil leusin, sehingga menyebabkan titik isoelektriknya tinggi, yaitu lebih dari 10. Ini berarti, bahwa lisozim, yang mempunyai nama ilmiah *peptidoglycan N-acetylmuramoyl-hidrolase*, sangat bermuatan positif pada pH fisiologis. Bagian dalam enzim bersifat non polar sedang bagian luarnya bersifat polar, sehingga dapat larut dalam air (Aspita Laila dkk. 2010 dan Sari, I. M 2010).

Lisozim mampu menghidrolisis ikatan β (1,4) antara N-asetilmuramat (NAM) dan N-asetilglukosamin (NAG) yang terdapat dalam dinding sel bakteri, sehingga terjadi pori-pori kecil di dalam dinding sel (porus). Oleh karenanya, nama lain bagi lisozim adalah muramidase atau muraminidase. Enzim ini dapat ditemukan dalam cairan tubuh dan hasil sekresi makhluk hidup, seperti air mata, air liur, darah, lendir dari hidung susu, pepaya dan putih telur. Suhu optimum lisozim putih telur adalah 55°C dan pH optimumnya adalah 6,2.

Lisozim yang memiliki aktivitas endokitinolitik yang rendah, mampu memecah ikatan glikosidik secara acak sepanjang rantai dan lisozim dapat menghidrolisis kitosan, yaitu senyawa yang terdapat dalam kulit udang. Bedanya dengan polisakarida dinding sel bakteri, kitosan hanya terdiri atas satu jenis gula, yaitu residu D-glukosamin yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik β -(1,4) (Lehninger A. 1994 dan Maggy. L.T 1990 dan Schomburga and Salzam 1991).

Lisozim larut dalam air dan larutan garam Na, tetapi tidak larut dalam alkohol, eter, aseton, kloroform, xylol, dan toluol. Enzim ini dapat terdenaturasi pada suhu 70°C .

Isolasi dan Pemurnian Enzim Lisozim

Proses isolasi enzim lisozim dari putih telur, diawali dengan melarutkan sampel putih telur dalam buffer glisin-NaOH 0,1 M pH 6,2. Tahap awal ini bertujuan untuk memisahkan protein enzim dari komponen lainnya, yang didasarkan pada perbedaan pH isoelektrik sehingga diharapkan protein lainnya mengendap, sedangkan lisozim sendiri tidak ikut mengendap. Untuk memisahkan yaitu dengan cara mensentrifugasi larutan sampel putih telur pada suhu dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) selama 45 menit dengan kecepatan 6500 rpm, sehingga komponen yang lebih berat akan mengendap. Sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin untuk menghindari kerusakan enzim, karena pada suhu tinggi enzim mudah terdenaturasi sehingga menyebabkan keaktifan enzim menurun (Aspita Laila dkk. 2010 dan Sari, I. M 2010).



Gambar 4.10. Sumber Enzim Lisozim

Filtrat hasil sentrifugasi adalah ekstrak kasar enzim, selanjutnya ekstrak kasar ini dimurnikan dengan ammonium sulfat. Protein enzim dapat diendapkan, karena ammonium sulfat dalam konsentrasi tinggi akan menghidrasi molekul protein, sehingga kelarutan protein berkurang dan protein akan mengendap.

Pada pemurnian dengan garam ammonium sulfat ini, setiap protein enzim akan memberikan respon yang berbeda terhadap konsentrasi ammonium sulfat. Sehingga untuk memisahkan protein enzim digunakan cara pengendapan bertingkat. Jumlah garam ammonium sulfat yang ditambahkan sesuai dengan peningkatan kejenuhan larutan enzim. Tiap kejenuhan enzim disebut fraksi kejenuhan (Aspita Laila dkk 2010 dan Sari, I. M 2010).

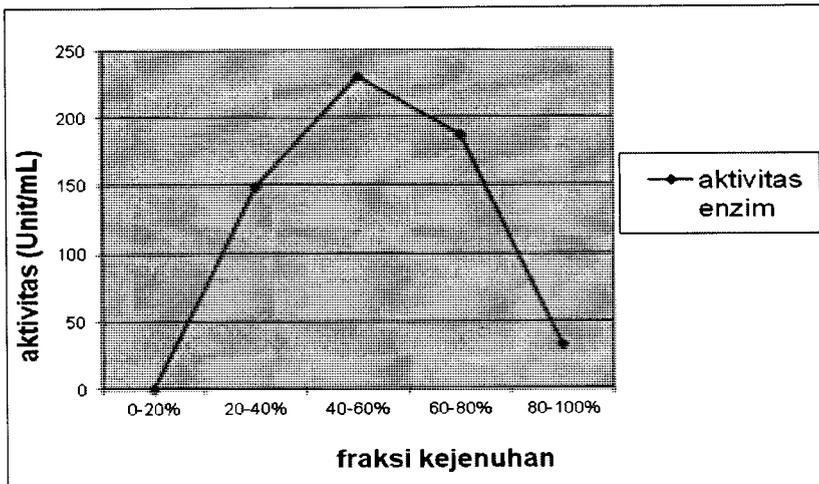
Dalam penelitian ini dilakukan pembagian fraksi kejenuhan, yaitu pada 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Banyaknya ammonium sulfat yang digunakan pada masing-masing fraksi dapat diketahui dari table banyaknya jumlah garam ammonium sulfat yang digunakan untuk mengendapkan enzim (Tabel 1).

Penambahan garam ammonium sulfat dilakukan dengan hati-hati, agar tidak terjadi pembusaan, sebab pembusaan dapat menurunkan keaktifan enzim. Setelah garam ditambahkan, larutan tersebut disentrifuse pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dengan kecepatan 6500 rpm. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer glisin-NaOH pH 6,2 dan endapan tersebut adalah enzim lisozim.

Enzim lisozim yang diperoleh dari masing-masing fraksi kejenuhan diuji aktivitasnya menggunakan metode Tata et al. (1983). Aktivitasnya ditentukan dengan substrat *escheria coli*, ternyata masing-masing fraksi kejenuhan menunjukkan adanya aktivitas enzim lisozim yang ditunjukkan dengan adanya penurunan serapan suspensi *escheria coli*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa tiap-tiap fraksi mempunyai aktivitas yang berbeda. Unit aktivitas dihitung dari 10 menit pertama, dengan rumus:

Perubahab serapan pada $\lambda = 600 \text{ nm}$ per menit
0,001 mL enzim

Pada kurva dapat dilihat bahwa aktivitas enzim meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan untuk pemurnian enzim (Aspita Laila dkk 2010 dan Sari, I. M 2010).



Gambar 4.11. Kurva aktivitas enzim hasil fraksinasi ammonium sulfat

Pada fraksi kejenuhan 40-60% enzim menunjukkan aktivitas tertingginya, selanjutnya aktivitas enzim mengalami penurunan, karena hanya sedikit enzim lisozim yang tidak terendapkan pada konsentrasi penambahan ammonium sulfat 40-60%.

4.2. Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu reaksi oksidasi reduksi yang memanfaatkan sumber energi, karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa dengan nilai ekonomi yang lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium. Proses fermentasi terjadi disebabkan oleh hasil metabolisme dari organisme. Medium dalam suatu fermentasi harus mengandung substrat yang kaya akan nutrisi. Nutrisi utama yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen dan pospor (Chahal et al 1996., Judoamidjojo, M. Dkk. 1992 dan Mitchel, D., et al 2006).

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan substrat untuk fermentasi adalah :

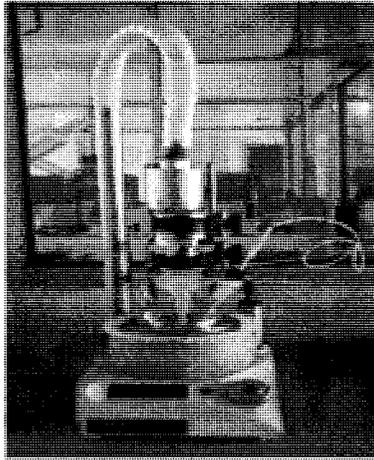
- a). Ketersediaan yang kontinyu, yaitu substrat tersedia sepanjang tahun sehingga saat disimpan dalam beberapa bulan, mutu dan komposisi relatif tetap.
- b). Sifat substrat harus dapat difermentasikan, contoh pada *Tichoderma viridae* yang tumbuh baik hanya pada substrat selulosa (jerami padi), tetapi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

4.2.1. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Fermentasi merupakan reaksi oksidasi reduksi yang menggunakan sumber energi dan sumber karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa bernilai ekonomi lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium. 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* (Wang. 1979 dan Weites A.M., et al 2001).

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu fermentasi tertutup (*batch culture*), fermentasi *fed batch* dan fermentasi kontinu (*continuous 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 pertumbuhannya spesifik mikroorganisme semakin menurun sampai akhirnya pertumbuhan terhenti. Penurunan dan berhentinya pertumbuhan disebabkan karena dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi nutrien-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. Pada fermentasi *fed batch* setelah inokulasi dilakukan penambahan medium baru tetapi tidak dilakukan pengambilan produk yang dihasilkan. *Yield* yang dihasilkan pada fermentasi *fed batch* lebih besar dibandingkan pada fermentasi *batch*. Sedangkan fermentasi *continuous batch* merupakan suatu fermentasi dimana secara terus menerus dilakukan penambahan medium kultur dan pengambilan produk (Wang 1979 dan Winarno, F. 1995).



Gambar 4.12. Fermentor



Gambar 4.13. Shaker Inkubator

4.2.2. 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 *Actinomyces* 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. Aerasi atau penambahan oksigen dapat dilakukan apabila diperlukan. *Actinomyces* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerobik, yaitu mikroorganisme yang dapat memanfaatkan oksigen disekitarnya jika tersedia.
6. Kultivasi, pada tahapan ini memerlukan bantuan mekanis untuk memisahkan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

Keuntungan Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Dibandingkan dengan medium padat, medium cair memiliki beberapa kelebihan, yaitu :

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.

Analisis Dan Karakterisasi

Karakterisasi senyawa kitin, kitosan dan turunnya dapat digunakan beberapa metoda antara lain penentuan kadar air, penentuan kadar abu, penentuan gugus fungsi dengan spektroskopi Infra merah, dan analisis termal dengan DSC.

5.1. Kadar Air

Kadar air adalah salah satu parameter penting untuk mengetahui kualitas kitin karena akan mempengaruhi daya simpannya. Dalam banyak senyawa kimia, air bisa terikat dalam bentuk hidratnya atau hanya sebagai air yang teradsorpsi oleh permukaan senyawa. Air yang terikat pada kitin merupakan air yang terikat secara fisik, sehingga untuk menghilangkannya diperlukan panas rendah, sekadar untuk menguapkannya. Biasanya suhu yang digunakan 105°C. Semakin halus butiran padatan semakin banyak air teradsorpsi, karena luas permukaan persatuan berat bertambah (Hendri 2005).

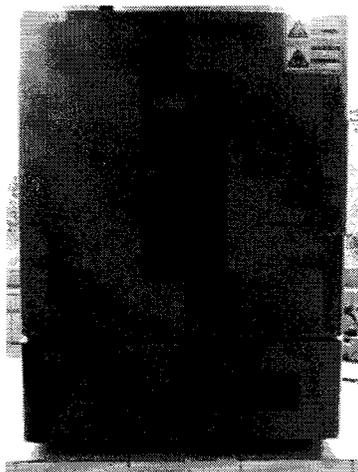
Kadar air berbeda-beda untuk tiap senyawa bergantung pada kelembapan udara, dan besar kecilnya ukuran partikel suatu zat. Semakin kecil partikel berarti akan semakin luas permukaan partikel untuk dapat menyerap air.

Dari beberapa penelitian telah diperoleh kadar air kitin cukup kecil yaitu 1,74 % yang berarti aktifitas air juga kecil sehingga bisa dipastikan bahwa kitin ini lebih tahan terhadap serangan mikroba yang mampu hidup pada aktifitas atau kadar air yang lebih tinggi. Pada penentuan kadar air ini dilakukan penimbangan terhadap botol timbang yang hendak dipakai, kemudian dimasukkan kitin hasil isolasi dari kulit kepiting dengan berat tertentu. Dikeringkan

dalam oven pada suhu 100 °C sampai beratnya tetap (kurang lebih selama 3 jam), kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (Hendri 2005 dan 2007).



Gambar 5.1. Desikator



Gambar 5.2. Oven

Perhitungan :

$$\text{Kadar air} = \frac{(x - y)}{x} \times 100\%$$

X = berat cuplikan mula-mula (gram)

Y = berat cuplikan kering (gram)

Contoh perhitungan kadar air kitin

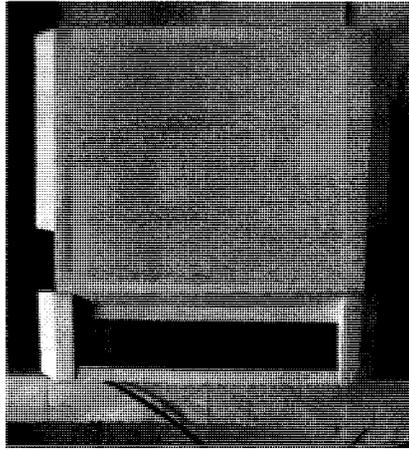
Berat cawan + berat sampel :	42,5629 gram
Berat sampel :	0,3812 gram (a)
Berat awal :	Berat cawan + berat sampel = (b)
Berat akhir :	42,5522 gram (c)

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} & : \frac{b - c}{a} \times 100\% \\ & : \frac{42,5629 - 42,5522}{0,3812} \times 100\% \\ & : 2,80\% \end{aligned}$$

5.2. Kadar Abu

Abu adalah sisa yang tertinggal setelah bahan dibakar sampai bebas karbon. Sisa yang tertinggal tersebut merupakan unsur-unsur mineral yang terdapat didalam sampel. Mineral yang terkandung dalam kitin adalah kalsium, dimana sebagian besar berada dalam bentuk garam kalsium karbonat (Hendri 2005 dan 2007).

Cawan pengabuan disiapkan untuk pengabuan. Cawan ditimbang, kemudian dibakar dalam tanur, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Dimasukkan sejumlah kitin yang telah ditimbang ke dalam cawan tersebut, kemudian dibakar di dalam tanur pengabuan sampai didapat abu berwarna putih. Proses pengabuan dilakukan pada temperatur 600°C, karena pada suhu ini senyawa karbon sudah menguap dan CaCO₃ sudah membentuk anhidratnya dan cenderung sudah tidak bersifat higroskopis sehingga sangat stabil untuk ditimbang.



Gambar 5.3. Furnace

Bila proses pengabuan dilakukan pada suhu yang lebih tinggi maka akan terbentuk CaO yang stabil namun cenderung lebih ringan sehingga menyebabkan kesalahan penimbangan yang lebih besar. Dari beberapa penelitian didapatkan kadar abu yang cukup rendah yaitu sekitar 0,66% , hal ini mengindikasikan proses demineralisasi berjalan cukup efektif.

Perhitungan :

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{berat abu (gram)}}{\text{berat cuplikan (gram)}} \times 100\%$$

Contoh perhitungan kadar abu kitin

Berat cawan + berat sampel :	82,4061 gram
Berat sampel :	1,00 gram (a)
Berat abu :	$6,6 \cdot 10^{-3}$ gram (b)
Kadar abu kitin :	$b/a \times 100\%$
	$: 6,6 \cdot 10^{-3} / 1,00 \times 100\%$
	$: 0,66\%$

5.3. Pengukuran Berat Molekul Kitin-Kitosan

Berat molekul merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk membedakan kitin dan kitosan dengan adanya pengurangan berat molekul pada kitosan akibat proses deasetilasi. Viskometri merupakan metode yang paling sederhana untuk

menentukan berat molekul dari kitin dan kitosan (Hendri 2005 dan Muzarelli 19884).

Pada metode ini berat molekul polimer ditentukan dengan persamaan Mark-Houwink, yaitu :

$$[\eta] = kM^\alpha$$

Nilai viskositas intrinsik atau $[\eta]$ diperoleh dari nilai viskositas spesifik (η_{sp}) pada konsentrasi mendekati nol. k dan α merupakan tetapan khas untuk sistem polimer tertentu dan M adalah berat Molekul.

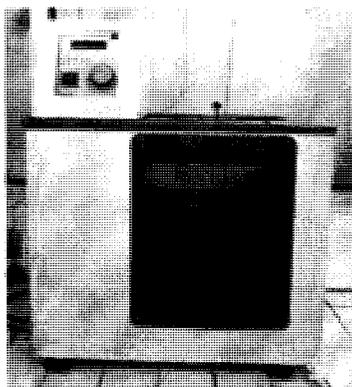
$$\eta_{sp}/C = [\eta] + K' [\eta]^2 C \dots\dots\dots(\text{Persamaan Huggins})$$

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + K' [\eta]^2 C \dots\dots\dots(\text{Persamaan Kreamer})$$

Viskositas (η_{sp}) spesifik ditentukan dengan waktu alir larutan dan

$$\eta_{sp} = \frac{t}{t_0} \text{ da viskometer(Bilmayer) .}$$

Viskositas spesifik (η_{sp}) ditentukan dengan mengetahui waktu alir larutan (t) dan pelarut (t_0) pada viskometer.



Gambar 5.4. Viskometer



Gambar 5.5. Pipa Kapiler Viskometer

Contoh Perhitungan Penentuan Berat Molekul Kitosan :

Persamaan Huggins :

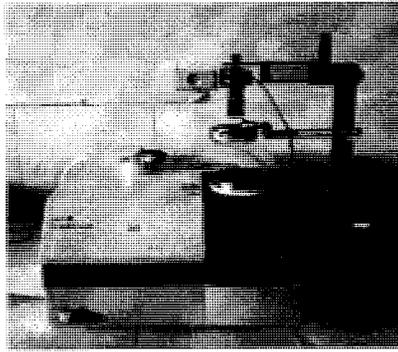
$$\begin{aligned}\eta &= \eta_{sp}/C - K' [\eta]^2 C \\ \eta &= 96.51 + 6.511,81.10^{-3} \times 0.00812 \\ \eta &= 84,34\end{aligned}$$

Persamaan Mark Houwwink :

$$\begin{aligned}\eta &= K M^a \\ M &= \eta K^a \\ M &= 84,341,81.10^{-310,93} \\ M &= 104347.4\end{aligned}$$

1. *Difference Scanning Calorimetry (DSC)*

DSC merupakan teknik yang digunakan untuk menganalisa dan mengukur perbedaan kalor yang masuk ke dalam sampel dan referensi sebagai pembandingnya. Teknik DSC merupakan ukuran panas dan suhu peralihan dan paling berguna dari segi termodinamika kimia karena semua perubahan kimia atau fisik melibatkan entalpi dan entropi yang merupakan satu fungsi keadaan. Teknik DSC dengan aliran panas dari sampel tertentu adalah ukuran sebagai fungsi suhu atau massa (Hourston, D.J. and Reading M. 2006.)



Gambar 5.6. DSC

Analisa DSC digunakan untuk mempelajari transisi fase, seperti melting, suhu *transision glass* (T_g), atau dekomposisi eksotermik, serta untuk menganalisa kestabilan terhadap oksidasi dan kapasitas panas suatu bahan. Temperatur *transision glass* (T_g) merupakan salah satu sifat fisik penting dari polimer yang menyebabkan polimer tersebut memiliki daya tahan terhadap panas atau suhu yang berbeda-beda. Dimana pada saat temperatur luar mendekati temperatur transisi glassnya maka suatu polimer mengalami perubahan dari keadaan yang keras kaku menjadi lunak seperti karet (Hourston, D.J. and Reading M. 2006.).

Kitosan dapat dikarakterisasi titik dekomposisi gugus asetilennya dengan analisa termal menggunakan instrument yang disebut *Differential Scanning Calorimetry*. Pada hasil karakterisasi hanya muncul masing-masing 1 puncak endoterm dan eksoterm yang merupakan titik dekomposisi air dan titik dekomposisi gugus asetilen dari kitosan yang dianalisa (Guinesi L.S., and Cavalheiro E.T.G., 2006., dan Tsigos I., et all 2000)

Gambar kurva analisa kitosan dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.7. Kurva DSC Kitosan Standar

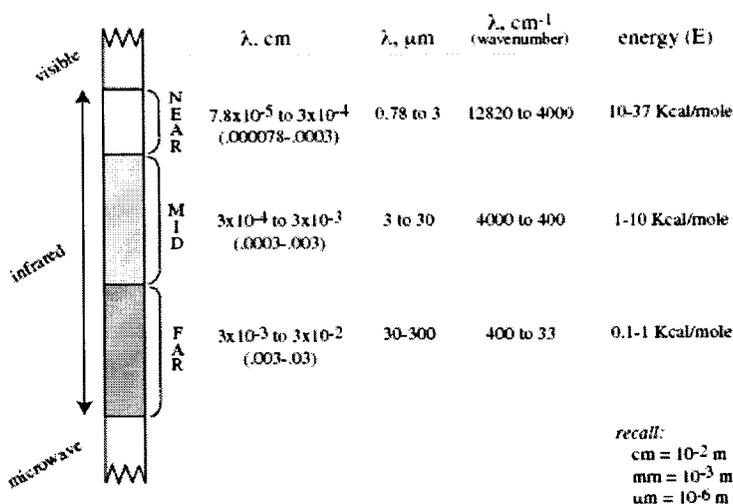
Pada kurvakitosan terlihat adanya 2 puncak, puncak pertama muncul berkisar pada suhu 100°C yang merupakan titik dekomposisi air, sedangkan puncak kedua muncul berkisar pada suhu 300°C menunjukkan proses dekomposisi dari gugus asetilen. Banyaknya energi yang dibutuhkan untuk mendekomposisi seluruh gugus asetilen (sama dengan luas area) sebanding dengan kadar asetilen yang dimiliki oleh kitosan.

2. Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Spektrofotometri Infra Merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang $0,75 - 1.000 \mu\text{m}$ atau pada bilangan gelombang $13.000 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Radiasi elektromagnetik dikemukakan pertama kali oleh *James Clark Maxwell*, yang menyatakan bahwa cahaya secara fisis merupakan gelombang elektromagnetik, artinya mempunyai vektor listrik dan vektor magnetik yang keduanya saling tegak lurus dengan arah rambatan (Hendri 2007 dan 2005).

Pada dasarnya Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) adalah sama dengan Spektrofotometer IR dispersi, yang membedakannya 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 (Hsu, C.P.S., 1994).

Adapun daerah IR terbagi dalam tiga daerah yaitu :

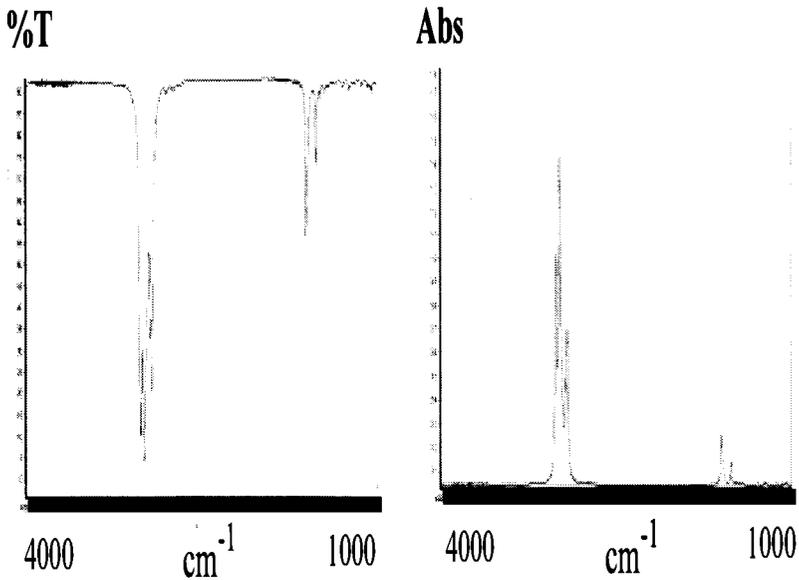


Daerah IR mid (3×10^{-4} s/d 3×10^{-3} cm) paling sering digunakan untuk penentuan struktur. Spektrum IR lebih sering ditulis dalam μm atau bilangan gelombang ($\bar{\nu}$)

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \Rightarrow E = h c \bar{\nu}$$

$$\bar{\nu} = 4000 \text{ s/d } 400 \text{ cm}^{-1} \text{ (mid IR)}$$

Bilangan gelombang akan semakin bertambah jika energi meningkat. Konsep dasar dari spektroskopi IR ini adalah radiasi IR diserap oleh molekul organik dan diubah untuk vibrasi molekul. Pada spektroskopi IR, molekul organik disinari radiasi IR, bila energi radiasi IR sesuai dengan energi spesifik vibrasi molekul maka proses penyerapan terjadi. Bentuk penyerapan akan menghasilkan spektrum IR seperti pada gambar berikut :



Gambar 5.8. Pita serapan IR dapat dituliskan dalam bentuk Absorbansi atau % Transmisi

$$A = \log_{10} (1/T)$$

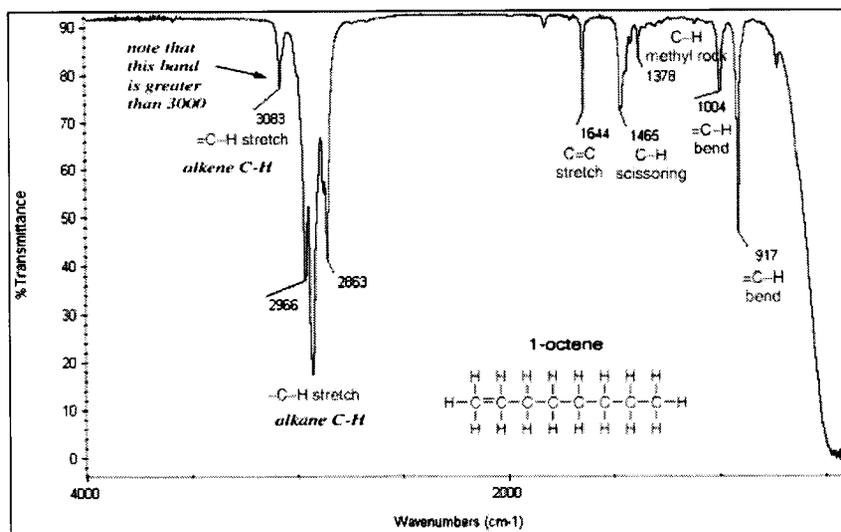
Untuk mengetahui daerah serapan pada spektrum IR dapat dilihat serapan pada spektrum IR Alkana, spektrum IR Alkena, spektrum IR Alkuna dan spektrum IR Alkil Haida (Hsu, C.P.S., 1994).

Spektrum IR Alkana

Spektrum IR Alkana dicirikan oleh serapan C-H tarik dan tekuk (pita serapan C-C tarik dan tekuk terlalu lemah atau terlalu rendah frekuensinya). Daerah serapan spesifik spektrum IR alkana :

- C-H tarik dari 3000–2850 cm^{-1}
- C-H tekuk atau *scissoring* dari 1470-1450 cm^{-1}
- C-H *rock*, methyl dari 1370-1350 cm^{-1}
- C-H *rock*, methyl, terlihat hanya pada rantai panjang alkana, dari 725-720 cm^{-1}

Spektrum IR Alkena

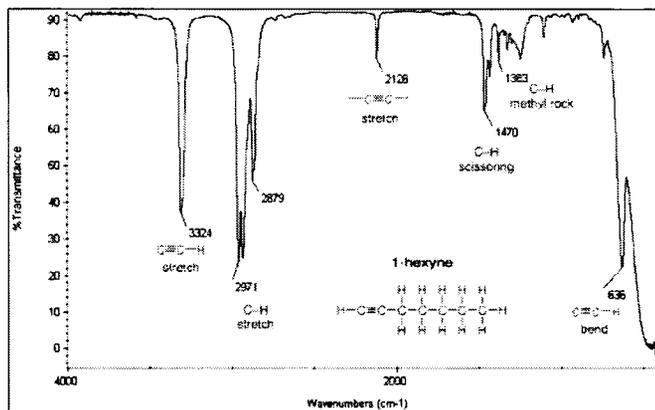


- Alkena memiliki ikatan, -C=C- . Vibrasi tarik ikatan C=C muncul pada daerah $1680\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$.
- Vibrasi tarik ikatan -C=C-H memiliki freq. lebih tinggi (bilangan gel. lebih besar) dibanding -C-C-H pada alkana.
(Sumber Hsu, C.P.S., 1994)

Hanya alkena dan aromatik memperlihatkan vibrasi tarik C-H di atas 3000 cm^{-1} . Senyawa yang tidak memiliki ikatan C=C memperlihatkan vibrasi tarik untuk C-H dibawah 3000 cm^{-1} .
Karakteristik:

- C=C v. tarik $1680\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$
- =C-H v. tarik $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$
- =C-H v. tekuk $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ (sidik jari)

Spektrum IR Alkuna

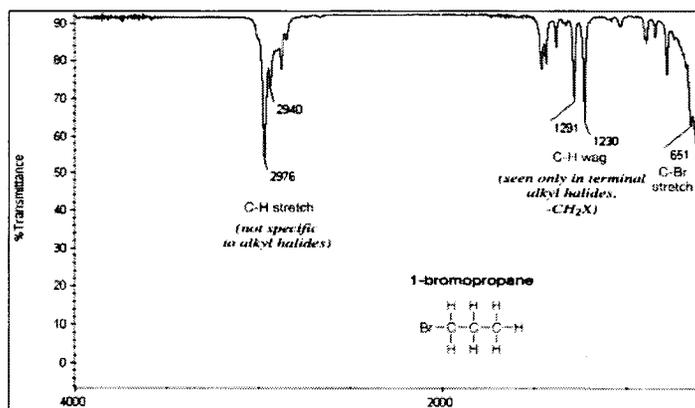


Alkuna memperlihatkan vibrasi tarik $\text{-C}\equiv\text{C-}$ sebagai pita serapan lemah di daerah $2260\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$. (hanya beberapa senyawa yang memperlihatkan serapan di daerah ini). Terminal Alkuna (bukan internal alkuna) memperlihatkan serapan vibrasi tarik C-H yang kuat dan tajam di daerah $3330\text{-}3270\text{ cm}^{-1}$. (sulit dibedakan dgn vibrasi tarik O-H). Terminal alkuna akan memperlihatkan vibrasi tekuk C-H pada daerah $700\text{-}610\text{ cm}^{-1}$. (Hsu, C.P.S., 1994)

Karakteristik:

- $\text{-C}\equiv\text{C-}$ stretch from $2260\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$
- $\text{-C}\equiv\text{C-H}$: C-H stretch from $3330\text{-}3270\text{ cm}^{-1}$
- $\text{-C}\equiv\text{C-H}$: C-H bend from $700\text{-}610\text{ cm}^{-1}$

Spektrum IR Alkil Halida



Alkil Halida merupakan senyawa yang memiliki ikatan C-X bond, untuk X adalah halogen: brom, klor, flour, atau Iod.). Secara umum, frekuensi vibrasi C-X muncul di daerah 850-515 cm^{-1} . Terminal alkyl halida, vibrasi wagging C-H dari gugus

-CH₂X group teramati di daerah 1300-1150 cm^{-1} .

Karakteristik:

C-H wag (-CH₂X) from 1300-1150 cm^{-1}

C-X stretches (general) from 850-515 cm^{-1}

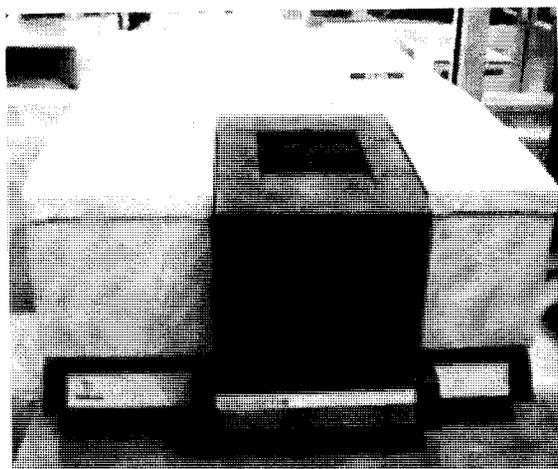
C-Cl stretch 850-550 cm^{-1}

C-Br stretch 690-515 cm^{-1}

Pada sistim optik FTIR digunakan radiasi LASER (*Light Amplification by Stimulated Emmission of Radiation*) yang berfungsi sebagai radiasi yang diinterferensikan dengan radiasi infra merah agar sinyal radiasi infra merah yang diterima oleh detektor secara utuh dan lebih baik(Hsu, C.P.S., 1994).

Detektor yang digunakan dalam Spektrofotometer FTIR adalah TGS (*Tetra Glycerine Sulphate*) atau MCT (*Mercury Cadmium Telluride*). Detektor MCT lebih banyak digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan detektor TGS, yaitu memberikan respon yang lebih baik pada frekwensi modulasi tinggi, lebih sensitif, lebih cepat, tidak dipengaruhi oleh temperatur, sangat selektif terhadap energi vibrasi yang diterima dari radiasi infra merah.

Vibrasi yang digunakan untuk identifikasi adalah vibrasi tekuk, khususnya vibrasi *rocking* (goyangan), yaitu yang berada di daerah bilangan gelombang 2000-400 cm^{-1} . Karena di daerah antara 4000 - 2000 cm^{-1} merupakan daerah yang khusus yang berguna untuk identifikasi gugus fungsional. Daerah ini menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh vibrasi regangan. Sedangkan daerah antara 2000- 400 cm^{-1} seringkali sangat rumit, karena vibrasi regangan maupun bengkokan mengakibatkan absorpsi pada daerah tersebut. Dalam daerah 2000 - 400 cm^{-1} tiap senyawa organik mempunyai absorpsi yang unik, sehingga daerah tersebut sering juga disebut sebagai daerah sidik jari (*fingerprint region*). Meskipun pada daerah 4000 - 2000 cm^{-1} menunjukkan absorpsi yang sama, pada daerah 2000 - 400 cm^{-1} juga harus menunjukkan pola yang sama sehingga dapat disimpulkan bahwa dua senyawa adalah sama.

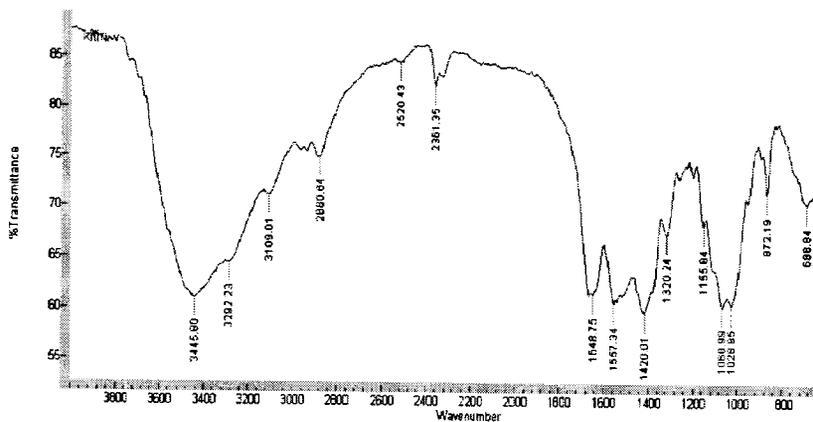


Gambar 5.9. FTIR

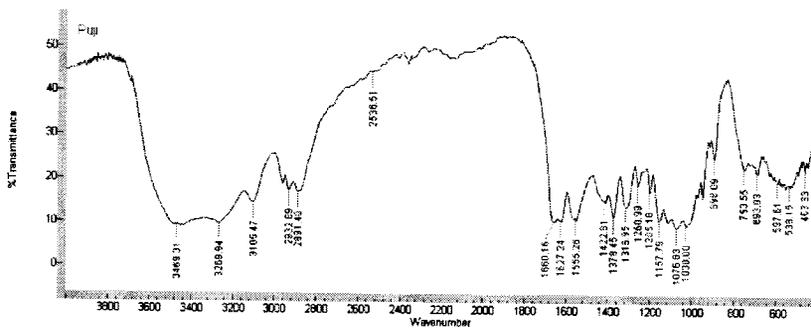
Secara keseluruhan, analisis menggunakan Spektrofotometer FTIR memiliki dua kelebihan utama dibandingkan metoda konvensional lainnya, yaitu :

1. Dapat digunakan pada semua frekwensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat daripada menggunakan cara sekuensial atau *scanning*.
2. Sensitifitas dari metoda Spektrofotometri FTIR lebih besar daripada cara dispersi, sebab radiasi yang masuk ke sistim detektor lebih banyak karena tanpa harus melalui celah (*slitless*).

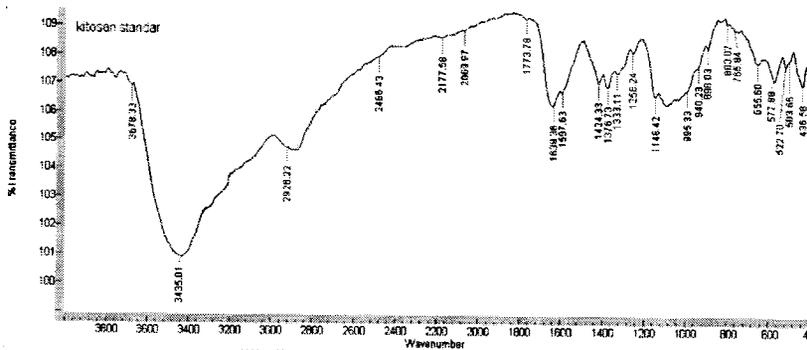
Pada analisis dengan spektrofotometer FTIR diharapkan terlihat pita serapan melebar dengan intensitas kuat pada daerah $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan karakteristik vibrasi ulur OH, pita serapan diatas 3300 cm^{-1} yang menunjukkan karakteristik vibrasi ulur NH amina. Pita serapan lainnya yang menunjukkan adanya vibrasi NH amina yaitu pada daerah $1650-1550\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi tekuk NH_2 (amina primer), diharapkan muncul pita serapan pada daerah $1250-1000\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi ulur CN, pita serapan pada daerah $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan karakteristik vibrasi ulur CH, pita serapan lainnya pada daerah $1470-1350\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi tekuk CH, dan pita serapan pada daerah $1250-970\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi tekuk C-O (Silverstein, R.M., et all, 1996 dan Hendri 2007).



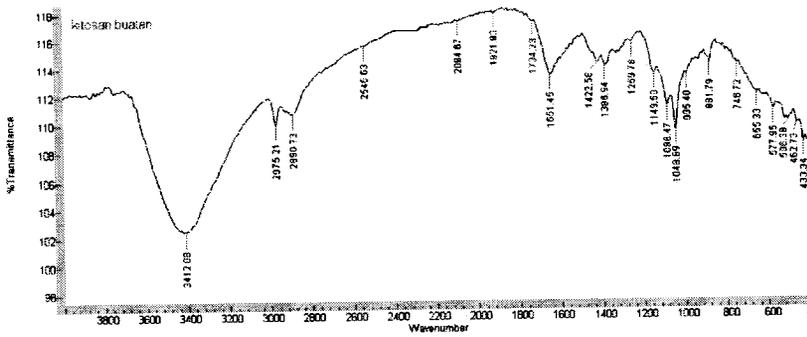
Spektrum FTIR Kitin Standar



Spektrum FTIR Kitin Hasil Isolasi



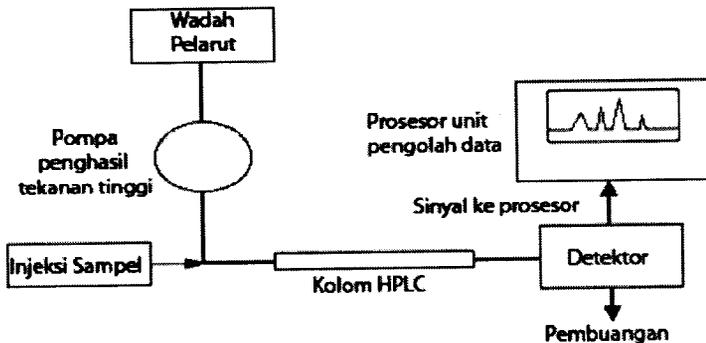
Spektrum FTIR Kitosan Standar



Spektrum FTIR Kitosan Hasil Isolasi

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC merupakan suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair untuk pemisahan sekaligus untuk analisis senyawa berdasarkan kekuatan atau kepolaran fasa geraknya. Berdasarkan polaritas relative fasa gerak dan fasa diamnya, HPLC dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar sehingga fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam dan fasa terbalik yang umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa polar, menggunakan fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam. Prinsip pemisahan senyawa menggunakan HPLC adalah perbedaan distribusi komponen diantara fasa diam dan fasa geraknya. Semakin lama terdistribusi dalam fasa diam maka semakin lama waktu retensinya (Gritter, R.] et all 1991 dan Tsigos I. Et all., 1995).



Gambar 5.10. Diagram Alat HPLC

Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom HPLC. Metode yang dipakai untuk menganalisis glukosamin adalah penggunaan evaporasi detektor hamburan cahaya (ELSD). Glukosamin tidak dapat dianalisis dengan detektor UV secara langsung (Jacyno, M. and T. Cary. 2004, dan Clark, J., 2007). Glukosamin memiliki serapan sinar UV pada panjang gelombang dibawah 205 nm yang hampir sama dengan serapan pelarut polar seperti air dan metanol. Pada detektor ini sampel yang akan dideteksi harus melalui 3 tahap yaitu:

Nebulisasi merupakan langkah pertama untuk mengubah seluruh fasa gerak yang mengalir dari kolom HPLC dengan bantuan gas Nitrogen menjadi butiran halus atau disebut dengan aerosol. Semakin besar ukuran aerosol, semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk menguapkan fasa gerak.

- a. Evaporasi (penguapan) merupakan langkah kedua setelah fasa gerak diubah menjadi aerosol yang dibawa oleh aliran gas ke daerah panas yang terletak sebelum ruang deteksi. Pelarut akan diuapkan untuk menghasilkan partikel zatterlarut murni.
- b. Deteksi dimana partikel-partikel sampel melewati sebuah sel aliran akan ditembakkan dengan sumber cahaya, jumlah cahaya yang tersebar yang diukur dengan menggunakan photomultiplier dan perangkat elektronik.

Cara yang praktis dan efisien untuk menganalisis glukosamin adalah dengan HPLC yang dilengkapi ELSD (Evaporative Light Scattering Detection). 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 (Clark, J., 2007).

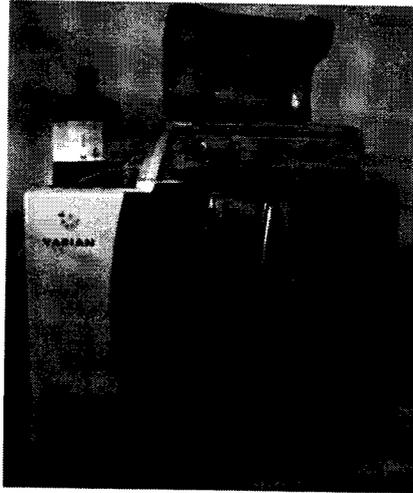
Adapun keunggulan dari ELSD yaitu:

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. *Reprodusibilitas* 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.

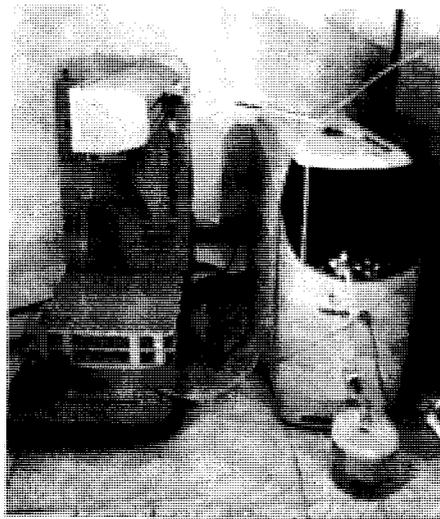
Kondisi HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detection) untuk identifikasi glukosamin menggunakan kolom C18, fasa gerak adalah asetonitril/H₂O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas Nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40°C, suhu evaporasi 30°C, dan waktu run 12 menit. Pada proses elusi, digunakan metode isokratik, yaitu eluennya menggunakan perbandingan komponen yang tetap dari awal sampai dengan akhir pemeriksaan (Sari M.I. 2010).

Penggunaan HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detection) dapat dilihat pada sampel hasil fermentasi kitin dengan *Actinomyces* ANL-4 dan *Mucor miehei*, standar glukosamin dan standar N-asetilglukosamin dianalisis menggunakan HPLC-ELSD dengan kolom C18, fasa gerak asetonitril/H₂O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas Nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40°C, suhu evaporasi 30°C dan waktu *run* 10 menit (Mugiarto P., 2012 dan Rumapea S.A., 2012).

Untuk analisis kemurnian dengan HPLC-ELSD maka sampel diderivatisasi dengan menggunakan *phenyl isothiocyanate*. Hal ini dilakukan agar apabila didalam sampel terdapat campuran anatar glukosamin dan N-asetilglukosamin menghasilkan puncak yang memisah pada analisis HPLC-ELSD. Glukosamin dapat diderivatisasi dengan *phenyl isothiocyanate* menghasilkan *phenyl thiourea* yang menyerap sinar UV pada panjang gelombang 254 nm (Jacyno, M. and T. Cary. 2004).

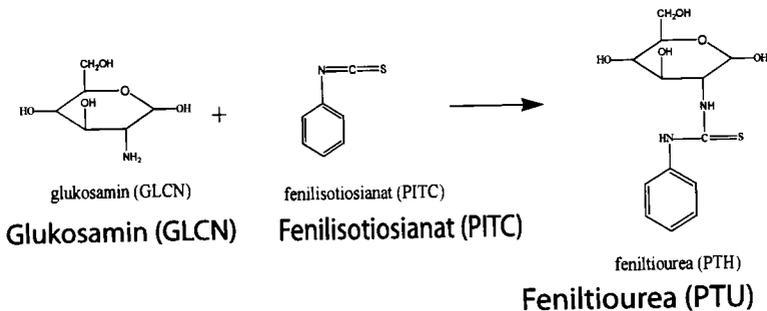


Gambar 5.11. HPLC



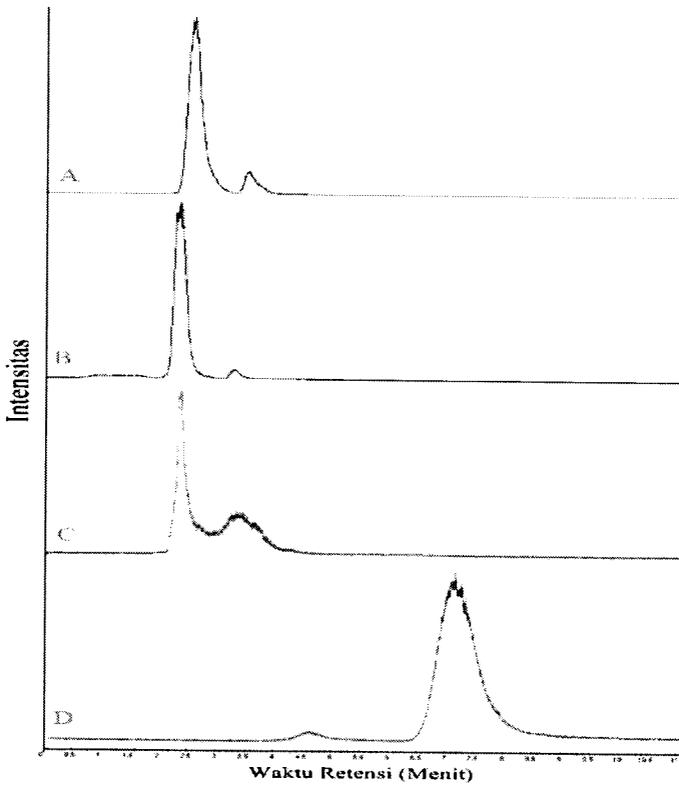
Gambar 5.12. ELSD

Reaksi yang terjadi antara glukosamin dan *phenylisothiocyanate* (Aspita Laila dkk 2010 dan Sari M.I 2010) adalah sebagai berikut :



N-asetilglukosamin tidak bisa bereaksi dengan *phenyl isothiocyanate* dikarenakan atom N pada N-asetilglukosamin mengikat gugus asetil. Sampel glukosamin yang dianalisis dengan HPLC-ELSD adalah *phenyl thiourea* yang merupakan produk derivatisasi glukosamin dengan *phenyl isothiocyanate*. *Phenyl isothiocyanate* juga bereaksi dengan dimer, trimer dan tetramer glukosamin (oligomer glukosamin). Sehingga jika dalam sampel hasil isolasi terdapat oligomer glukosamin dapat terdeteksi (Mugianto P., 2012 dan Rumapea S.A., 2012).

Kromatogram menunjukkan sampel hasil fermentasi kitin dengan *Actinomyces* ANL-4, sampel hasil fermentasi kitin dengan *Mucor miehei*, *phenyl thiourea* dari glukosamin standar, dan N-asetilglukosamin standar. Dari kromatogram terlihat bahwa sampel hasil fermentasi kitin baik dengan *Actinomyces* ANL-4 maupun dengan *Mucor miehei* hanya memberikan satu puncak yang dominan. Sampel hasil fermentasi kitin dengan *Actinomyces* ANL-4 memiliki puncak dengan rentang waktu retensi 2,1-3 menit, sedangkan produk fermentasi kitin dengan *Mucor miehei* memiliki puncak dengan rentang waktu retensi 2,1-3 menit. Kedua waktu retensi tersebut mendekati waktu retensi puncak dari *phenyl thiourea* glukosamin standar yaitu 2-3 menit. Sehingga dapat disimpulkan bahwa produk fermentasi kitin baik dengan *Actinomyces* ANL-4 maupun dengan *Mucor miehei* adalah glukosamin.



Gambar 5.13. Kromatogram HPLC-ELSD *Phenyl thiourea* glukosamin hasil fermentasi kitindengan *Actinomyces* ANL-4 (A), *Phenyl thiourea* glukosamin hasil fermentasikitin dengan *Mucor miehei* (B), *Phenyl thiourea* glukosamin standar (C), danN-asetilgluksoamin standar (D) (Aspita Laila dkk., 2010 dan Sari M.I., 2010)

5.4. Penentuan Derajat Deasetilasi

5.4.1. Penentuan Derajat Deasetilasi Kitosan dengan metoda FTIR

Derajat deasetilasi merupakan suatu parameter mutu yang menunjukkan gugus asetil yang dapat dihilangkan dari rendemen kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, maka gugus asetil yang terdapat dalam kitosan tersebut semakin sedikit. Derajat deasetilasi dapat diukur dengan berbagai metode dan yang paling lazim digunakan adalah metode garis dasar spektroskopi IR transformasi

Fourier (FTIR) yang pertama kali diajukan oleh Moore dan Robert pada tahun 1977 (Martinou A, et. all., 1995 dan Hendri 2007). Teknik ini memiliki beberapa keuntungan, yaitu relatif cepat, sampel tidak perlu murni, dan tingkat ketelitian tinggi dengan kisaran derajat deasetilasi sampel yang luas, dibandingkan dengan metode spektroskopi lainnya. Nilai yang digunakan untuk menghitung derajat deasetilasi bergantung pada nisbah pita serapan yang digunakan untuk menghitungnya. Tiga nisbah yang digunakan yaitu A_{1655}/A_{2867} , A_{1550}/A_{2878} , dan A_{1655}/A_{3450} . Dua nisbah pertama memberikan keakuratan pada % N asetilasi rendah, sedangkan A_{1655}/A_{3450} lebih akurat pada % N deasetilasi tinggi. % Derajat deasetilasi (DD) kitin dan kitosan dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\%DD = 1 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right] \times 100\%$$

Contoh Perhitungan derajat deasetilasi Kitosan :

$$\begin{array}{lll} A_{3450} = \log P_0/P & P_0 = 77,98 & \log P_0 = 1,89 \\ & P = 36,90 & \log P = 1,56 \end{array}$$

$$A_{3450} = 1,89 - 1,56 = 0,33$$

$$\begin{array}{lll} A_{1650} = \log P_0/P & P_0 = 52,40 & \log P_0 = 1,72 \\ & P = 40,00 & \log P = 1,60 \end{array}$$

$$A_{1650} = 1,72 - 1,60 = 0,12$$

$$\begin{aligned} \text{N-deasetilasi} &= 1 - (A_{1650}/A_{3450} \times 1/1,33) \times 100\% \\ &= 1 - (0,12/0,33 \times 1/1,33) \times 100\% \\ &= 72,72\% \end{aligned}$$

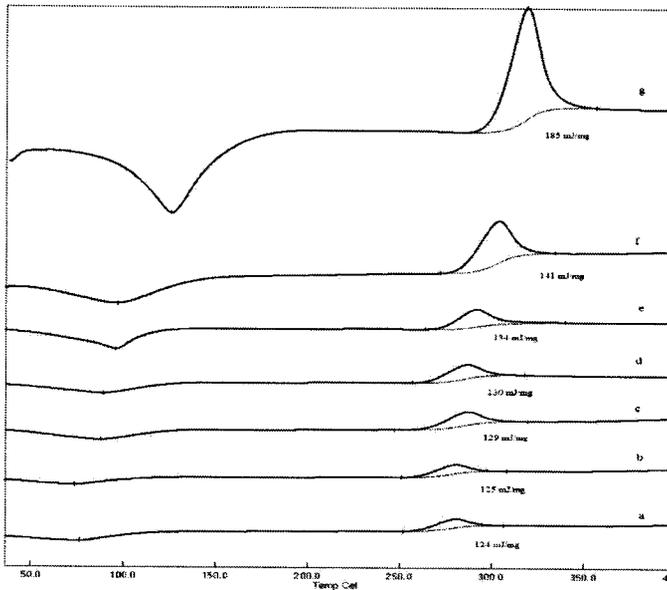
5.4.2. Penentuan Derajat Deasetilasi Kitosan dengan metoda DSC

Pada kurva DSC, banyaknya energi yang dibutuhkan untuk mendekomposisi seluruh gugus asetilen (sama dengan luas area) sebanding dengan kadar asetilen yang dimiliki oleh kitosan. Dengan demikian, DSC selain digunakan untuk karakterisasi termal suatu material juga dapat digunakan sebagai penentuan kadar deasetilasi kitosan.

Persamaan untuk menentukan derajat deasetilasi dari kitosan dapat dilihat pada persamaan 1.

$$y = 257,98 - 3,25x \quad (1)$$

Dimana, y merupakan luas puncak (mJ/mg) dan x adalah derajat asetilasi (DA) (%). Dari persamaan tersebut akan didapatkan derajat deasetilasi dari kitosan yang dianalisis pada kecepatan kalor 2,5 °C/min, 4 °C/min, 5 °C/min, 10 °C/min, dan 20 °C/min. (tabel 1).

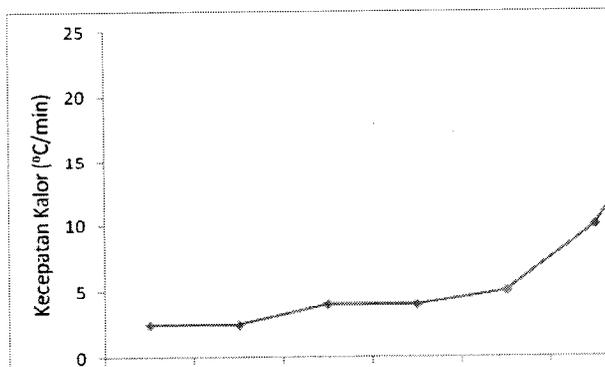


Gambar 5.14. Kurva DSC kitosan hasil isolasi dengan massa 2,5 mg dan kecepatan kalor masing-masing (a) 2,5°C/min, (b) 2,5°C/min, (c) 4°C/min, (d) 4°C/min, (e) 5°C/min, (f) 10°C/min, dan (g) 20°C/min

Tabel 5.1. Luas puncak, dan suhu puncak yang digunakan dalam penentuan derajat deasetilasi kitosan

Kecepatan Kalor (°C/min)	Luas puncak (mJ/mg)	Interval Suhu (°C)	Suhu Puncak (°C)	Derajat
2,5	124	260-293	280	58,78
2,5	125	260-293	280	59,08
4	129	266-301	288	60,32
4	130	267-301	288	60,62
5	134	273-305	292	61,85
10	141	284-316	301	64,00
20	185	300-328	316	75,55

Pada kolom 3 terlihat perbedaan luas puncak kitosan yang dianalisis pada kecepatan kalor 2,5 °C/min, 4 °C/min, 5 °C/min, 10 °C/min, dan 20 °C/min. Hal ini dikarenakan perbedaan waktu pencatatan perubahan termal yang terjadi pada saat analisis pada kecepatan kalor 2,5 °C/min, 4 °C/min, 5 °C/min, 10 °C/min, dan 20 °C/min. Semakin besar kecepatan kalor yang digunakan, maka luas puncak, suhu puncak dan derajat deasetilasi dari kitosan akan semakin besar. Sebaliknya, semakin kecil kecepatan kalor yang digunakan, maka luas puncak, suhu puncak dan derajat deasetilasi akan semakin kecil (Mugianto P, 2012 dan Rumapea S.A., 2012). Perbedaan derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan dari kurva DSC yang menggunakan kecepatan kalor yang berbeda tersebut dapat dilihat pada gambar.



Gambar 5.15. Grafik hubungan kecepatan kalor dan derajat deasetilasi kitosan

Derajat deasetilasi kitosan yang paling optimum adalah pada kecepatan kalor 2,5-5oC/min. Hal ini dikarenakan kurva dengan luas puncak lebih kecil memiliki presisi dan akurasi lebih baik dibandingkan kurva yang memiliki luas puncak lebih besar. Selain itu, kitosan yang dianalisa menggunakan kecepatan kalor 10oC/min, pada saat suhu puncaknya 303oC, kondisi fisik kitosan mulai berubah menjadi hitam. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pada kecepatan kalor 10oC/min, bukan hanya gugus asetilen yang terdekomposisi tetapi seluruh kitosan habis terdekomposisi. Sehingga kurva DSC yang dapat digunakan untuk menentukan derajat deasetilasi paling optimum dengan menggunakan kecepatan kalor 2,5-5oC/min(Mugianto P, 2012 dan Rumapea S.A., 2012).

Kegunaan Kitin Kitosan

Dalam pemanfaatannya, kitin dan kitosan dapat digunakan sebagai bahan dasar industri seperti kosmetik, makanan, kesehatan, pertanian, koagulasi untuk pengolahan limbah industri, kultur sel, imobilisasi enzim, dan pembuatan. Selain itu kitin dan kitosan dapat juga berfungsi sebagai pengikat bahan-bahan untuk membuat alat-alat gelas, plastik dan karet dari selulosa. Beberapa contoh penggunaan kitin dan kitosan adalah amobilisasi, pengikat logam dan pembuatan film anti mikrobaial (antibakteri) (Aspita Laila dkk 2007, Cahyaningrum, S.E. 2001, Hendri 2008, Virdiana E. 1994, Knorr, D 1984)

6.1. Amobilisasi Enzim α -amilase dengan Kitin

Enzim adalah suatu katalisator protein atau dalam bentuk gabungan dengan molekul asam nukleat yang berfungsi mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologi. Enzim merupakan katalis biologik, yang mampu meningkatkan laju reaksi dengan cara selektif dan efisien yang mendasar pada hukum termodinamika dan kinetika (Aspita Laila dkk. 2007 dan 2010, Cabib, E. 1987, Tortora G., et all 2001)

Enzim umumnya larut dalam air, oleh karena itu banyak enzim tidak ekonomis untuk digunakan dalam pengoperasian tipe *batch* skala besar, karena hanya dapat digunakan satu kali dengan biaya yang cukup mahal. Tetapi dalam tahun-tahun belakangan ini berbagai teknik telah ditemukan untuk memperbaiki kerja enzim, yaitu dengan caramengikatkan enzim pada bahan-bahan yang tidak larut dalam air, dimana bahan-bahan tersebut dapat dipisahkan dari produk dengan mudah. Hal itu memungkinkan penggunaan

kembali bahan-bahan tak larut yang mengandung enzim tersebut atau disebut amobilisasi enzim (Aspita Laila dkk. 2007).

Amobilisasi enzim merupakan suatu penempatan atau lokalisasi enzim sehingga dapat digunakan kembali terus menerus. Ada beberapa alasan mengapa amobilisasi lebih diinginkan; untuk pemrosesan dengan enzim yang telah diisolasi bentuk enzim teramobilisasi dapat dipertahankan dalam reaktor. Sebaliknya dengan enzim yang tercampur dalam larutan, sebagian akan ikut meninggalkan reaktor bersama-sama dengan produk yang terbentuk. Tidak hanya enzim-enzim baru harus dimasukkan untuk mengganti yang hilang, tetapi enzim yang tercampur dalam produk mungkin juga merupakan kotoran yang tidak diinginkan yang harus dikeluarkan. Selain itu enzim teramobilisasi dapat dipertahankan aktifitasnya lebih lama dibanding dengan yang berada dalam suatu larutan (Wirahadikusumah M. 1981).

Amobilisasi enzim pada kitin dapat dilakukan dengan metode adsorpsi sederhana, dengan adsorpsi pada kitin yang diaktifkan dengan glutaraldehid, atau dengan ikatan silang dari enzim dan pendukung dengan glutaraldehid. Ikatan silang dengan glutaraldehid menyebabkan penurunan aktivitas enzim sebesar 14 - 60%. Metode adsorpsi fisik merupakan salah satu metode amobilisasi enzim yang sederhana dan efektif karena sedikit atau tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim, atau destruksi pada pusat aktif enzim (Aspita Laila dkk., 2007.,

Metode adsorpsi fisik untuk amobilisasi enzim didasarkan pada adsorpsi fisik dari protein enzim pada permukaan bahan pendukung yang tidak larut air. Metode ini biasanya menyebabkan sedikit atau tidak ada perubahan konformasi protein enzim, atau destruksi pada pusat aktif enzim. Oleh karena itu jika bahan pendukung yang sesuai untuk enzim target ditemukan, metode ini dapat menjadi metode yang sederhana dan efektif.

Beberapa industri skala besar telah menggunakan katalis enzim teramobilisasi dalam beberapa tahap prosesnya. Dua contoh yang penting adalah produksi sirup fruktosa tinggi dari pati jagung dan pabrik asam L-amino dengan pelarutan campuran asam amino rasemik (mengandung isomer D dan L optik). Penggunaan amobilisasi enzim juga dijumpai pada produksi gula dari kanji dan dalam produksi serta analisis berbagai produk-produk yang berhubungan dengan obat (Rao K. 2009).

Amobilisasi enzim menjadi menarik jika substrat yang dibutuhkan sangat banyak atau enzim yang bersangkutan mahal. Penggunaan enzim teramobilisasi dibatasi oleh mahalannya harga bahan pendukung, oleh karena itu diperlukan bahan pendukung yang murah, tersedia dalam jumlah besar serta memiliki sifat menguntungkan (Aspita Laila dkk 2007).

Enzim amilase adalah enzim yang dapat menghidrolisis pati, glikogen, dan turunan polisakarida dengan jalan memecah rantai, ikatan α -1,4-glukosidiknya. Proses hidrolisis pati oleh amilase mula-mula menghasilkan polimer gula berantai pendek (dekstrusi), kemudian maltosa dan akhirnya glukosa. Enzim amilase dapat dibagi menjadi 3 berdasarkan bagian rantai yang diserang, yaitu α -amilase yang memecah ikatan dibagian dalam substrat sehingga disebut jaringan endoamilase. Ke-2, β -amilase yang menghidrolisis unit paling ujung dari substrat, dan ke-3, glukamilase, pemecah unit glukosa yang ikatannya belum tereduksi (Harman, G.E., et all 1993, Waites, A.M., et all. 2001).

α -amilase merupakan endoenzim yang memecah molekul pati menjadi dua komponen yaitu amilosa dan amilopektin. α -amilase umumnya stabil pada kisaran pH 5,5 - 8,0. Aktivitas optimum mencapai kisaran pH 4,8 - 6,5. Hidrolisis amilosa oleh α -amilase menghasilkan maltosa dan maltotriosa. Hidrolisis amilopektin oleh α -amilase menghasilkan glukosa dan maltosa serta sejumlah α -limit dekstrin. Aktivitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau dari kadar dekstrin dengan menggunakan substrat jenuh. Keaktifan α -amilase dapat juga dinyatakan dalam berbagai cara, misalnya pengukuran viskositas dan jumlah produksi yang terbentuk, atau pengukuran gula pereduksi yang terbentuk dengan menggunakan metode DNS (Aspita Laila dkk 2007).

Kitin dapat mengikat enzim α -amilase sebanyak 0,0194; 0,0190; 0,0205 (mg protein/ mg kitin) dengan rata-rata 0,0196 mg protein/ mg kitin. Banyaknya enzim yang diserap ini dihitung dari selisih antara kadar protein enzim bebas dengan kadar protein filtrat pada proses amobilisasi. Kadar protein enzim bebas adalah 1,038 mg, kadar protein filtrat yaitu 0,449 mg. Dengan kata lain protein enzim yang diikat oleh kitin adalah 56,74%. Aktivitas spesifik enzim α -amilase bebas yaitu $93,95 \times 10^{-2}$ unit/mg dan aktivitas enzim amobilnya adalah $90,48 \times 10^{-2}$ unit/mg. Kesesuaian kitin sebagai

bahan pendukung untuk amobilisasi enzim tergantung pada derajat deproteinasi, keberadaan gugus amino, kandungan mineral, ukuran partikel, struktur permukaan, dan konformasi molekul kitin (Aspita Laila dkk 2007).

6.2. Amobilisasi Enzim Protease Dengan Bahan Pendukung Polimer Kitosan

Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis protein menjadi satuan monomernya yaitu peptida-peptida yang sederhana atau asam amino. Protease berperan di dalam banyak reaksi biokimiawi selular yang penting sehingga sering dijadikan objek penelitian struktur, fungsi, dan sebagai model regulator metabolik. Protease banyak digunakan dalam industri sebagai biokatalis misalnya dalam industri detergen, kulit, sutera, pada proses pengempukan daging, pelunakan adonan roti, industri pangan dan berbagai produk biomedis (Sukma D 2003).

Penggunaan protease amobil dibandingkan protease bebas memiliki keuntungan antara lain dapat mengurangi biaya produksi karena dalam bentuk amobil, enzim dapat digunakan berulang. Karena banyak keunggulannya, maka teknik amobilisasi enzim telah digunakan dalam skala industri misalnya untuk memproduksi L-asam amino menggunakan enzim aminoasilase.

Kitosan dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengikat enzim karena memiliki beberapa keuntungan seperti struktur yang keras, inert, berpori serta mudah didapat. Penggunaan kitosan sebagai matrik pengamobilisasi karena kitosan memiliki gugus hidroksil dan amino yang dapat dimanfaatkan sebagai tempat pengikatan enzim melalui modifikasi kimia yang beraneka ragam

Kitosan diaktifkan dengan menggunakan asam asetat (CH_3COOH) 5% dan NaOH 0,5 M, yang dimulai dengan komponen negatif dari gugus fungsi ditempati oleh ion CH_3COO^- dan dalam kondisi ini larutan kitosan memiliki pH 3,8. Larutan kitosan dengan pH < 6 membentuk formasi gel dengan sejumlah *counter* ion (ion penukar) anionik multivalen. Kemudian ion CH_3COO^- diganti kedudukannya oleh ion OH^- dan dinetralkan dengan menggunakan aquades dan kitosan dalam keadaan aktif (Sukma D 2003).

Peningkatan konsentrasi protein enzim berbanding lurus dengan kadar protein enzim yang teradsorpsi oleh matriks kitosan, dimana ketika konsentrasi protein enzim ditingkatkan maka kadar protein

enzim yang teradsorpsi oleh matriks kitosan juga meningkat, tetapi pada kondisi tertentu kenaikan konsentrasi protein enzim tidak diikuti oleh kenaikan protein enzim yang teradsorpsi oleh kitosan, keadaan ini menunjukkan bahwa kitosan telah mencapai titik adsorpsi maksimum sehingga tidak mampu lagi dalam mengadsorpsi protein enzim.

Permukaan adsorben memiliki sejumlah gugus fungsi aktif yang sebanding dengan luas permukaan adsorbat. Setiap gugus fungsi aktif yang dimiliki adsorben hanya dapat menyerap satu molekul adsorbat (Oscik, 1998). Sehingga dengan memperbesar konsentrasi adsorbat sedangkan jumlah adsorben matriks kitosan dibuat tetap (0.1 g) dapat menyebabkan kenaikan adsorpsi protein enzim hingga batas tertentu dan setelah tercapai keadaan jenuh maka akan terjadi penurunan adsorpsi protein oleh kitosan. Pada adsorben kitosan terdapat gugus fungsi aktif berupa $-NH_2$ dan $-OH$ yang dapat berinteraksi dengan protein enzim yang juga memiliki gugus fungsi aktif berupa $-NH_2$ dan $-COO^-$ (Sukma D 2003).

Ketika mengamobilisasi enzim protease pada permukaan seperti pada matriks kitosan sangat penting untuk memilih metode yang dapat mencegah kehilangan sisi aktif enzim. Sisi aktif enzim dapat dijaga sepanjang sisi aktif tersebut terlindungi dalam matriks kitosan sehingga dapat digunakan dalam pemakaian berulang.

Enzim protease teradsorpsi pada permukaan matriks kitosan sebesar 66,949 % atau 49,375 mg/L dari konsentrasi enzim bebasnya sebesar 73,750 mg/L. Pengikatan enzim protease pada permukaan kitosan terjadi karena enzim teradsorpsi pada permukaan kitosan yang memiliki *counter ion* (ion penukar). Dengan teradsorpsinya enzim maka terjadi interaksi elektrostatik yaitu pertukaran reversibel dari ion-ion dalam campuran. Muatan negatif dari enzim akan menggantikan kedudukan *counter ion* sehingga enzim akan terikat pada matriks kitosan (Sukma D 2003, dan Gupta, 2000).

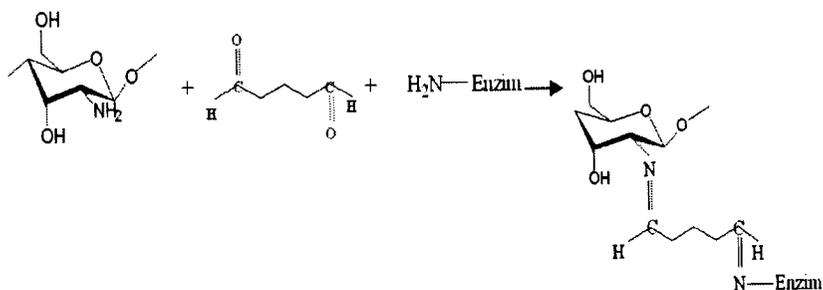
Sebagaimana dijelaskan dalam Smith, 1990, kelemahan dari metode ini yaitu ikatan yang dihasilkan antara enzim dengan kitosan relatif tidak kuat, akibatnya enzim yang teradsorpsi mungkin dapat keluar kembali dari pendukungnya. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan reaksi *crosslinking* antara enzim protease dengan matriks kitosan dengan penambahan reagen bifungsional glutaraldehid.

Reaksi *crosslinking* dapat menurunkan kebebasan pengeluaran enzim dari matriks kitosan, dimana dengan metode ini dapat terjadi pengikatan bersama rantai-rantai polimer melalui ikatan kovalen atau ionik oleh reagen bifungsional glutaraldehid sehingga terbentuk jaringan tiga dimensi. Glutaraldehid merupakan reagen *crosslinker* yang paling efisien (Christova, D. 2003).

Metode *crosslinking* dengan reagen glutaraldehid dapat menghasilkan stabilitas yang lebih baik untuk enzim teramobilisasi karena dapat mempengaruhi kekuatan ikatan intermolekuler. Glutaraldehid dipilih sebagai reagen *crosslinker* pada teknik amobilisasi enzim karena tidak mengganggu sisi aktif enzim. Proses penambahan glutaraldehid ke dalam matriks kitosan-enzim pada kondisi pH pengikatan 6,5 akan terbentuk gel ionotropic, dimana gugus NH_2 dari kitosan ataupun enzim dapat terprotonasi dan selanjutnya terjadi pengikatan silang ionik dengan *crosslinker* (Yisong, W.Li and T.Yu. 1990).

Mekanisme reaksi *crosslinking* antara protein enzim dan matriks kitosan dengan penambahan reagen glutaraldehid belum jelas benar, tetapi diduga terjadi melalui reaksi *Schiff* seperti pada

gambar 15 berikut ini :



Gambar 6.1. Reaksi *crosslinking* dengan reagen glutaraldehid

Sejumlah perubahan ekstrem akan menyertai proses reaksi *crosslinking*. Jika sebelumnya matriks kitosan-enzim dapat larut dalam larutan asam asetat maka setelah terjadi reaksi *crosslinking* dengan penambahan reagen glutaraldehid dapat menyebabkan matriks kitosan-enzim tersebut menjadi tidak larut dengan penambahan larutan asam asetat. Reaksi *crosslinking* enzim pada kitosan dengan reagen glutaraldehid dapat menghasilkan kondisi penyusunan konformasi pusat aktif enzim dalam matriks

kitosan relatif lebih kuat sehingga dapat mengatasi penurunan aktivitas enzim pada proses pemakaian berulang. Penambahan reagen glutaraldehid pada polimer kitosan-enzim meningkatkan kestabilan enzim amobil yang terikat pada matriks kitosan, jumlah protein enzim yang teradsorpsi pada permukaan kitosan sebelum ditambahkan reagen glutaraldehid sebesar 38,125mg/L atau 51,695% dan mengalami peningkatan menjadi 49,375mg/L atau 66,949% dengan penambahan reagen glutaraldehid dari kadar protein enzim bebasnya sebesar 73,750 mg/L(Sukma D 2003). Dari hasil penelitian ini telah diamati morfologi permukaan matriks kitosan yang mengadsorpsi enzim protease menggunakan fotomikroskop dengan perbesaran 400 kali seperti pada Gambar berikut ini :



Gambar 6.2. Morfologi permukaan matriks kitosan



Gambar 6.3. Morfologi permukaan adsorpsi enzim protease oleh matriks kitosan pada pH pengikatan 6,5 sebelum reaksi *crosslinking*



Gambar 6.4. Morfologi permukaan adsorpsi enzim protease oleh matriks kitosan pada pH pengikatan 6,5 setelah reaksi *crosslinking* dengan glutaraldehid

6.3. Studi Adsorpsi Asam Amino Glisin ($C_2H_5NO_2$) dan Lisin mono hidroklorida ($C_6H_{15}ClN_2O_2$) Menggunakan Polimer Kitosan

Asam amino adalah senyawa monomer yang dihasilkan dari hidrolisis sempurna protein murni. Pada umumnya protein murni tersebut mengandung dua puluh macam asam amino biasa. Selain itu ada pula asam amino lain yang jarang dan tidak sama sekali ditemukan sebagai satuan pembentuk protein.

Struktur umum asam amino dalam keadaan tak terionisasi adalah memiliki gugus karboksil, gugus α -amino, dan gugus rantai cabang yang terdiri dari alkil, sulfur, dan ada yang memiliki cabang gugus aromatik. Asam amino diklasifikasikan berdasarkan rantai samping atau gugus $-R$ yang bervariasi dalam struktur, muatan listrik, dan kelarutannya di dalam air.

Proses adsorpsi kitosan terhadap larutan asam amino glisin dan lisin adalah kemampuan kitosan untuk mengambil zat dalam bentuk larutan melalui permukaan tanpa penetrasi. Kemampuan adsorpsi polimer kitosan terhadap larutan asam amino dapat dijelaskan secara kimia, karena adanya ikatan yang mengikuti pembentukan *agregat*. Ikatan-ikatan tersebut berupa ikatan hidrogen yang lemah, yang disebabkan oleh gaya-gaya Van Der Waals, dan gaya-gaya adhesi yang berupa gaya tarik menarik antara gugus yang berbeda kutub.

Secara umum kenaikan konsentrasi awal asam amino baik glisin maupun lisin akan menyebabkan kenaikan konsentrasi sisa asam amino. Hal ini dapat dilihat dari meningkatnya konsentrasi akhir untuk glisin sebesar 229,63 mg/L untuk yang berkonsentrasi awal 500 mg/L dan konsentrasi sisa ini akan terus meningkat hingga mencapai 486,82 mg/L untuk konsentrasi awal 1000 mg/L. Berbeda dengan pengaruh konsentrasi awal asam amino glisin terhadap konsentrasi akhir setelah glisin diadsorpsi oleh kitosan, besarnya persentase adsorpsi menurun tidak beraturan yaitu (500 mg/L; 54.07%), (600 mg/L; 53.69%), (700 mg/L; 58.01%), (800 mg/L; 53.21%), (900 mg/L; 56.62%), dan (1000 mg/L; 51.32%) (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Secara umum, adsorpsi mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi awal larutan adsorbat, dan sampai pada konsentrasi tertentu perubahan mg/gr zat yang teradsorpsi tidak akan mengalami perubahan yang sangat berarti. Berdasarkan teori adsorpsi yang disampaikan oleh Adamson (1990), adsorbat yang tidak jenuh lebih diadsorpsi dibandingkan dengan adsorbat yang jenuh. Hal ini sesuai dengan menurunnya persentase teradsorpsi pada konsentrasi adsorbat dari 500 sampai 700 mg/L, namun setelah itu persentase adsorpsi kembali meningkat dari 800 sampai 1000 mg/L (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Langmuir telah menjelaskan, bahwa permukaan adsorben memiliki sejumlah gugus fungsi aktif yang sebanding dengan luas permukaan adsorbat. Setiap gugus fungsi aktif yang dimiliki oleh adsorben, hanya akan dapat menyerap satu molekul adsorbat, sehingga dengan memperbesar konsentrasi zat terserap yang berinteraksi dengan adsorben polimer kitosan yang beratnya tetap (0,1 gr) akan menghasilkan serapan asam amino yang meningkat secara linier hingga batas waktu tertentu. Pada adsorben polimer kitosan terdapat gugus fungsi aktif berupa $-NH_2$, dan $-OH$, yang akan jenuh bila berinteraksi dengan zwiterion, maka peningkatan konsentrasi asam amino yang bersifat amfoter di dalam H_2O sampai pada batas tertentu tidak dapat lagi dapat meningkatkan serapan asam amino glisin yang juga memiliki gugus fungsi aktif $-NH_2$ dan $-COO^-$. Secara stereokimia, glisin termasuk asam amino yang paling sederhana karena tidak bersifat asimetrik, karena atom C pusat tidak mengikat gugus yang berlainan atau tidak mengikat satu pun rantai alkil. Disamping itu berat molekulnya adalah paling kecil dibanding dengan asam amino yang lain. Menurut klasifikasi

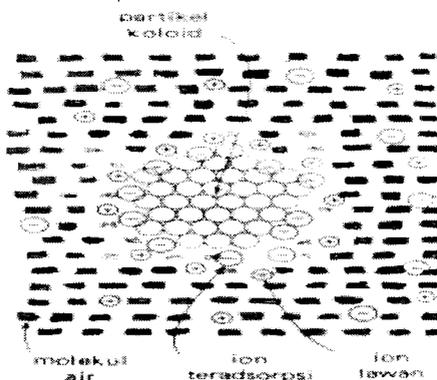
asam amino berdasarkan kepolarannya, glisin termasuk kedalam golongan asam amino polar (mengutub) tapi tidak bermuatan. Ketiadaan muatan asam amino glisin ini disebabkan keseimbangan muatan kutub positif dan kutub negatif antara dua gugus yang diikat oleh atom C pusat. Dari kondisi pH juga dapat dilihat bahwa glisin memiliki pH mendekati 7 apabila dilarutkan dalam air, dan secara elektroforesis kertas setetes asam amino akan menuju ke kutup positif dan kutub negatif sesuai dengan gugus yang dimiliki oleh asam amino itu sendiri (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Peningkatan konsentrasi awal lisin, berbanding lurus dengan konsentrasi akhir setelah asam amino tersebut diinteraksikan dengan kitosan. Konsentrasi akhir lisin untuk 500 mg/L adalah 81,18 mg/L, besarnya konsentrasi sisa ini akan terus meningkat hingga mencapai 296,24 mg/L untuk lisin yang berkonsentrasi awal 1000 mg/L. Di samping itu, peningkatan konsentrasi awal juga menyebabkan penurunan persentase lisin yang teradsorpsi oleh kitosan. Dapat dilihat bahwa besarnya penurunan ini tidak teratur seperti halnya pada persentase glisin yang teradsorpsi. Kenaikan konsentrasi awal dan penurunan lisin teradsorpsi adalah: (500 mg/L; 83.76%), (600mg/L; 80.49%), (700 mg/L; 80.73%), (800 mg/L; 76.41%), (900 mg/L; 77.04%), dan (1000 mg/L; 70.38%). Pengaruh pH terhadap konsentrasi sisa lisin, adalah minimum pada pH 3 yaitu sebesar 134.95 mg/L. Setelah pH dibuat sehingga mendekati netral, konsentrasi sisa meningkat tidak teratur. Kenaikan konsentrasi sisa ini tidak mengiringi perubahan persentase lisin yang teradsorpsi, nilainya menurun secara tidak teratur. Besarnya persentase lisin teradsorpsi maksimum pada pH 3 yaitu sebesar 86.51% yang diikuti dengan (4; 72.17%), (6; 77.55%), (6.5; 70,38%), (7; 66.79%), (7.5; 61.42%), (8; 57.83%), dan (8.5; 52.46%) (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Bentuk molekul dominan pada pH awal adalah $^+NH_3CHRCOOH$, dengan cabang cabang R-nya adalah $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$. Dan bentuk protonasi pertama lisin ada dalam bentuk $^+NH_3CHRCOOH$ dan $^+NH_3CHCH_2CH_2CH_2CHNH_2COO^-$. Pada tabel harga pH isoelektrik untuk berbagai asam amino dapat diketahui bahwa lisin memiliki pK'_1 2,18, pK'_2 8,95 dan pK'_R adalah 10,53. Karena pK' terdiri dari 3 jenis, pembentukan ion tidak bisa disamakan dengan pembentukan ion pada glisin. Namun harga titik isoelektrik tetap dapat ditentukan yaitu sebesar 5,97, namun pada grafik titik ini dibuat pada pH = 6, yang merupakan titik belok, apabila

disamakan dengan kondisi titrasi asam amino secara umum, titik ini menggambarkan pembebasan proton yang pertama telah berlangsung, dan dilanjutkan dengan pelepasan proton yang kedua. Pada pH ini, lisin sebagian besar terdapat dalam bentuk ion dipolar $^+NH_3CHCH_2CH_2CH_2CHNH_2COO^-$. Adsorpsi mg/gr lisin oleh polimer kitosan menurun setelah melewati titik isoelektrik ini. Hal ini disebabkan pada pH basa ($pK'NH_3^+ = 8,95$) terjadi pembebasan proton dari gugus NH_3 pada gugus R lisin, sehingga sebagian besar lisin berbentuk $NH_2CHCH_2CH_2CH_2NH_2CHCOO^-$ (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003)

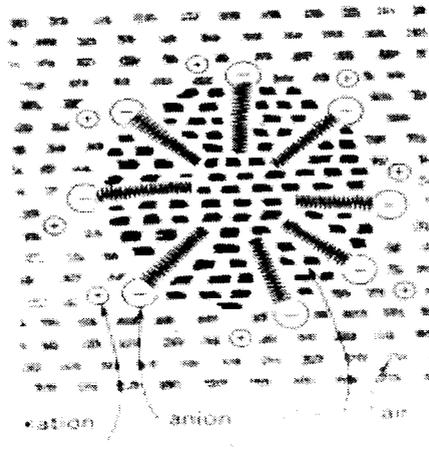
Secara fisika yang teramati adalah terbentuknya kerumunan partikel-partikel yang terlalu besar untuk disebut sebagai padatan berbutiran halus yang terlarut dan terlalu kecil untuk disebut sebagai endapan atau disebut sebagai *agregat*, dalam kimia koloid.



Gambar 6.5. Pemaparan terdispersinya polimer kitosan dalam larutan asam amino

Pada suasana asam, secara umum *agregat* yang terbentuk lebih besar dan tidak diikuti dengan terbentuknya *agregat* yang berukuran lebih kecil, hal ini terjadi karena tarik menarik antara gugus amina yang menjadi bermuatan positif (kation) lebih dominan tertarik ke gugus hidroksil kitosan yang bersifat basa kuat, atau gugus aminanya yang bersifat asam maupun basa, bahwa kitosan bersifat basa karena gugus amino yang dimilikinya (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Penggambaran adanya tarik menarik antara ion yang berbeda kutub antara asam amino dan kitosan dapat diperlihatkan pada gambar berikut ini.



Gambar 6.6. Tarik menarik antara kutub yang berlawanan pada larutan asam amino dan polimer kitosan

Asam amino dalam larutan asam (pH = 3,0) apabila ditambahkan di dalamnya partikel-partikel resin polimer, yang terdapat dalam kolom pemisahan, asam amino yang bersifat kation (pH = 3,0) akan mengusir sebagian ion positif yang terikat pada polimer dan mengikatkan dirinya pada partikel polimer tersebut (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

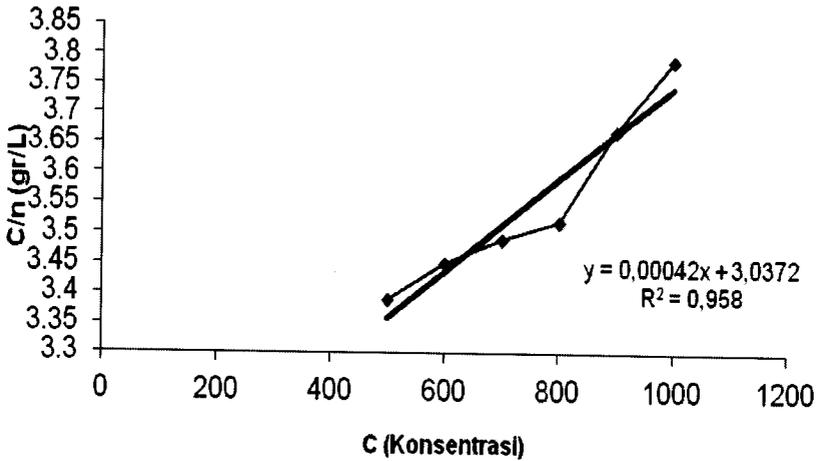
Pemindahan ion oleh asam amino ini berbeda-beda bergantung pada derajat ionisasi dari masing-masing asam amino. Pada pH 3,0 semua asam amino basa seperti lisin terikat lebih kuat pada resin (polimer penyerap) daripada asam amino asam seperti asam glutamat dan aspartat. Berdasarkan harga pK' yang berbeda-beda pada pH tertentu, asam amino bergerak dengan arah yang berbeda-beda. Lehninger mengatakan bahwa lisin mempunyai muatan +2, sehingga bergerak lebih cepat menuju ke arah kutub yang bermuatan negatif.

Kapasitas dan energi adsorpsi glisin dan lisin oleh kitosan dapat ditentukan dengan grafik adsorpsi langmuir, sehingga hasilnya dapat diterapkan ke dalam persamaan:

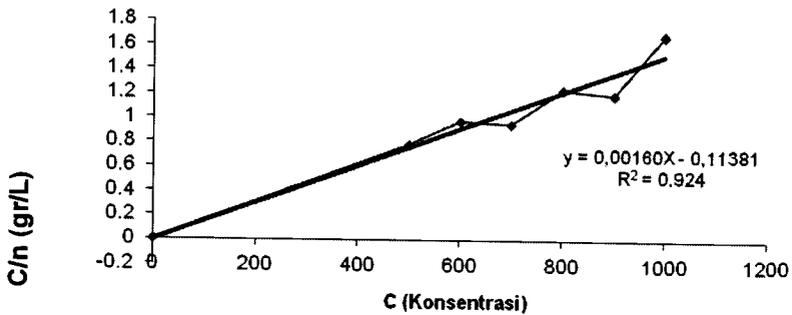
$$C/n = 1/nmK + (C/nm)$$

Dengan C adalah konsentrasi keseimbangan, n adalah jumlah zat yang teradsorpsi per gram adsorben, sedangkan nm dan K, masing-masing adalah kapasitas serapan maksimum dan afinitas serapan.

Dengan memplotkan C/n terhadap C dari persamaan di atas diperoleh garis lurus dengan slope dan intersep adalah $1/nm$ dan $1/nmK$ (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).



Gambar 6.7. Plot Langmuir untuk adsorpsi glisin oleh kitosan



Gambar 6.8. Plot Langmuir untuk adsorpsi lisin oleh kitosan

Dari persamaan linier yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan kapasitas adsorpsi dalam mg/gr adsorben (nm), Energi adsorpsi (DG_{ads}^0), koefisien regresi (r), serta afinitas adsorpsi (k), seperti yang tertera pada tabel di bawah ini (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Tabel. 6.1. Hasil perhitungan plot kinetika Langmuir

Adsorbat	r	Nm		K	DG ⁰ _{ads} (Kj. Mol ⁻¹)
		mg/g	mol/g		
Glisin	0,958	1306,667	17,406	2,574. 10 ⁻⁴	20,477
Lisin	0,954	623,869	3,416	0,0141	-10,558

Hasil perhitungan harga nm dan K disajikan dalam tabel. Energi total adsorpsi per mol dapat ditentukan dari harga konstanta keseimbangan dengan persamaan:

$$DG^0_{ads} = - RT \ln K.$$

Pada tabel menunjukkan bahwa ada perbedaan energi adsorpsi polimer kitosan terhadap glisin dan lisin. Besarnya harga energi adsorpsi kimia (kimisorpsi) minimal adalah 20,92 kj .mol⁻¹. Dan energi ikatan adalah energi yang ditimbulkan oleh gaya-gaya dispersi yang besarnya bekisar antara 10 – 40 kj.mol⁻¹, yang dihasilkan karena adanya gaya London atau van der Waals. Selain adanya gejala ikatan kimia, juga diikuti oleh adanya proses pada permukaan padat. Perluasan permukaan dan pertumbuhan partikel padatan yang disebabkan oleh akumulasi partikel bisa disebut sebagai gejala adsorpsi. Zat yang mengadsorpsi disebut sebagai adsorbat dan material dibawahnya merupakan adsorben atau substrat. Permukaan yang bertumbukan dengan molekul gas sebagai bola yang melambung.

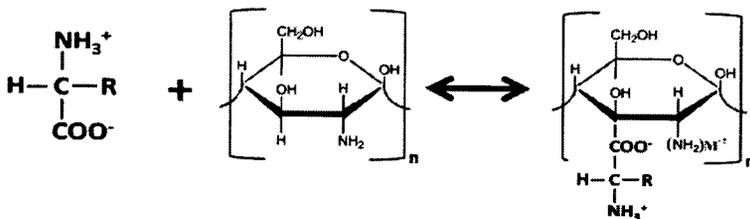
Adsorpsi asam amino glisin oleh polimer kitosan termasuk kimisorpsi karena mendekati batas minimal energi adsorpsi kimia. Hal ini diperkuat pula bahwa sebenarnya terjadinya *agregat* atau adanya molekul dan atom yang saling menempel pada permukaan padatan kitosan berbutiran halus dengan dua cara, yaitu bisa dengan fisisorpsi dan kimisorpsi. Dalam fisisorpsi ini, terdapat antaraksi Van der Waals (contohnya, dispersi atau antar aksi dipolar) antara adsorben dan substrat (adsorbat). Antar aksi Van der Waals ini mempunyai jarak jauh, tetapi lemah dan energi yang dilepaskannya jika partikel terfisisorpsi mempunyai orde besaran yang sama dan entalpi kondensasi. Kuantitas energi sekecil ini dapat diadsorpsi sebagai vibrasi kisi dan dapat dihilangkan sebagai gerakan termal. Molekul yang melambung pada permukaan, akan kehilangan energinya secara perlahan-lahan dan akhirnya teradsorpsi,

peristiwa ini disebut sebagai proses akomodasi. Pada kimisorpsi, partikel melekat pada permukaan dengan membentuk ikatan kimia (biasanya ikatan kovalen) dan cenderung untuk mencari tempat yang dapat memaksimumkan bilangan koordinasinya dengan substrat. Molekul yang terkimisorpsi ini, dapat terpisah karena keharusan valensi atom permukaan yang tidak terpenuhi. Adanya fragmen molekul pada permukaan, adalah merupakan hasil dari kimisorpsi, yang dapat menjadikannya sebagai katalis pada suatu reaksi (Hendri dkk 2007, PratiwiDesy 2003).

Dan dari segi gaya antar molekul, interaksi antara asam amino dan kitosan ini merupakan gaya-gaya adhesi, sehingga karena hal ini pula adsorpsi oleh kitosan dapat dimanfaatkan untuk mengikat sejumlah zat-zat asing yang tersentuh oleh permukaannya.

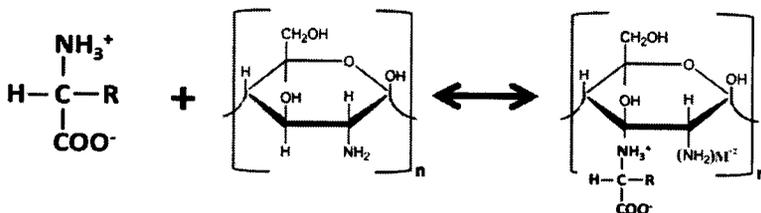
Ada dua jenis mekanisme reaksi yang digunakan untuk menggambarkan adsorpsi asam amino oleh polimer kitosan, yaitu pertukaran ion dan pembentukan ikatan antara adsorbat dan adsorben (Masrurah, Umi. 2003).

Adsorpsi asam amino melalui pertukaran ion digambarkan berikut ini :



Gambar 6.9. Reaksi pertukaran ion antara asam amino dengan kitosan

Adsorpsi asam amino melalui reaksi pengikatan digambarkan sebagai berikut :



Gambar 6.10. Reaksi Pengikatan Ion antara Asam Amino dengan Kitosan

6.4. Adsorpsi Ion logam Pb dan Cd oleh kitosan

Istilah “logam” secara khas berarti suatu unsur yang merupakan konduktor listrik yang baik dan mempunyai konduktivitas panas, kerapatan, kemudahan ditempa, kekerasan, dan keelektropositifan yang tinggi. Istilah “logam berat” digunakan secara luas dalam literatur ilmiah yang berarti logam beracun. Berbeda dengan logam biasa, logam berat biasanya menimbulkan efek-efek khusus pada makhluk hidup. Dapat dikatakan bahwa semua logam berat dapat menjadi bahan racun yang akan meracuni tubuh makhluk hidup. Suatu logam dikatakan sebagai logam berat bila gaya berat spesifik logam lebih besar dari 4 atau 5, memiliki nomor atom 22 – 34 dan 40 – 52 serta logam-logam golongan lantanida dan aktinida, dan memiliki respon biokimia yang spesifik di dalam hewan dan tumbuhan (Hendri dkk 2010 dan Cahyaningrum, S.E. 2001)

Kitosan merupakan polimer alami yang dapat digunakan untuk mengikat ion logam, terutama ion logam yang berada dalam golongan transisi. Kitosan dapat membentuk kompleks dengan ion logam transisi dan logam berat (khususnya Pb dan Cd). Struktur kitosan yang memiliki gugus fungsi aktif berupa gugus hidroksil dan amina yang memungkinkan terbentuknya kompleks kitosan-logam.

Timbal atau timah hitam adalah logam yang berwarna abu-abu kebiruan, dengan rapatan yang tinggi ($11,48 \text{ g ml}^{-1}$ pada suhu kamar). Pada tabel periodik, logam Pb termasuk dalam golongan IV A dan memiliki nomor atom (NA) 82 dengan massa atom relatif (Ar) 207,19. Keracunan timbal dapat menyebabkan gangguan pada sistem syaraf tepi seperti kram, lumpuh, dan kehilangan koordinasi seperti anemia. Efek keracunan timbal biasanya tampak pada konsentrasi 0,1 – 5 mg/L pada manusia. Berdasarkan keputusan Menteri Lingkungan Hidup No 51/Men LH/10/1995, kadar maksimal Pb adalah 0,1—1 mg/L.

Kadmium adalah logam putih keperakan, yang dapat ditempa dan liat. Memiliki nomor atom (NA) 48 dengan massa atom relatif (Ar) 112,40 dengan titik lebur 321°C . Kadmium merupakan logam yang mendapat perhatian utama dalam kesehatan manusia dan lingkungan, karena dampaknya terhadap lingkungan (pencemaran lingkungan) dan sifat toksiknya berbahaya bagi tubuh makhluk hidup. Kadmium merupakan logam berat yang paling berbahaya setelah raksa (Hg). Sifat racun pada manusia bersifat akumulatif.

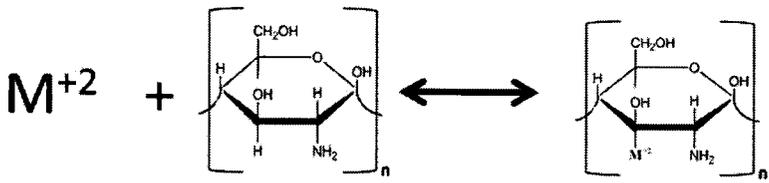
Keracunan yang bersifat kronis menyebabkan tekanan darah tinggi, menghambat fungsi kerja dan fungsi enzim, kerusakan ginjal, kehilangan darah merah, kerapuhan pada tulang dan gangguan lambung. Keracunan kadmium dapat pula menyebabkan gangguan pada sistem urinaria (ginjal), sistem respirasi (pernafasan/paru-paru), sistem sirkulasi darah, jantung, dan kelenjar reproduksi.

Kadar Ion Timbal (Pb^{2+}) dan Kadmium (Cd^{2+}) yang teradsorpsi oleh kitosan berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ion logam, dimana saat konsentrasi ion logam dinaikkan pada larutan maka ion logam yang teradsorpsi oleh kitosan pun meningkat, namun pada kondisi tertentu kenaikan konsentrasi ion logam tidak diikuti oleh kenaikan ion logam yang teradsorpsi oleh kitosan, keadaan ini menandakan bahwa kitosan telah mencapai titik adsorpsi maksimum serta tidak dapat lagi menyerap ion logam pada larutan tersebut.

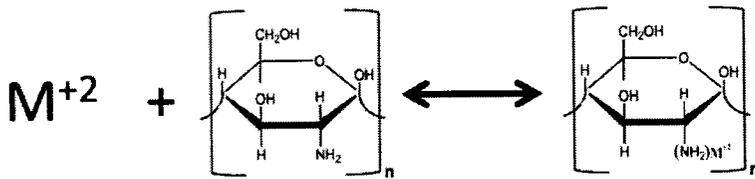
Kitosan mempunyai kapasitas gugus fungsional yang tinggi, laju pengikatan yang cepat dan penyaring yang baik untuk beberapa ion logam. Adanya gugus amino menyebabkan kitosan dapat dipergunakan untuk mengikat ion lain, dan untuk proses pengikatan ion logam perlu dilakukan pengaturan pH larutan. Gugus fungsi aktif yang dimiliki adsorben, hanya akan dapat menyerap satu molekul adsorbat, sehingga dengan memperbesar konsentrasi zat terserap yang berinteraksi dengan adsorben polimer kitosan yang beratnya tetap (0,1 gr) akan menghasilkan serapan ion logam yang meningkat secara linier hingga batas tertentu. Pada adsorben kitosan, terdapat dua gugus fungsi aktif yaitu $-NH_2$ dan $-OH$. Adanya ion H^+ dalam larutan dapat mengganggu keberadaan gugus amina (Hendri dkk 2010).

Ada dua jenis mekanisme reaksi yang digunakan untuk menggambarkan adsorpsi ion logam oleh kitosan, yaitu pertukaran ion dan pembentukan ikatan antara adsorbat dan adsorben.

Adsorpsi ion logam melalui pertukaran ion digambarkan seperti berikut ini:



Adsorpsi ion logam melalui reaksi pengikatan digambarkan sebagai berikut :



6.5. Pengikatan Kitosan Pada Polietilen Tergrafting Asam Akrilat

Kitosan memiliki sifat sebagai anti oksidan dan penghambat pertumbuhan bakteri patogen karena dapat menekan proses metabolisme dari bakteri. *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium* merupakan salah satu jenis bakteri patogen yang dapat ditemukan dalam air minum. *Escherichia colidan Salmonella typhimurium* termasuk ke dalam bakteri gram negative, tidak mempunyai spora, dan bersifat patogen. *E. Coli* ditemukan melimpah di usus besar mamalia dan dapat menyebabkan berbagai penyakit. Sedangkan *Salmonella typhimurium* dapat ditemukan pada daerah perairan bahkan dalam beberapa penelitian bakteri ini dapat ditemukan pada air minum. Bila bakteri ini ditemukan dalam air yang dikonsumsi maka dapat membahayakan kesehatan (Hendri dkk. 2008).

Kitosan yang memiliki sifat antibakteri yang disebutkan di atas dapat diikatkan pada polietilen film. Polietilen yang merupakan bahan dasar pembuatan film, pipa, dan plastik telah digunakan untuk berbagai macam keperluan mulai dari alat rumah tangga sampai keperluan industri seperti bahan pengemas makanan dan minuman terutama minuman botol. Hal ini disebabkan polietilen mempunyai sifat yang mudah dibentuk, ringan, awet, lentur, dan murah. Sayangnya, beberapa polimer tidak dapat digunakan secara langsung seperti dalam pemanfaatannya di atas karena tidak memiliki sifat-sifat yang sesuai, seperti plastik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Untuk memenuhi sifat-sifat polimer yang sesuai dengan pemanfaatannya, maka seringkali dilakukan fungsionalisasi polimer (Hendri dkk. 2008).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memfungsionalisasi polimer adalah metode grafting (penempelan/pencangkokan)

monomer pada permukaan suatu polimer dengan memanfaatkan bantuan inisiator sebagai pemicu. Kunci utama untuk melakukan polimerisasi grafting adalah dengan membentuk sisi aktif sebagai tahap inisiasi yang dapat dilakukan dengan menggunakan plasma, sinar gamma, *electron beam*, sinar ultraviolet, dan korona. Kelebihan metoda ini adalah polimer dapat difungsionalisasi berdasarkan sifat yang dimiliki monomer penggrafting tanpa mempengaruhi struktur dasar polimer induk (Amr Elhag A. Et all 2000).

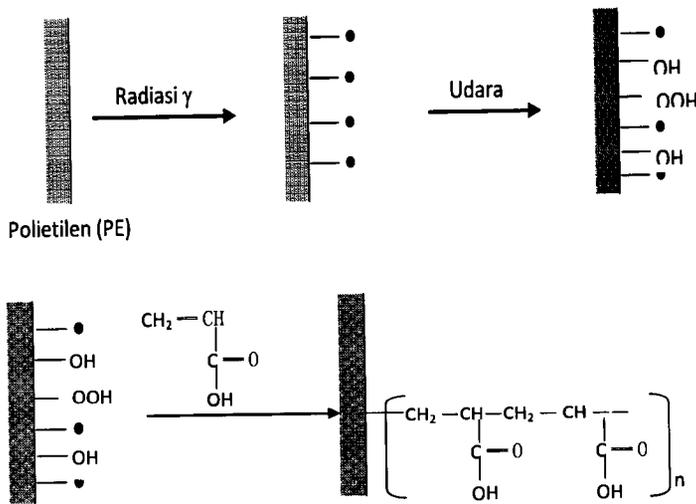
Polimerisasi grafting dengan radiasi gamma merupakan salah satu metode untuk memodifikasi bahan-bahan polimer. Metode ini telah banyak digunakan misalnya untuk menyiapkan membrane selektif penukar ion, membuat bahan elastomer, mengembangkan polimer yang ramah lingkungan, dan pengujian proses pembuatan membran penukar ion. Pada teknik ini radiasi sinar gamma diperlukan untuk menginisiasi terjadinya proses polimerisasi (Ginting S.I. et all 2005, Hu.S.G., 2002, dan Kubota H., 1992)

Grafting dengan menggunakan radiasi gamma cenderung lebih cepat dan dapat bersaing langsung dengan homopolimerisasi dari monomer-monomer. Hal ini disebabkan, radiasi energi tinggi tidak selektif, efisiensi grafting didapat hanya jika polimer substrat dapat berinteraksi lebih cepat dengan radiasi gamma dibandingkan dengan monomer. Selain itu teknik ini juga memiliki keuntungan yaitu minimnya kontaminasi zat kimia pada polimer induk. Modifikasi polimer dengan teknik ini dapat dilakukan pada polimer berbentuk film/membran, karena teknik ini tidak terpengaruh oleh masalah reologi polimer yang mungkin timbul sebagai akibat gugus yang digraftingkan pada sample.

Grafting dengan teknik radiasi gamma terbagi menjadi dua metode yaitu metode langsung atau bersamaan (*mutual or simultaneous*) dan tidak langsung (*preirradiation*). Dalam metode langsung, monomer dan substrat polimer yang akan digrafting terletak bersama-sama pada saat tabung polimerisasi diradiasi dengan energi tinggi (sinar gamma). Sedangkan pada metode tidak langsung, substrat polimer diradiasi terlebih dahulu dengan sumber energi tinggi untuk menghasilkan radikal-radikal, kemudian substrat polimer dicelupkan ke dalam larutan monomer untuk menghasilkan proses kopolimerisasi grafting (Amr Elhag A. et all 2000, dan Onishi, M. et all., 2000)..

Satuan dosis radiasi yang biasa digunakan adalah RAD (*Radiation Adsorbed Dose*) yang sama dengan satuan energi absorpsi dari 100 erg per g sampel (1 sampel = 100 erg/g). Gray adalah satuan lain untuk radiasi yang menyatakan sejumlah energi sebesar 1 joule yang diserap tiap 1 kg bahan (1 Gy = 1 j/kg). Pada penelitian sebelumnya digunakan dosis 15 kGy, tetapi pada penelitian ini dilakukan variasi dosis radiasi sebesar 5, 10, 15, dan 20 kGy. Hal ini bertujuan untuk mengetahui dosis radiasi optimum sehingga akan menghasilkan persen grafting polietilen-asam akrilat tertinggi (Hendri dkk 2008).

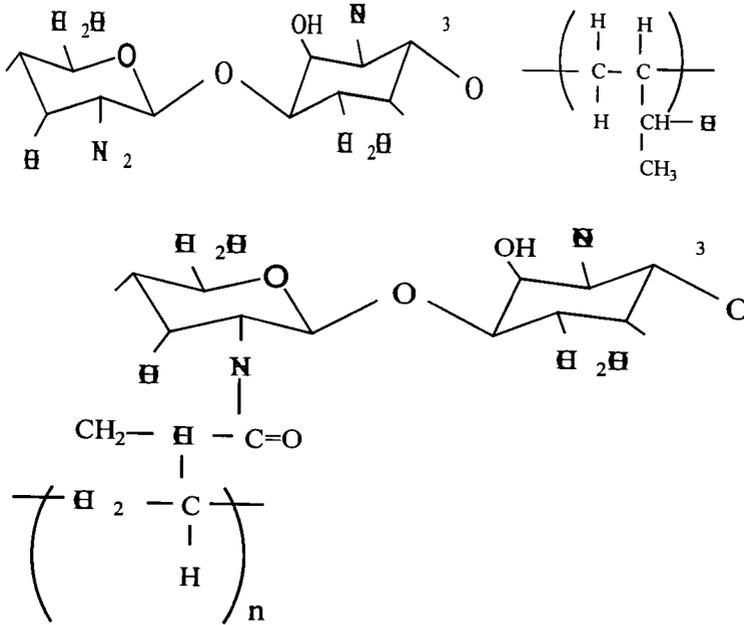
Dengan radiasi sinar gamma, radikal bebas yang terbentuk pada polietilen akan terbentuk lebih cepat, minimnya kontaminasi zat kimia pada polimer induk, dan metode ini dapat digunakan untuk polimer berbentuk film/membran. Radikal yang terbentuk diharapkan akan menginisiasi reaksi polimerisasi grafting asam akrilat pada polietilen. Polietilen yang telah tergrafting dengan asam akrilat kemudian direaksikan dengan kitosan melalui pembentukan amida antara gugus karboksil dari asam akrilat dengan gugus amina dari kitosan.



Gambar6.11. Grafting antara PE dengan Asam Akrilat dengan Menggunakan radiasi sinar gamma.

Persen pengikatan kitosan akan meningkat dengan semakin tingginya konsentrasi kitosan. Konsentrasi kitosan menunjukkan difusibilitas kitosan atau kemampuan kitosan untuk berdifusi ke dalam matriks polimer. Semakin tinggi konsentrasi kitosan berarti semakin besar kemampuan kitosan dapat berdifusi ke dalam matriks polietilen. Kitosan dapat berikatan dengan polietilen dengan memanfaatkan gugus karboksil dari asam akrilat yang telah tergrafting dalam polietilen, kemudian gugus ini berikatan dengan gugus amina dari kitosan dan membentuk amida. Konsentrasi pengikatan optimum dihasilkan pada konsentrasi kitosan 5 % (w/v) yaitu sebesar 28,3 % (Hendri dkk 2008).

Mekanisme reaksi pengikatan kitosan pada polietilen film yang terlebih dahulu digrafting dengan asam akrilat yang mungkin terjadi adalah sebagai berikut:



Pembentukan polietilen-asam akrilat- kitosan (PE-AA-kitosan).

Daftar Pustaka

- Abbas I.H. 2006, Biological and Biochemical Studies of *Actinomyces* Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait, *Journal of Applied Science Research*, 2(10): 809-815 INSInet Publiation
- Adamson, A.W. 1990. *Physical Chemisry of Surface*. 5th edition.
- Agusnar,H. 2006. Penggunaan Kitosan Sebagai Bahan Penyalut Fiber Glass Dan Filter Paper Untuk Penyerap Logan Ni Dan Cr Dengan system Aquatic. Disertasi. USU. Medan
- Amr Elhag A., Yoshida M., Hendri, J., Hiroki A., Maekawa Y., Kume T., Katakai R., and Elsayed A. H., 2000, Preparation and Characteristic of Chitosan-Containing Gels by g-Irradiation, *Takasaki Symposium on Radiation Processing of Natural Polymers*, Takasaki, Gunma, Japan, October 23-24.
- Amr Elhag A., Elsayed A. H., Hendri, J., Hiroki A., Katakai R., Maekawa Y., Kume T., and Yoshida M., 2000, Effect of Crossliked Chitosan on The Properties of Acrylic Acid Gels Prepared by Radiation-Induced Polymerization and Self-Bridging, *Autumn Meeting of the Society of Fiber Science and Technology*, Japan, Kiryu, (Gunma), October 5-6,
- Anonim. 2010. Lampung Dalam Angka, *Biro Pusat Statistik Daerah Propinsi Lampung*.
- Aspita Laila, Ipung Miranti Sari, Hendri J., 2010 "Studi Degradasi Kitosan Dengan Bantuan Enzim Lisozim Menjadi Glukosamin Dan Analisisnya Dengan Ftir Dan Hplc" Prosiding : Seminar Nasional Sains & Teknologi - III, Lembaga Penelitian - Universitas Lampung, 18 - 19 Oktober 2010

- Aspita Laila, Aida Fetra, Irwan Ginting S., Hendri J., 2007 "Peningkatan Stabilitas Enzim Amilase Melalui Amobilisasi Pada Polimer Kitosan" Jurnal Sains MIPA Vol. 13 No. 2, (Edisi Khusus).
- Aspita Laila, Irwan Ginting S. Hendri J., 2007 "Teknologi Dan Aplikasi Kitin Dan Kitosan" Suatu Seri Monograf Analisis dan Karakterisasi Senyawa Kimia, Jurusan Kimia FMIPA Unila,
- Austin, P.R. Reed, G.A., 1995. *Chemistry of Chitin isolates*. College of Marine Studies. University of Delaware. New York.
- Austin, T. George. 1984. "Shreve's Chemical Process Industries". Fifth Edition. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Bastaman. 1989. *Studies on Degradation and Extraction of Chitin and Chitosan from prawn Shells*. The Queen's University of Belfast England.
- Cabib, E. 1987. *The Synthesis and Degradation of Chitin*. Dalam A. Meister (Ed) *Carbohydrates, Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. Vol. 7.
- Cahyaningrum, S.E. 2001. Karakteristik Adsorpsi Ni (II) dan Cd(II) pada Kitosan dan Kitosan Sulfat dari Cangkang Udang Windu (*Penaeus monodon*). Tesis. Program Pasca Sarjana. UGM
- Chahal, P.S., D.S. Chahal, and G.B.B. Lee. 1996. Production of Cellulase in Solid State Fermentation with *Trichoderma reesi* MCG80 on Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 57-58: 433-441.
- Christova, Darinka. 2003. Glutaraldehyde-crosslinked poly (glycidol-block-ethylen-block-glycidol) networks with temperature responsive swelling behaviour. *Journal of Polimers*. Bulgaria.
- Clark, J. 2007. *Kromatografi Cair kinerja Tinggi (HPLC)*. [<http://www.Chem-is-try.org>] diakses pada tanggal 10 September 2011.
- Desi Indriani. 2003. Perbandingan komposisi Kulit Udang dan komposisi Kulit Kepiting dalam Pembuatan N-Asetilglukosamin secara enzimatik (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Dinter, S., U. Bunger, and E. Siefert. 2000. Enzymatic Degradation of Chitin by Microorganisms. In: *Advances in Chitin Science*. Peter, M.G. and R.A.A. Muzzarelli. 2000. University of Potsdam Druckhaus Schmergow. Germany.
- Firman, H. (1991). *Penilaian Hasil Belajar dalam Pengajaran Kimia*. Bandung : Jurusan Kimia FPMIPA IKIP.
- Florkin, M and Stratz, E.H. 1963. *Comprehensive Biochemistry, Elsevier Publishing company*. London. Vol 5 : 256-270.
- Gadgoli, C. 2006. *Spectrophotometric Method for Determination of Glucosamine in Tablets*. Saraswathi Vidya Bhavan's College of Pharmacy. Sonarpada. Dombivli (East)-421 201.
- Gijzen, M., K. Kuflu, D. Qutob, and J.T. Chernys. 2001. A Class I Chitinase from Soybean Seed Coat. *Journal of Experimental Botany*. 52: 2283-2289.
- Guinesi Luciana Simionatto, Cavalheiro Eder Tadeu Gomes, 2006., The Use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples., *Thermochemica Acta* 444, 128-133
- Gritter, R.J., J. M. Bobbitt, and A.E. Schwarting. 1991. *Intoduction to Chromatography*. Halden Day Inc Oakland. USA.
- Gupta, K.C., Ravi Kumar. 2000. Preparation, Characterization and Release Profile of Chitosan Beads. *Journal of Polimer International*. India.
- Harman, G. E., C.K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic Enzyme of *Trichoderma hazianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. *Phytopathology* .Vol.83.
- Haryanto, T. 1995. Deasetilasi Kitin dari Cangkang Kepiting Bakau Menjadi Kitosan. *Skripsi*. Unila
- Hegazy, E.A., Abdel-Rehim, H.A., Kamal, H. and Kandeel, K.A. 2001. Advances in Radiation Grafting. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*.185: 235-240.
- Hendri J. Rahmawati dan Aspita Laila., 2010, "Kemampuan Kitosan Dalam Mengadsorpsi Ion Logam Timbal (Pb²⁺) Dan Kadmium (Cd²⁺)" Prosiding : Seminar Nasional Sains & Teknologi - III, Lembaga Penelitian - Universitas Lampung, 18 - 19 Oktober 2010

- Hendri J., Aspita Laila, Irwan Ginting Suka, and Wasinton S., 2008 Characteristic of Acrylic Acid Grafted Polytehelene Film Prepared By Gamma Irradiation Method Dimuat dalam Indonesia Journal Of Chemistry, Vol. 8, No. 1 March 2008
- Hendri J, Desi Indriani, Aspita Laila, Irwan Ginting Suka., 2007 "Pembuatan-Asetilglukosamin Secara Enzimatik Dari Kulit Udang dan Kepiting" Jurnal Ilmiah MIPA(JIM) Vol. 10, NO. 2,
- Hendri J., Wardana, Aspita Laila, Irwan Ginting, S, 2007, "Penentuan Kadar Ca Dan Mg Pada Hasil Demineralisasi Optimum Kulit Udang Windu Gravimetri Dan Spektroskopi Serapan Atom Dimuat" dalam Jurnal Sains MIPA, Vol. 13 No. 2, (Edisi Khusus), Vol. 13 No.2.
- Hendri J., 2007 "Karakterisasi Analisis Kandungan Senyawa Kitin" Suatu Seri Monograf Analisis dan Karakterisasi Senyawa Kimia, Jurusan Kimia FMIPA Unila,
- Hendri J., 2005 "Teknik Pengolahan Limbah Kulit Dan Kepala Udang" Suatu Seri Monograf Permasalahan Dan Pengelolaan Lingkungan Hidup. Provinsi Lampung, Pusat Penelitian Lingkungan, Lambaga Penelitian Unila, September 2005,
- Hirano, S. 1986. *Chitin and Chitosan*. Ulaman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Republic of Germany.
- Holker, U., M. Hofer, and J. Lenz. 2004. Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid State Fermentation with Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:175-186.
- Hourston, D.J. and Reading M. 2006., *Modulated Temperature Differntial Scanning Colorimetry, Theoretical and Practical in Polymer Characterization*, Springer.
- Hsu, C.P. S. 1994. *Infrared Spectroscopy*. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Hlm. 123-126.
- Hu, S.G., Jou, C.H., Yang, M.C. 2002. Surface grafting of polyester fiber with chitosan and antibacterial activity of pathogenic bacteria. *J. Appl. Polym. Sci.* 86: 2977-2983.
- Irwan, G. S. 2005. Pengaruh Distribusi Rantai Grafting Terhadap Sifat Kepekaan pH Dari Polietilen Tergrafting Dengan Asam Metakrilat *J. Sains Tek.* FMIPA Unila, 11(3): 167-172.

- Jacyno, M. and T. Cary. 2004. *New High Sensitivity HPLC Assay For Glucosamine Using ELSD*. <http://www.dongmyung.co.kr>. Diakses pada 22 Januari 2012.
- Judoamidjojo, M, Darwis dan Said, G. Endang. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Knorr, D. 1982. Functional Property of Chitin and Chitosan. *Journal Food Science* 40 (298).
- Knorr, D. 1984. *Use of Chitinous Polymer in Food*, Food Technology 38 (1) : 85.
- Kubota, H. 1992. Catalytic Activity of 4-Vinylimidazole-Grafted Polyethylene: Effect of Method of Introduction of Grafted Chains by Means of Photografting. *Eur. Polym. J.* 3: 267-270.
- Lehninger, Albert. 1994. *Dasar-dasar Biokimia* Jilid 3. Erlangga.
- Maggy, L.T. 1990. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Martin, C.W. 2004. *Glucosamine : Review of Its Effectiveness in Treating Knee Osteoarthritis*. Workers' Compensation Board of BC.
- Martinou, A., D. Kafetzopoulos dan V. Bouriotis, 1995. Chitin Deacetylation by Enzymatic Means:
- Massey, Alan. G. 1990. *Main Group Chemistry*. Ellis Horwood. Ltd. West Sussex.
- Mitchel, D., N. Krieger, and M. Berovic. 2006. *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Monitoring of Deacetylation Processes. *Carbohydr. Res.*, 273:235-242
- Montgomery, Rex, Thomas W. Conway, Arthur. A. Spector. 1993. *Biokimia: Berorientasi Pada kasus Klinik*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Mugianto Puji, 2012, Uji Efektivitas Fermentasi Kitin Secara Bertahap Dengan Isolat *Actinomyces Anl-4* Dan *Mucor Miehei* Untuk Pembuatan Glukosamin (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Murray, T. Athonsen, and Sandford. 2003. Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science*, London.

- Masrurah, Umi. 2003. *Amobilisasi Enzim α -amylase dengan Pendukung Polimer Kitin*(Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Muzarelli, R.A.A. 1984a. *Chitin*. Pergamon, Oxford.
- Muzarelli, R.A.A. 1984b. *New Derivates of Chitin and Chitosan: Properties and Aplication*. European Chitin Society. Grottamare.
- Nurhasanah. 2003. Deproteinasi Polimer Kitin Dari Kulit Rajungan (*Portunus Pelagious*) Menggunakan *Pseudomonas Aeruginosa* Dan Deasetilasi Polimer Kitin(Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Oscik, J. 1982. Adsorption. John Wiley & Sons. New York.
- Onishi, M., Kuroda, S., Kubota, H. 2000. Methods, Characterization, and Application of Grafting. *J. M. S-Pure Appl. Chem.* 37 (7) : 807
- Pareira, B. M. 2004. *Limbah Cangkang Udang menjadi Kitosan*. <http://www.Chem-is-try.org>. Diakses pada 15 Januari 2012.
- Patil, R.S., V. Ghormade, and M.V. Deshpande. 2000. Chitinolytic Enzymes Exploration, Enzyme and Microbiol. *Technology*. Vol. 26.
- Peter, Martin G. 1995. *Application and Environmental Aspect of Chitin and Chitosan*. Journal of Pure and Appl. Chem. Vol. VII.
- Poedjadi, Anna. 1994. *Dasar – dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Pratiwi Desy 2003, Studi Adsorpsi Asam Amino *Glisin*($C_2H_5NO_2$) DAN *Lisin Mono Hidroklorida* ($C_6H_{15}ClN_2O_2$) Menggunakan Polimer Kitosan(Skripsi). Unila. Bandar Lampung.
- Pujaningsih, R. 2005. *Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pakan*. Laboratorium Teknologi Makanan Ternak Fakultas Peternakan UNDIP. Semarang.
- Rabea, E.E., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smaghe, G., and Steurbout, W. 2003. " Chitosan as Antimicrobial agent: Applications and Mode of Action", *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Rao, K. 2009. *Fermentation Biotechnology*. <http://www.fbae.org>. Diakses pada 11 Oktober 2011. 14.00 WIB.

- Rao, N. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UI press. Jakarta.
- Ratledge, Collin. 1993. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers.
- Rumapea Siti Oktavia, 2012, Uji Efektivitas Fermentasi Kitin Bertahap Menggunakan *Mucor Miehei* Dan *Actinomyces Anl-4* Untuk Pembuatan Glukosamin (Skripsi). Unila. Bandar Lampung.
- Sari, I. M. 2010. *Pembuatan Glukosamin dari Kitosan Dengan Bantuan Enzim Lisozim* (Skripsi). Unila. Bandar Lampung.
- Sadava, Purves. 2003. *Life The Science of Biology Seventh Edition*, Taylor and Francis Group LLC. USA.
- Schlegel, Hans G. 1995. Mikrobiologi Umum. Edisi keenam. Dikerjakan kembali dengan bantuan K. Schmidt. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. (Penerjemah: T. Baskoro, Penyunting: J. R. Wattimena).
- Schomburg and Salzman. 1991. *Enzyme Handbook 4 (Hidrolase)*. Springer-Verlag.
- Shimahara, Kenzo, and Takiguchi, Y. 1988. *Methods Enzymol.* 161, 417.
- Shimahara, Kenzo, Kazuhiro and Masahiko Ikeda. 1982. *A New Isolation Method of Crustacean Chitin Using a Protolytic Bacterium Pseudomonas Maltophilia on Proceedings of The Second International Conference of Chitin and Chitosan*. Tokyo.
- Silverstein, R.M., G.C. Bassler dan T.C. Morrill. 1986. *Penyelidikan Spektrometri Senyawa Organik*. Edisi Keempat. Alih bahasa A.J. Hartono dan Purba A.V. Erlangga. Jakarta. Hlm. 17-33.
- Soim. 1994. *Pembesaran Kepiting*. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta.
- Suryanto, D., E.M. dan Yurnaliza. 2005. *Eksplorasi Bakteri Kitinolitik : Keragaman Genetik Gen Penyandi Kitinase Pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya* (Tesis). USU.
- Sukma Diana 2003, Amobilisasi Enzim *Protease* Dengan Bahan Pendukung Polimer Kitosan (Skripsi). Unila. Bandar Lampung.

- Sutrisna, S. 2011. Pembuatan Glukosamin Dari Kitosan Tulang Rawan Cumi-Cumi (*Loligo Pealii*) Dengan Bantuan Enzim Lisozim. Skripsi.Unila.
- Suyanto, S.R dan Mujiman, A. 2001. Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tata, S. J., Beintema, J. J., dan Balabaskaran, S. 1983. *The Lisozime of Havea Brasiliensis Latex : Isolation, Purification, Enzyme Kinetic, and Partial Amino Acid Sequences*. J. Rubbris Ins. Malaysia. Hlm. 307-313.
- Tortora, G., B. Funke, and C. Case. 2001. *Microbiology: An Introduction*. 7th Edition. Benjamin Cummings.
- Tsigos, I. and V. Bouritis. 1995. Purification and Characterization of Chitin deacetylase from *Colletotrium Lindemuthianum*. *Journal Biology Chemistry*. Vol. 270.
- Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos dan V. Bouriotis, 2000. *Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology*. TIBTECH, 18:305-312
- Tyrre, S. Young, Jr and Kerro Knox. 1961. *Text Book of Inorganic Chemistry*. Macmillian.Co. New York
- Virdiana, E. 1994. Amobilisasi Glukosa Isomerase Dengan Kitin Kulit Kepiting. Skripsi. Unila.
- Wang, S.L., Chio, S.H., and Chang, W.T. 1997. *Chitin*. Proc. Natl Sci Counc ROC(B). 21,17.
- Wang. 1979. *Fermentation and Enzyme Tecnology*. John Willey and Sons, New York.
- Winarno, F. 1995. *Enzim Pangan*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1981. *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Penerbit ITB. Bandung.
- Yisong, W.Li and T.Yu. 1990. Crosslinking Chitosan Membranes for Pervaporation of Alcohol-Water Mixtures. China.

Glosarium

- Actinomycetes*** : Mikroorganisme peralihan antara Bakteri dan Jamur
- Adsorpsi** : penyerapan partikel atau ion atau senyawa lain pada permukaan *partikel koloid* yang disebabkan oleh luasnya permukaan partikel.
- Aerosol** : butiran halus cairan yang tersebar secara merata diudara
- Aktinida** : kelompok unsur kimia yang mencakup 15 unsur antara aktinium dan lawrensium pada tabel periodik, dengan nomor atom antara 89 sampai dengan 103.**Akuades** : air hasil destilasi atau penyulingan.
- Alginat** : polimer linier organik polisakarida yang terdiri dari monomer α -L asam guluronat (G) dan β -D asam manuronat (M), atau dapat berupa kombinasi dari kedua monomer tersebut.
- Amilase** : enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana

- Amobilisasi enzim** : proses dimana pergerakan molekul enzim dalam ruang tempat reaksi ditahan sedemikian rupa sehingga terbentuk sistem enzim yang aktif dan tidak larut dalam air.
- Analit** : komponen dari larutan sampel yang hendak ditetapkan kuantitasnya
- Anion** : Ion bermuatan negatif, yang menangkap satu atau lebih elektron
- Annelida** : kelompok cacing dengan tubuh bersegmen.
- Antibiotik** : golongan senyawa, baik alami maupun sintetik, yang mempunyai efek menekan atau menghentikan suatu proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh bakteri.
- Arthropoda** : hewan yang mempunyai kaki bersendi-sendi (beruas-ruas)
- Asam amino** : suatu asam organik yang mengandung paling sedikit satu gugusan amino ($-NH_2$) dan paling sedikit satu gugusan karboksilat ($-COOH$) atau turunannya.
- Astakantin** : pigmen karotenoid berwarna merah, yang secara alami terdapat pada alga
- Bacidiomycetes** : kelompok jamur yang menghasilkan spora seksualnya, basidiospora, pada basidium.
- Bakteri** : mikroorganisme prokariotik uniselular, berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel.
- Batch** : fermentasi tertutup dimana setelah inokulasi tidak dilakukan lagi penambahan medium kedalam *fermentor*, kecuali pemberian oksigen (udara steril), antibiuh dan asam atau basa yang mengatur pH.

Biokimia	: Ilmu Kimia yang mempelajari reaksi kimia yang terjadi dalam makhluk hidup.
Bioteknologi	: penggunaan organism yang dimodifikasi secara genetic atau teknik atau proses modern dengan system biologi untuk produksi berskala industri.
Coelentrata	: hewan yang memiliki rongga di dalam tubuhnya yang sekaligus berfungsi sebagai organ pencernaan makanan.
Crustacea	: hewan yang memiliki anggota badan bersendi-sendi
Cumi-Cumi	:
Continue batch	: fermentasi dimana secara terus menerus dilakukan penambahan medium kultur dan pengambilan produk.
Deasetilasi	: proses penghilangan gugus asetil dari kitin menjadi kitosan
Degradasi	: pembongkaran molekul-molekul yang lebih besar menjadi molekul-molekul yang lebih kecil
Demineralisasi	: proses pemisahan mineral atau senyawa anorganik yang ada pada sampel dari kitin
Depigmentasi	: proses penghilangan warna pada kitin yang terdiri atas karotenoid dan astaksantin.
Deproteinasi	: proses pemisahan protein yang ada pada sampel dari kitin.
Difusi	: peristiwa mengalirnya/berpindahannya suatu zat dalam pelarut dari bagian berkonsentrasi tinggi ke bagian yang berkonsentrasi rendah.
Dimer	: senyawa kimia yang terdiri dari dua monomer yang identik atau mirip, dan terikat bersama-sama.

- Elektroforesis** : pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik
- Emulsi** : campuran antara partikel-partikel suatu zat cair (fase terdispersi) dengan zat cair lainnya (fase pendispersi) dimana satu campuran yang terdiri dari dua bahan tak dapat bercampur, dengan satu bahan tersebar di dalam fasa yang lain.
- Endapan** : zat yang memisahkan diri sebagai suatu fase padat keluar dari larutan
- Endoenzim** : enzim yang bekerja di dalam sel.
- Enzim** : suatu katalisator protein atau dalam bentuk gabungan dengan molekul asam nukleat yang berfungsi mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologi.
- Escherichia coli*** : salah satu jenis spesies utama bakterigram negatif
- Evaporasi** : Proses penguapan sebagian dari pelarut sehingga didapatkan larutan zat cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi.
- Fermentasi** : proses yang memanfaatkan kemampuan mikroba untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan.
- Fermentor** : fermentor adalah tangki atau wadah dimana didalamnya seluruh sel (mikrobia) mengubah bahan dasar menjadi produk biokimia dengan atau tanpa produk sampingan.
- Filtrat** : substansi yg telah melewati penyaring

- Garam** : senyawa ionik yang terdiri dari ion positif (kation) dan ion negatif (anion), sehingga membentuk senyawa netral (tanpa bermuatan)
- Glikoprotein** : suatu protein yang mengandung rantai oligosakarida yang mengikat glikan[1] dengan ikatan kovalen pada rantai polipeptida bagian samping
- Glikosaminoglikan** : Polisakarida panjang tidak bercabang yang tersusun atas pengulangan unit-unit disakarida
- Glukosa** : gula sederhana (monosakarida) yang berfungsi sebagai sumber utama energi di dalam tubuh.
- Glukosamin** : monomer dari Kitosan
- Grafting** : Teknik Polimerisasi suatu monomer melalui pembentukan percabangan pada polimer
- Gugus fungsi** : kelompok gugus khusus pada atom dalam molekul, yang berperan dalam memberi karakteristik reaksi kimia pada molekul tersebut.
- Glisin** : asam amino alami paling sederhana (asam aminoetanoat)
- Heterotrof** : organisme yang membutuhkan senyawa organik dimana karbon diekstrak untuk kelangsungan hidupnya.
- Hidrolisis** : reaksi kimia yang memecah molekulair (H₂O) menjadi kationhidrogen (H⁺) dan anionhidroksida (OH⁻) melalui suatu proses kimia.
- Hifa** : berupa berkas-berkas halus yang merupakan bagian dari tubuh vegetatif berbagai fungi

- Ikatan hidrogen** : ikatan yang terbentuk karena adanya gaya tarik menarik antar atom-atom yang mempunyai keelektronegatifan yang sangat besar
- Ikatan Kovalen** : Ikatan yang terjadi akibat pemakaian bersama pasangan elektron.
- Ikatan kimia** : Gaya tarik-menarik antaratom. Ikatan kimia dibedakan menjadi ikatan ion, ikatan kovalen, ikatan kovalen polar, ikatan kovalen koordinasi, dan ikatan logam.
- Inokulasi** : memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru
- Inokulum** : campuran antara kultur mikroba dan media pertumbuhannya yang digunakan untuk memfermentasikan suatu produk.
- Insecta** : kelompok utama dari hewan beruas (Arthropoda) yang bertungkai enam (tiga pasang)
- Jamur** : tumbuhan yang tidak mempunyai klorofil sehingga bersifat heterotrof
- Karotenoid** : Pigmenorganik yang ditemukan dalam kloroplas, kromoplas, tumbuhan dan kelompok organisme lainnya seperti alga, sejumlah bakteri dan beberapa fungi.
- Kepiting** : Anggota krustaseaberkaki sepuluh yang dikenal mempunyai "ekor" yang sangat pendek atau yang perutnya (abdomen) tersembunyi di bawah dada (thorax).
- Kitin** : Polisakarida struktural yang digunakan untuk menyusun eksoskeleton dari artropoda (serangga, laba-laba, krustase, dan hewan-hewan lain sejenis).

- Kitinase** : Enzim yang dapat mengkatalisis reaksi degradasi (pemecahan) kitin dengan memotong ikatan glikosidik antara residu N-asetilglukosamin (monomer penyusun kitin).
- Kitosan** : Suatu polisakarida berbentuk linier yang terdiri dari monomer N-asetil glukosamin (GlcNAc) dan D-glukosamin (GlcN).
- Koagulasi** : Suatu proses yang rumit di dalam sistem koloid darah yang memicu partikel koloidal terdispersi untuk memulai proses pembekuan dan membentuk trombus.
- Konsentrasi** : Ukuran yang menggambarkan banyaknya zat di dalam suatu campuran dibagi dengan volume total campuran tersebut.
- Kromatografi** : Suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan.
- Kultivasi** : Pengolahan atau pengerjaan lahan.
- Kultur** : Pemeliharaan.
- Lantanida** : Kelompok unsur kimia yang terdiri dari 15 unsur, mulai lantanum (La) sampai lutetium (Lu) pada tabel periodik, dengan nomor atom 57 sampai 71.
- Lemak** : Senyawa yang terdiri atas unsur-unsur karbon, hidrogen, dan oksigen meliputi asam lemak, malam, sterol, vitamin-vitamin yang larut di dalam lemak, monogliserida, digliserida, fosfolipid, glikolipid, terpenoid.

- Limbah** : Buangan yang dihasilkan dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik (rumah tangga).
- Lisozim** : Enzim yang memutuskan ikatan β -1,4-glikosida antara asam-N-asetil glukosamin dengan asam-N-asetil muramat pada peptidoglikan sehingga dapat merusak dinding sel bakteri.
- Logam** : Sebuah unsur kimia yang siap membentuk ion dan memiliki ikatan logam.
- Maltosa** : Disakarida yang terbentuk dari dua unit glukosa bergabung dengan ikatan α (1,4), terbentuk dari reaksi kondensasi.
- Metabolisme** : Semua reaksi kimia yang terjadi di dalam organisme, termasuk yang terjadi di tingkat selular.
- Mineral** : Senyawa alami yang terbentuk melalui proses geologis.
- Miselium** : Hifa dapat dengan mudah dilihat dengan mata bila telah membentuk massa yang rapat dan membentuk koloni-koloni pada bagian tubuh organisme inang atau sisa-sisa organisme atau makanan.
- Mol** : Satuan dasar SI yang mengukur jumlah zat.
- Mollusca** : Hewan triploblastik selomata yang bertubuh lunak.
- Monomer** : Struktur molekul yang dapat berikatan secara kimia dengan monomer lainnya untuk menyusun molekul polimer yang panjang dan berulang-ulang.
- Non-polar** : Ikatan kovalen antara atom karbon dengan atom hidrogen yang biasanya ditemukan pada senyawa organik.

Nukleus	: Inti yang biasanya berhubungan dengan pusat dari sesuatu, tetapi juga dapat berarti.
Oligomer	: Gabungan dari monomer-monomer yang berikatan satu sama lain.
Organisme	: Kumpulan molekul-molekul yang saling memengaruhi sedemikian sehingga berfungsi secara stabil dan memiliki sifat hidup.
Parasit	: <i>Hewan renik yang dapat menurunkan produktivitas hewan yang ditumpanginya.</i>
Pati atau amilum	: Karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air, berwujud bubuk putih, tawar dan tidak berbau.
pH	: Derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan.
Pigmen	: Zat yang mengubah warnacahaya tampak sebagai akibat proses absorpsi selektif terhadap panjang gelombang pada kisaran tertentu.
Polimer	: Substansi yang terdiri dari molekul-molekul yang menyertakan rangkaian satu atau lebih dari satu unit monomer.
Prokariotik	: Makhluk hidup yang tidak memiliki membran inti sel.
Protein	: Kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomerasam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida.
Ragi	: Zat yang menyebabkan fermentasi.
Residu	: Bagian yang mengendap dan tidak larut dalam suatu larutan.

- Rumus empiris** : Suatu senyawa kimia adalah ekspresi sederhana jumlah relatif setiap jenis atom (unsur kimia) yang dikandungnya.
- Reaksi Eksoterm** : adalah reaksi yang disertai dengan perpindahan kalor dari lingkungan ke sistem (kalor diserap oleh sistem dari lingkungannya)
- Reaksi Endoterm** : adalah reaksi yang disertai dengan perpindahan kalor dari sistem ke lingkungan (kalor dibebaskan oleh sistem ke lingkungannya)
- Sampel** : Bagian dari populasi yang ingin diteliti; dipandang sebagai suatu pendugaan terhadap populasi, namun bukan populasi itu sendiri.
- Sekresi** : Proses untuk membuat dan melepaskan substansi kimiawi dalam bentuk lendir yang dilakukan oleh seltubuh dan kelenjar.
- Sel** : Kumpulan materi paling sederhana yang dapat hidup dan merupakan unit penyusun semua makhluk hidup.
- Selulosa** : Senyawa organik dengan rumus $(C_6H_{10}O_5)_n$, sebuah polisakarida yang terdiri dari rantai linier dari beberapa ratus hingga lebih dari sepuluh ribu ikatan $\beta(1 \rightarrow 4)$ unit D-glukosa.
- Senyawa kimia** : Zat kimia murni yang terdiri dari dua atau beberapa unsur yang dapat dipecah-pecah lagi menjadi unsur-unsur pembentuknya dengan reaksi kimia tersebut.
- Senyawa kompleks** : Molekul atau entitas yang terbentuk dari penggabungan ligan dan ionlogam.
- Senyawa Anorganik** : senyawa pada alam yang pada umumnya menyusun material / benda tak hidup.

- Sokletasi** : Suatu metode / proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang ulang dengan menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terisolasi.
- Spora** : Satu atau beberapa sel (bisa haploid ataupun diploid) yang terbungkus oleh lapisan pelindung.
- Sporangiofor** : Hifa yang tumbuh menjulang yang berfungsi mendukung sporangium.
- Substrat** : Molekulorganik yang telah berada dalam kondisi siap/segera bereaksi, karena telah mengandung promoter.
- Suhu** : Derajat panas benda.
- Sumber daya alam** : Segala sesuatu yang muncul secara alami yang dapat digunakan untuk pemenuhan kebutuhan manusia pada umumnya.
- Titik didih** : Suhu (temperatur) dimana tekanan uap sebuah zat cair sama dengan tekanan external yang dialami oleh cairan.
- Titik Isoelektrik** : Derajat keasaman atau pH ketika suatu makromolekul bermuatan nol akibat bertambahnya proton atau kehilangan muatan oleh reaksi asam-basa.
- Titik leleh** : Suhu di mana benda padat akan berubah wujud menjadi benda cair.
- Udang** : Binatang yang hidup di perairan, khususnya sungai, laut, atau danau.
- Unsur** : Zat kimia yang tidak dapat dibagi lagi menjadi zat yang lebih kecil, atau tidak dapat diubah menjadi zat kimia lain dengan menggunakan metode kimia biasa.
- Viskometer** : Alat yang digunakan untuk mengukur kekentalan suatu larutan.

Viskositas

: Pengukuran dari ketahanan fluida yang diubah baik dengan tekanan maupun tegangan.

Zygomycetes

: Tumbuhan jamur yang terdiri dari benang-benang hifa yang bersekat, tetapi ada pula yang tidak bersekat.

Tentang Penulis



Prof. Dr. John Hendri, M.S. saat ini merupakan staf pengajar Jurusan Kimia Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung sejak tahun 1987 sampai sekarang. Penulis menamatkan pendidikan Sekolah Menengah Atas pada tahun 1977 di Kota Batu Sangkar Sumatera Barat, kemudian melanjutkan kuliah pada tahun 1979 di Jurusan Kimia di FIPIA Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat dan menyelesaikannya pada tahun 1985. Pada tahun 1986 penulis melanjutkan kuliah Strata 2 pada Jurusan Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung dan menyelesaikannya pada tahun 1989. Pada tahun 1998 penulis melanjutkan studi strata-3 di Department of Chemistry dalam bidang Polymer Science di Faculty of Engginering, Gunma University, Jepang dan menyelesaikan Phylosophi of Doctoral pada tahn 2001.

Sejak mulai aktif sebagai staf pengajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, penulis aktif dalam kegiatan organisasi, penelitian dan reviewer berbagai program di DIKTI dan Ristek. Pada tahun 2001 - 2010, penulis diberi amanah sebagai Ketua Lembaga Penelitian, Unniversitas Lampung.

Pada bidang penelitian penulis juga aktif melakukan penelitian yang didanai oleh DIKTI Kemendikbud, Kementerian RISTEK, Kementerian ESDM, Kementerian Kelautan dan Perikanan dan Kementerian Pertanian Republik Indonesia,

ISBN : 978-979-8510-60-1



9 789798510601