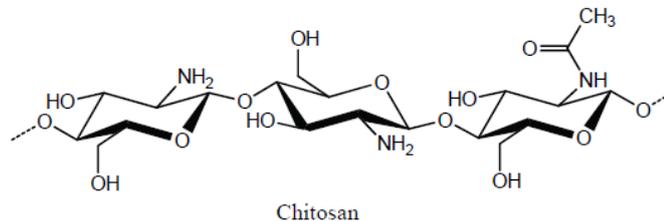


2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kitosan

Kitosan dapat disintesis dari kulit udang dan cangkang binatang invertebrata lainnya seperti kepiting, rajungan, dan lain sebagainya. Kulit udang yang mengandung senyawa kimia kitin dan kitosan merupakan limbah yang mudah didapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak, yang belum dimanfaatkan secara optimal. Kitosan merupakan modifikasi dari senyawa kitin yang banyak terdapat pada kulit luar hewan yang tergolong dari crustacea. Seperti udang, kepiting. Kitosan merupakan turunan dengan struktur kimia poli(2-amino-2-dioksi- β -D-Glukosa). Untuk membedakan polimer kitin dan kitosan berdasarkan kandungan nitrogennya. Polimer kitin mempunyai kandungan nitrogen kurang dari 7% dan kitosan bila mempunyai kandungan nitrogen lebih dari 7% (Mahatmanti, *et al.* 2010). Untuk struktur kitosan bisa dilihat pada gambar 1.



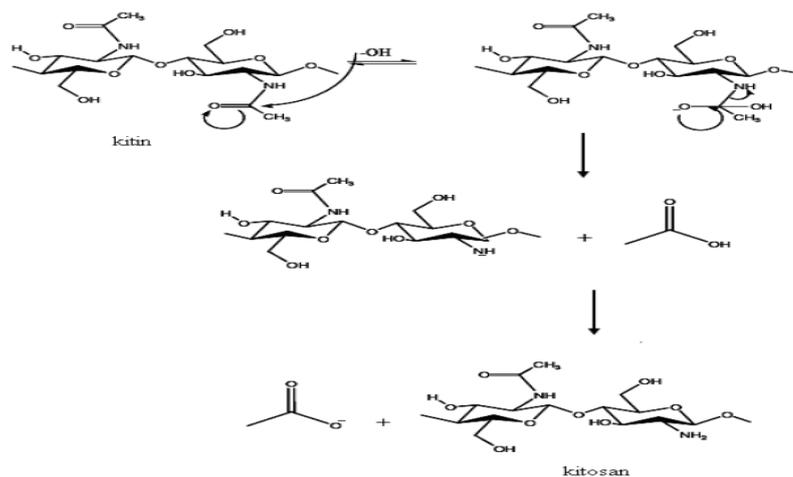
Gambar 1 struktur kitosan
Sumber: Alvarage, 2011

Kitosan merupakan produk yang bersifat kationik, non toksik, biogredible dan biokompatibel. Dengan kandungan asam amino yang lebih banyak kitosan lebih bersifat basah dan nukleofilik. Kitosan juga tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), Dimetilformamida (DMF), pelarut alcohol organik dan piridin. Namun, kitosan larut pada asam organik yang encer pada pH kurang dari 6,5. Pelarut yang baik untuk melarutkan kitosan adalah asam

format, asam asetat dan asam glutamat. Kelarutan kitosan juga dipengaruhi oleh berat molekul kitosan tersebut. (Wiyarsi, 2010)

Kitosan merupakan produk deasetilasi kitin melalui proses reaksi kimia menggunakan basa natrium hidroksida atau reaksi enzimatik menggunakan enzim kitin deacetylase. Kitosan merupakan biopolimer yang resisten terhadap tekanan mekanik. Unsur-unsur yang menyusun kitosan hampir sama dengan unsur-unsur yang menyusun kitin yaitu C, H, N, O dan unsur-unsur lainnya. Kitosan adalah turunan kitin yang diisolasi dari kulit kepiting, udang, rajungan, dan kulit serangga lainnya. Kitosan merupakan kopolimer alam berbentuk lembaran tipis, tidak berbau, terdiri dari dua jenis polimer, yaitu poli (2 – Deoksi – 2 – asetilamin – 2 - Glukosa) dan poli (2 – Deoksi – 2 - Aminoglukosa) yang berikatan beta – D (1 – 4). Kitosan tidak beracun dan mudah terbiodegradasi. Kitosan tidak larut dalam air, dalam larutan basa kuat, dalam H₂SO₄ dan dalam beberapa pelarut organik seperti alkohol dan aseton. Kitosan sedikit larut dalam HCl dan HNO₃, serta larut baik dalam asam lemah, seperti asam formiat dan asam asetat (Savitri, *et al.*2010).

Pemutusan gugus asetil dari gugus N-asetil pada kitin untuk menghasilkan kitosan disebut proses deasetilasi. Metode yang umum digunakan untuk deasetilasi kitin adalah dengan menggunakan larutan alkali panas seperti NaOH dalam waktu yang lama. Proses deasetilasi dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu: konsentrasi NaOH, temperatur reaksi dan waktu reaksi, konsentrasi NaOH yang tinggi dapat menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi yang tinggi. Proses deasetilasi yang dilakukan secara bertahap dapat meningkatkan derajat deasetilasi kitosan. Oleh karena itu, proses deasetilasi dalam penelitian ini dilakukan menggunakan NaOH 60% (b/v) pada temperatur 120 °C dan dilakukan dengan tiga tahap (Champagne, 2002). Untuk proses asetilisasi bisa dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Proses diasetilisasi kitin menjadi kitosan
 Sumber: Kurniansih dan Kartika, 2014

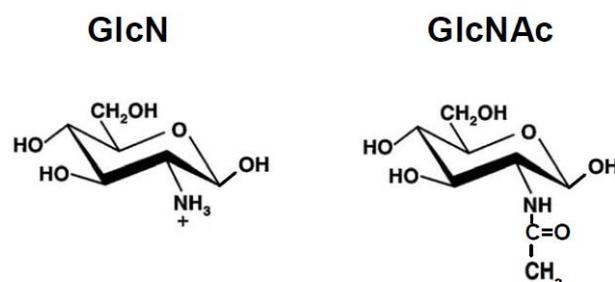
Untuk menghasilkan glukosamin ikatan kitosan dipotong lebih sederhana dalam bentuk kitosan oligomer atau kitooligosakarida yang merupakan salah satu cara untuk mendapatkan kitosan larut air. Kitooligosakarida dapat diproduksi secara enzimatik, kimiawi, maupun iradiasi. Produksi secara kimiawi dan iradiasi bersifat acak dan tidak terkontrol akan menghasilkan mayoritas glukosamin berbentuk monomer kitosan. Sedangkan untuk secara enzimatik menggunakan agen biologi seperti enzim bersifat spesifik dan terkontrol sesuai dengan spesifikasi masing-masing enzim yang digunakan. Disisi lain penggunaan enzimatik dipandang lebih aman dan ramah lingkungan (Chasanah, 2010).

2.2. Glukosamin

Glukosamin (C₆H₁₃NO₅) adalah gula mengandung amina yang diperoleh dari hasil hidrolisis kitin. Di alam, glukosamin tersebar luas sebagai komponen utama dari rangka luar Crustacea, Artropoda, dan cendawan. Glukosamin juga ditemukan di matriks tulang rawan sendi dan cairan sendi manusia, bahkan di hampir semua jaringan lunak dalam tubuh manusia, konsentrasi tertinggi di tulang rawan (Ulfa, 2016).

Hidrolisis kitosan akan menyebabkan pemutusan pada ikatan glikosidik dengan bantuan asam dapat menghasilkan kitooligosakarida dan juga monomer glukosamin (GlcN) dalam jumlah yang beragam (Cabrera dan Cutsem, 2005). Glukosamin merupakan senyawa gula amino yang banyak dimanfaatkan untuk kesehatan. Pada bentuk Glukosamin Sulfat dan Glukosamin HCl banyak dimanfaatkan untuk perawatan kesehatan tulang atau sendi yang biasa disebut osteoarthritis (Zhou, *et al.* 2005).

N-asetilglukosamin merupakan monomer dari kitin, dengan rumus molekul $C_6H_{15}NO_6$ dan mempunyai massa molekul 221,21 g/mol. N-asetilglukosamin merupakan serbuk berwarna putih yang mempunyai rasa sedikit manis, tidak berbau, dengan titik leleh $221^{\circ}C$ dan larut dalam air dengan kelarutan 25%, sedikit larut dalam metanol yang dipanaskan dan tidak larut dalam dietileter (Chen *et. al.*, 2010) Glukosamin terbagi atas 2 macam D – glukosamin dan N – asetil Glukosamin. Perbedaan antara glukosamin dan N- asetil glukosamin yaitu pada stuktur dari senyawa tersebut. Dimana pada N-asetil glukosamin memiliki gugus dari asetil sedangkan pada senyawa D - glukosamin sendiri gugus asetilnya sudah dihilangkan melalui perlakuan enzimatik atau kimia. Untuk stuktur D - Glukosamin dan N – Asetil Glukosamin dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Stuktur D - Glukosamin dan N - asetil Glukosamin
Sumber: Einbu, 2007

Glukosamin adalah salah satu zat yang dapat dihasilkan dari kitosan. Glukosamin merupakan gula amino yang berperan penting sebagai prekursor

dalam sintesis biokimia dari protein glikosilasi dan lipid (Kelly 1998). Glukosamin hidroklorida juga dikenal sebagai 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranos, hidroklorida chitosamine, dan D - glukosamin hidroklorida. Secara struktural, glukosamin adalah gula molekul amino dengan rumus kimia $C_6H_{13}NO_5$ HCl dan massa molekul 215,63 Da. glukosamin murni dalam bentuk kristal putih halus dengan titik leleh 190-194 °C. Glukosamin sangat larut dalam air, dengan kelarutan 100 mg / ml pada 20 °C (Cahyono, *et al.* 2014).

Menurut beberapa penelitian tentang glukosamin mengatakan bahwa glukosamin mampu mempengaruhi jalur sitokin yang mengatur peradangan, menghilangkan rasa nyeri, degradasi tulang rawan, dan respon imun. Glukosamin dilaporkan dapat menjadi substrat untuk sintesis kondroitin baru. Dimana kondroitin dan glukosamin merupakan senyawa penyusun tulang rawan. Selain itu glukosamin mampu merangsang produksi synovial asam hyluronat yang berfungsi sebagai media untuk melindungi dan menjaga tulang rawan. dan menghambat degradasi tulang rawan oleh enzim liposomal (Fadhila, 2016).

Glukosamin merupakan prekursor utama untuk biosintesis berbagai makromolekul seperti proteoglikan, glikosaminoglikan, glikolipid dan glikoprotein. Glukosamin sebagai makromolekul mempunyai peran dalam sintesis membrane sel, kolagen, osteroid dan tulang matrik. Glukosamin dapat diproduksi didalam tubuh tetapi seiring dengan bertambahnya usian produksi glukosamin didalam tubuh akan berkurang. Glukosamin sangat dibutuhkan dalam pembentukan cairan pelumas dan sebagai pelindung tulang dari degradasi tulang rawan (Purnomo, *et.al.*,2012).

Glukosamin merupakan gula amino dan prekursor penting dalam sintesis biokimia protein, glikosilasi dan lipid. Dalam industri, glukosamin diproduksi secara komersial oleh hidrolisis eksoskeleton krustasea atau melalui fermentasi dari biji-bijian seperti jagung atau gandum. Glukosamin adalah zat yang secara alami

memperbaiki tulang rawan. Mekanisme kerja glukosamin menghambat sintesis glikosaminoglikan dan mencegah destruksi tulang rawan. Glukosamin merangsang sel-sel tulang rawan untuk pembentukan proteoglikan dan kolagen yang merupakan protein esensial untuk memperbaiki fungsi persendian (Utami, 2012).

Glukosamin merupakan salah satu jenis suplemen yang banyak dikaji berkaitan dengan manfaatnya untuk kesehatan sendi. Glukosamin dalam bentuk klorida maupun sulfat telah dipasarkan secara luas di Kanada dan Amerika. Glukosamin juga telah banyak beredar di Indonesia pada kisaran harga Rp 2.100-3.000 per kapsul 0,5 gram. Mengingat tingginya resiko penyakit osteoarthritis di Indonesia dan harga glukosamin yang terbilang cukup mahal maka upaya memproduksi glukosamin hidroklorida dengan harga 2 terjangkau menjadi penting untuk dilakukan (Erawati, 2012).

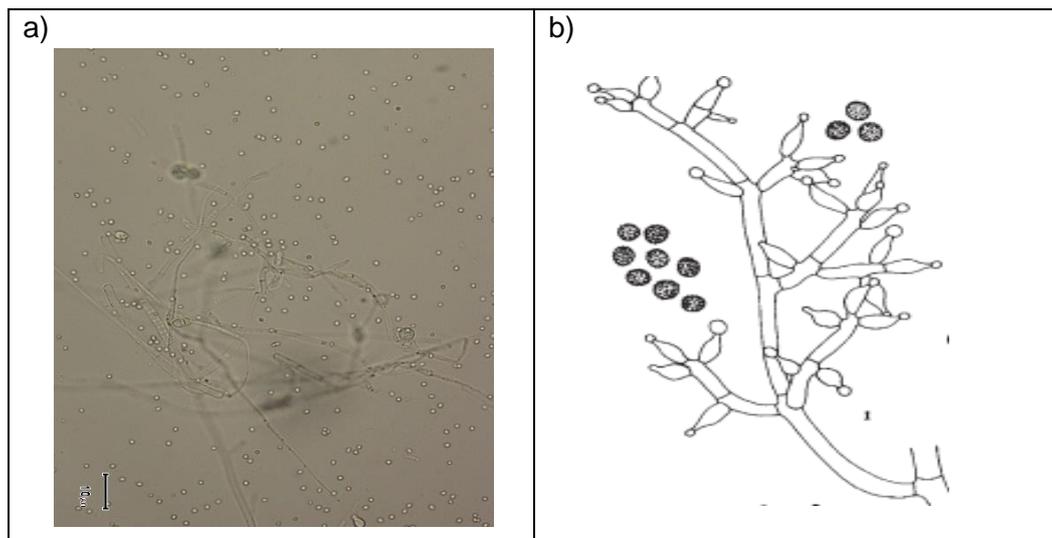
2.3. *Trichoderma viride*

Klasifikasi *trichoerma viride* menurut Alexopoulos dan Mims (1979) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: amastigomycota
Subdivisi	: Deuteromycotina
Kelas	: Deuteromycetes
Ordo	: Moniliales
Famili	: Moniliaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

Kultur kapang *Trichoderma viride* dalam skala laboratorium berwarna hijau, hal ini disebabkan oleh adanya kumpulan konidia pada ujung hifa kapang tersebut (Pelczar, *et al.* 1974). Susunan sel kapang *Trichoderma viride* bersel banyak,

berderet dan membentuk benang halus yang disebut dengan hifa. Hifa pada kapang ini berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang-cabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Miseliumnya dapat tumbuh dengan cepat dan dapat memproduksi berjuta-juta spora, karena sifatnya inilah maka kapang ini memiliki daya kompetitif yang tinggi (Alexopoulos dan Mims, 1979). Untuk hifa *Trichoderma viride* dapat diligat pada gambar 4

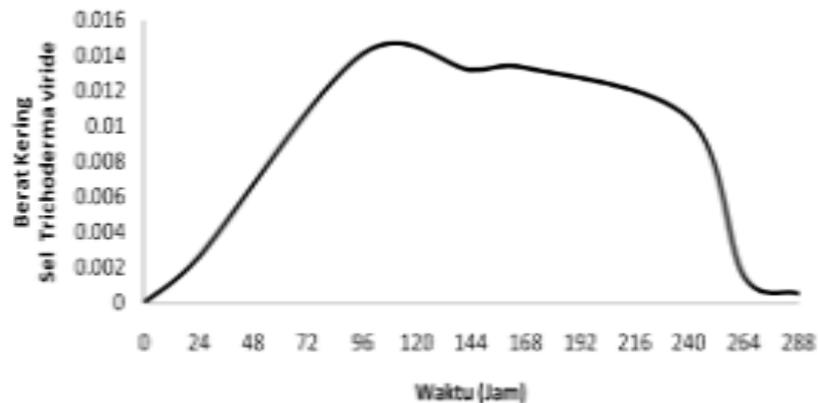


Gambar 4. a) hifa jamur *Trichoderma* yang diamati dengan mikroskop dan b) Hifa *Trichoderma viride* Kubicek dan Harman , 1998

Trichoderma viride berkembang biak secara aseksual dengan membentuk spora di ujung *filialida* atau cabang dari hifa. Reproduksi *Trichoderma viride* adalah dengan menggunakan cara mitosis dan klonal. Pertumbuhan miselia dan pigmen juga dapat dilihat pada media. Dari penelitian yang dilakukan dengan perlakuan media yang berbeda dan berbagai faktor seperti pH, suhu dan kelembaban. Pertumbuhan *Trichoderma viride* terbaik pada media sabourauin malto yeast agar (SMYA) pada waktu inkubasi selama 5 hari menghasilkan koloni berdiameter 2 cm. sedangkan fase stasioner dialami pada masa inkubasi 9 hari dan mengalami fase penurunan pada inkubasi selama 11 hari. *Trichoderma viride* tumbuh subur pada pH asam namun sebaliknya pada pH basah yang akan menghambat pertumbuhan danperkembangan miselia serta pigmentasi jamur. *Trichoderma*

viride tubuh pada suhu 20-30°C dan pertumbuhan terbaik pada suhu 28°C dengan diameter koloni jamur sebesar 2,6 cm sedangkan pH optimum adalah 6 dengan diameter koloni 3,7 cm sedangkan untuk kelembaban terbaik adalah 80% (Misrah dan Firoz, 2015).

Untuk kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* (Sarjono, et al. 2012)

Trichoderma viride, agen biokontrol yang paling menjanjikan adalah mampu mengendalikan berbagai tanaman patogen. *Trichoderma viride* adalah salah satu spesies yang paling banyak digunakan untuk melawan penyakit tanaman dan dapat meningkatkan tanaman pertumbuhan dan hasil panen. Hasil biomassa dan sporulasi dari *Trichoderma viride* tergantung pada budaya kondisi kultur, kebutuhan gizi (karbon dan sumber nitrogen, unsur-unsur mineral, Konsentrasi karbon, rasio karbon terhadap nitrogen), bersama-sama dengan faktor lingkungan termasuk potensial air, pH, siklus gelap cahaya dan suhu (Gao, 2016).

Genus *Trichoderma* menurut Herdyastuti, et al. (2009). mampu memproduksi kompleks enzim multikatalitik. *Trichoderma viride* TNJ 63 berhasil diisolasi dari tanah perkebunan jeruk dan coklat di daerah Riau dan hasil deteksi menunjukkan adanya tiga tipe kitinase. *Endokitinase* berhasil dipisahkan dari *N-asetil-β-*

glukosaminidase dan *1,4-β-kitobiosidase* melalui dialisis dan gel filtrasi setelah dipekatkan dengan polietilen glikol dan mempunyai pH dan suhu optimum berturut-turut 5,5 dan 30°C

Penelitian intensif yang menjadikan *Trichoderma* sebagai agen kontrol karena kemampuan mereka yang menghasilkan enzim untuk menghidrolisis kitosan. Enzim tersebut bisa menginfeksi jamur yang dikeluarkan oleh exoskeleton serangga. Dalam penelitian tujuannya untuk mengevaluasi kemampuan produksi kitosanase oleh perlakuan dengan menguji 4 jenis kultur *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma konnigi*, *Trichoderma polyspororum* dan *Trichoderma viride*) untuk menentukan pH, suhu serta aktivitas enzim kitosanase yang baik. dan jamur *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma viride* didapatkan pada pH 5,0 sedangkan untuk suhu optimal 60°C dan menghasilkan enzim kitosanase sebanyak 1,06 IU/gds dan 1,2 IU/gds. Sedangkan *Trichoderma konnigi* dan *Trichoderma polysporum* optimal pada pH 5,5 sedangkan perlakuan suhu optimal *Trichoderma konnigi* dan *Trichoderma polysporum* 40°C dan 60 °C dan menghasilkan enzim kitosanase 0,6 IU/gds dan 1,4 IU/gds. (Luis, *et al.* 2012).

2.1. Degradasi Kitosan

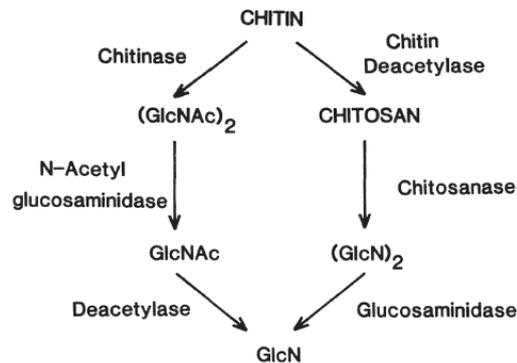
Beberapa mikroorganisme kininolitik dari berbagai sumber telah berhasil diisolasi dan dikarakteristisasi. Kitin bisa digradasi dalam 2 jalur yaitu degradasi oleh mekanisme kitinolitik yang menghidrolisis ikatan β-1,4-glikosida, dan polimer kitin mengalami deasetilasi pertama yang selanjutnya dihidrolisis oleh kitosanase. Sebagian besar mikroorganisme tanah dan air adalah pendegradasi kitin yang unggul dan beberapa mikroorganisme dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. (Halizah, *et al.* 2012).

Kitin merupakan polimer yang tidak larut air dan asam lemah, sedang kitosan adalah kitin dalam bentuk terdeasetilasi sebagian (lebih dari 50%) maupun yang 100% bebas asetil, memiliki sifat lebih baik dari kitin dalam kelarutan dan sifat fungsionalnya. Kitosan larut dalam asam lemah, dan memiliki aplikasi yang lebih luas dibanding kitin karena memiliki gugus aktif yang lebih banyak. Meskipun demikian, dengan sifatnya yang hanya larut dalam asam lemah, maka aplikasi kitosan juga memiliki keterbatasan dalam industri. Modifikasi kitosan secara kimia dengan menambah gugus hidroksil (suka air) secara kimia sehingga menjadi karboksilmetil kitosan yang bersifat larut air, menjadi salah satu strategi dalam memanfaatkan kitosan secara lebih luas (Fawzya, *et al.* 2008).

Strategi memotong kitosan menjadi potongan yang lebih pendek yang disebut kitosan oligomer atau kitooligosakarida merupakan salah satu strategi untuk mendapatkan kitosan larut air. Keuntungan lain adalah bahwa dalam bentuk potongan dengan panjang tertentu, kitosan memiliki aktivitas biologis yang lebih baik dibanding dalam bentuk polimernya. Semakin tinggi derajat deasetilasinya (semakin sedikit gugus asetil amino) maka semakin bagus aktivitas biologisnya karena gugus aktif yang dimiliki bertambah yaitu gugus positif (Chasanah, 2010).

Dalam menghasilkan glukosamin bisa dilakukan dengan dua alur yaitu mendegradasi langsung menjadi glukosamin dalam bentuk N – asetil glukosamin atau mengubah kitin menjadi kitosan terlebih dahulu. Pada produksi glukosamin secara langsung kitin akan didegradasi oleh enzim kitinase akan merombak kitin menjadi senyawa – senyawa yang lebih sederhana seperti oligosakarida, disakarida dan monosakarida. Enzim secara langsung akan mengurai kitin sehingga menghasilkan N – Asetil Glukosamin dalam bentuk disakarida ataupun oligosakarida dan terus didegradasi sampai menghasilkan N – Asetil Glukosamin dalam bentuk monosakarida. Dari N – Asetil Glukosamin dilakukan proses penghilangan gugus amina (deasetilisasi) sehingga menghasilkan glukosamin.

Jalur kedua dengan mengubah kitin menjadi kitosan dengan melewati proses deasetilisasi. Selanjutnya kitosan diurai oleh enzim kitosinase sehingga menghasilkan D – glukosaminase selanjutnya akan diurai oleh glukosaminase sehingga dihasilkan Glukosamin (Gooday, 1990). Degradasi kitosan menjadi glukosamin dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Degradasi kitin menghasilkan glukosamin

Sumber: Gooday (1990)

Proses degradasi kitin menjadi glukosamin menurut Jung, et.al. (2014)

adalah kitin didegrasi menjadi kitosan oleh enzim kitin deasetilase yang menyebabkan kitin kehilangan gugus asetilnya dan menjadi kitosan. Kitosan selanjutnya di degradasi oleh kitosinase yang akan mendegradasi kitosan menjadi oligomer dari kitosan. Selanjutnya kemudian oligomer tersebut dipotong oleh enzim β-d glukosaminidase sehingga menghasilkan monomer-monomer Glukosamin.

D – glukosamin adalah monomer kitosan dengan derajat asetilasi 100 %. Banyak secara luas sudah di kabarkan bisa digunakan dalam sebagai perlindungan terhadap hati dan aktivitas tubuh seperti dalam aplikasinya sebagai obat osteoporosis dan penyembuhan luka dengan meningkatkan sintesis asam hyaluronic dan fungsi lainnya. Chitosinase merupakan kelompok enzim hidrolitik yang mempercepat pemutusan ikatan antar molekul pada kitosan. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri *Escheria coli* dan merubah struktur kitosan kompleks

menjadi oligo glukosamin dan terus akan didegradasi sampai menghasilkan monomer dari glukosamin oleh d- glukosaminidase (Yuyin, *et al.* 2013).

2.5. Fermentasi

Fermentasi merupakan salah satu cara pengolahan melalui penguraian senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan enzim atau mikroorganisme serta berlangsung secara dalam keadaan terkontrol atau diatur. Agar fermentasi dapat berjalan dengan maksimal maka perlu di perhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi dalam fermentasi terutama pada mikroorganisme faktor yang mempengaruhi fermentasi meliputi suhu, pH, oksigen, air dan substrat yang ditambahkan (Adawiyah, 2009).

Menurut Rusmana (2008), fermentasi dibedakan menjadi dua berdasarkan cara operasinya, yaitu : Fermentasi media cair dan fermentasi semi padat. Fermentasi media cair merupakan fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinyu dari sistem pertumbuhan sel yang bersangkutan atau substrat baik sumber karbon maupun mineral terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair. Contoh produk dari fermentasi media cair, seperti etanol, pengolahan limbah cair dan sebagainya. Dan Fermentasi media padat merupakan proses fermentasi yang berlangsung dalam substrat yang tidak terlarut dan tidak mengandung air. Contoh yaitu tape, tempe, dan sebagainya.

Menurut Bhargav, *et al.* (2008), fermentasi semi padat atau (SSF) Solid-state fermentation memiliki kelebihan dari fermentasi solid-state (SSF) dari, produksi fermentasi cair. dengan menggunakan SSF sangat menguntungkan dan cocok untuk produksi banyak orang produk lebih meningkatkan produksi produk seperti enzim, antibiotik, dan asam organik. Selain itu teknik ini bisa mengurangi biaya proses namun juga membuat proses ini mudah dilakukan.

Kondisi yang optimum untuk fermentasi menurut Ton, *et al.* (2010), tergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Pengendalian faktor-faktor fermentasi sangat dibutuhkan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit suatu mikroorganisme tertentu. Faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi seperti suhu, pH, dan kebutuhan oksigen.

Menurut Melati, *et al.* (2012) Fermentasi merupakan suatu proses yang memanfaatkan mikroba untuk memperbaiki kualitas suatu bahan. Proses fermentasi relatif murah dan mudah dilakukan. Mikroba yang umum digunakan dalam fermentasi adalah *Trichoderma viride* dan *Phanerochaete chrysosporium*. *Trichoderma viride* diketahui sebagai sumber enzim selulase komersial dan dapat menginduksi enzim yang berbeda sesuai dengan substrat yang digunakan.