

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Tahap Pertama

4.1.1. Pembuatan Kitosan

Tahap pertama dalam pembuatan kitosan, cangkang udang dibersihkan lalu dijemur sampai kering. Setelah kering cangkang udang dihaluskan sehingga didapatkan tepung cangkang udang. Tepung cangkang udang selanjutnya siap diproses untuk menjadi kitosan melalui proses demineralisasi, deproteinasi dan deasetilisasi.

Rendemen merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui efektifitas suatu proses. Rendemen diperoleh dari perbandingan berat kering bahan dan berat basah bahan yang dinyatakan dalam satuan persen (%). Data rendemen akhir pada setiap tahap isolasi kitosan ditunjukkan pada Tabel 4. Untuk hasil perhitungan rendemen bisa dilihat pada Lampiran 4.

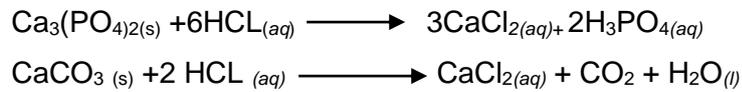
Table 4. Rendemen proses isolasi kitosan

No	Tahap Isolasi	Rata-rata \pm Std (%)	Rendemen (Agustina, <i>et al.</i> 2015) (%)
1	Pengeringan	19,80 \pm 1,05	26,45
2	Demineralisasi	3,54 \pm 0,16	12,56
3	Deproteinasi	2,79 \pm 1,12	9,72
4	Deasetilasi	2,24 \pm 0,11	6,52

Proses pembuatan kitosan diawali dengan mengeringkan cangkang udang. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam cangkang sehingga dihasilkan cangkang udang kering. Proses pengeringan dilakukan dengan menjemur cangkang udang udang dibawah sinar matahari. Rendemen hasil pengeringan sebesar 19,80 %.

Proses demineralisasi dilakukan dengan penambahan larutan HCL 1,5 M. Penambahan senyawa tersebut bertujuan untuk menghilangkan kandungan mineral pada tepung cangkang udang. Mineral yang terkandung pada cangkang

udang pada umumnya CaCO_3 dan $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$. Menurut Reaksi Kurniasih (2011), yang terjadi antara HCL dengan dengan garam mineral seperti berikut:



Rendemen dari proses demineralisasi adalah sebesar 3,54 %, berwarna coklat keputihan dan berbentuk serbuk. Rendahnya hasil rendemen ini dipengaruhi oleh kadar mineral yang terdapat pada udang, suhu pemanasan, konsentrasi pelarut, lamanya proses demineralisasi serta proses penetralan tepung cangkang udang.

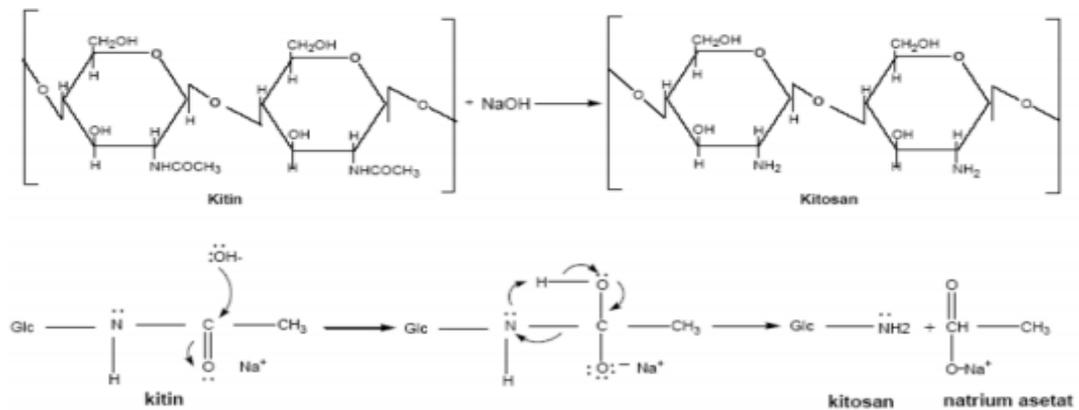
Penghilangan mineral dipengaruhi oleh proses agitasi (pengadukan) selama proses, sehingga panas yang dihasilkan menjadi homogen. Proses pengadukan yang konstan akan menyebabkan panas dapat meratas sehingga pelarut (HCl) dapat mengikat mineral secara sempurna. Jika pengadukan yang dilakukan tidak konstan maka panas yang dihasilkan tidak merata, sehingga reaksi pengikatan mineral oleh pelarut juga akan tidak sempurna (Hartati, *et al.* 2002).

Proses deproteinasi dilakukan dengan menambahkan NaOH 3,5% pada tepung cangkang udang, Tujuan penambahan NaOH adalah untuk menghilangkan kandungan protein yang terdapat pada tepung cangkang udang. Pada proses deproteinasi tepung pada cangkang udang terlihat mengental.

Hal ini serupa dengan hasil penelitian Edward (2016), Pada proses deproteinasi terjadi terbentuk sedikit gelembung pada permukaan dan tepung cangkang udang tagak mengental serta berwarna agak kemerahan. Pengentalan larutan disebabkan adanya kandungan protein pada tepung cangkang udang yang terlepas dan berikatan dengan ion Na^+ dalam larutan membentuk natrium proteinat.

Rendemen yang dihasilkan pada dari proses deproteinasi adalah 78,31 %, berwarna putih kekuningan. Tingginya rendement yang dihasilkan pada proses ini dipengaruhi oleh kandungan protein pada tepung cangkang udang, konsentrasi pelarut, suhu dan lama proses deproteinasi.

Proses deasetilasi menggunakan larutan NaOH dengan konsentrasi 60 % dengan suhu 110°C. tujuan perlakuan ini adalah untuk memutus gugus asetil pada kitin. Karena stuktur kitin pada awalnya memiliki ikatan yang kuat intramolekul antara atom hidrogen pada gugus amina dan atom oksigen pada gugus karboksil. Rendemen deasetilasi yang dihasilkan pada dari proses ini adalah 2,24 %, berwarna putih kekuningan. Tingginya rendemen yang dihasilkan pada proses ini dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut, suhu dan lama proses deproteinasi. Untuk proses perubahan dari kitin menjadi kitosan dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Proses Tranformasi kitin menjadi kitosan
Sumber: Fadli, *et al.* (2016)

Salah satu parameter penentu kualitas kitosan adalah nilai derajat deasetilasi. Semakin tinggi konsentrasi NaOH dan suhu yang digunakan semakin tinggi nilai derajat deasetilasi. Akan tetapi konsentrasi alkali dan suhu yang digunakan akan menurunkan rendemen kitosan serta menyebabkan dipolimerisasi dan degradasi dan degradasi polimer (Citrowati, *et al.* 2017).

Tinggi rendahnya rendemen disebabkan oleh suhu pengeringan yang berpengaruh terhadap rendemen semakin tinggi suhu pengeringan menyebabkan semakin berkurang kadar air serta rendemenya juga akan menurun. Menurut Yuniarti, *et.al.* (2013) semakin kecil kadar air dari suatu bahan menyebabkan penurunan bobot air dalam bahan. Apabila air hilang maka bahan akan lebih ringan sehingga akan mempengaruhi rendemen produk akhir.

4.1.2. Karakteristik Kitosan

Kitosan yang dihasilkan dikarakterisasi terhadap beberapa parameter: kadar air, kadar abu, kadar protein dan Derajat deasetilasi. Karakterisasi ini bertujuan untuk menentukan kualitas dari kitosan. Hasil karakterisasi kitosan dapat dilihat pada Tabel.5. dan untuk perhitungan dari karakteristik kitosan dapat di lihat pada lampiraan 5.

Table 5. Hasil Karakteristik Kitosan dan standar proton laboratory

No	Karakteristik	Rata rata (%)	Standar Protan Laboratory
1	Kadar air	6,09 ± 0,25	≤ 10
2	Kadar protein	4,85 ± 1,26	≤ 5
3	Kadar abu	0,75 ± 0,24	≤ 2
4	Derajat Deasetilasi	75.434%	≥ 70

Sumber: (Edward *et.al*, 2016)

4.2.1.1. Kadar Air

Kadar air pada merupakan satu indikator yang penting pada kitosan. Kitosan yang yang diisolasi tergolong bagus, kadar air yang pada kitosanyang dihasilkan adalah 6,09 ± 0,25 %. kadat air kitosan yang dihasilkan sudah memenuhi standar protan laboratory. Kadar air pada kitosan dipengaruhi oleh proses pada saat pengeringan, lama pengeringan, jumlah kitosan yang dikeringkan dan luas permukaan tempat

Besarnya kandungan air pada kitosan tidak dikehendaki dalam pemanfaatan diberbagai bidang, karena akan mempengaruhi daya tahan kitosan

terhadap serangan mikroorganisme (Rochima, *et al.* 2004). Besarnya penyusutan kadar air di menurut Adawiyah (2008), menyatakan bahwa pada proses pemanasan dimulai, uap panas yang dialirkan meliputi permukaan bahan akan menyebabkan naiknya tekanan uap air serta menimbulkan pergerakan air secara difusi dari bahan ke permukaan. Akhirnya kadar air dalam bahan berkurang serta tekanan uap air menurun sampai terjadi keseimbangan dengan udara sekitar.

4.1.2.2. Kadar Protein

Kadar protein merupakan jumlah protein yang terkandung dalam suatu bahan. Kadar protein pada kitosan $4,85 \pm 1,26$ %, kadar protein kitosan yang dihasilkan sudah memenuhi standar protan laboratory. Tinggi rendahnya kadar protein pada kitosan disebabkan oleh konsentrasi larutan yang digunakan suhu, pengadukan dan lama pemanasan pada proses deproteinasi dan deasetilasi.

Menurut No and Meyers (1995), proses untuk menghilangkan protein di cangkang hewan *Crustacea* dapat dilakukan dengan melarutkannya ke dalam larutan NaOH dengan konsentrasi 1–10% pada suhu proses antara 65–100°C selama 0,5–12 jam. Perbandingan antara cangkang yang diproses dengan larutan basa yang digunakan diperoleh nilai optimum pada 1:10 (g/mL) atau 1:15-10 (g/mL). Proses tersebut dilakukan dengan pengadukan yang cukup sehingga dapat memaksimalkan proses deproteinasi.

4.1.2.3. Kadar Abu

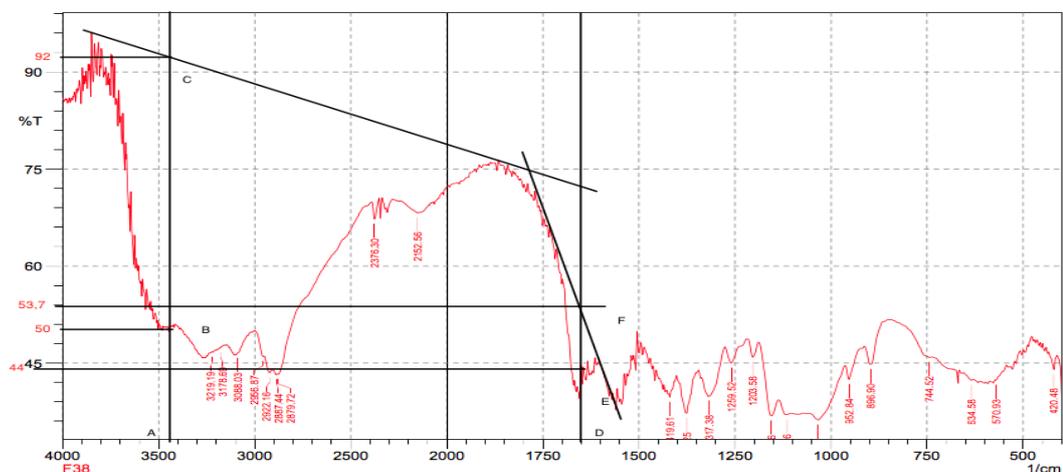
Kadar abu merupakan kandungan abu atau mineral yang terkandung dalam suatu bahan. Kadar abu pada kitosan adalah $0,75 \pm 0,24$ %. Kadar abu kitosan yang dihasilkan sudah sesuai dengan standar protan laboratory. Rendah nilai kadar abu dipengaruhi oleh kadar mineral cangkang udang yang dihilangkan pada proses demineralisasi.

Proses pencucian yang baik menurut Angka dan Suhartono (2000) juga berpengaruh terhadap kadar abu. Mineral yang telah terlepas dari bahan dan berikatan dengan pelarut dapat terbuang dan larut bersama air. Pencucian yang kurang sempurna akan mengakibatkan mineral yang telah terlepas dapat melekat kembali pada permukaan molekul kitin.

4.1.2.4. Derajat Deasetilasi

Derajat deasetilasi merupakan parameter yang menunjukkan persentase gugus asetil yang hilang dari kitin. Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan hasil derajat deasetilasi kitosan 75.434 %, Jika dibandingkan dengan standar protan laboratory hampir sama.

Proses penghilangan gugus asetil ($-\text{CH}_3\text{COO}-$) dari gugus asetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) sehingga terbentuk gugus amina ($-\text{NH}_2$), dimana gugus karbon karbonil diserang OH^- yang akibatnya terjadi reaksi adisi sehingga terbentuk zat antara. Zat antara selanjutnya mengalami reaksi eliminasi sehingga gugus asetil pada asetamida kitin terlepas. Konsentrasi basah dalam larutan akan mempengaruhi proses deasetilasi gugus asetil pada kitin (Azhar, *et al.* 2010). Hasil FTIR kitosan dapat dilihat pada gambar nomor 13. Dan perhitungan derajat deasetilasi dapat dilihat pada lampiran 5.



Gambar 13. Hasil analisa FTIR sampel kitosan

Perbedaan yang terjadi setelah tahap deasetilasi adalah tidak munculnya gugus C=O pada 1680-1660 cm^{-1} yang menandakan hilang atau telah berkurangnya gugus C=O pada kitosan, serta munculnya serapan pada 850,0 - 750,0 cm^{-1} yang merupakan vibrasi dari gugus kibasan dan pelintiran NH_2 . Spektra hasil penelitian menunjukkan tidak adanya vibrasi C=O, hal tersebut menunjukkan telah terdeasetilasi secara sempurna. Namun vibrasi lemah pada kibasan dan pelintiran NH_2 yaitu pada serapan 744.52. pada serapan khas untuk kitosan yang terdapat pada bilangan gelombang 3219.19 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan hidrogen dari gugus -OH yang tumpang tindih dengan rentangan -NH. Sedangkan untuk spektrum FT-IR, vibrasi ulur gugus NH terlihat pada 3178.69 cm^{-1} (Puspawati dan Simpen, 2010)

Tabel 6. Karakteristik kitosan pada spektra FTIR (Puspawati dan Simpen, 2010)

Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsi
3450*	OH
3335	N-H Ulur
2891,1	C-H ulur
1655*	NH_2 guntingan, N-H bengkokan
1419,5	CH_3
1072,3	C-O-C
850-750	NH_2 Pelintiran dan kibasan
715	N-H kibasan

Keterangan : * = Gelombang absorbansi yang digunakan untuk menghitung derajat deasetilasi

Pada pita serapan dengan bilangan gelombang 1655 cm^{-1} ditarik garis lurus kemudian dilakukan perpotongan sehingga didapatkan titik perpotongan yang ditandai dengan huruf F dan lembah yang ditandai dengan huruf E. Selanjutnya, pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} ditarik garis lurus dan dilakukan perpotongan pada dua puncak (peak) tertinggi yang terbentuk. Hasil perpotongan yang terbentuk ditandai dengan huruf B dan C. Kemudian ditentukan nilainya dan dilakukan perhitungan sehingga diperoleh nilai derajat deasetilasi kitin sebesar 77,75%. Hasil perhitungan derajat deasetilasi kitin dapat dilihat pada Lampiran 5.

Penentuan derajat deasetilasi menurut Saputro, *et al.* (2006) Derajat deasetilasi menyatakan persentase gugus asetil yang telah hilang dari kitin. Semakin tinggi derajat deasetilasi semakin bagus dan murni kitosan yang dihasilkan. Konsentrasi bash kuat yang tinggi dalam proses deasetilasi dapat meningkatkan derajat deasetilasi dan memecah rantai molekul pada kitosan. Akibatnya, berat molekul dan viskositas kitosan menurun dan kelarutanya meningkat.

4.1.3. Hasil Uji Kitosanolitik *Trichoderma viride*

Hasil pengujian kitosanolitik *Trichoderma viride* setelah diinkubasi selama 4 hari berupa zona ungu yang biasa dilihat pada table 6. Pengujian aktivitas kitosanolitik dilakukan dengan menggunakan metode sumuran yang merujuk kepada penelitian Angrawal dan konsthanane (2012) metode sumuran ini dilakukan dengan cara membuat lubang pada cawan petri yang sudah berisi media agar kitosan. Masing masing lubang pada media. Setelah itu di tambahkan kultur jamur dengan kepadatan $47,75 \times 10^8$, $24,75 \times 10^7$, dan 11×10^6 . Selanjutnya di inkubasi selama 4 hari. Adapun hasil perhitunga zona warna dapat dilihat pada Lampiran 6.

Table 7. Kitosanolitik *Trichoderma viride*

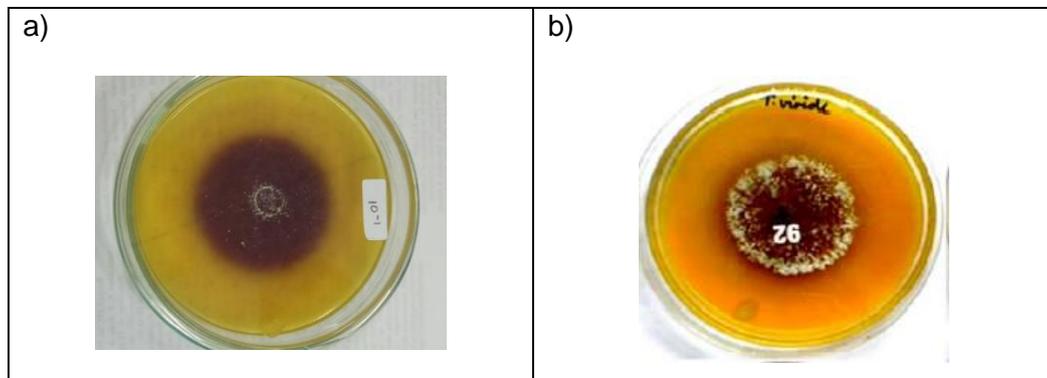
Kepadatan Spora	Diameter Zona Ungu (mm)*
$47,75 \times 10^8$	$32,3 \pm 3,42$
$24,75 \times 10^7$	$22,43 \pm 10,98$
11×10^6	$0,48 \pm 0,83$

Ket: * zona ungu merupakan hasil pengurangan diameter zona ungu dengan diameter sumuran.

Dari data diatas bahwa nilai rata rata diameter zona warna pada kepadatan 10^8 , sebesar $32,3 \pm 3,42$ mm, nilai rata rata pada kepadatan 10^7 sebesar, $22,43 \pm 10,98$ dan 10^6 sebesar $0,48 \pm 0,83$ mm. Pada pengamatan kitosanolitik pada media terdapat hifa jamur yang berwarna putih kehijauan. Hal ini sesuai dengan

penelitian Lunge, *et al.* (2012) diameter hifa yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* yang berwarna kuning pucat kehijau- hijauan.

Untuk uji kitosanolitik *Trichoderma viride* dapat dilihat pada gambar 14.



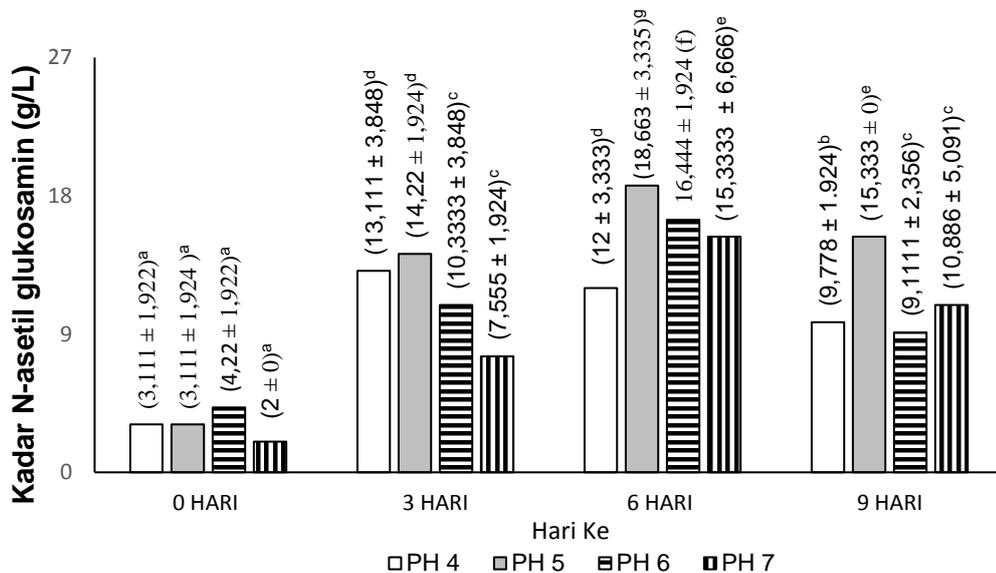
Gambar 14. Uji kitosanolitik *Trichoderma viride* a) hasil uji kitosanolitik pada penelitian dan b) hasil uji kitinolitik inkubasi 3 hari oleh Pandey, *et al.* (2014).

Zona ungu yang dihasilkan merupakan hasil degradasi kitosan oleh jamur *Trichoderma viride*. Apabila zona warna yang dihasilkan pekat dan diameternya besar maka enzim yang dimiliki oleh jamur *Trichoderma viride* semakin tinggi. Menurut Agrawal dan Kostasthane (2012), Kolloidal kitin maupun kitosan yang terdiri dari dua unit N-asetil glukosamin dan glukosamin maupun lebih yang terikat satu sama lain oleh ikatan β -1, 4 glikosidik. Kolloidal kitin atau kitosan memiliki gugus aktif aktif seperti gugus hidroksil, karbonil, dan amina akan berikatan dengan pewarna anionik seperti Bromocresol Purple membentuk warna kuning (pH 4,7) ketika ditambahkan inokulasi *Trichoderma* dalam media agar koloidal kitosan dan mendegradasi kitosan menjadi N-asetil glukosamin maupun D-glukosamin serta perubahan pH menjadi lebih alkali sehingga mengakibatkan perubahan warna Bromocresol Purple dari zona kuning menjadi ungu.

4.2. Produksi Glukosamin Tahap Awal

4.2.1. Kadar N-asetil-D-Glukosamin

Pada penelitian tahap awal dilakukan fermentasi kitosan dengan pH 4, 5, 6 dan 7 serta lama fermentasi 3, 6 dan 9 Hari. Tujuan perlakuan ini adalah untuk mendapatkan perlakuan yang terbaik yang dapat menghasilkan glukosamin. Dari hasil ANOVA, menunjukkan faktor pH, lama fermentasi, dan interaksi keduanya adalah berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar N-asetil-D-glukosamin. Hasil uji lanjut BNT 5% secara umum dapat dilihat pada Lampiran 7 dan Gambar 15. Nilai tertinggi terdapat pada pH 5 hari ke 6 dengan nilai $18,666 \pm 3,335$ g/L. sedangkan nilai terendah terjadi pada pH 7 dan lama 0 fermentasi yaitu dengan nilai $2,0 \pm 0$ g/L. Berdasarkan ANOVA yang dihasilkan interaksi keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.



Gambar 15. Kadar N-asetil glukosamin

Secara umum terjadi peningkatan kadar pada hari ke 3 hingga ke 6 mencapai titik tertinggi dan mengalami penurunan setelah fermentasi ke 9 harinya. Hal ini mungkin disebabkan oleh menurunnya pH media fermentasi yang akan mempengaruhi kerja enzim atau terjadinya denaturasi enzim sehingga menurunnya

produksi N-asetil Glukosamin. Berkurangnya produksi N-asetil glukosamin pada hari ke 9 diduga akibat akumulasi N-asetil glukosamin hasil degradasi dalam medium yang tinggi dapat menghambat produksi enzim kitosanase. Sehingga waktu produksi 6 hari dianggap sebagai waktu produksi yang terbaik jamur *Trichoderma viride*.

Menurut Wirawan, *et al.* (2013) pada saat proses hidrolisis berlangsung sebahagian kitin akan terdegradasi menjadi oligomer dan belum terdegradasi secara sempurna menjadi N-asetil glukosamin. produksi N-asetil glukosamin mengalami penurunan, hal ini kemungkinan dikarenakan denaturasi enzim yang mengakibatkan menurunnya produksi N-asetil glukosamin.

Senyawa kitooligosakarida dan N-asetil D-glukosamin hasil hidrolisis tepung cangkang udang oleh kitinase pada konsentrasi tinggi akan dapat menyebabkan inhibisi umpan balik karena kelebihan N-asetil D-glukosamin yang akan menghambat kerja enzim. Penurunan produksi N-asetil glukosamin menurut Widyastuti (2007), disebabkan oleh senyawa kitooligosakarida dan N-asetil Glukosamin hasil hidrolisis kitin oleh kitinase pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan inhibisi umpan balik karena kelebihan N-asetil glukosamin sebagai produk akhirnya. Tetapi terdapat faktor lain seperti penghambatan kitinase secara kompetitif oleh beberapa senyawa seperti alosamidin dan senyawa lain selain gula.

Selain itu menurut Muammaroh, *et al.* (2015) Enzim yang dihasilkan oleh sel bakteri dapat berperan dalam memproduksi N-asetil glukosamin yang diperoleh dari degradasi kitin. Selain itu N-asetil glukosamin yang dihasilkan juga dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan bakteri sendiri. N-asetil glukosamin yang diperoleh akan digunakan dalam metabolisme bakteri itu sendiri sehingga menghasilkan CO₂, H₂O dan NH₃.

Amoniak yang dihasilkan oleh mikroba yang menyebabkan terganggunya pertumbuhan jamur atau bakteri, jika pertumbuhan jamur terganggu maka akan menyebabkan penurunan produksi enzim dan akan berpengaruh terhadap produksi N-asetil Glukosamin dan d-glukosamin. Kecilnya produksi N-asetil glukosamin menurut Saskiwan dan handayani (2011) disebabkan oleh adanya amoniak yang dibebaskan pada media yang bersifat toksik sehingga mengagangu pertumbuhan jamur.

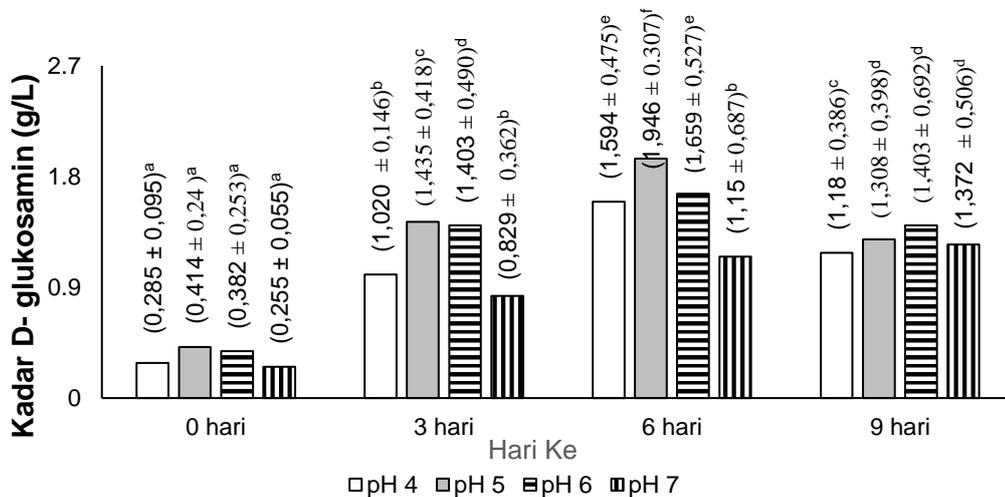
Hasil produksi N-asetil glukosamin hasil fermentasi terbaik lebih kecil jika dibandingkan dengan penelitian Alfandi 2016. N-asetil glukosamin yang dihasilkan kecil dibandingkan dari fermentasi kitin oleh *Trichoderma harzianum* N-asetil glukosamin yang dihasilkan sebesar 127 g/L.

Genus *Trichoderma* menurut Herdyastuti, *et al.* (2009) Mampu memproduksi kompleks enzim multikitinolitik. Salah satunya jenis *Trichoderma viride* TNJ 63 yang di isolasi 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 dengan filtrasi gel setelah dipekatkan dengan poli etilen glikol dan mempunyai pH dan suhu optimum 5,5 dan 30°C.

Selain itu jika di bandingkan dengan penelitian dengan kadar Wulandari (2011), dimana kadar kadar N-asetil glukosamin yang di hasilkan 2,228 $\mu\text{g/mL}$. kecilnya kadar N-asetil glukosan yang dihasilkan di karenakan saat hidrolisis berlangsung sebagian kitin hanya terhidrolisis dalam bentuk oligomer dan belum terdegradasi secara sempurna menjadi monomer (N-asetilglukosamin). perbedaan kadar glukosamin juga didapatkan disebabkan oleh jenis jamur yang digunakan, dan cara analisis N- asetil glukosamin yang berbeda.

4.2.2. D- glukosamin.

Pada penelitian tahap awal dilakukan fermentasi kitosan dengan pH 4, 5, 6 dan 7 serta lama fermentasi 3, 6 dan 9 Hari. Tujuan perlakuan ini adalah untuk mendapatkan perlakuan yang terbaik yang dapat menghasilkan glukosamin. Dari hasil ANOVA, menunjukkan faktor pH, lama fermentasi, dan interaksi keduanya adalah berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar D- glukosamin. Hasil uji lanjut BNT 5% secara umum dapat dilihat pada Lampiran 8 dan Gambar 16. Nilai tertinggi terdapat pada pH 6 hari ke 6 dengan nilai 1.945 ± 0.307 g/L. sedangkan nilai terendah terjadi pada pH 7 dan lama fermentasi 0 hari yaitu dengan nilai $0.255 \pm 0,055$ g/L. Secara umum terjadi peningkatan kadar pada hari ke 3 hingga ke 6 mencapai titik tertinggi dan penurunan yang signifikan setelahnya. Berdasarkan ANOVA yang dihasilkan interaksi keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.



Gambar 16. Kadar D-glukosamin

Secara umum terjadi peningkatan kadar pada hari ke 3 hingga ke 6 mencapai titik tertinggi dan mengalami penurunan setelah fermentasi ke 9 harinya. Hal ini mungkin disebabkan oleh menurunnya pH media fermentasi yang akan mempengaruhi kerja enzim atau terjadinya denaturasi enzim sehingga menurunnya

produksi N-asetil glukosamin. Jika dibandingkan dengan penelitian Afandi (2014) kadar D- glukosamin yang dihasilkan kecil dibandingkan dari fermentasi kitin oleh *Trichoderma harzianum* D - glukosamin yang dihasilkan sebesar 18,294 g/L.

Salain itu kadar d-glukosamin yang dihasilkan masih tergolong kecil jika di bandingkan dengan hasil penelitian Yu, *et al.* (2011) dimana produksi glukosamin maksimal menggunakan jamur *Aspergillus sp.* BCRC 31742 didapatkan sebesar 5,48 g/L. perbedaan hasil produksi glukosamin dipengaruhi oleh suhu, pH, waktu, substrat yang digunakan dan kemampuan jamur untuk menghasilkan enzim untuk mendegradasi substrat kitin maupun kitosan. Selain itu cara untuk menganalisis kandungan glukosamin juga mendai penyebab tingginya kadar glukosamin.

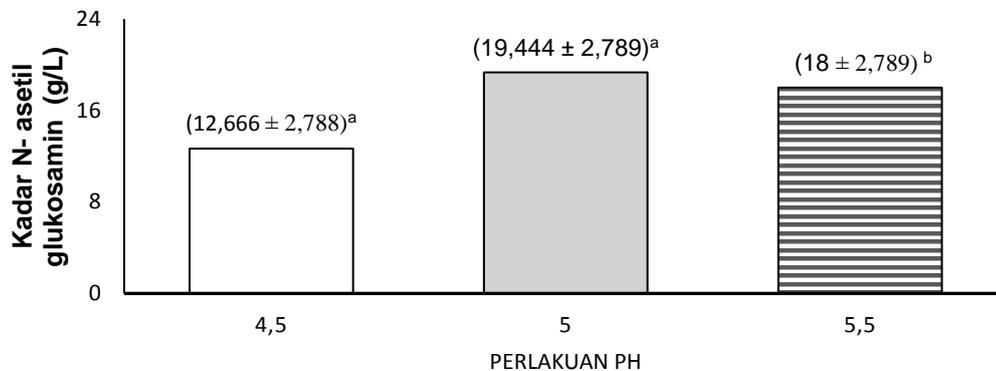
Produksi D-glukosamin sangat berhubungan erat dengan enzim kitosanolitik dimana menurut Wen-kai, *et al.* (2007), Produksi chitosanase optimum jamur *Trichoderma viride* dengan ph 5.0, suhu kultur 28 °C, dan waktu inkubasi 40 jam volume media 75 ml dan penambahan inoculum jamur sebanyak 6% menghasilkan aktivitas kitosanase sebesar 0,291 U/mL. Ada beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kitosanolitik dari *Trichoderma viride* yang dihasilkan yaitu meliputi sumber karbon, sumber nitrogen, pH, suhu, volume media kultur, inokulum, dan waktu inkubasi.

Menurut Sun, *et al.* (2013), crude enzim chitosanase dan β -d-glucosamidase yang diperoleh dari hasil fermentasi oleh *Microbacterium sp.* OU0. Enzim tersebut digunakan untuk menghidrolisis kitosan untuk menghasilkan glukosamin (GlcN). Adapun beberapa faktor yang mempengaruhi kinerja enzim tersebut yaitu: suhu, konsentrasi substrat terhadap rasio kitosan, dan waktu produktivitas dalam memproduksi glukosamin. Kondisi optimum dalam produksi glukosamin dengan menggunakan crude enzim chitosanase dan d-glucosamidase didapatkan kondisi optimum pada perlakuan pH 5,8, suhu 50°C, rasio enzim yang ditambahkan 1,5 U/60 gram dan waktu hidrolisis selama 5 jam.

4.3. Produksi Glukosamin Tahap Ke Dua

4.3.1. Kadar N-Asetil-D-Glukosamin

Pada hasil pengujian Anova N-Asetil-D-Glukosamin tahap 2, diperoleh faktor pH berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar N-Asetil-D-Glukosamin yang ditampilkan pada Lampiran 17. Dengan diperolehnya hasil yang berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut BNT 5% dengan hasil 5,4376 yang kemudian diinterpretasikan dengan menggunakan notasi huruf pada Lampiran 9. Hasil uji lanjut N-asetil-D-glukosamin secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Kadar N-asetil D-glukosamin penelitian tahap 2

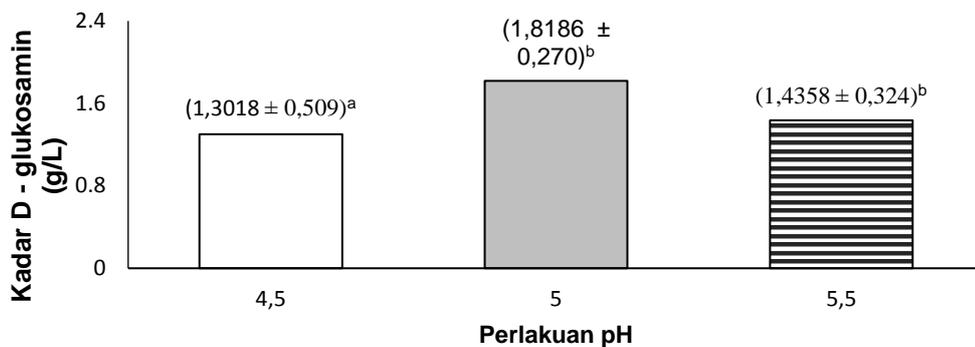
Pada Gambar 17 diketahui bahwa nilai rata-rata kadar N-Asetil-D-Glukosamin tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5 dengan nilai sebesar $19,33 \pm 2,789$ g/L. Sedangkan, nilai terendah terdapat pada perlakuan pH 4,5 dengan nilai sebesar $12.666 \pm 2,788$ g/L. Didapatkan hasil tertinggi pada pH 5, hal ini diduga terjadi berhubungan dengan enzim kitosanolitik yang dalam mendegradasi kitosan.

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Bohlman, *et al.* (2004) glukosamin yang dihasilkan cukup tinggi. Hasil penelitiannya menyatakan produksi N-asetil glukosamin dengan 2 kultur jamur yaitu *Trichoderma harianum* dan *Trichoderma reesei* didapatkan konsentrasi maksimal pada jam ke 212 yaitu sebesar 0,19 g/L dan

0,22 g/L. sedangkan produksi glukosamin dari gabungan enzim yang dihasilkan oleh jamur tersebut bias menghasilkan N-asetil glukosamn sebanyak 4,04 g/L.

4.3.2. D-Glukosamin

Pada hasil pengujian Anova D-Glukosamin tahap 2, diperoleh faktor pH berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar D-Glukosamin yang ditampilkan pada Lampiran 18. Dengan diperolehnya hasil yang berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut BNT 5% dengan hasil 0,8043 yang kemudian diinterpretasikan dengan menggunakan notasi huruf pada Lampiran 10. Hasil uji lanjut D-glukosamin secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Kadar D-glukosamin penelitian tahap 2

Pada Gambar 18 diketahui bahwa nilai rata-rata kadar D-Glukosamin tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5 dengan nilai sebesar $1.8184 \pm 0,271$ g/L. Sedangkan, nilai terendah terdapat pada perlakuan pH 4.5 dengan nilai sebesar $1,300 \pm 0,508$ g/L. Kadar tertinggi diperoleh pada pH 5 diduga dikarenakan pH tersebut merupakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan jamur *Trichoderma viride*.

Jika di bandingkan dengan hasil penelitian Hsieh, *et al.* (2007). kadar d-glukosamin yang dihasilkan cukup baik. Hasil optimal produksi yang diperoleh dari 3 jenis jamur yang berbeda yaitu *Aspergillus sp.* BCRC31742, *Monascus pilosus* BCRC31527, *Rhizopus oligosorus* BCRC 31996 serta media yang ditambahkan juga berbeda. Sehingga di dapatkan produksi glukosamin optimal pada *Aspergillus*

sp BCRC31742 dengan media *Glukosa-pepton* (GP) menghasilkan glukosamin sebesar 3,428 g/L, *Monascus pilosus* BCRC315227 dengan media rice bran + sucrose (RSA) menghasilkan glukosamin 0,719 g/L dan *Rhizopus oligosorus* BCRC 31996 dengan media Sabouraud Dextrose Broth (SDB) kadar glukosamin 0,394 g/L.

Tinggi rendahnya kadar glukosamin disebabkan oleh jenis jamur, nutrisi, pH suhu, jumlah enzim yang dihasilkan oleh jamur dan cara analisi glukosamin yang berbeda. Selain itu kadar glukosamin dipengaruhi kandungan nutrisi yang ditambahkan juga akan mempengaruhi jamur dalam menghasilkan enzim. Menurut Luis, *et al.* (2012) suhu optimum chitosanase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* yaitu pada pH 5,0 dan suhu 40-50°C dengan enzim yang dihasilkan sebesar 1,2 UI/gds.

Menurut Sitanggang (2012), D-glukosamin (GlcN) dapat diperoleh dari degradasi substrat kitin secara langsung dari limbah cangkang kerang atau udang maupun melalui tahapan fermentasi. Bakteri telah melalui rekayasa genetika untuk meningkatkan produksi glukosamin (GlcN) banyak melalui produksi dari enzim tertentu dibandingkan dengan kapang yang membutuhkan konversi kandungan biomasa yang diperoleh dari kultur kapang menjadi monomer glukosamin (GlcN).

4.3.3. pH Akhir setelah Media Difermentasi

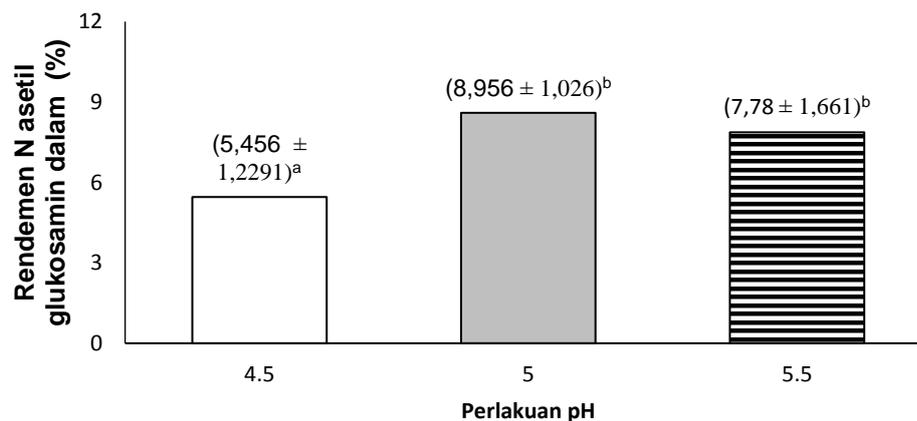
Pada pengujian pH akhir sampel, didapatkan keseluruhan hasil dengan perlakuan tiga pH berbeda mengalami penurunan untuk lebih lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 11. Sedangkan pada rata-rata pH akhir pada diperoleh hasil pH akhir tertinggi dengan pH awal 5,5 dan terendah 4.5. Terjadinya penurunan pH pada fermentasi sampel diduga disebabkan adanya penambahan glukosa sebagai sumber karbon dalam media kitosan yang digunakan jamur *Trichoderma viride* dalam metabolismenya untuk menghasilkan enzim kitosanolitik.

. Menurut Desniar (2004) menyatakan bahwa jika sumber karbon yang paling besar di dalam kultur medium adalah suatu karbohidrat maka pH akan turun selama pertumbuhan di bawah kondisi aerob. Mikroorganisme menghasilkan senyawa metabolisme seperti asam piruvat dan asam asetat dengan adanya gula berlebih. Asam organik jika berdisosiasi dalam air akan menghasilkan H⁺ yang dapat menurunkan pH cairan kultivasi.

4.3.4. Rendemen Glukosamin

4.3.4.1. Rendemen N-Asetil-D-Glukosamin

Hasil rendemen N-asetil-D-glukosamin dapat dilihat pada gambar 19. dari hasil analisis penelitian menunjukkan bahwa pH berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen akhir sampel N-asetil-D-glukosamin yang dihasilkan. Hasil uji lanjut BNT secara umum dapat dilihat pada Lampiran 12.



Gambar 19. Rendemen akhir N-asetil-D-glukosamin

Dilihat dari Gambar 19 didapatkan perolehan rendemen N-asetil-D-glukosamin tertinggi pada pH 5,0 yaitu sebesar $8.596 \pm 1,026$ % dan terendah pada pH 4,5 sebesar $5.456 \pm 1,2291$ %. Jika di bandingkan dengan penelitian Maggadani (2012), dengan menggunakan isolat *Bacillus* sp. BPPT CC 2 yang diperoleh dari hasil penapisan dari air di Sumatera Utara. Isolat *Bacillus* sp. BPPT CC 2 berpotensi sebagai penghasil enzim kitinase. Produksi N-asetil glukosamin menggunakan enzim kitinase yang berasal dari *Bacillus* sp. BPPT CC 2. Di

dapatkan kondisi optimum dengan rendemen sebanyak 99.41% dari hasil hidrolisis 3% substrat koloidal kitin dengan 0.2 U enzim pada kondisi pH 6.0 dan suhu 50°C selama 5 hari.

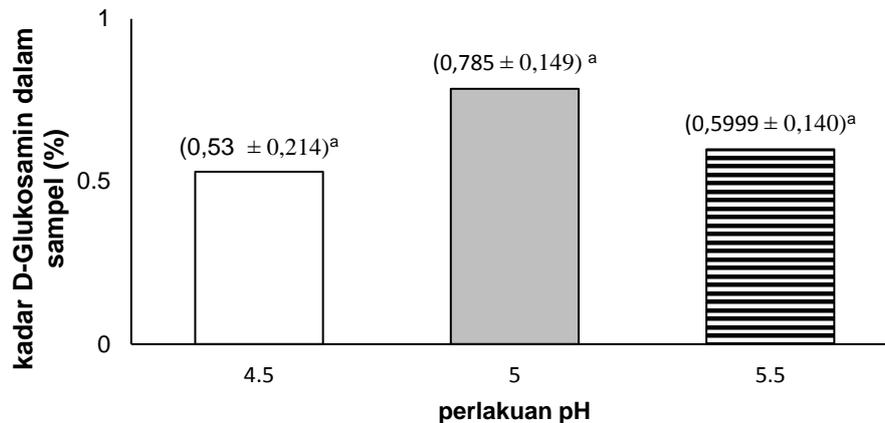
Jika di bandingkan dengan Lawati (2013), Hasil dari pemurnian enzim kitinase beaveria bassiania dari ekstrak enzim kitinase hingga tahap dialilisa dengan menggunakan ammonium sulfat 70% didapatkan hasil rendemen sebesar 12 sebesar 12,6667 % dari ekstrak enzim kasar. Jika dilakukan dialisi maka didapatkan rendemen sebesar 0,9287 %. Hal itu menandakan bahwa substrat kitosan yang digunakan tidak sepenuhnya terdegradasi menjadi glukosamin melainkan juga dapat menghasilkan produk oligomernya.

Menurut Nusa, *et al.* (2012) semakin lama fermentasi maka rendemen yang dihasilkan semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena semakin lama fermentasi maka produksi enzim yang dapat menghancurkan substrat semakin banyak. Selain itu penambahan inokulum jamur juga akan meningkatkan enzim yang berfungsi mendegradasi bahan sehingga rendemen dari hasil fermentasi meningkat.

4.3.4.2. Rendemen D-Glukosamin

Hasil dari perhitungan Anova rendemen D-Glukosamin di Lampiran 12 yang menunjukkan bahwa pH tidak berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen akhir sampel D-glukosamin yang dihasilkan. Namun rendemen tertinggi diperoleh dengan perlakuan pH 5. Gambar 20.

Gambar 20. Rendemen akhir D-glukosamin



Dari gambar 20 dapat dilihat bahwa rendemen tertinggi pada pH 5 dengan nilai $0,785 \pm 0,149$ % dan terendah pada pH 4,5 sebesar $0,53 \pm 0,214$ %. Jika dibandingkan dengan penelitiannya Aisyah (2016). Rendemen yang dihasilkan masih kecil. Dimana hasil rendemen yang dihasilkan padapenelitiannya menyatakan besar rendemenglukosamin sebesar 0,19646 g/L atau 19,64 %.

Peningkatan rendemen menurut Nasrun (2015) dipengaruhi penambahan jumlah jamur, suhu, pH dan lama fermentasi optimum. Saat fermentasi jamur akan menghasilkan enzim yang akan mendegradasi sampel. Jika enzim yang dihasilkan tinggi maka produk yang dihasilkan akan tinggi sehingga rendemen juga ikut meningkat. Namun apabila fermentasi terlalu lama akan menyebabkan penurunan nutrisi dalam substrat akan habis dan fermentasi akan terhenti dan produksi enzim oleh jamur, pun akan menurun. Selain itu semakin lama waktu fermentasi maka jumlah mikroba menuju ke fase kematian.