

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Rasa *umami* berasal dari asam amino (asam glutamat dan asam aspartat) serta nukleotida. Meskipun rasa *umami* dapat diperoleh dari berbagai senyawa, namun belum ada senyawa yang menyamai intensitas *umami* dari asam glutamat. Oleh sebab itu asam glutamat disebut sebagai komponen utama rasa *umami*. Konsentrasi asam glutamat dapat ditemukan di berbagai jenis bahan pangan, baik hewani maupun nabati. Sebagian besar bahan pangan yang tinggi asam glutamat merupakan bahan pangan berprotein tinggi. Beberapa bahan yang termasuk bahan pangan tinggi asam glutamat yaitu kacang pinus atau *pine nut* (6.740g/100g bahan), tepung gandum utuh (3.529g/100g bahan), ikan tuna segar (3.397g/100g bahan), dan *edible seaweed* kering (1.378–3.200g/100g bahan). Bahan pangan kaya akan asam glutamat memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber asam glutamat dan dikembangkan menjadi bahan utama bumbu penyedap. Diantara keempat bahan pangan tersebut, *edible seaweed* merupakan bahan yang paling cocok sebagai sumber asam glutamat yang akan digunakan sebagai bahan utama bumbu penyedap. Selain karena konsentrasi asam glutamatnya yang tergolong tinggi, *edible seaweed* lebih murah dibandingkan ketiga bahan yang lain serta ketersediaannya melimpah dan dapat ditemukan hampir di setiap wilayah perairan di seluruh dunia, termasuk Indonesia. Data kisaran konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang disebutkan di atas hanya berasal dari beberapa spesies *edible seaweed* yang sudah sering dikonsumsi di Asia Timur. Namun secara umum, *edible seaweed* dapat memiliki konsentrasi asam glutamat yang bervariasi tergantung dari jenis dan spesiesnya, bahkan pada satu spesies yang sama, konsentrasi asam glutamat dapat bervariasi tergantung dari lokasi tempat tumbuh *edible seaweed*, musim atau waktu panen, serta proses paska panen yang dilakukan terhadap *edible seaweed* tersebut.

Dalam proses pengembangan produk pangan dengan senyawa yang berasal dari bahan alami, ekstraksi dan analisis merupakan proses paska panen yang wajib dilakukan. Ekstraksi perlu dilakukan agar senyawa target terpisah dari senyawa yang tidak dibutuhkan atau senyawa yang dapat mengganggu fungsi dari senyawa target, sedangkan

analisis dilakukan untuk mengetahui efektifitas dari proses ekstraksi yang telah dilakukan dengan mencari jumlah senyawa target yang diperoleh dan memastikan senyawa target dapat dikembangkan menjadi produk yang diinginkan. Namun secara umum, proses ekstraksi dan analisis dapat bervariasi tergantung dari senyawa yang diinginkan, bahkan untuk memperoleh suatu senyawa tertentu seperti asam glutamat, proses yang dapat digunakan juga beragam. Penggunaan proses ekstraksi dan analisis yang berbeda kemungkinan besar dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh juga berbeda. Hal ini disebabkan karena setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Oleh karena itu, pemilihan proses ekstraksi dan analisis asam glutamat *edible seaweed* yang tepat perlu dilakukan sebelum dimanfaatkan sebagai bahan utama bumbu penyedap. Pemilihan proses yang tepat dapat dilakukan jika mengetahui proses ekstraksi dan analisis apa saja yang sudah pernah dilakukan serta membandingkan konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh dari berbagai proses yang ditemukan. Proses mengumpulkan, menyusun, serta membandingkan berbagai data yang sudah ada disebut sebagai proses *review*.

Review mengenai topik yang berkaitan dengan proses ekstraksi dan analisis asam glutamat sudah pernah dilakukan oleh beberapa peneliti. Pertama, Kumar dan kawan-kawan (2014) dalam jurnalnya yang berjudul “*Production & Purification of Glutamic Acid: a Critical Review*”, membahas mengenai potensi penggunaan *membrane filtration* dalam proses pemisahan (ekstraksi) senyawa asam glutamat yang dihasilkan melalui proses fermentasi. Selanjutnya, Lafarga dan kawan-kawan (2020) dalam jurnalnya berjudul “*Bioactive Peptides and Carbohydrates from Seaweed for Food Applications: Natural Occurrence, Isolation, Purification, and Identification*”, membahas mengenai potensi *seaweed* sebagai sumber senyawa bioaktif yang akan dikembangkan sebagai produk pangan fungsional, dimana di dalam *review* tersebut juga membahas bagaimana metode analisis dapat memengaruhi senyawa target (*peptide*) serta senyawa yang berkaitan (protein dan asam amino). Kemudian, Milinovic dan kawan-kawan (2021), membahas mengenai rasa umami yang dihasilkan oleh *edible seaweed*, dimana dalam *review* ini juga membahas sedikit mengenai pengaruh metode pengeringan, penyimpanan, serta suhu dan waktu pemanasan (ekstraksi) terhadap konsentrasi asam glutamat *edible seaweed*. Berdasarkan tiga *review* tersebut, dapat diketahui bahwa masih

belum ada yang secara spesifik mengumpulkan, membandingkan, dan membahas perbedaan atau faktor dalam proses ekstraksi dan analisis yang sudah pernah dilakukan beserta pengaruhnya terhadap konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh.

1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Asam Glutamat

Asam glutamat merupakan salah satu asam amino non-esensial penyusun protein (Ronzio, 2003; Mouritsen & Klavs, 2014). Senyawa tersebut pertama kali ditemukan dalam gluten gandum yang dihidrolisis dengan larutan asam oleh ilmuwan bernama Ritthausen tahun 1866 (Nishimura & Motonaka, 2019). Asam glutamat memiliki berbagai peran dan fungsi dalam kehidupan manusia. Dalam tubuh manusia, asam glutamat berperan sebagai senyawa yang membantu transmisi sinyal antar sel saraf (*neurotransmitter*). Kemudian, senyawa asam glutamat dari bahan tertentu yang dikombinasikan dengan senyawa hidroklorida, dimanfaatkan sebagai suplemen untuk meningkatkan keasaman lambung serta menyeimbangkan kekurangan asam lambung (asam klorida). Namun peran asam glutamat yang secara umum diketahui oleh banyak orang adalah sebagai penambah rasa (*flavor enhancer*) (Ronzio, 2003).

Asam glutamat merupakan salah satu senyawa sumber rasa umami dan reseptor rasa *umami* pertama yang ditemukan oleh Kikunae Ikeda pada tahun 1908 yang berasal dari hidrolisat *seaweed Laminaria japonica* yang sering digunakan untuk membuat kaldu sup Jepang (Winter, 2009; Mouritsen & Klavs, 2014; Burdock, 2014). *Umami* termasuk dalam 5 rasa dasar bersama dengan rasa manis, asin, pahit, dan asam. *Umami* tergolong rasa dasar karena reseptor asam glutamat berbeda dengan reseptor rasa lainnya, tidak memengaruhi rasa dasar lainnya, memiliki kualitas rasa yang berbeda, serta rasa umami tidak bisa dibuat dengan mencampurkan rasa dasar lainnya (de Man et al., 2018). *Umami* berasal dari kata “*umai*” yang berarti enak dan “*mi*” yang berarti rasa atau *flavor* sehingga dapat dideskripsikan sebagai rasa enak yang khusus atau khas. Selain itu, masyarakat Jepang biasanya menggunakan kata tersebut untuk mengekspresikan kesempurnaan rasa (Mouritsen & Klavs, 2014).

Selain asam glutamat, senyawa lain yang juga diketahui menjadi sumber rasa *umami*, adalah asam aspartat (asam amino) (Mouritsen & Klavs, 2014). Setelah kedua asam amino tersebut ditemukan, pada tahun 1913 ditemukan senyawa lain dari ikan kering yang juga berkontribusi dalam memberikan rasa *umami*, yaitu 5'-inosin monofosfat (IMP) dan pada tahun 1960 ditemukan lagi senyawa lain dari jamur kering yang juga berkontribusi dalam memberikan rasa *umami*, yaitu 5'-guanilat monofosfat (GMP) (Nishimura & Motonaka, 2019). Meskipun begitu, peran dan intensitas rasa *umami* setiap senyawa berbeda, asam amino berperan sebagai penentu ada/tidaknya rasa *umami* sedangkan nukleotida berperan sebagai senyawa yang mampu meningkatkan rasa *umami* dari asam amino tersebut (Winter, 2009). Selain itu, jika kedua asam amino tersebut dibandingkan, maka asam glutamat diketahui memiliki intensitas rasa *umami* yang lebih besar yaitu 3–10 kali lebih kuat dibandingkan asam aspartat. Oleh karena itu, asam glutamat disebut sebagai senyawa utama sumber rasa *umami* karena belum ada atau bahkan tidak ada senyawa lain yang dapat melampaui bahkan menyamai intensitas rasa *umami* dari asam glutamat (Choi & Jung, 2015; Nishimura & Motonaka, 2019).

Asam glutamat yang terikat dengan asam amino lain dalam bentuk peptida atau protein tidak akan menimbulkan rasa karena berat molekulnya meningkat (Choi & Jung, 2015). Artinya, asam glutamat yang dapat menghasilkan rasa *umami* adalah asam glutamat dalam bentuk bebas. Terdapat senyawa asam glutamat bebas yaitu bentuk L dan D, dimana bentuk L dapat memberikan rasa *umami* sedangkan bentuk D tidak (de Man et al., 2018). Selain itu, tidak semua bahan pangan segar memiliki banyak asam glutamat bebas, meskipun begitu umumnya asam glutamat dalam bentuk terikat tersedia dalam jumlah banyak, dan begitu juga sebaliknya (Mouritsen & Klavs, 2014). Oleh karena itu diperlukan proses hidrolisis yang tepat agar asam glutamat dapat dilepaskan dari protein sehingga menjadi asam amino bebas ketika dilarutkan dengan air (Choi & Jung, 2015). Namun asam glutamat yang telah bebas tetap belum bisa menghasilkan rasa *umami*. Hal ini disebabkan karena rasa *umami* dari glutamat hanya dapat muncul secara optimal pada pH 6–8, sedangkan pada pH rendah akan kurang terasa bahkan tidak terasa (de Man et al., 2018). Oleh karena itu, asam glutamat perlu dinetralkan, umumnya diubah menjadi bentuk garam. Asam glutamat yang dinetralkan disebut sebagai glutamat (Ronzio, 2003). Dalam larutan, ion-ion pembentuk garam akan berpisah, ion glutamat

yang terpisah inilah yang dapat merangsang reseptor glutamat sehingga menghasilkan rasa *umami*. Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa bukan bentuk asam amino terikat, asam amino bebas, maupun garam yang menghasilkan *umami*, melainkan ion glutamat yang terpisah (bebas) dari garam yang dapat menghasilkan rasa *umami* (Mouritsen & Klavs, 2014).

Saat ini, penambah rasa *umami* (*flavor enhancer*) yang paling umum digunakan adalah monosodium glutamat (MSG), disodium-5'-inosinat (IMP), dan disodium-5'-guanilat (GMP) (Banies & Brown, 2016). Di antara ketiganya, MSG merupakan penambah rasa yang paling terkenal dan paling banyak digunakan, tidak hanya untuk masakan tetapi juga produk pangan seperti saus, kecap, bumbu penyedap, bubuk sup, makanan ringan, makanan kaleng, dan makanan beku (Burdock, 2014; Ronzio, 2003). MSG banyak digunakan karena berbentuk kristal, mudah larut dalam air, memiliki rasa *umami* murni dan kuat, sangat stabil, dan tidak menyerap kelembapan (Nishimura & Motonaka, 2019; de Man et al., 2018). Setelah berhasil mengisolasi asam glutamat dari *seaweed Laminaria japonica* dalam bentuk garam, Kikunae Ikeda mulai mengembangkan proses ekstraksi asam glutamat dari berbagai jenis tepung untuk diproduksi secara komersial (Burdock, 2014). Selain dari gluten gandum, MSG juga diproduksi dari limbah gula bit atau protein kedelai (de Man et al., 2018). Proses produksi MSG saat ini tidak menggunakan proses atau metode awal yang ditemukan yaitu hidrolisis, melainkan menggunakan teknologi fermentasi (Nishimura & Motonaka, 2019). Meskipun begitu ada juga produk penambah rasa (*umami*) dalam bentuk hidrolisat protein (berbentuk cair maupun bubuk kering) dari bahan pangan dengan konsentrasi asam glutamat minimal 16%. Proses produksi tersebut umumnya menggunakan proses hidrolisis dengan larutan asam klorida (HCl) yang kemudian dinetralkan, tetapi hidrolisis juga bisa dilakukan dengan enzim (de Man et al., 2018).

Tabel 1.2. Konsentrasi asam glutamat pada berbagai bahan pangan

Bahan pangan	Asam glutamat (g/100g)
Tepung gandum utuh	3.529
Kacang pinus	6.740
Ikan tuna segar	3.397
<i>Seaweed</i> kering*	1.378 – 3.200
<i>Seafood</i>	43 – 140
Daging & Unggas	0.009 – 0.022

Sayuran	0.048 – 0.108
Buah	0.004 – 0.176
Susu	0.001 – 0.019

**Kombu/konbu, nori, wakame, laver*

Sumber: Guichard, et al. (2016) dan Mouritsen & Klavs (2014)

Asam glutamat dapat ditemukan dalam berbagai jenis bahan pangan, baik hewani maupun nabati (Tabel 1.2.). Bahan–bahan kaya akan asam glutamat ini berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber asam glutamat untuk digunakan sebagai bahan utama bumbu penyedap. Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa *seaweed* merupakan bahan pangan yang paling berpotensi untuk dimanfaatkan dan digunakan untuk produksi bumbu penyedap karena konsentrasi asam glutamatnya yang tergolong sangat tinggi, relatif lebih murah dibanding tepung gandum utuh, kacang pinus, dan ikan tuna segar, serta ketersediaan *seaweed* di alam sangat melimpah, jenisnya sangat beragam, dan dapat ditemukan hampir di setiap wilayah perairan di seluruh dunia, mulai dari daerah tropis hingga daerah kutub (Guichard, et al., 2016; Mouritsen & Klavs, 2014; Mouritsen, 2013; O'Connor, 2017). Asam glutamat dari suatu bahan alami dapat diperoleh secara optimal jika melalui proses proteolisis yang menyebabkan protein dapat melepaskan atau membebaskan asam glutamat (Mouritsen & Klavs, 2014; Guichard, et al., 2016). Selain itu, untuk dijadikan produk penambah rasa atau bumbu penyedap, proses pemisahan asam glutamat dengan senyawa lain wajib dilakukan. Hal ini disebabkan karena tidak semua bahan pangan yang kaya asam glutamat dapat memberikan rasa *umami* dengan jelas karena rasa *umami* dapat tertutupi dengan rasa yang lebih kuat yang berasal dari senyawa lain (Nishimura & Motonaka, 2019).

1.2.2. Ekstraksi Asam Glutamat

Ekstraksi merupakan salah satu proses yang sering dilakukan dalam industri pengolahan pangan sebagai proses dasar untuk memperoleh senyawa tertentu dari suatu bahan sehingga senyawa tersebut dapat dikembangkan menjadi produk pangan tertentu (Tzia & George, 2003). Menurut kamus *Oxford Chemistry*, ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu senyawa dari suatu campuran berdasarkan kelarutannya (Daintith, 2008). Secara fenomenologis, ekstraksi merupakan proses perpindahan massa suatu senyawa dari satu fase ke fase lain (Rostagno & Juliana, 2013). Sedangkan dari sudut

pandang teknik, ekstraksi merupakan proses perpindahan senyawa dari suatu bahan (padat) ke suatu pelarut (cair) karena pelarut yang masuk ke dalam bahan menyebabkan senyawa yang berada dalam bahan tersebut menjadi tidak stabil dan terlepas atau larut dalam pelarut (Tzia & George, 2003). Dari beberapa definisi tersebut dapat diketahui bahwa ekstraksi asam glutamat *edible seaweed* merupakan proses pemisahan asam glutamat dari *edible seaweed* dengan pelarut tertentu yang dipilih sesuai dengan kelarutan senyawa target, agar pelarut masuk ke dalam bahan dan menyebabkan ikatan senyawa target dalam bahan menjadi tidak stabil, dan senyawa target dapat terlepas dan larut dalam pelarut.

Umumnya, proses ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh suatu senyawa tertentu dengan jumlah dan tingkat kemurnian tinggi untuk dikembangkan atau memperoleh senyawa yang tidak diinginkan dalam jumlah yang rendah (kemurnian/selektivitas tinggi) yang dapat dideteksi saat proses analisis meski jumlahnya sedikit (sensitivitas tinggi). Tidak semua tujuan harus tercapai, tergantung dari proses apa yang akan dilakukan. Pada proses analisis (skala laboratorium), selektivitas dan sensitivitas (efektivitas berkaitan dengan kuantitas/jumlah) merupakan tujuan utama yang perlu dicapai, tetapi pada proses produksi (skala industri) kemurnian (kualitas) dan jumlah (kuantitas) lebih diutamakan (Rostagno & Juliana, 2013). Tantangan yang sering dijumpai dalam proses ekstraksi suatu senyawa dari bahan alami adalah senyawa yang diinginkan tidak tersedia atau hanya sedikit yang ditemukan secara bebas atau berinteraksi dengan senyawa lain seperti protein, karbohidrat, dan lipid, contohnya adalah senyawa asam glutamat. Oleh karena itu, perlu adanya proses untuk memutus ikatan senyawa target dengan senyawa lain yang berinteraksi, agar dapat dipisahkan secara efektif (Rostagno & Juliana, 2013).

Proses ekstraksi cukup beragam dan masing-masing proses memiliki kelebihan serta kekurangan. Selain itu, perlu diketahui bahwa tidak ada proses standar, meskipun ada proses standar yang ditentukan oleh suatu organisasi tetapi tidak menjamin proses tersebut adalah yang terbaik untuk semua tujuan. Dalam proses produksi, proses yang tepat untuk bahan dan senyawa target serta tujuan produksi, tetap harus dicari untuk memperoleh proses yang optimal (efektif dan efisien). Kemudian, saat ini sulit untuk

menemukan proses ekstraksi tunggal, artinya proses ekstraksi yang diterapkan tidak hanya satu, umumnya kombinasi dari beberapa metode agar proses lebih efektif dan hasil yang diperoleh lebih optimal. Meskipun proses lama masih digunakan tetapi perkembangan proses ekstraksi masih terus berlanjut dengan cara meningkatkan kinerja melalui adopsi metode baru yang ditemukan (Rostagno & Juliana, 2013). Dalam proses ekstraksi terdapat banyak faktor yang dapat memengaruhi jumlah senyawa target yang diperoleh. Beberapa faktor tersebut diantaranya jenis pelarut, suhu, waktu kontak, serta peralatan yang digunakan (Rostagno & Juliana, 2013, Tzia & George, 2003).

a. Metode Hidrolisis

Proses ekstraksi asam glutamat dari *edible seaweed* memiliki tantangan yaitu jumlah asam glutamat dalam bentuk bebas pada *edible seaweed* terbatas karena sebagian besar berikatan dengan senyawa lain dalam bentuk protein. Oleh karena itu dalam proses ekstraksi perlu suatu metode untuk memutuskan ikatan asam glutamat dari asam amino lainnya sehingga nantinya dapat lebih mudah untuk dipisahkan. Proses pemutusan ikatan tersebut dilakukan dengan proses hidrolisis. Secara sederhana, hidrolisis merupakan reaksi kimia yang terjadi antara suatu senyawa dengan air yang menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan senyawa tersebut (Daintith, 2008; Speinght, 2017). Selain itu, hidrolisis juga dapat disebut sebagai proses penguraian suatu senyawa kimia oleh air dimana prosesnya sangat bergantung pada kelarutan, pH, dan potensi oksidasi–reduksi senyawa tersebut (Murphy & Robert, 2007).

Dalam pengertian yang lebih luas, hidrolisis merupakan reaksi substitusi nukleofilik, dimana senyawa yang kaya elektron dengan pasangan elektron yang belum dibagi (nukleofil) menyerang senyawa yang kekurangan elektron (elektrofil), dengan memutuskan satu ikatan *kovalen* sehingga terbentuk senyawa baru, sedangkan secara spesifik hidrolisis merupakan reaksi dekomposisi ganda (metatesis) oleh reaktan/pelarut, salah satunya adalah air. Air dikatakan sebagai salah satu reaktan/pelarut yang dapat digunakan karena hidrolisis tidak hanya dilakukan dalam kondisi netral (dengan senyawa netral seperti air), tetapi juga bisa dilakukan dalam kondisi asam atau basa (dengan senyawa ionik seperti asam, basa, atau garam) (Speinght, 2018). Penggunaan pelarut (secara kimiawi) dalam proses hidrolisis

merupakan metode yang sudah ada sejak lama, namun metode tersebut terus berkembang dan kinerjanya ditingkatkan dengan cara dikombinasikan dengan metode baru seperti gelombang ultrasonikasi, pemanasan dengan gelombang mikro, atau enzim (Rostagno & Juliana, 2013; Kuddus, 2019).

1) Hidrolisis secara Kimiawi

Hidrolisis secara kimiawi merupakan metode hidrolisis dengan menambahkan pelarut selain air yang berperan sebagai katalis untuk mempercepat proses hidrolisis; katalis dapat berupa cairan atau padatan, tetapi umumnya digunakan dalam bentuk larutan (Speinght, 2017; Rostagno & Juliana, 2013). Proses hidrolisis dengan katalis dapat menyebabkan kehilangan beberapa senyawa akibat kontak yang terlalu lama dengan katalis. Namun di sisi lain, terdapat beberapa senyawa yang tidak mengalami degradasi atau tidak terpengaruh (*inert*) akibat kontak yang terlalu lama dengan katalis. Hidrolisis hanya dengan air tidak akan menyebabkan kehilangan senyawa, tetapi tidak semua senyawa yang diinginkan dari bahan pangan dapat diperoleh dari hidrolisis dengan air. Hal ini disebabkan karena ikatan-ikatan kimia dalam bahan pangan (khususnya nabati) cenderung sangat kompleks (Speinght, 2018).

Pada proses hidrolisis secara kimiawi, umumnya pemilihan jenis pelarut penting untuk diperhatikan karena jenis pelarut merupakan faktor utama yang memengaruhi efektifitas suatu proses (Syed, 2010; Rostagno & Juliana, 2013). Karakteristik yang menjadi dasar dalam memilih pelarut cukup beragam dan dapat berbeda pada setiap proses, tetapi secara umum pelarut yang dipilih untuk proses yang berkaitan dengan bahan pangan adalah pelarut yang dapat melakukan perannya secara optimal (contoh: pelarut hidrolisis mampu secara efektif memutus ikatan kimia dalam bahan), tidak menyebabkan degradasi atau kerusakan pada senyawa target, serta aman untuk manusia dan ramah lingkungan (toksisitas rendah & *food grade*) (Tzia & George, 2003; Rostagno & Juliana, 2013). Hidrolisis secara kimiawi dapat dikelompokkan menjadi 2 yaitu hidrolisis dengan asam (*acid hydrolysis*) dan hidrolisis dengan etanol.

a) Hidrolisis dengan Asam (*Acid Hydrolysis*)

Acid hydrolysis merupakan proses pemutusan ikatan suatu senyawa melalui substitusi nukleofil oleh pelarut air yang dibantu oleh pelarut berupa asam protik sebagai katalis (Speinght, 2018). Hidrolisis dengan asam adalah metode hidrolisis secara kimiawi yang paling sering digunakan karena prosesnya cukup sederhana dengan hasil (analisis) yang relatif tinggi serta cukup akurat dan presisi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Hidrolisis dengan asam identik dengan hidrolisis ikatan peptida yang menahan asam amino dalam bentuk protein atau peptida pada berbagai sampel termasuk bahan pangan (Rutherford & Sarwar, 2009). Asam protik merupakan pelarut bersifat asam yang dapat melepaskan atau mendonorkan protonnya (ion H^+) (Daintith, 2008). Pelarut ini sangat umum digunakan sebagai katalis dalam proses hidrolisis, khususnya untuk memperoleh komponen asam amino, termasuk asam glutamat (Speinght, 2017; Greenfield & Southgate, 2003). Beberapa asam protik yang digunakan sebagai katalis dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (termasuk asam glutamat) adalah asam klorida (HCl), asam metanasulfonat (MSA), dan asam perklorat ($HClO_4$) (Toldra & Leo, 2021; Davies & Alan, 1973). Berikut penjelasan dari ketiga pelarut asam tersebut:

(1) Asam Klorida/*Hydrochloric Acid* (HCl)

Asam klorida atau *Hydrochloric Acid* (HCl) merupakan salah satu asam kuat yang tersusun dari gas hidrogen klorida yang dilarutkan dalam air. HCl memiliki beberapa sifat, salah satunya dapat terdisosiasi (terpisah) sepenuhnya dalam larutan. Selain itu, HCl bersifat korosif, memiliki bau yang menyengat, dan dapat menguap pada suhu $-85^{\circ}C$ (titik didih). Uap yang dihasilkan tersebut juga bersifat korosif dan dapat menyebabkan iritasi dan peradangan akut pada manusia. Meskipun begitu, HCl sering digunakan untuk berbagai proses, baik skala kecil (penelitian di laboratorium) maupun skala besar (produksi di industri). Oleh karena itu, umumnya penggunaan HCl dilakukan dengan prosedur yang cukup ketat agar pengguna dan lingkungan tetap aman (NCBI^a, 2021; Daintith, 2008).

HCl 6N adalah pelarut yang paling umum digunakan dalam metode standar hidrolisis (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Hal ini disebabkan karena penggunaannya cukup mudah, bisa digunakan dalam fase cair atau gas, serta dapat dihilangkan (dengan penguapan) dari hasil hidrolisis atau dinetralkan (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Metode dimana HCl 6N bersentuhan langsung dengan sampel disebut sebagai hidrolisis dengan asam fase cair. Metode ini sangat cocok untuk hidrolisis sampel dalam jumlah besar atau sampel dengan ikatan yang kompleks. Sedangkan sampel dalam jumlah kecil lebih cocok menggunakan hidrolisis dengan asam fase uap karena dapat meminimalkan kontaminan dari pelarut yang digunakan. Dalam hidrolisis dengan asam fase uap, tabung yang berisi sampel ditempatkan di dalam bejana besar yang berisi HCl 6N (sampel dan pelarut terpisah). Tujuannya agar ketika dipanaskan hanya uap asam yang dihasilkan saja yang dapat bersentuhan dengan sampel, sedangkan kontaminan dalam pelarut yang tidak mudah menguap tidak akan bersentuhan dengan sampel (Toldra & Leo, 2021).

Dalam penggunaannya, HCl 6N diinkubasi dalam kondisi vakum (bebas oksigen) (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998; Greenfield & Southgate, 2003). Kondisi bebas oksigen (vakum) berfungsi untuk mengurangi tekanan uap HCl selama proses pemanasan; biasanya digunakan dalam metode fase uap agar uap asam dapat menyelubungi sampel (Rutherford & Sarwar, 2009). Kemudian hasil hidrolisis kedua fase tersebut diketahui relatif sama, sehingga dapat dikatakan bahwa metode fase uap lebih menguntungkan. Selain itu, jika bejana hidrolisis dapat dirancang khusus untuk menampung banyak tabung maka hidrolisis dengan asam fase uap juga bisa digunakan untuk jumlah sampel yang besar (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Namun untuk menggunakan hidrolisis dengan asam fase gas dibutuhkan operator yang terampil untuk menentukan waktu pengambilan hasil hidrolisis dengan aman (Rutherford & Sarwar, 2009).

(2) Asam Metanasulfonat/*Methanesulfonic Acid* (MSA)

Asam metanasulfonat atau *methanesulfonic acid* (MSA) merupakan asam alkanasulfonat dimana gugus alkil yang berkaitan langsung dengan fungsi sulfo adalah metil. Asam ini merupakan asam konjugasi (basa yang menerima proton dari asam) dari metanasulfonat dan hanya memiliki satu karbon ($\text{CH}_4\text{O}_3\text{S}/\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}_4$) (Daintith, 2008; NCBI^b, 2021). Selain HCl 6N, MSA 4M juga dapat digunakan sebagai katalis dalam proses hidrolisis. Penggunaan MSA umumnya bertujuan untuk mempertahankan asam amino triptofan yang sebagian besar hancur/terdegradasi selama proses hidrolisis dengan HCl 6N (Toldra & Leo, 2021; Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

Berbeda dengan HCl, MSA dapat digunakan dalam fase cair tetapi tidak dapat digunakan dalam fase uap (Rutherford & Sarwar, 2009). Hal ini disebabkan karena MSA memiliki titik didih yang sangat tinggi yaitu 443°C (Toldra & Leo, 2021; NCBI^b, 2021). Umumnya penggunaan MSA diikuti dengan penggunaan reagen pelindung seperti triptamin atau asam tioglikolat untuk mencegah oksidasi selama hidrolisis (Toldra & Leo, 2021). Kekurangan dari penggunaan MSA yaitu tidak mudah menguap sehingga asam tidak dapat dihilangkan dengan penguapan setelah hidrolisis (Rutherford & Sarwar, 2009). Meskipun begitu, hasil hidrolisis tetap bisa dianalisis setelah pengenceran (umumnya 4 kali lipat) dan pH diatur mendekati 2.3 dengan catatan jumlah sampel yang digunakan untuk hidrolisis lebih besar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021).

(3) Asam Perklorat/*Perchlorate Acid* (PCA)

Asam perklorat atau *perchloric acid* (HClO_4/PCA) merupakan asam kuat berbentuk cairan jernih tidak berbau pada konsentrasi antara 50–72%. Jika kurang dari 50% cairan tetap jernih dan tidak berbau, tetapi menjadi tidak berwarna. PCA termasuk salah satu senyawa *oxoacid chlorine*, dimana atom hidrogen (H) dari asam klorida merupakan bagian dari gugus hidroksil yang terikat pada gugus okso ($=\text{O}$) atau atom oksigen (O). Selain itu, PCA

merupakan asam konjugasi (basa yang menerima proton dari asam) dari perklorat (ClO_4). PCA bersifat korosif, menguap (titik didih) pada suhu 39°C (50 mmHg) dan tidak stabil, dimana senyawa tersebut dapat meledak pada suhu sekitar 90°C (1 atm/760 mmHg) atau jika dipanaskan di wadah tertutup dalam waktu lama maka wadah dapat pecah (Daintith, 2008; NCBI^c, 2021).

PCA dapat digunakan untuk proses penguraian bahan organik, baik hewani maupun nabati (Daintith, 2008). Salah satu bentuk penguraian adalah hidrolisis protein menjadi komponen asam amino. Pada sampel kasein, diketahui bahwa penggunaan PCA untuk hidrolisis memberikan hasil yang lebih baik dibanding HCl pada beberapa asam amino seperti alanin, valin, dan histidin. Namun, penggunaan PCA menyebabkan sistein dan metionin mengalami degradasi total selama hidrolisis, sedangkan asam amino lain yang dihidrolisis dengan PCA, hasilnya lebih kecil dibanding penggunaan HCl. Selain itu, peningkatan kekuatan (konsentrasi) larutan dari 6N menjadi 8N, diketahui tidak hanya menghancurkan sistein dan metionin tetapi juga tirosin serta komponen asam amino lainnya yang diperoleh menjadi semakin kecil. Hal ini disebabkan karena PCA merupakan oksidator kuat (senyawa yang dapat menghilangkan elektron dari senyawa lain) dan karena sifat tersebut PCA jarang digunakan untuk hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (Davies & Alan, 1973).

(4) Pelarut Tambahan dalam *Acid Hydrolysis*

Asam amino memiliki karakteristik kimia yang berbeda, oleh karena itu stabilitasnya juga bervariasi selama hidrolisis dengan asam. Pertama, glutamin dan asparagin mengalami modifikasi menjadi asam glutamat dan asam aspartat. Kedua, triptofan dan sistein mengalami kerusakan/degradasi, efeknya senyawa tersebut tidak terdeteksi saat analisis. Ketiga, serin dan treonin berkurang masing-masing sekitar 10% dan 5%. Terakhir, jumlah isoleusin, valin, metionin, tirosin diketahui juga berkurang karena degradasi yang disebabkan oleh asam (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Kekurangan hidrolisis dengan asam tersebut dapat diatasi

dengan menambahkan pelarut yang dapat memperbaiki atau meningkatkan jumlah asam amino yang diperoleh (Rutherford & Sarwar, 2009). Oleh sebab itu, penambahan pelarut serta jenis pelarut tambahan yang digunakan juga dapat menjadi faktor yang memengaruhi efektifitas proses hidrolisis dengan asam (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998; Sikorski, 2001). Berikut beberapa pelarut yang umum ditambahkan ke pelarut asam dalam proses hidrolisis:

(a) Air Distilasi/*Distilled Water* (H_2O)

Air merupakan cairan yang terdiri dari atom oksigen yang terikat secara *kovalen* dengan dua atom hidrogen dengan karakteristik bening, tidak berwarna, tidak berbau, dan tidak berasa. Air sangat dibutuhkan manusia untuk berbagai tujuan, salah satunya adalah sebagai pelarut atau reagen (NCBI^d, 2021). Proses pemurnian sangat dibutuhkan jika air akan digunakan sebagai pelarut atau reagen dalam berbagai proses penelitian. Proses pemurnian dilakukan untuk menghilangkan sebagian/seluruh kontaminan yang berpotensi mengganggu hasil penelitian (McTigue & James, 2010). Salah satu metode pemurnian air yang banyak digunakan adalah distilasi, yaitu proses mendidihkan, mengembungkan, serta mengumpulkan uap. Hasil dari proses destilasi air umumnya disebut sebagai air distilasi (*distilled water*) (Daintith, 2008). Air distilasi banyak digunakan untuk proses pelarutan, pengenceran, sebagai sampel kosong, atau untuk mereaksikan berbagai senyawa kimia (NCBI^d, 2021; McTigue & James, 2010).

(b) Norleusin/*Norleucine* ($C_6H_{13}NO_2$)

Norleusin atau *norleucine* ($C_6H_{13}NO_2$) merupakan senyawa asam amino non–proteinogenik (asam amino tapi bukan 20 asam amino yang secara alami dapat tersusun menjadi protein), yang terdiri dari asam heksanoat ($C_6H_{12}O_2$) yang mengikat gugus amino (NH_2) pada C–2. Strukturnya mirip dengan asam amino metionin tetapi tidak mengandung sulfur (S) (NCBI^e, 2021). Dalam proses hidrolisis dan analisis asam amino, norleusin merupakan salah satu larutan standar internal. Penambahan norleusin dapat

dilakukan sebelum atau sesudah hidrolisis sesuai tujuan yang ingin dicapai. Penambahan sebelum hidrolisis dilakukan untuk mengecek seberapa banyak asam amino yang terdegradasi selama hidrolisis. Namun, setiap asam amino memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap kondisi proses hidrolisis, sehingga penggunaan larutan standar internal untuk mengecek asam amino yang terdegradasi dianggap kurang tepat. Kemudian, penambahan setelah hidrolisis umumnya selalu dilakukan untuk mengurangi variabilitas data yang diperoleh dari proses analisis. Larutan standar internal digunakan sebagai kontrol kualitas untuk penambahan *buffer* dan reagen, proses injeksi ke kolom HPLC, dan efisiensi derivatisasi. Larutan standar harus disiapkan dengan hati-hati agar tidak memengaruhi perhitungan hasil analisis (Rutherford & Sarwar, 2009).

(c) Norvalin/Norvaline (C₅H₁₁NO₂)

Norvalin atau *norvaline* (C₅H₁₁NO₂) merupakan asam 2-aminopentanoat yang memiliki konfigurasi S (sulfur). Reagen ini merupakan salah satu senyawa asam amino non-proteinogenik (asam amino tapi bukan 20 asam amino yang secara alami dapat tersusun menjadi protein) serta isomer dari asam amino valin (NCBI^m, 2021). Selain norleusin, norvalin juga merupakan larutan standar internal yang dapat digunakan sebelum atau sesudah hidrolisis sesuai tujuan yang ingin dicapai yang telah dijelaskan pada bagian norleusin (Rutherford & Sarwar, 2009).

(d) Fenol/Phenol (C₆H₅OH/C₆H₆O)

Fenol atau *phenol* (C₆H₅OH/C₆H₆O) merupakan senyawa organik yang mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung pada atom karbon dalam cincin benzena; karena bentuk cincin tersebut, pelarut fenol bersifat asam. Fenol dapat berupa padatan kristal tidak berwarna hingga putih (murni) atau cairan (produk komersial) tidak berwarna saat murni/berwarna merah muda. Fenol menguap lebih lambat daripada air (titik didih: 182°C), uapnya lebih berat dari udara (Daintith, 2008) (NCBI^f, 2021). Secara umum, fenol reaktif dengan berbagai senyawa kimia serta

dapat berperan sebagai perantara dalam proses sintesis kimia (NCBI^f, 2021). Dalam proses hidrolisis dengan asam (*acid hydrolysis*), fenol ditambahkan sebagai agen pelindung sampel agar asam amino yang mudah terdegradasi dapat berkurang selama hidrolisis, sehingga hasil asam amino yang diperoleh tidak berkurang (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif pada hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein (Toldra & Leo, 2021).

(e) 3,3'–Asam Ditioldipropionik (DTDPA/C₆H₁₀O₄S₂)

3,3'–Asam Ditioldipropionik atau 3,3'–*Dithiodipropionic acid* (DTDPA) dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino, umumnya ditambahkan dalam sampel sebelum hidrolisis (NCBI^g, 2021; Johns, 2021). Penambahan senyawa tersebut dilakukan untuk melindungi asam amino sistein agar tidak mengalami degradasi selama proses hidrolisis sehingga tetap dapat terdeteksi. Selain itu, dengan penambahan senyawa ini, dimungkinkan untuk melakukan deteksi tanpa proses penurunan atau derivatisasi (*derivatization*). Dalam penggunaannya dalam proses hidrolisis dengan asam, larutan DTDPA umumnya disiapkan dalam larutan NaOH 0.2M (Johns, 2021).

(f) Ditiotreititol/Dithiothreititol (DTT/C₄H₁₀O₂S₂)

Ditiotreititol atau *dithiothreititol* (DTT/C₄H₁₀O₂S₂) merupakan reagen pereduksi yang digunakan sebagai agen pelindung asam amino sistein dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino. Reagen tersebut dapat menjadi agen pelindung karena mampu mencegah oksidasi gugus tiol (–SH) pada asam amino sistein serta mampu mereduksi disulfida menjadi ditiol (NCBI^o, 2022).

(g) Merkaptioetanol/Mercaptoethanol (ME/C₂H₆OS)

Merkaptoetanol atau *mercaptoethanol* (ME/C₂H₆OS) merupakan senyawa tiol dan alkohol primer yaitu senyawa alkohol yang memiliki dua atom

hidrogen pada karbon yang bergabung dengan gugus hidroksil (mengandung gugus $-\text{CH}_2-\text{OH}$). ME berbentuk cairan bening tidak berwarna hingga kuning samar, titik didihnya $157-158\text{ }^\circ\text{C}$, dan bersifat beracun jika tertelan, tertiuap, ataupun terserap kulit (NCBI^h, 2021; Daintith, 2008; Wexler, 2014; Rutherford & Sarwar, 2009). Dalam proses hidrolisis dengan asam, ME ditambahkan ke pelarut asam sebagai agen pelindung sampel agar asam amino (khususnya triptofan dan sistein) yang mudah terdegradasi selama hidrolisis tidak berkurang atau pengurangannya dapat diminimalkan (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Ishii & Giovanni, 2014). Penambahan 0.4% ME ke dalam pelarut asam diketahui dapat memulihkan triptofan sebesar 100% setelah hidrolisis kecuali pada sampel dengan konsentrasi karbohidrat yang tinggi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

(h) Triptamin/Tryptamine ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$)

Triptamin atau *tryptamine* ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$) merupakan senyawa alkaloid yaitu senyawa organik bernitrogen yang di biosintesis dari asam amino. Berdasarkan strukturnya, triptamin termasuk senyawa alkaloid kelompok indol karena strukturnya terdiri dari cincin benzena (segi enam) dan cincin segi lima yang mengandung nitrogen. Selain itu, triptamin memiliki rantai samping $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ pada posisi 3 cincin yang mengandung nitrogen (Daintith, 2008). Dalam proses hidrolisis dengan asam, triptamin ditambahkan sebagai agen pelindung sampel agar asam amino (khususnya triptofan) yang mudah terdegradasi selama hidrolisis dapat terjaga sehingga hasil yang diperoleh tidak berkurang (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Keberadaan triptamin selama hidrolisis fase gas dan tanpa oksigen (vakum) diketahui dapat mempertahankan atau meningkatkan asam amino triptofan yang diperoleh dibanding tanpa penambahan triptamin (Toldra & Leo, 2021).

Namun, pelarut tambahan tidak wajib digunakan, penggunaannya tergantung dari senyawa yang ingin diperoleh atau tujuan penelitian lain (Rutherford & Sarwar, 2009).

b) Hidrolisis dengan Etanol (*Ethanol Hydrolysis*)

Etanol (etil alkohol/ C_2H_5OH) merupakan etana yang salah satu hidrogennya disubstitusi oleh gugus hidroksil ($-OH$). Etanol termasuk dalam alkohol primer yaitu yaitu senyawa alkohol yang mengandung gugus $-CH_2-OH$ (CH_3CH_2OH). Etanol berwujud cairan bening, tidak berwarna, memiliki bau khas, dan rasa yang tajam. Selain itu, etanol larut dalam air dan mudah menguap (titik didih = $78.3^\circ C$) (NCBI, 2021; Daintith, 2008). Selain air, etanol merupakan pelarut yang umum digunakan dalam proses pengolahan bahan pangan, khususnya proses pemecahan atau penguraian senyawa dalam bahan pangan. Hal ini disebabkan karena etanol termasuk pelarut dengan toksisitas tingkat 3 yaitu pelarut yang memiliki efek racun lebih rendah dari tingkat 1 dan 2, dapat digunakan dalam proses pengolahan pangan dengan syarat hanya meninggalkan sebagian kecil residu dalam produk akhir (Rostagno & Juliana, 2013).

Dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (termasuk asam glutamat), etanol dengan konsentrasi $\geq 70\%$ adalah pelarut alkohol yang paling sering digunakan selain pelarut asam (Nollet, 2004; Verma, 2014). Tidak hanya menghidrolisis, pelarut etanol juga dapat mengekstraksi asam amino, khususnya memisahkan komponen asam amino dari senyawa lain termasuk protein atau peptida yang tidak terhidrolisis (Nollet, 2004). Selain itu, dengan menggunakan etanol, tidak perlu ada proses pemisahan atau pemurnian hasil hidrolisis karena etanol mudah menguap sehingga pelarut dapat dihilangkan dengan cara didiamkan saja (Nollet, 2004; Verma, 2014). Namun, untuk menggunakan pelarut ini, perlu diketahui bahwa jika sampel yang digunakan tinggi akan karbohidrat atau garam, maka kedua senyawa tersebut perlu dihilangkan terlebih dahulu (Katoch, 2011).

Hidrolisis secara kimiawi memang metode yang paling umum digunakan tetapi metode ini memiliki banyak kekurangan, diantaranya membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak, waktu proses lama, serta perlu pemanasan pada suhu tinggi. Selain dari segi efisiensi proses, tiga hal tersebut dapat menyebabkan jumlah senyawa yang diperoleh berkurang, kehilangan fungsi senyawa yang diinginkan, serta masalah toksisitas yang berasal dari pelarut sehingga pelarut harus dihilangkan atau diminimalkan dari hasil hidrolisis (Syed, 2010). Penggunaan pelarut yang memiliki banyak kekurangan tersebut mendorong banyaknya minat untuk mengembangkan metode yang menghasilkan proses lebih cepat, jumlah senyawa yang diperoleh lebih optimal, produk yang aman bagi manusia, dan lebih ramah lingkungan (Rostagno & Juliana, 2013).

2) Hidrolisis dengan Enzim (*Enzymatic Hydrolysis*)

Selain dengan pelarut (metode hidrolisis secara kimiawi), hidrolisis protein menjadi komponen asam amino juga dapat dilakukan dengan enzim, meskipun jurnal yang membahas mengenai metode hidrolisis dengan enzim dan modifikasinya tidak sebanyak metode hidrolisis secara kimiawi, khususnya hidrolisis dengan asam (Kuddus, 2019; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Secara umum tujuan penggunaan enzim cukup beragam, salah satunya untuk melepaskan berbagai senyawa yang terikat. Dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (termasuk asam glutamat), enzim yang digunakan umumnya adalah protease (Syed, 2010). Protease (enzim proteolitik) merupakan kumpulan enzim yang dapat mempercepat proses hidrolisis protein menjadi senyawa penyusunnya; prosesnya disebut sebagai proteolisis (Daintith, 2008). Secara khusus, penggunaan enzim protease merupakan salah satu cara yang direkomendasikan untuk mengatasi masalah kerusakan atau degradasi asam amino pada proses hidrolisis secara kimiawi (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

a) Faktor yang Berpengaruh

Hidrolisis dengan enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah jenis dan konsentrasi enzim (Syed, 2010). Enzim proteolitik (protease) sangat beragam, setiap enzim dapat memiliki mekanisme yang berbeda dalam

memotong polimer (protein atau peptida) (Jenkins & Artemis, 2012). Hal ini disebabkan karena setiap enzim memiliki aktivitas yang spesifik dan terdefinisi dengan baik sehingga hasilnya juga spesifik (Nollet, 2004; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Enzim dapat digunakan sendirian jika enzim tersebut dapat langsung menghasilkan senyawa yang diinginkan, tetapi umumnya enzim yang digunakan lebih dari satu dan dilakukan secara berurutan jika senyawa yang diinginkan berikatan dengan banyak senyawa, seperti asam glutamat salah satu asam amino penyusun protein (Daintith, 2008; Toldra & Leo, 2021). Selain jenis dan konsentrasi enzim, hidrolisis dengan enzim juga dapat dipengaruhi oleh jenis sampel, prakondisi sampel, serta suhu dan waktu inkubasi (Syed, 2010).

Penggunaan enzim dalam proses hidrolisis umumnya dilakukan untuk memanfaatkan senyawa fungsional, tetapi kurang cocok untuk analisis kuantitatif yang biasanya dilakukan berkali-kali (Syed, 2010; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Hal ini disebabkan karena sampel yang digunakan sedikit sehingga hasil analisis kuantitatif cenderung tidak tepat. Jika menambah jumlah sampel maka jumlah enzim juga bertambah, artinya biaya yang dikeluarkan semakin besar karena harga enzim relatif mahal. Kemudian, jika menggunakan beberapa enzim, selain biayanya besar, proses hidrolisisnya menjadi sangat lama, energi yang dibutuhkan untuk hidrolisis juga semakin besar, terutama karena analisis kuantitatif biasanya dibutuhkan pengulangan beberapa kali (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Meskipun termasuk metode yang mahal tetapi hidrolisis dengan enzim dianggap lebih ramah lingkungan dibanding hidrolisis secara kimiawi (Syed, 2010).

b) Enzim Bromelin

Bromelin (EC 3.4.22.) merupakan salah satu enzim proteolitik yang tergolong dalam enzim hidrolase, peptidase, dan merupakan endopeptidase sistein (katalis berupa sistein) (NCBI, 2021; Nabavi & Ana, 2019). Enzim ini dapat ditemukan pada tumbuhan nanas, khususnya pada batang (EC 3.4.22.32) dan buahnya (EC 3.4.22.33) (Kuddus, 2019). Enzim bromelin dibedakan berdasarkan sumbernya

karena ekstrak bromelin (kasar) dari kedua sumber memiliki komposisi yang berbeda (Nabavi & Ana, 2019; Caballero, 2016). Bromelin komersial biasanya diproduksi dari bagian batang (*stem bromelain*), meskipun bagian nanas lainnya juga mengandung bromelin (Caballero, 2016). Hal ini disebabkan karena batang nanas mengandung bromelin lebih banyak dibandingkan pada buahnya (NCBI, 2021; Caballero, 2016). Selain itu batang nanas tidak dikonsumsi (limbah), sedangkan buah nanas dikonsumsi (Nabavi & Ana, 2019). Bromelin merupakan endopeptidase sistein utama dalam batang nanas, namun selain itu terdapat ananain dan comosain sebagai endopeptidase sistein minor (Rawlings & Guy, 2013). Bromelin dijual dalam bentuk bubuk kering (berwarna putih hingga coklat) yang dapat larut dalam air tetapi tidak dapat larut dalam alkohol, kloroform, atau eter (NCBI, 2021).

Mekanisme kerja bromelin dimulai dengan sistein pada enzim bertindak sebagai nukleofil (senyawa yang kaya elektron dengan pasangan elektron yang belum dibagi) dan menyerang elektrofil (senyawa yang kekurangan elektron) pada substrat yang berupa ikatan peptida internal dari rantai protein (Nabavi & Ana, 2019; Caballero, 2016; Speinght, 2018). Bromelin batang memiliki spesifitas yang luas untuk pemisahan protein dan bekerja secara optimal pada substrat [Z-Arg-Arg-NHMec]. Sedangkan bromelin buah digunakan untuk hidrolisis protein dengan spesifitas luas untuk ikatan peptida dan bekerja secara optimal pada substrat [Z-Phe-Val-Arg-NHMec] tetapi sama sekali tidak bereaksi pada substrat [Z-Arg-Arg-NHMec] (NCBI^{k&l}, 2021). Bromelin bekerja secara optimal pada pH 6–8.5 dan kisaran suhu 50–60°C (Kuddus, 2019). Kemudian beberapa sumber menyebutkan bahwa bromelin buah memiliki aktivitas proteolitik yang lebih tinggi dan spesifitas yang lebih besar dibanding bromelin batang (Barrett et al., 2004 & Grzonka et al., 2007 dalam Kuddus, 2019). Jika dibandingkan dengan enzim papain, maka aktivitas enzimatik bromelin sedikit lebih kecil dari papain dan proses proteoliticnya cukup rumit (Kuddus, 2019). Bromelin telah banyak digunakan dalam berbagai industri, salah satunya industri pangan, dimana bromelin sudah digunakan sebagai

pelunak daging dan untuk produksi hidrolisat protein ikan yang memiliki senyawa fungsional (Tanuja et al., 2012 dalam Caballero, 2016).

3) Hidrolisis dengan Gelombang Ultrasonik (Ultrasonikasi)

Gelombang suara ultra (ultrasonik) merupakan gelombang mekanik, yaitu gelombang yang membutuhkan media untuk merambat. Gelombang suara ini disebut sebagai gelombang ultra karena memiliki frekuensi yang lebih besar (20kHz hingga 10MHz) dengan suara yang dapat didengar manusia (16Hz – 20kHz) (Rostagno & Juliana, 2013). Pemanfaatan gelombang ultrasonik dimulai sekitar pertengahan abad ke-20 dan dalam perkembangannya gelombang ultrasonik juga digunakan dalam berbagai bidang termasuk bidang pangan, baik dalam laboratorium maupun industri. Gelombang ultrasonik dapat digunakan dalam rentang frekuensi dan daya yang luas dan setiap kombinasi yang berbeda dapat menghasilkan efek yang berbeda pula. Oleh karena itu gelombang ultrasonik tidak hanya digunakan dalam satu proses tertentu saja, tetapi dapat diterapkan pada berbagai proses termasuk penguraian senyawa (hidrolisis) untuk meningkatkan ekstraksi berbagai senyawa. Hal inilah yang menyebabkan penggunaan gelombang ultrasonik (ultrasonikasi) disebut sebagai metode yang inovatif dan menjanjikan sebagai pengganti hidrolisis secara kimiawi (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010).

a) Mekanisme Ultrasonikasi

Meskipun dapat menghasilkan efek yang berbeda tergantung frekuensi dan daya yang dipilih, namun prinsip kerja dari proses ultrasonikasi secara umum sama yaitu terjadinya peristiwa kavitasi, dimana gelembung uap atau gas mikro dalam cairan terbentuk, mengalami pembesaran, serta meledak karena adanya perubahan tekanan secara cepat dan melebihi daya tarik (*tensile strength*) cairan (Rostagno & Juliana, 2013; Panda & Sivakuma, 2019; Vilku et al., 2008 dalam jurnal [1]). Proses ultrasonikasi dimulai dengan mengalirkan gelombang ultrasonik (umumnya untuk pemecahan sel 20–1000kHz) secara langsung maupun tidak langsung (Show, 2019; Panda & Sivakuma, 2019). Molekul–molekul pembentuk dalam media cair disatukan oleh gaya tarik menarik tetapi

saat gelombang ultrasonik melewati cairan tersebut, terjadi peristiwa *compression* dan *rarefaction (decompression)*. Pada peristiwa *compression*, gelombang ultrasonik yang melewati media cair berperan sebagai penekan, dimana tekanan dan densitas cairan tersebut meningkat, lalu molekul–molekul pembentuk terlepas dari posisinya atau terpisah dan saling bertabrakan. Pada peristiwa *rarefaction (decompression)*, gelombang ultrasonik yang melewati media cair menginduksi perpindahan molekul–molekul yang terpisah tersebut, sehingga molekul–molekul itu saling menjauh. Hal ini disebabkan karena tekanan dan densitas cairan tersebut menurun atau mengalami dekompresi (Rostagno & Juliana, 2013).

Penggunaan daya yang tinggi pada proses ultrasonikasi menyebabkan kedua peristiwa tersebut terus terjadi sehingga proses kavitasi dapat terjadi. Ruang–ruang kosong yang terbentuk dalam cairan akibat kedua peristiwa itu, diisi oleh gas terlarut dan terbentuklah gelembung–gelembung mikro (Rostagno & Juliana, 2013). Pembentukan gelembung tersebut terjadi secara cepat dan dalam jumlah banyak (Show, 2019; Panda & Sivakuma, 2019). Hal tersebut menyebabkan terjadinya tumbukan antar gelembung secara intens. Gelembung yang saling bertumbukan menyebabkan tekanan dan suhu larutan menjadi meningkat dan akibatnya gelembung meledak dan pecah (Panda & Sivakuma, 2019). Tekanan dan suhu tinggi yang menembus gelembung tersebut menghasilkan *microjet* dan gelombang kejut yang dapat mengenai permukaan sampel (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Proses muncul dan hilangnya gelembung secara terus menerus dan cepat ini pada akhirnya mengakibatkan penipisan dinding sel. Dinding sel yang semakin menipis menyebabkan penetrasi pelarut ke dalam sel meningkat sehingga sel membengkak dan pori–pori sel ikut membesar. Hal tersebut menyebabkan transfer massa ke sel maupun dari sel meningkat sehingga komponen intraseluler dapat keluar dari sel (Panda & Sivakuma, 2019; Povey & Timothy, 1998). Selain itu peningkatan suhu juga menyebabkan reaktivitas kimia media cair menjadi lebih cepat (Rostagno & Juliana, 2013).

b) Faktor yang Berpengaruh

Terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam menggunakan ultrasonikasi, agar memperoleh kombinasi terbaik, sehingga diperoleh hasil optimal, konsumsi daya dan energi terendah, serta kondisi skala laboratorium dapat ditingkatkan ke skala industri (Rostagno & Juliana, 2013). Faktor-faktor tersebut adalah sampel, pelarut, jenis alat, daya (P), frekuensi (f), intensitas (I), serta kontrol suhu (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Pertama, karakteristik sampel seperti kadar air, ukuran, porositas, dan kompleksitas sampel serta stabilitas senyawa target perlu dipertimbangkan karena dapat memengaruhi efisiensi proses ultrasonikasi, seperti peningkatan suhu, lama waktu proses, serta kemudahan pelarut untuk berdifusi. Secara umum, sampel kering (kelembaban rendah) lebih sering digunakan karena dapat meningkatkan difusi serta waktu kontak pelarut dan sampel. Kemudian, pelarut dipilih berdasarkan kelarutan senyawa target, viskositas, tegangan permukaan, serta tekanan uap pelarut. Viskositas yang tinggi dapat meningkatkan interaksi molekul sehingga proses kavitasi meningkat secara signifikan, tetapi tegangan permukaan yang ikut meningkat menyebabkan proses kavitasi tidak optimal. Oleh karena itu, penggunaan viskositas tinggi harus diikuti dengan peningkatan amplitudo/intensitas. Selain itu, pelarut yang dipilih harus memiliki tekanan uap yang sangat rendah karena hal tersebut berkaitan dengan faktor suhu yang juga dapat memengaruhi proses kavitasi (Rostagno & Juliana, 2013).

Kedua, jenis alat ultrasonikasi dikelompokkan menjadi dua yaitu *probe* dan *waterbath* (Syed, 2010). Baik *probe* maupun *waterbath*, memiliki transduser yang berperan mengubah energi listrik menjadi energi suara dengan bergetar secara mekanis pada frekuensi ultra sehingga menghasilkan gelombang ultrasonik (Rostagno & Juliana, 2013). Perbedaannya, *probe* digunakan untuk proses ultrasonikasi secara langsung, yaitu proses dimana gelombang ultrasonik dialirkan langsung ke larutan sampel bervolume kecil, sedangkan *waterbath* digunakan untuk proses ultrasonikasi secara langsung maupun tidak langsung, dimana gelombang ultrasonik dialirkan melalui media cair dan wadah larutan sampel (sampel bervolume besar) (Pico, 2013 dalam Galanakis, 2019; Syed, 2010). Kelebihan penggunaan *probe* adalah energi dan biaya yang digunakan

relatif lebih rendah dibanding penggunaan *waterbath*, tetapi selama proses ultrasonikasi terjadi penurunan intensitas secara cepat, oleh karena itu *probe* tidak boleh bersentuhan dengan dinding wadah. Selain itu, penggunaan *probe* menyebabkan peningkatan suhu sampel secara cepat karena proses kavitasi yang terkonsentrasi pada area tertentu, oleh karena itu suhu selama proses perlu dikontrol (Rostagno & Juliana, 2013). Kemudian, kelebihan dari ultrasonikasi secara langsung yaitu mampu memberikan intensitas gelombang ultrasonik yang lebih tinggi dibanding ultrasonikasi secara tidak langsung, tetapi dapat menyebabkan kontaminasi logam, sedangkan pada ultrasonikasi secara tidak langsung tidak akan terjadi karena sampel berada dalam wadah kaca yang tidak mudah bereaksi (Capelo-Martinez, 2009).

Ketiga, penggunaan daya (P; Watt) yang besar dapat menyebabkan perubahan besar pada sampel karena dapat menginduksi gaya geser yang lebih besar, tetapi hal tersebut berefek pada peningkatan biaya operasional. Peningkatan daya dapat diganti dengan optimalisasi karakteristik sampel yang juga memengaruhi gaya geser. Dengan demikian hasil yang optimal tetap dapat diperoleh dan biaya operasional dapat diminimalkan. Selain itu, penggunaan daya yang berbeda dapat menghasilkan selektivitas senyawa yang berbeda (Rostagno & Juliana, 2013). Kemudian, penerapan frekuensi (f; Hz) tinggi sebenarnya sulit untuk menginduksi pembentukan gelembung karena peristiwa *compression* dan *rarefaction (decompression)* terjadi secara cepat dan dalam waktu singkat, sedangkan untuk membentuk ruang-ruang kosong dalam cairan yang akan terisi gas terlarut membutuhkan proses *compression* dan *rarefaction (decompression)* yang cukup lama. Oleh karena itu, penerapan frekuensi yang tinggi pada proses ultrasonikasi membutuhkan amplitudo yang lebih besar (Rostagno & Juliana, 2013). Selanjutnya, peningkatan intensitas (I; watt/m^2 atau kg/s^3) berkaitan dengan peningkatan amplitudo yang berpengaruh secara langsung pada tekanan yang dihasilkan ketika gelombang ultrasonik diterapkan. Hal tersebut berdampak pada peningkatan efek sonokimia yaitu proses kavitasi, tetapi penerapan amplitudo yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada transduser (Rostagno & Juliana, 2013).

Keempat, peningkatan suhu selama proses hidrolisis dapat meningkatkan efisiensi seperti peningkatan jumlah gelembung, area kontak sampel–pelarut, serta difusivitas pelarut, tetapi efek tersebut akan berkurang ketika suhu melebihi ambang batas tertentu atau mendekati titik didih pelarut. Peningkatan suhu yang berlebihan menyebabkan tekanan uap meningkat serta viskositas dan tegangan permukaan menurun. Hal tersebut mendorong pertumbuhan gelembung yang terlalu cepat serta mendorong lebih banyak uap pelarut ke dalam rongga, sehingga perbedaan tekanan di dalam dan di luar gelembung berkurang, akibatnya efek sonikasi juga berkurang. Selain itu, peningkatan suhu yang berlebihan juga dapat menyebabkan penurunan hasil, khususnya pada senyawa yang tidak stabil pada suhu tinggi atau mudah menguap. Oleh karena itu, suhu selama proses ultrasonikasi perlu dikontrol agar tidak memicu degradasi senyawa target (Rostagno & Juliana, 2013).

Secara umum, kelebihan ultrasonikasi adalah mampu mengurangi penggunaan pelarut (ramah lingkungan), dapat meningkatkan hasil yang diperoleh, kualitas hasil menjadi lebih baik, serta waktu proses jauh lebih singkat dibanding metode secara kimiawi dan enzimatis (Galanakis, 2019). Meskipun begitu, ultrasonikasi diketahui kurang cocok digunakan sendirian untuk bahan pangan nabati yang memiliki susunan sel yang kompleks (Syed, 2010). Hal ini dapat diatasi dengan melakukan kombinasi dengan pelarut karena pelarut memiliki kinerja yang baik untuk berbagai bahan serta lebih murah dibandingkan dengan enzim, sehingga dapat bekerja secara sinergis dan efisien serta hasil yang diperoleh lebih optimal (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Pada akhirnya, penerapan proses hidrolisis yang berbeda diharapkan dapat memberikan hasil yang berbeda (Sikorski, 2001). Tidak hanya memberikan hasil tertinggi, tetapi juga dapat menghemat konsumsi energi (biaya produksi), menghemat waktu proses, serta hasil yang diperoleh berkualitas, artinya hasil dapat diolah lebih lanjut sebagai produk pangan yang aman bagi manusia (Rostagno & Juliana, 2013).

b. Proses Hidrolisis

Selain penentuan jenis metode hidrolisis, kondisi proses hidrolisis seperti penghilangan oksigen dari tabung sampel, pemilihan alat pemanas, serta pengaturan (kontrol) suhu dan waktu juga dapat memengaruhi efektivitas dan efisiensi proses hidrolisis (Sikorski, 2001). Proses penghilangan oksigen atau penggantian gas oksigen dengan gas inert (nitrogen) hanya dan wajib dilakukan jika menggunakan metode *acid hydrolysis* (baik fase cair atau gas) dengan tujuan untuk meminimalkan degradasi asam amino, khususnya tirosin, treonin, serin, metionin, triptofan (Toldra & Leo, 2021; Rutherford & Sarwar, 2009; Nollet, 2004). Lingkungan bebas oksigen dapat diciptakan dengan beberapa cara seperti refluks, penyemprotan sampel dengan gas inert (*sparging*), penyegelan tabung dalam kondisi vakum, atau kombinasi kedua metode terakhir (Rutherford & Sarwar, 2009). Berbeda dengan proses penghilangan oksigen, proses pemilihan alat pemanas serta pengaturan (kontrol) suhu dan waktu hidrolisis pasti dilakukan pada semua jenis metode hidrolisis. Berikut penjelasan mengenai masing–masing kondisi proses hidrolisis yang perlu diperhatikan.

1) Pemilihan Alat Pemanas

Oven konvensional atau umumnya disebut oven merupakan alat pemanas yang umum digunakan dalam laboratorium untuk hidrolisis, ekstraksi, atau inkubasi suatu bahan dengan/tanpa pelarut, baik dalam tabung terbuka maupun tertutup (Rostagno & Juliana, 2013; Marconi, 1995; Nollet, 2004). Penggunaan oven dalam metode standar membutuhkan waktu yang lama dan hal ini dapat menjadi masalah karena dalam analisis kuantitatif dibutuhkan pengulangan beberapa kali dan dalam proses produksi dibutuhkan energi yang besar (Marconi, 1995; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Salah satu cara untuk mengurangi waktu hidrolisis adalah mengganti penggunaan oven konvensional dengan oven *microwave* (Rutherford & Sarwar, 2009).

Oven *microwave* atau biasa disebut *microwave* merupakan alat pemanas alternatif selain oven konvensional, yang memanfaatkan energi gelombang mikro untuk proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino, termasuk asam glutamat (Lee & Choung, 2011; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Gelombang mikro

termasuk gelombang elektromagnetik, yaitu gelombang yang terdiri dari medan listrik dan medan magnet yang tegak lurus dan bersilasi. Dalam fungsinya sebagai alat pemanas, *microwave* menggunakan frekuensi 2450 MHz, dimana pada frekuensi tersebut *microwave* memiliki panjang gelombang 12.2 cm dan energi 0.23kal/mol (=0.94J/mol) (Rostagno & Juliana, 2013). Mekanisme pemanasan oleh *microwave* dan oven konvensional sangat berbeda (Hui, 2006). Pada oven konvensional, energi panas disalurkan dari lingkungan ke bahan melalui pelat konduktor (konduksi) atau udara (konveksi), namun umumnya oven yang digunakan dalam laboratorium menggunakan prinsip pemanasan secara konveksi, sedangkan pada *microwave*, energi panas dapat terbentuk dari dalam bahan karena efek dari paparan gelombang mikro (Varzakas & Constantina, 2016; Rutherford & Sarwar, 2009; Lee & Choung, 2011).

Secara umum, gelombang elektromagnetik yang dipancarkan pada suatu bahan, dapat dipantulkan, diserap, disalurkan (hanya lewat), atau kombinasi dari ketiganya (Lavelle et al., 2021). Untuk menghasilkan panas dalam bahan maka suatu bahan harus dapat menyerap gelombang mikro. Penyerapan gelombang mikro pada bahan tergantung dari senyawa kimia yang ada dalam bahan tersebut. Selain itu senyawa kimia yang berbeda menyerap gelombang mikro pada tingkat yang berbeda (Rostagno & Juliana, 2013). Bahan yang mengandung senyawa polar seperti air, dapat menyerap gelombang mikro dengan kuat (Rostagno & Juliana, 2013). Hal ini disebabkan karena air memiliki momen dipol yang tinggi yang dapat dilihat dari konstanta dielektriknya yang tinggi ($K_d \text{ air} = 80.1$) (Rostagno & Juliana, 2013). Oleh karena itu untuk bahan kering yang akan dihidrolisis dengan *microwave* perlu rehidrasi terlebih dahulu dengan cara direndam air selama beberapa waktu lalu dicampur dengan pelarut yang memiliki konstanta dielektrik rendah ($K_d \text{ HCl} = 4.6$), sedangkan untuk bahan dengan konsentrasi air yang cukup tinggi dapat langsung dicampur dengan pelarut yang memiliki konstanta dielektrik rendah ($K_d \text{ HCl} = 4.6$). Penggunaan pelarut konstanta dielektrik rendah, memungkinkan pemanasan hanya terjadi di dalam bahan, sedangkan di luar bahan (pelarut) tidak mengalami pemanasan. Cara ini memungkinkan senyawa target tidak mengalami pemanasan

yang berlebihan sehingga cara ini sangat cocok untuk mencegah degradasi atau kerusakan senyawa target (Rostagno & Juliana, 2013).

Kemudian, perubahan energi gelombang mikro atau elektromagnetik menjadi energi kalor (panas) terjadi melalui 2 mekanisme yaitu rotasi dipol dan konduksi ionik dalam sampel (Rostagno & Juliana, 2013). Rotasi dipol berkaitan dengan gerakan dari molekul polar yang memiliki momen dipol dalam bahan yang berotasi mengikuti medan listrik yang berosilasi karena mencoba untuk sejajar dengan medan listrik (Rostagno & Juliana, 2013; Morris, 2011). Namun, karena frekuensinya tinggi (2450 MHz), rotasi molekul tersebut semakin cepat, akibatnya molekul tidak memiliki waktu untuk menyesuaikan posisinya, sehingga molekul saling bergesekan dan menimbulkan energi panas dalam bahan (Rostagno & Juliana, 2013; Lavelle et al., 2021). Secara bersamaan, konduksi ionik juga terjadi, dimana semua muatan ion bergerak karena pergeseran medan listrik dan arah ion berubah-ubah mengikuti pergeseran medan listrik. Hal ini menyebabkan ion bergesekan dengan ion, molekul, atau atom di sekitarnya, sehingga tercipta arus listrik yang dapat menginduksi energi panas (Lavelle et al., 2021; Rostagno & Juliana, 2013). Energi panas yang terbentuk dengan cepat dalam sel menyebabkan peningkatan suhu secara drastis sehingga penguapan air juga terjadi dengan cepat. Uap air yang menumpuk pada sel menyebabkan tekanan dalam sel meningkat terus-menerus hingga dinding sel pecah dan proses perpindahan senyawa dari dalam sel ke lingkungan (pelarut) menjadi lebih lancar dan cepat (Lee & Choung, 2011; Rostagno & Juliana, 2013).

Penggunaan *microwave* dalam proses hidrolisis memiliki kelebihan dan kekurangan. Pada pelarut dan suhu yang sama dengan penggunaan oven konvensional, penggunaan *microwave* diketahui dapat mempercepat perpindahan massa senyawa target dari sampel sehingga waktu hidrolisis berkurang secara drastis dari satu hari atau lebih (oven konvensional) menjadi beberapa jam hingga beberapa menit saja (Lee & Choung, 2011; Rutherford & Sarwar, 2009). Namun, kekurangan dari penggunaan *microwave* adalah tingkat rasemisasi residu yang lebih tinggi, khususnya pada histidin, metionin, dan lisin, terutama tanpa adanya pelarut

tambahan seperti fenol. (Toldra & Leo, 2021). Secara keseluruhan *microwave* untuk hidrolisis protein dan analisis asam amino cukup menjanjikan, tetapi terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan agar hasilnya tidak bervariasi antar tabung, seperti radiasi gelombang mikro harus merata, jumlah cairan dalam setiap tabung harus sama (jika lebih kecil akan lebih cepat panas), pengulangan harus dilakukan pada alat yang sama (keluaran dayanya sama) (Rutherford & Sarwar, 2009).

2) Pengaturan Suhu & Waktu

Pemilihan alat pemanas berkaitan dengan pengaturan (kontrol) suhu dan waktu hidrolisis yang juga memengaruhi kesempurnaan proses hidrolisis (Lee & Choung, 2011; Marconi, 1995; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Pengaturan suhu memiliki pengaruh yang signifikan pada suatu proses karena dapat mengubah sifat senyawa target dan pelarut, memengaruhi kelarutan dan difusivitas senyawa target, serta memberikan energi untuk hidrolisis (Rostagno & Juliana, 2013). Oleh karena itu, penggunaan suhu tinggi pada proses hidrolisis cenderung lebih efektif dibanding suhu rendah atau suhu ruang (Rutherford & Sarwar, 2009). Kemudian pengaturan waktu hidrolisis berkaitan langsung dengan suhu hidrolisis, dimana waktu tidak hanya berpengaruh pada efektifitas tetapi juga efisiensi proses hidrolisis (Rostagno & Juliana, 2013). Dalam metode hidrolisis standar, sampel yang telah ditambahkan pelarut HCl 6N dididihkan dan diinkubasi pada suhu 110°C selama 18–24 jam atau 20–24 jam, dimana 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021). Selain itu, sumber lain menyebutkan bahwa *acid hydrolysis* juga dilakukan dalam kurun waktu lebih dari 24 jam bahkan hingga 96 jam, karena beberapa ikatan asam amino seperti isoleusin, valin, leusin, dan fenilalanin bersifat hidrofobik sehingga sangat sulit untuk diurai (Nollet, 2004; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

Penggunaan kombinasi suhu tinggi sekaligus waktu proses yang lama memang efektif untuk memperoleh sebagian besar asam amino, termasuk yang sulit diurai, tetapi asam amino yang sensitif dengan suhu tinggi dapat terdegradasi dan

kehilangan fungsinya selama proses hidrolisis (Nollet, 2004; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Oleh karena itu, metode standar disebut kurang cocok digunakan pada skala industri, sehingga banyak penelitian yang melakukan modifikasi pada pelarut, suhu, dan/atau waktu hidrolisis (Nollet, 2004). Modifikasi tersebut dilakukan berdasarkan pada fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Fakta lain yang menjadi dasar yaitu waktu hidrolisis untuk biaya terendah berbeda dengan waktu hidrolisis yang memberikan efektifitas terbaik, sehingga hampir tidak mungkin memiliki biaya dan hasil yang optimal secara bersamaan dengan menggunakan metode standar (Tzia & George, 2003).

Modifikasi paling umum dilakukan yaitu mencari keseimbangan antara suhu dan waktu hidrolisis (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Beberapa contoh modifikasi metode standar yaitu hidrolisis dengan HCl 6N pada suhu yang lebih tinggi (145°C) selama waktu yang lebih singkat (4 jam), diketahui dapat memberikan hasil yang sebanding dengan hidrolisis pada 110°C selama 24 jam (Toldra & Leo, 2021; Nollet, 2004; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Selain itu, ada juga penelitian yang menggunakan pelarut MSA 4N pada suhu 115°C selama 22–72 jam atau 160°C selama 45 menit, yang diketahui memiliki hasil yang serupa atau bahkan lebih unggul untuk beberapa asam amino (khususnya triptofan) jika dibanding metode standar (110°C; 24 jam) (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Namun sebenarnya dalam metode hidrolisis secara kimiawi, tidak ada satupun kombinasi pelarut, suhu, dan waktu yang akan menghasilkan seluruh asam amino secara akurat dan dalam jumlah yang maksimal (Nollet, 2004). Berbagai kombinasi yang dicoba merupakan kompromi kondisi yang menawarkan estimasi total asam amino terbaik, sedangkan sebelumnya sudah disebutkan bahwa tujuan hidrolisis tidak hanya tentang total asam amino dalam jumlah besar, tetapi ada hal lain yang juga perlu diperhatikan dan dijadikan pertimbangan. Salah satunya adalah efisiensi proses yang berkaitan dengan waktu dan energi yang dibutuhkan untuk proses hidrolisis yang merupakan bagian dari proses produksi, serta kualitas hasil dimana fungsi dari asam amino yang ingin dimanfaatkan tidak hilang sehingga

dapat diolah lebih lanjut sebagai produk pangan yang aman (Nollet, 2004; Rostagno & Juliana, 2013).

Selanjutnya, dalam penggunaan *microwave* untuk hidrolisis, pengaturan suhu bergantung pada kemampuan larutan sampel untuk menyerap gelombang mikro. Peningkatan suhu selama proses menyebabkan interaksi antar molekul dalam larutan sampel menurun, sehingga gerakan molekul meningkat dan menyebabkan kelarutan meningkat. Peningkatan suhu juga dapat menyebabkan pemecahan sel serta dalam wadah tertutup suhu bisa melebihi suhu didih pelarut. (Rostagno & Juliana, 2013). Kelebihan penggunaan *microwave* dibanding oven yaitu pada suhu yang sama (110°C), waktu hidrolisis dapat berkurang menjadi beberapa jam hingga beberapa menit saja (Lee & Choung, 2011; Rutherford & Sarwar, 2009). Selain itu, proses hidrolisis dengan *microwave* menunjukkan bahwa selisih waktu yang kecil dapat memengaruhi hasil yang diperoleh. Pada penelitian Weiss dan kawan-kawan (1998), hidrolisis protein dengan *microwave* selama 20 menit dan 45 menit menghasilkan jumlah asam amino yang relatif kecil, sedangkan hidrolisis selama 30 menit diketahui menghasilkan jumlah asam amino terbaik. Oleh karena itu, waktu hidrolisis dengan *microwave* perlu ditentukan dengan hati-hati (Rutherford & Sarwar, 2009). Sama seperti hidrolisis dengan oven, kombinasi suhu dan waktu yang dapat digunakan cukup bervariasi. Salah satu kombinasi yang diketahui memiliki hasil yang mirip dengan metode standar adalah hidrolisis dengan HCl pada suhu 150°C selama 10–30 menit di dalam *microwave*. Selain itu, kombinasi HCl 6N pada suhu 160°C selama 1 jam atau pada suhu 170°C selama 45 menit menyebabkan rasemisasi asam amino yang lebih rendah (sekitar 50%) dibanding metode standar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

Dalam proses hidrolisis protein untuk memperoleh asam amino yang diinginkan, terdapat banyak faktor yang sangat penting dan perlu untuk diperhatikan. Hal ini disebabkan karena hidrolisis merupakan faktor utama yang menyebabkan ketidaktepatan proses analisis asam amino dan nantinya akan sulit untuk dikembangkan menjadi produk pangan (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

c. Proses Paska Hidrolisis

Proses ekstraksi secara umum tidak berhenti sampai hidrolisis saja, tetapi masih ada proses lanjutan yang perlu dilakukan (Kerese, 1984 dalam Sikorski, 2001). Persiapan sampel sebelum analisis maupun produksi lebih lanjut perlu dilakukan karena kondisi hasil hidrolisis dapat memengaruhi hasil analisis maupun hasil produksi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Berikut beberapa proses yang umum dilakukan setelah hidrolisis.

1) Pemisahan (*Separation*)

Proses pemisahan setelah hidrolisis bertujuan untuk menghilangkan kontaminan (garam, ion logam berat, protein, atau asam amino lain) dari asam amino yang diinginkan, agar tidak mengganggu proses selanjutnya dan senyawa target yang diperoleh murni. Hal ini penting dan harus dilakukan terutama saat hasil hidrolisis akan diolah menjadi produk pangan (Tzia & George, 2003; Rostagno & Juliana, 2013; Armarego & Christina, 2009). Berikut beberapa metode pemisahan yang umum digunakan.

a) Sentrifugasi (*Sentrifugation*)

Sentrifugasi merupakan metode pemisahan yang menggunakan gaya sentrifugal, dimana partikel padat dalam cairan dipisahkan dengan memutar tabung dalam lingkaran horizontal (gaya sentrifugal). Partikel padat (pelet) cenderung bergerak di sepanjang tabung yang rotasinya lebih besar, sedangkan partikel yang lebih ringan (supernatan) akan bergerak berlawanan (Daintith, 2008; Hatti-Kaul & Bo, 2003; Nollet, 2004). Pemisahan dengan alat *centrifuge* merupakan metode yang paling umum digunakan baik skala laboratorium (analisis) maupun skala industri (produksi) (Rutherford & Sarwar, 2009; Kim & Katarzyna, 2015; Adebisi et al., 2005; Nollet, 2004). Sentrifugasi selalu dilakukan pada suhu rendah yaitu 4°C untuk menghindari peningkatan suhu yang dapat mendegradasi senyawa target. Kemudian sentrifugasi dapat dilakukan pada kecepatan yang bervariasi tetapi umumnya untuk hasil hidrolisis protein (asam amino) dilakukan pada kecepatan 10000 ×g (Nollet, 2004).

b) Pengendapan (*Precipitation*)

Pengendapan merupakan proses pemisahan dimana suatu senyawa dalam suatu larutan bereaksi dengan agen presipitasi sehingga terbentuk gumpalan padat yang disebut sebagai endapan (Daintith, 2008). Dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino, kontaminan berupa makromolekul seperti protein atau peptida dapat dihilangkan dengan pelarut organik seperti PCA atau TCA (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Moughan et al., 1990; Chem et al., 1987). TCA merupakan agen presipitasi yang paling umum digunakan dan sudah terbukti efektif, tetapi mekanisme kerjanya masih belum diketahui dengan jelas (Sivaraman et al., 1997; Ciborowski & Silberring, 2016). Secara sederhana dapat dijelaskan bahwa penggunaan 5–40% larutan TCA menyebabkan ion negatif dari TCA mengganggu interaksi elektrostatik (berperan menstabilkan bentuk protein) sehingga protein mengalami *unfolding*. Proses *unfolding* tersebut menyebabkan permukaan protein (non-polar) dapat berinteraksi dengan pelarut sehingga terjadi proses pengendapan (Rajalingam et al., 2009; Sivaraman et al., 1997).

c) Penyaringan (*Filtration*)

Penyaringan merupakan proses pemisahan lanjutan setelah sentrifugasi atau pengendapan untuk memastikan bahwa pelet atau endapan benar-benar terpisah dari supernatan atau cairannya (Richard & Murray, 2009; Kim & Katarzyna, 2015). Metode penyaringan cukup beragam. Penyaringan paling sederhana dilakukan dengan kertas Whatman no. 4 yang memiliki ukuran pori sebesar 20–25 μm (Merck^b, 2022). Kemudian, terdapat metode penyaringan dengan menjaga tekanan absolut pada media saring tetap rendah menggunakan pompa vakum, sehingga terbentuk kekuatan untuk mendorong cairan melewati media saring lebih cepat dibanding penyaringan sederhana; metode ini disebut *vacuum filtration* dan umumnya menggunakan kertas Whatman no. 4 (Heldman & Carmen, 2011). Namun kedua metode penyaringan tersebut kurang cocok untuk memisahkan asam amino dari senyawa lain karena molekul asam amino memiliki ukuran (panjang atau lebar) yang beragam, umumnya sekitar 0.33–1.13 nm (Ching et al., 1989; Ainavarapu et al., 2007).

Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil yang lebih murni digunakan metode yang lebih spesifik seperti penyaringan dengan membran. *Membrane filtration* merupakan metode pemisahan secara mekanis dan kimia, yang digerakkan oleh tekanan serta menggunakan membran untuk menyaring molekul yang seukuran atau lebih kecil dari ukuran pori membran tersebut (Benjamin & Lawler, 2013 dalam Babu, 2016). Selain metode tersebut, terdapat metode penyaringan yang tidak hanya dilakukan untuk memisahkan padatan dan cairan, tetapi juga dapat memisahkan senyawa berdasarkan berat molekulnya; metode ini disebut sebagai ultrafiltrasi (Tiwari & Declan, 2015). Ultrafiltrasi merupakan metode penyaringan yang umum digunakan setelah proses hidrolisis dan ekstraksi (Kim & Katarzyna, 2015; Tiwari & Declan, 2015; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009; Armarego & Christina, 2009; Nollet, 2004).

d) Penguapan (*Evaporation*)

Penguapan merupakan proses perubahan wujud zat cair menjadi uap karena suhu zat cair melewati titik didihnya (Daintith, 2008). Metode ini umumnya digunakan untuk menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan yaitu pelarut dari hasil hidrolisis (Sikorski, 2001). Proses penguapan tidak harus melalui pemanasan jika pelarut mudah menguap di suhu ruang (titik didih $\leq \pm 25^{\circ}\text{C}$) seperti HCl 6N (Rostagno & Juliana, 2013). Namun, jika ada pelarut lain yang ditambahkan dan memiliki titik didih diatas suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) seperti fenol, maka perlu dilakukan proses pemanasan agar pelarut dapat menguap (Adebiyi, 2005).

2) Pengerinan (*Drying*)

Mirip dengan penguapan, pengeringan dilakukan untuk menghilangkan pelarut yang digunakan untuk hidrolisis melalui proses pemanasan dengan suhu yang relatif tinggi. Perbedaannya, tidak hanya pelarut yang hilang, tetapi konsentrasi air juga berkurang. Selain menghilangkan pelarut dan konsentrasi air, dengan melakukan pengeringan, hasil hidrolisis dapat disimpan beberapa hari bahkan beberapa bulan jika suhu penyimpanannya lebih rendah (Rutherford & Sarwar,

2009). Metode pengeringan cukup bervariasi, salah satu metode yang sering digunakan adalah *freeze drying*. *Freeze drying* (liofilisasi) merupakan metode pengeringan bahan dengan membekukan bahan terlebih dahulu, lalu hasilnya disublimasi sehingga air dalam bahan yang membeku berubah menjadi uap (Caballero, 2003). Metode ini diketahui mampu meminimalkan kerusakan *seaweed* akibat oksidasi dan pemanasan serta mampu mencegah perpindahan cairan dan zat terlarut selama pengeringan sehingga sebagian besar konsentrasi nutrisi dapat dipertahankan (Robic et al., 2008). Namun metode ini lebih cocok digunakan untuk skala kecil (laboratorium) karena waktu proses lama serta energi dan biaya yang dibutuhkan tinggi (Hsu et al., 2003).

Kemudian, hal yang perlu diperhatikan dalam proses pengeringan adalah penggunaan suhu tinggi dan waktu proses yang lama dapat memengaruhi karakteristik senyawa target (degradasi atau kerusakan senyawa). Oleh karena itu, proses pengeringan disarankan menggunakan metode dengan suhu yang lebih rendah serta proses yang lebih cepat (Rostagno & Juliana, 2013). Salah satu metode yang dapat memenuhi dua syarat tersebut adalah metode *vacuum drying* (Bhandari et al., 2013). *Vacuum drying* merupakan proses pengeringan dengan menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik didih air menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013). Metode ini cukup sering digunakan setelah proses hidrolisis, namun memiliki biaya operasi yang relatif tinggi (Adebiyi et al., 2005; Tello–Ireland et al., 2011 dalam Gressler et al., 2010). Metode pengeringan lain yang juga biasa digunakan dan relatif lebih murah adalah metode *convective (air) drying* yaitu pengeringan dengan udara panas dan kering yang dialirkan ke ruang pengering dengan kecepatan yang dapat diatur untuk menguapkan konsentrasi air dalam bahan dan menghilangkan uap air dari permukaan bahan (Gressler et al., 2010; Berk, 2009). Namun pengeringan dengan metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama tetapi tidak selama *freeze drying*, dan suhu yang digunakan cukup tinggi tetapi tidak setinggi pengeringan dengan suhu tinggi yang lain. Pengeringan ini dapat menyebabkan panas berlebih, tetapi

dapat diatasi dengan mengontrol suhu dan kecepatan aliran udara (Jacob–Lopes et al., 2020; Gressler et al., 2010).

3) Pelarutan (*Dissolving*) & Pengenceran (*Dilution*)

Proses pelarutan dilakukan setelah proses penghilangan pelarut pada hasil hidrolisis atau sebelum asam amino dianalisis (Sikorski, 2001). Hasil hidrolisis umumnya dilarutkan ke dalam *buffer* natrium sitrat pH 2.2 (Adebiyi et al., 2005). Hal ini dilakukan untuk mengkondisikan senyawa sebelum atau sesudah dihidrolisis agar hasil analisis tepat (Sikorski, 2001). Berbeda dengan proses pelarutan, pengenceran merupakan proses menambahkan sejumlah volume air atau pelarut pada larutan, agar konsentrasinya berkurang (lebih encer) (Daintith, 2008). Pengenceran perlu dilakukan jika akan dianalisis dengan prinsip kromatografi (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998; Adebiyi et al., 2005). Pengenceran juga dilakukan untuk membantu proses pemisahan kontaminan dari hasil hidrolisis dengan metode sentrifugasi atau penyaringan (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998).

4) Penetralkan (*Neutralization*)

Penetralkan merupakan proses dimana senyawa asam bereaksi dengan senyawa basa atau sebaliknya membentuk senyawa netral berupa garam dan air (Daintith, 2008). Penetralkan juga sering dilakukan setelah hidrolisis karena pelarut yang paling umum digunakan adalah asam (Sikorski, 2001; Adebiyi et al., 2005; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Namun sebenarnya penetralkan tidak harus selalu dilakukan setelah *acid hydrolysis*, karena beberapa pelarut asam dapat menguap pada suhu ruang. Penambahan larutan basa untuk menetralkan pelarut asam yang mudah menguap kurang efisien karena secara tidak langsung menambah biaya yang tidak perlu (Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Namun, dalam proses pengembangan produk yang memanfaatkan rasa *umami* dari asam glutamat, penetralkan wajib dilakukan karena pada pH rendah rasa *umami* tidak terasa sehingga perlu dinetralkan sehingga menjadi bentuk garam (glutamat). Nantinya, saat diaplikasikan atau dilarutkan dalam air, ion–ion akan terpisah, dan ion glutamat inilah yang dapat menghasilkan rasa umami (de Man et al., 2018; Ronzio, 2003; Mouritsen & Klavs, 2014).

1.2.3. Analisis Asam Glutamat

Proses setelah senyawa target diperoleh tergantung pada tujuan proses ekstraksi senyawa tersebut. Pada skala laboratorium, umumnya dilanjutkan dengan proses analisis senyawa baik secara kualitatif atau kuantitatif, sedangkan pada skala industri senyawa target dapat langsung menjadi produk akhir atau dapat digunakan untuk bahan produksi. Meskipun begitu, biasanya proses analisis tetap dilakukan untuk mengontrol kualitas dan kuantitas senyawa tersebut selama proses produksi (Rostagno & Juliana, 2013). Pemilihan metode analisis dapat dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa hal, seperti rekomendasi organisasi internasional serta jika terdapat beberapa metode maka pilih berdasarkan kehandalannya dalam menganalisis senyawa target (Greenfield & Southgate, 2003). Kehandalan suatu metode analisis berkaitan dengan penerapan, spesifisitas, akurasi, presisi, serta sensitivitas (Greenfield & Southgate, 2003).

Metode yang dipilih harus dapat diterapkan untuk menganalisis senyawa target secara lengkap (artinya karakteristik bahan tertentu tidak akan mengganggu) dan tepat (artinya meskipun ada senyawa lain tapi tidak terpengaruh). Kemudian, metode yang dapat diterapkan pada konsentrasi tinggi mungkin tidak dapat diterapkan pada konsentrasi rendah, demikian juga suatu metode mungkin berlaku untuk satu bahan tertentu (misalnya hewani) tetapi tidak sesuai untuk yang lain (misalnya nabati). Oleh karena itu, hal-hal tersebut perlu dicek terlebih dahulu sebelum menentukan metode analisis apa yang akan digunakan. Selanjutnya, spesifisitas adalah kemampuan suatu metode untuk merespon secara khusus terhadap suatu senyawa tertentu. Banyak metode yang "semi spesifik" dan dapat diterima jika tujuan melakukan analisis adalah mengukur semua senyawa serupa dalam suatu kelompok, contohnya seperti asam amino (Greenfield & Southgate, 2003).

Kemudian, akurasi didefinisikan sebagai kedekatan nilai hasil analisis dengan nilai standar. Perbedaan antara nilai hasil analisis dan nilai standar merupakan hal yang wajar. Hal ini disebabkan karena nilai standar bersifat hipotesis, dimana nilai standar senyawa gizi dalam makanan sebenarnya tidak diketahui secara pasti. Namun menurut beberapa peneliti, nilai standar untuk semua konstituen dalam sampel makanan tetap ada dan tidak benar bahwa nilai hasil analisis yang ditentukan dari suatu bahan tertentu dianggap sebagai untuk semua bahan sejenis, artinya nilai standar bukan diperoleh dari penelitian

umum (berbagai senyawa atau bahan) tetapi dari proses penelitian yang lebih spesifik dan terkontrol. Batas kepercayaan terhadap suatu nilai hasil analisis ditentukan berdasarkan sampel yang digunakan serta kelebihan dan kekurangan dari metode yang digunakan. Selain itu, presisi atau tidaknya hasil analisis dapat diketahui dengan pengulangan analisis (minimal 10 kali) dari bahan yang sama dan menghitung simpangan baku relatif (Buttner et al. 1975 dalam Greenfield & Southgate, 2003).

Selama 50 tahun terakhir, perkembangan metode analisis asam amino tidak terlalu banyak. Umumnya pengembangan metode analisis berkaitan pengurangan waktu analisis, penyederhanaan metode, dan pengurangan variabilitas data (Rutherford & Sarwar, 2009). Terdapat dua metode analisis asam amino yang dapat digunakan yaitu metode elektroforesis dan kromatografi, tetapi yang paling populer adalah metode kromatografi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Kromatografi merupakan metode analisis suatu campuran dengan cara memisahkan komponen-komponen dalam campuran tersebut (Syed, 2010; Daintith, 2008). Metode analisis dengan kromatografi merupakan penemuan yang cukup besar karena saat ini metode kromatografi sudah digunakan dalam berbagai industri, termasuk industri pangan meskipun penggunaannya tidak sebesar bidang lain, khususnya bioteknologi (Rutherford & Sarwar, 2009; Syed, 2010). Berikut beberapa jenis metode kromatografi yang digunakan untuk analisis asam amino, termasuk asam glutamat dari bahan pangan.

a. Kromatografi Cair (*Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair (LC) merupakan metode analisis yang kuat yang digunakan untuk pemisahan suatu campuran kompleks (McSweeney & John, 2022). Metode ini umumnya digunakan untuk menganalisis senyawa yang tidak mudah menguap atau yang tidak dapat dianalisis dengan kromatografi gas (*gas chromatography* atau GC) (Waldron, 1989). Kromatografi cair (LC) terdiri dari berbagai jenis metode yang berbeda. Berdasarkan penggunaan fase gerak cair, metode kromatografi digolongkan menjadi *paper chromatography* (PC), *thin layer chromatography* (TLC), *ion chromatography* (IC), dan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Selain itu, berdasarkan mekanismenya, metode kromatografi digolongkan menjadi *adsorption chromatography*, *ion exchange chromatography* (IEC), *size exclusion*

chromatography (SEC), *affinity chromatography*, serta *ion pair chromatography* (IPC) (Siegel et al., 2013). Kemudian, kromatografi cair (LC) merupakan metode yang paling sering digunakan untuk analisis protein dan asam amino (Ciborowski & Silberring, 2016). Berikut beberapa jenis metode yang tergolong dalam kromatografi cair dan umum digunakan untuk analisis asam amino.

1) Kromatografi Pertukaran Ion (*Ion Exchange Chromatography*)

Kromatografi pertukaran ion (IEC) termasuk salah satu metode kromatografi tertua (Valko, 2020). Sebelum metode ini ditemukan, analisis komponen asam amino dilakukan dengan metode kolorimetri atau uji mikrobiologi. Hasil dari kedua metode tersebut memang dapat diterima, tetapi saat metode kromatografi ditemukan oleh Moore dan Stein (1948), metode lama tersebut hampir tidak pernah digunakan lagi (Greenfield & Southgate, 2003). Kromatografi pertukaran ion (IEC) merupakan salah satu metode kromatografi dengan kemampuan pemisahan yang sangat kuat dan paling sering digunakan dalam bidang pangan (mulai penelitian hingga pengolahan), serta paling umum digunakan untuk analisis dan pemurnian protein dan asam amino (Syed, 2010; Jagschies et al., 2017). Metode IEC dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan jenis metode yang lain jika ingin tingkat kemurnian senyawa yang lebih tinggi, yang nantinya dapat dimanfaatkan lebih lanjut (Worsfold et al., 2019). Metode IEC memiliki prinsip kerja dimana senyawa target dipisahkan berdasarkan perbedaan muatan ion yang dapat dimodulasi oleh pH dan kekuatan (konsentrasi) ion dalam larutan atau fase gerak (Syed, 2010; Wei & Sangamesh, 2020; Ciborowski & Silberring, 2016). Ion pada permukaan molekul senyawa akan mengalami interaksi elektrostatik dengan ion yang menempel pada fase diam, gaya tolak menolak antar ion akan muncul jika muatannya sejenis, tetapi gaya tarik menarik akan muncul jika muatannya berlawanan (Jagschies et al., 2017).

Dalam metode ini, fase diam yang digunakan berupa resin penukar ion yang terbuat dari berbagai kopolimer (dua atau lebih monomer berbeda yang disatukan) organik sintetik atau anorganik, polisakarida yang terikat silang, serta ligan yang bermuatan positif atau negatif (Ciborowski & Silberring, 2016; Daintith, 2008). Berdasarkan

jenis resin penukar ion yang digunakan, metode IEC dikelompokkan menjadi *anion exchange chromatography* (AEC) dan *cation exchange chromatography* (CEC) (Fanali et al., 2017). Metode AEC digunakan jika senyawa yang diinginkan menghasilkan ion negatif (anion) ketika diionisasi, seperti asam glutamat dan asam aspartat (Wei & Sangamesh, 2020). Oleh karena itu, dalam metode AEC, resin penukar ion yang digunakan adalah resin yang memiliki ion positif (resin kation atau penukar anion) (Daintith, 2008; Valko, 2020). Kemudian, metode CEC digunakan jika senyawa yang diinginkan menghasilkan ion positif (kation) ketika diionisasi, seperti histidin, lisin, dan arginin (Wei & Sangamesh, 2020). Berbeda dengan metode AEC, resin penukar ion yang digunakan dalam metode CEC adalah resin yang memiliki ion negatif (resin anion atau penukar kation) (Daintith, 2008; Valko, 2020). Kemudian, kemampuan resin untuk menukar (menyerap) ion dibagi menjadi 2 yaitu kuat dan lemah. Resin kation yang kuat mengandung gugus $N(CH_3)^{3+}$ (amonium kuarterner) dan resin anion yang kuat mengandung gugus SO_3^- (sulfonat), sedangkan resin kation yang lemah mengandung gugus amina tersier atau sekunder dan resin anion yang lemah mengandung gugus asam karboksilat atau fosfonat (Valko, 2020). Resin yang sering digunakan yaitu stirena–divinilbenzena (tinggi = 1–5 mEq/g) atau silika (sedang = 0.3–1 mEq/g). Pembentukan ion pada resin penukar ion dipengaruhi oleh pH fase gerak (Valko, 2020).

Selanjutnya, fase gerak dalam metode ini berupa cairan (larutan *buffer*) karena dalam proses ini dibutuhkan proses pembentukan ion (ionisasi) (Ciborowski & Silberring, 2016). Larutan *buffer* digunakan karena pH fase gerak merupakan faktor yang penting dalam metode IEC, khususnya berkaitan dengan pembentukan ion pada resin penukar ion (Ciborowski & Silberring, 2016; Valko, 2020). Ion pada resin dengan kemampuan yang kuat dapat terbentuk sempurna saat *buffer* memiliki rentang pH 2–12, sedangkan ion pada resin dengan kemampuan yang lemah dapat terbentuk hanya saat *buffer* memiliki pH rendah (asam). Secara umum, resin penukar ion yang kuat lebih sering digunakan karena ion pada resin dapat terbentuk pada fase gerak (*buffer*) dengan rentang pH yang luas (Valko, 2020). Selain itu pH fase gerak (*buffer*) umumnya berada pada kisaran mendekati normal hingga basa, bukan asam. Fase gerak pada metode AEC umumnya memiliki pH 8.5, sedangkan

fase gerak pada metode CEC memiliki pH 6.5 (Ciborowski & Silberring, 2016). *Buffer* yang sering digunakan dalam metode IEC adalah *buffer* Tris, fosfat, asam asetat, atau trietanolamin (Abbott & Ellison, 2008). Selain itu, kuat lemahnya interaksi elektrostatik juga dipengaruhi oleh kekuatan ionik (konsentrasi ion) *buffer* yang digunakan pada fase gerak. Umumnya, interaksi elektrostatik menjadi sangat kuat jika kekuatan ionik *buffer* rendah (10–100 mM; umumnya sekitar 25 mM) (Jagschies et al., 2017; Ciborowski & Silberring, 2016; Valko, 2020). Perubahan konsentrasi *buffer* menjadi lebih tinggi (mencapai 1.5 M) dan perubahan pH dibutuhkan hanya saat molekul yang terikat pada resin penukar ion akan dielusi (dipisahkan atau dicuci) dari kolom setelah proses pemisahan selesai (Ciborowski & Silberring, 2016; Fanali et al., 2017).

2) Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) merupakan teknik pemisahan sekaligus analisis campuran yang sensitif, dimana sampel dipaksa melalui kolom (fase diam) di bawah tekanan (Daintith, 2008). HPLC merupakan konversi pertama dari metode kromatografi cair tradisional yang mulai dikembangkan pada akhir tahun 1960–an. Pengembangan ini dilakukan karena metode kromatografi cair tradisional (metode LC–MS awal; kombinasi kromatografi cair dan spektrofotometri massa) memiliki kekurangan yaitu efektivitas kolom (fase diam) rendah dan prosesnya membutuhkan waktu yang lama (Galluzzi & Guido, 2014). Penemuan metode HPLC diketahui dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) dan meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) sehingga metode ini menggeser penggunaan metode IEC (awal) sejak tahun 1990 (Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Waktu analisis diketahui berkurang dari 16 jam (metode IEC awal) menjadi hanya 1–2 jam (HPLC atau kombinasi) (Rutherford & Sarwar, 2009).

Saat ini, HPLC menjadi metode pemisahan sekaligus analisis campuran yang paling sering digunakan (Dabrowski, 1999). Hal ini disebabkan karena HPLC cocok diaplikasikan pada berbagai proses, seperti penelitian produk, kontrol kualitas, pelabelan nutrisi, dan deteksi senyawa aditif dan kontaminan. Selain itu, jumlah

sampel yang dapat digunakan dalam metode ini sangat bervariasi, mulai dari picogram dan nanogram (skala analitik), mikrogram dan miligram (skala semipreparatif), hingga multigram (skala preparatif). Kemudian, metode HPLC dapat digunakan untuk berbagai jenis sampel, mulai dari ion dan molekul organik kecil hingga biomolekul dan polimer besar. Penggunaan metode HPLC memungkinkan analisis berbagai senyawa dengan sifat atau karakteristik yang berbeda, misalnya senyawa dengan kisaran polaritas yang luas dapat dianalisis dalam sekali proses. Metode ini juga cocok untuk senyawa yang mudah terdegradasi karena suhu tinggi, karena proses analisis dilakukan pada atau sedikit di atas suhu lingkungan (Zhong & Xichang, 2019).

Prinsip kerja dari metode HPLC yaitu fase gerak dilewatkan dengan tekanan tinggi pada kolom (fase diam) yang memiliki senyawa adsorben. Fase diam tersebut akan menyerap senyawa tertentu tergantung dari senyawa adsorben yang digunakan. Senyawa adsorben yang berbeda akan memiliki perbedaan gaya ikat dan kinetika penyerapan sehingga pemilihan kolom dapat memengaruhi senyawa yang diperoleh (Dabrowski, 1999; Babar, 2019). Fase diam dalam metode ini berupa serbuk halus yang disebut sebagai kolom fase normal. Kolom fase normal bersifat polar (biasanya berupa alumina atau silika) yang dapat menahan senyawa polar lebih lama dibanding senyawa non-polar. Kolom ini digunakan ketika fase gerak berupa senyawa non-polar, biasanya pelarut organik seperti heksana, tetrahidrofur, atau iso-oktana (Waldron, 1989). Kemudian, umumnya fase diam untuk metode HPLC harus memiliki luas permukaan atau satuan volume yang tinggi, ukuran dan bentuk yang merata, serta tahan terhadap kerusakan mekanis dan kimia. Hal inilah yang menyebabkan biaya operasional metode ini tinggi. Dalam skala analisis, biaya operasional yang tinggi masih bisa diterima, tetapi dalam skala yang lebih besar (preparatif) biaya operasional yang tinggi dapat menyebabkan harga produk akhir menjadi terlalu tinggi. Keterbatasan HPLC tersebut telah diminimalkan dengan perkembangan kromatografi baru-baru ini, seperti kromatografi cair protein cepat (FPLC) yang merupakan salah satu varian dari HPLC yang diketahui lebih cocok untuk proses pemurnian skala besar (Stanbury et al., 2016; Zhong & Xichang, 2019).

3) Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik (*Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik (RP-HPLC) merupakan salah satu perkembangan dari metode HPLC yang juga mendukung penggantian metode IEC, dimana karakteristik fase diam (kolom) dan fase geraknya berkebalikan dengan metode HPLC fase normal. Kolom fase terbalik (*reverse phase column*) digunakan ketika fase gerak berupa senyawa polar karena kolom tersebut memiliki sifat non-polar dan dapat menahan senyawa non-polar lebih lama dibanding senyawa polar. (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Waldron, 1989; Makowski, 2019). Penggunaan kolom fase terbalik dapat mengurangi lebih banyak waktu analisis dibandingkan IEC dan HPLC fase normal, yaitu menjadi kurang dari 1 jam (Rutherford & Sarwar, 2009; Makowski, 2019). Selain itu, metode RP-HPLC cocok digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih kecil (sekitar 20 senyawa) dalam satu kali proses, khususnya memisahkan senyawa non polar dan polar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Vekey et al., 2008). Selain itu, metode ini dapat digunakan untuk analisis berbagai jenis senyawa, salah satunya sangat umum digunakan untuk analisis komponen protein seperti peptida dan asam amino karena dapat terpisah dengan baik (Caballero et al., 2016; Wilson, 2000; Vekey et al., 2008; Caballero, 2003).

Prinsip kerja dari metode RP-HPLC yaitu pemisahan senyawa dalam fase gerak berdasarkan perbedaan tingkat hidrofobisitas (Misra, 2011; Caballero, 2003). Pelarut dan senyawa polar dalam fase gerak berinteraksi (tarik menarik) secara kuat selama melewati kolom, sedangkan pelarut dan senyawa polar tersebut tidak berinteraksi secara kuat dengan rantai hidrokarbon yang terikat pada silika atau fase diam. Oleh karena itu, senyawa polar akan segera melewati kolom, sedangkan senyawa non-polar yang tidak berinteraksi dengan pelarut polar akan berinteraksi dengan fase diam. Akibatnya senyawa non-polar akan lebih lama tertahan di kolom (Mukherjee, 2015). Kuat dan lemahnya interaksi tersebut dipengaruhi oleh afinitas (kemampuan untuk berikatan) senyawa hidrofobik dalam fase gerak selama melewati fase diam. Asam amino hidrofobik (non-polar) seperti asam amino

aromatik (fenilalanin, triptofan, alanin) dan alifatik (glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin) akan tertahan dalam kolom lebih lama dibandingkan asam amino polar (asparagin, glutamin, prolin, serin, treonin, sistein) (Misra, 2011).

Fase diam (kolom) dan fase gerak (pelarut) yang digunakan dalam metode RP-HPLC cukup bervariasi (Shen, 2019). Fase diam yang digunakan umumnya berupa silika atau polimer organik sintetik yang mengandung atau ditutup dengan rantai alkil yang terikat secara *kovalen* dan memiliki panjang yang bervariasi, yaitu oktadesil (C₁₈), oktil (C₈), fenil (C₆), atau butil (C₄) (Caballero, 2003; Waldron, 1989; Ciborowski & Silberring, 2016; Shen, 2019). Semakin panjang rantai alkil (jumlah C) maka interaksi kolom dengan senyawa non-polar semakin kuat (Caballero, 2003). Oleh karena itu untuk memilih fase diam, perlu diketahui terlebih dahulu seberapa besar hidrofobisitas senyawa target. Jika hidrofobisitas senyawa target tinggi tetapi kolom yang digunakan hidrofobisitasnya tidak sebanding, maka proses interaksinya tidak akan berjalan optimal sehingga pemisahan menjadi kurang efisien (Ciborowski & Silberring, 2016). Hal ini juga yang menyebabkan kolom C₁₈ dan C₈ lebih sering dan umum digunakan (Waldron, 1989; Shen, 2019). C₁₈ sering disebut "matriks fase terbalik tradisional" karena memiliki tingkat hidrofobisitas tertinggi, sedangkan C₈ dengan hidrofobisitas yang lebih rendah digunakan ketika waktu retensi (waktu untuk melewati kolom) yang lebih pendek diinginkan (Shen, 2019). Kekurangan dari kolom fase terbalik adalah meskipun jenisnya sama, kolom dari produsen yang berbeda dapat menghasilkan selektivitas yang berbeda karena terdapat perbedaan bahan kimia dalam pembuatan kolom-kolom tersebut (Caballero et al., 2016).

Dalam metode RP-HPLC, fase gerak berupa pelarut polar seperti air dan/atau pelarut organik (polar) seperti asetonitril dan metanol (Shen, 2019; Waldron, 1989; Caballero et al., 2016). Kombinasi air (pelarut polar) dan asetonitril (pelarut organik) sering digunakan sebagai fase gerak dalam metode ini (Vekey et al., 2008). Pelarut polar memiliki kemampuan melarutkan senyawa polar yang tinggi, sedangkan penambahan pelarut organik pada fase gerak dapat menurunkan polaritas yang menyebabkan interaksi hidrofobik antara fase diam dan senyawa

non-polar dalam fase gerak juga menurun, sehingga senyawa non-polar tersebut dapat terelusi dari kolom (Ciborowski & Silberring, 2016). Kombinasi air-asetonitril ini biasanya digunakan mulai dari kadar air yang lebih tinggi (misal 90%), kemudian seiring berjalannya proses, kadar asetonitril meningkat hingga 100% (Vekey et al., 2008). Proses tersebut disebut sebagai elusi (pencucian senyawa dari kolom) gradien yang biasanya digunakan untuk analisis profil lengkap asam amino (Caballero et al., 2016). Konsentrasi pelarut organik yang lebih besar dibutuhkan untuk mengelusi senyawa non-polar ketika jumlah senyawa non-polar yang berinteraksi dengan fase diam lebih kuat (Ciborowski & Silberring, 2016).

4) Kromatografi Cair Kinerja Ultra (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair kinerja ultra (UPLC) merupakan pengembangan dari metode HPLC dan RP-HPLC, yang mulai digunakan sejak sekitar satu dekade yang lalu (Galluzzi & Guido, 2014; Rutherford & Sarwar, 2009; Atta-ur-Rahman, 2021). Pengembangan metode kromatografi cair terus dilakukan karena kromatografi cair memiliki koefisien difusi yang lebih rendah dibandingkan kromatografi gas yang berakibat pada lambatnya difusi senyawa dalam fase gerak ke fase diam (Taleuzzaman et al., 2015). Oleh karena itu, UPLC diciptakan dengan tujuan utama yaitu untuk mempercepat proses analisis dengan mengatur ukuran partikel dalam fase diam (Taleuzzaman et al., 2015; Chawla & Chanda, 2016). Metode UPLC sudah cukup banyak digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif di berbagai bidang termasuk pangan, karena alat dan komponen sistemnya sudah tersedia secara komersial, waktu proses singkat, dan hasil yang diperoleh juga tinggi, dimana metode ini sangat cocok untuk analisis campuran kompleks seperti asam amino (Taleuzzaman et al., 2015; Chawla & Chanda, 2016; Fanali et al., 2017).

Salah satu kelebihan yang menonjol dari metode ini adalah waktu proses yang lebih cepat dibandingkan metode HPLC dan RP-HPLC yaitu kurang dari 30 menit (Taleuzzaman et al., 2015; Makowski, 2019). Selain waktu proses yang lebih cepat, penggunaan UPLC untuk analisis diketahui meningkatkan sensitivitas, resolusi (daya pisah), serta kapasitas atau retensi secara signifikan dibandingkan HPLC dan

RP-HPLC (Galluzzi & Guido, 2014). Selain itu dengan menggunakan UPLC, volume fase gerak (*buffer* atau pelarut) yang digunakan dapat berkurang atau lebih sedikit dibanding menggunakan HPLC dan RP-HPLC, sehingga biaya analisis dapat berkurang sekaligus lebih ramah lingkungan (Chawla & Chanda, 2016; Taleuzzaman et al., 2015). Meskipun penggunaan *buffer* atau pelarut lebih sedikit tetapi laju aliran tetap lebih cepat dibanding metode kromatografi cair yang lain (Fanali et al., 2017).

Prinsip kerja dari metode UPLC hampir sama dengan HPLC atau RP-HPLC tetapi senyawa dalam fase gerak berukuran lebih kecil ($<2\mu\text{m}$) dibandingkan ukuran senyawa pada umumnya (Taleuzzaman et al., 2015). Ukuran senyawa yang lebih kecil (misal $\frac{1}{3}$ dari ukuran awal) diketahui dapat mengurangi panjang kolom yang digunakan hingga $\frac{1}{3}$ dari ukuran awal, meningkatkan laju perpindahan (koefisien difusi) hingga 3 kali lipat dari laju awal, serta mempercepat proses hingga $\frac{1}{9}$ dari waktu proses secara umum (Chawla & Chanda, 2016). Kemudian, agar alat dapat bekerja dengan baik, senyawa dalam fase gerak perlu dipompa dengan tekanan yang sangat tinggi dengan tujuan untuk mempertahankan laju perpindahan agar senyawa bergerak secara stabil melewati fase diam (Chawla & Chanda, 2016; Attaur-Rahman, 2021). Fase diam yang biasa digunakan pada HPLC atau RP-HPLC tidak dapat digunakan untuk senyawa yang lebih kecil karena dapat menyebabkan kerusakan pada fase diam, dimana tekanan yang digunakan pada metode UPLC melebihi kapasitas fase diam HPLC atau RP-HPLC ($40\text{ MPa} = 400\text{ bar} = 5801.51\text{psi}$ atau 6000 psi) untuk menahan tekanan (Taleuzzaman et al., 2015; Chawla & Chanda, 2016). Oleh karena itu, analisis senyawa kecil ($<2\mu\text{m}$) dengan metode UPLC umumnya menggunakan fase diam khusus yang diketahui dapat menahan tekanan hingga 100 MPa (1000bar atau $1034.214\text{bar}=14503.8\text{psi}$ atau 15000 psi). Dengan menggunakan fase diam tersebut, proses pemisahan dapat berjalan dan meningkat secara signifikan sehingga proses dapat selesai lebih cepat (Taleuzzaman et al., 2015; Rutherford & Sarwar, 2009; Chawla & Chanda, 2016).

Fase diam (kolom) yang digunakan dalam metode UPLC hampir sama dengan HPLC dan RP-HPLC (C_{18} , C_8 , C_6) tetapi ukuran senyawa kolom lebih kecil yaitu sekitar 1.7–1.9 μm (Taleuzzaman et al., 2015; Atta–ur–Rahman, 2021). Kemudian, pilihan kolom UPLC juga bervariasi seperti HPLC atau RP-HPLC. Hal ini disebabkan karena teknologi pembuatan senyawa kecil yang digunakan untuk mengemas kolom cukup beragam, yaitu *charged surface hybrid* (CSH), *ethylene bridged hybrid* (BEH), *high strength silica* (HSS), dan *peptide separation* (PST). Setiap jenis kolom memiliki kelebihan masing–masing, tetapi secara umum semua kolom dapat mempercepat waktu proses serta meningkatkan sensitivitas, resolusi (daya pisah), retensi atau kapasitas pemisahan, dan hasil akhir analisis (Chawla & Chanda, 2016). Pada fase gerak, senyawa yang lebih kecil dapat menyebabkan peningkatan tekanan yang berefek pada peningkatan faktor retensi atau kapasitas pemisahan (Chawla & Chanda, 2016). Kemudian, volume *buffer* atau pelarut yang lebih sedikit dapat menghasilkan efisiensi lebih tinggi dan peningkatan resolusi (daya pisah) (Chawla & Chanda, 2016). Meskipun kolom dan *buffer* untuk UPLC sudah tersedia secara komersial namun seringkali masih perlu dimodifikasi dan dioptimalkan agar lebih efisien (Makowski, 2019). Efisiensi metode UPLC dapat ditingkatkan dengan melakukan pemanasan pada fase gerak atau fase diam. Tujuan pemanasan kedua fase tersebut sama, yaitu mengurangi viskositas *buffer* atau pelarut dalam fase gerak agar laju perpindahan senyawa meningkat dan tekanan pada fase diam dapat berkurang secara signifikan (Taleuzzaman et al., 2015).

Dalam proses analisis menggunakan kromatografi cair (LC), terdapat proses derivatisasi serta deteksi senyawa target. Derivatisasi (*derivatization*) merupakan proses perubahan senyawa tertentu menjadi senyawa lain yang serupa dengan senyawa awal, hasil perubahan disebut sebagai senyawa turunan (*derivate*). Derivatisasi dalam kromatografi cair (LC) dilakukan dengan tujuan untuk membuat senyawa target lebih hidrofobik agar dapat terpisah dari senyawa lain dengan baik, hasil pemisahan dapat dideteksi secara spektroskopi dengan ultraviolet (prinsip absorbansi) atau fluoresen (prinsip fluoresensi), serta dapat meningkatkan batas deteksi (sensitivitas atau spesifisitas) (Rutherford & Sarwar, 2009; Caballero et al., 2016; Caballero, 2003; Worsfold et al., 2005). Kemudian, terdapat 2 jenis metode derivatisasi, yaitu paska–

kolom (*pasca-column*) dan pra-kolom (*pre-column*). Berdasarkan sejarahnya, metode derivatisasi paska-kolom sudah dikembangkan terlebih dahulu sebelum metode derivatisasi pra-kolom (*pre-column*). Perbedaan kedua metode tersebut adalah waktu proses derivatisasi dilakukan. Dalam metode paska-kolom, derivatisasi dilakukan pada efluen atau residu yang dihasilkan setelah senyawa target melewati kolom dan sebelum proses deteksi, sedangkan dalam metode pra-kolom (*pre-column*), derivatisasi dilakukan pada fase gerak sebelum senyawa target melewati kolom (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

Setiap jenis metode derivatisasi menggunakan reagen yang berbeda dan dalam satu metode tertentu, pilihan reagen yang digunakan beragam, begitu juga batas deteksi asam amino pada setiap reagen. Dalam proses derivatisasi paska-kolom, derivatisasi dapat dilakukan dengan reagen ninhidrin (*ninhydrin*; batas deteksi = hingga 10 picomol kecuali prolin hanya 50 picomol) atau *o-phthalaldehyd* (OPA; 5–10 kali lebih sensitif dibanding ninhidrin) (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Kemudian, kelebihan dari metode derivatisasi paska-kolom adalah tidak terjadi reaksi samping, tidak perlu derivatisasi lengkap selama tingkat derivatisasi dapat dilanjutkan lagi jika dibutuhkan, dan turunannya tidak perlu stabil untuk bisa dideteksi. Namun kekurangannya yaitu pilihan kondisi reaksi terbatas, butuh alat untuk memasukan reagen, kemungkinan terjadi perluasan pita, waktu proses dari kolom ke detektor lebih panjang, dan kemungkinan terjadi gangguan karena reagen selama deteksi. (Rutherford & Sarwar, 2009). Selanjutnya, dalam proses derivatisasi pra-kolom, derivatisasi dapat dilakukan dengan reagen *phenyl isothiocyanate* (PITC/Pico-Tag; batas deteksi: ± 1 picomol), *6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate* (AQC/AccQ-Tag; batas deteksi: ± 40 –800 femtomol), *9-fluorenylmethyl chloroformate* (FMOC; batas deteksi: kisaran femtomol), atau kombinasi reagen OPA dan FMOC (batas deteksi: mendekati 1 picomol) (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009; Makowski, 2019). Kemudian, kelebihan dari metode derivatisasi pra-kolom adalah pilihan reagen dan kondisi reaksi lebih banyak, tidak ada batasan pada kinetika reaksi, serta memungkinkan terjadinya derivatisasi bertingkat. Namun kekurangan utamanya yaitu

adanya kemungkinan gangguan deteksi karena terjadi reaksi samping yang menghasilkan produk samping (Rutherford & Sarwar, 2009).

Hasil kromatografi cair umumnya dideteksi dengan suatu alat atau sistem yang disebut detektor. Berbeda dari detektor kromatografi gas, detektor kromatografi cair memiliki sensitivitas yang lebih rendah, sehingga terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan agar proses deteksi berjalan dengan baik (Worsfold et al., 2005; Caballero, 2003). Beberapa hal tersebut adalah desain detektor harus mencegah perluasan pita kromatografi untuk memastikan bahwa pemisahan yang dicapai pada kolom stabil hingga proses deteksi, serta waktu proses harus singkat dan hasil harus linier (stabil) pada rentang konsentrasi yang cukup luas (Caballero, 2003). Kemudian, jenis detektor sangat beragam, beberapa detector yang paling sering digunakan untuk analisis asam amino adalah detektor ultraviolet (UVD; *ultraviolet-visible detector/UV-VIS*), detektor fluoresensi (FLD), detektor spektrofotometri massa (MS; *tandem mass spectrometry/MS-MS*), atau detektor amperometrik (*pulsed amperometric detector/PAD*) yang termasuk dalam detektor elektrokimia (*electrochemical detector/ECD*) (Worsfold et al., 2005; Caballero, 2003; Grumezescu, 2018; Rutherford & Sarwar, 2009; Waldron, 1989; Chawla & Chanda, 2016; Robertson & Gordon, 2017).

b. Kromatografi Gas (*Gas Chromatography*)

Kromatografi gas (GC) merupakan metode pemisahan sekaligus analisis campuran senyawa kompleks berdasarkan volatilitas (titik didih atau tekanan uap) dan polaritas dari senyawa tersebut dengan bantuan aliran gas *inert* sebagai fase geraknya (Makowski, 2017; Staufefr et al., 2008; Wen et al., 2019). Metode ini ditemukan pada awal abad ke-20 tetapi tidak langsung dikembangkan karena penemu (Martin dan Synge) belum mengetahui fungsi dari metode GC. Pengembangan mulai dilakukan pada tahun 1952 ketika mereka mengetahui bahwa metode GC dapat digunakan untuk pemisahan asam lemak volatil (Staufefr et al., 2008). Dari penemuan tersebut, diketahui bahwa metode GC digunakan untuk pemisahan dan analisis senyawa volatil dan semi-volatile, serta dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif pada berbagai bidang termasuk bidang pangan (Atta-ur-Rahman, 2020; Dayal &

Devleena, 2017; Meyers, 2001). GC dikenal sebagai metode yang efektif, fleksibel, dan sensitif untuk analisis senyawa dalam bahan pangan, khususnya senyawa volatil (mudah menguap) seperti aroma dan rasa, dengan tujuan yang beragam seperti sebagai informasi, untuk pengembangan produk, atau mengontrol standar kualitas suatu produk (Pico, 2012; Sparkman et al., 2011).

Senyawa dalam bahan pangan yang dapat dianalisis dengan metode GC diantaranya asam amino dan peptida, asam lemak, serta karbohidrat, tetapi dengan syarat harus melalui proses derivatisasi terlebih dahulu karena senyawa tersebut secara umum bersifat polar dan tidak volatil; dengan derivatisasi gugus polar senyawa dapat diblokir sehingga volatilitas senyawa dapat meningkat (Meyers, 2001; Sparkman et al., 2011). Diantara senyawa yang disebutkan, metode GC paling sering digunakan untuk analisis asam amino karena sensitivitasnya relatif tinggi. Asam amino bersifat *zwitterionic* sehingga derivatisasi dua langkah diperlukan. Derivatisasi pertama dilakukan untuk memblokir fungsi asam (karboksi) melalui esterifikasi, sedangkan derivatisasi kedua dilakukan untuk mengasilasi gugus amino. Kemudian kelebihan lain dari metode GC yaitu dapat digunakan pada skala kecil (analisis) maupun skala besar (preparatif atau industri) meskipun relatif jarang digunakan. Senyawa yang dapat dianalisis dengan metode GC berukuran mikrogram (10^{-6} g) hingga nanogram (10^{-9} g), bahkan femtogram (10^{-15} g) dapat diukur dalam keadaan khusus (Meyers, 2001).

Peralatan kromatografi gas (GC) secara umum terdiri dari injektor, fase gerak, fase diam, detektor, dan unit pemrosesan data (Lees, 2003). Injektor berfungsi untuk mengirimkan sampel ke fase diam (Lees, 2003). Sampel yang digunakan berupa campuran cairan yang mudah menguap, yang diuapkan dan dialirkan oleh gas pembawa melalui fase diam (Daintith, 2008). Injektor yang digunakan dalam metode GC adalah injektor penguapan yang menggunakan suhu tinggi ($100\text{--}300^{\circ}\text{C}$) untuk menguapkan sampel cair dengan cepat, sehingga dapat bercampur dengan gas pembawa dan dapat dialirkan ke fase diam (Lees, 2003). Selanjutnya, seperti yang sudah disebutkan sebelumnya, fase gerak dalam metode ini adalah gas *inert* dengan kapasitas adsorpsi yang rendah atau dapat diabaikan seperti hidrogen, helium, atau nitrogen, dimana gas tersebut bertugas membawa sampel dari injektor melalui fase

diam menuju detektor (Caballero, 2003; Lees, 2003; Dayal & Devleena, 2017; Sparkman et al., 2011). Sifat gas yang dipilih dapat memengaruhi selektivitas pemisahan dan dapat mengubah sensitivitas detektor (Lees, 2003).

Kemudian, sebagian besar kolom yang digunakan dalam metode GC saat ini adalah kolom kapiler (Sparkman et al., 2011). Kolom kapiler terbuat dari kaca atau silikat dengan diameter bagian dalam yang sangat kecil yaitu antara 0.20–0.53mm dan panjang kolom sekitar 10–60m (Lees, 2003; Daintith, 2008). Fase diam pada kolom kapiler berbentuk lapisan tipis ($\pm 0.1\text{--}5\mu\text{m}$) yang berikatan silang dan terikat secara *kovalen* dengan dinding bagian dalam kolom. Retensi senyawa (waktu yang dibutuhkan senyawa untuk melewati kolom) sebanding dengan ketebalan lapisan tersebut dan ketebalan lapisan melambatkan jumlah fase diam dalam kolom kapiler (Lees, 2003). Kelebihan dari kolom kapiler adalah faktor retensi (kapasitas pemisahan) sangat tinggi sehingga dapat mencapai resolusi (daya pisah) yang optimal (puncak), atau dapat dikatakan kinerja pemisahan dengan kapiler lebih baik dari kolom kemas sehingga kolom kapiler lebih sering digunakan dalam metode GC (Lees, 2003).

Fase diam yang dapat digunakan dalam kolom ada 2 jenis yaitu berupa padatan (kromatografi gas–padat atau GSC) atau berupa cairan (kromatografi gas–cair atau GLC) (Caballero, 2003; Atta–ur–Rahman, 2020). Beberapa padatan yang dapat digunakan sebagai fase diam yaitu tanah diatom (*kieselguhr*), karbon hitam, atau manik–manik kaca, sedangkan cairan yang dapat digunakan yaitu cairan yang tidak mudah menguap, memiliki tekanan uap rendah, stabilitas tinggi, memiliki viskositas relatif rendah pada suhu analisis, selektif; serta dapat menyatu dengan dinding bagian dalam kolom yang mungkin *inert* (tidak mudah bereaksi) (Lees, 2003; Daintith, 2008). Salah satu contoh fase diam berupa cairan adalah minyak hidrokarbon (Daintith, 2008). Kemudian, prinsip kerja kedua jenis fase diam tersebut juga berbeda, dimana fase diam padat menggunakan prinsip adsorpsi dalam proses pemisahan, sedangkan pemisahan dengan fase diam cair berdasarkan kelarutan senyawa (Meyers, 2001). Selain itu, hal lain yang perlu diperhatikan yaitu alat yang digunakan (termasuk kolom) dalam metode GC harus dipanaskan dan dikontrol suhunya. Pada kolom, suhu dapat

diatur menjadi konstan atau gradien, tetapi penerapan suhu yang gradien dapat meningkatkan resolusi (daya pisah) kolom (Lees, 2003).

Mekanisme proses analisis dengan metode GC dimulai dengan injektor berisi sampel dipanaskan hingga menguap, lalu campuran senyawa dalam bentuk uap dibawa oleh gas *inert* (fase gerak) menuju kolom atau fase diam (). dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan kemampuan senyawa untuk berinteraksi dengan fase diam (Sparkman et al., 2011; Daintith, 2008). Senyawa yang tidak dapat berinteraksi atau interaksinya dengan fase diam lemah akan melewati kolom atau terelusi dengan cepat, sedangkan senyawa yang tertinggal dalam kolom akan dialirkan menuju detektor (Sparkman et al., 2011). Kemudian, seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, dalam proses analisis menggunakan kromatografi gas (GC) terdapat proses derivatisasi untuk meningkatkan volatilitas serta proses deteksi senyawa target.

Dalam metode GC, derivatisasi dilakukan sebelum analisis atau pra-kolom jika dilihat dari tujuannya untuk mengubah senyawa polar atau non-volatil menjadi produk yang relatif non-polar agar dapat menguap (Pawliszyn, 2012). Derivatisasi wajib dilakukan jika asam amino akan dipisahkan dan dianalisis dengan metode GC. Hal ini disebabkan karena asam amino merupakan *zwitter ion* (ion yang memiliki muatan positif dan negatif) yang terbentuk dari senyawa yang memiliki gugus asam (karboksil) dan basa (amino) secara bersamaan, dan asam amino juga mengandung berbagai senyawa polar yang mengandung gugus hidroksil, tiol, dan amino (Wilson, 2000; Daintith, 2008). Kemudian, reaktivitas asam amino berbeda-beda tergantung dari jenis senyawanya, oleh karena itu derivatisasi asam amino dalam metode GC cukup rumit (Wilson, 2000). Selanjutnya, prinsip kerja derivatisasi dalam metode GC, umumnya dapat dibagi menjadi 3 yaitu sililasi (*silylation*), asilasi (*acylation*), atau alkilasi (*alkylation*) (Carreira & Hisashi, 2012). Metode sililasi dan asilasi dapat digunakan untuk berbagai senyawa salah satunya asam amino, alkilasi lebih banyak digunakan untuk senyawa aromatik (Pawliszyn, 2012; Daintith, 2008).

Diantara kedua metode tersebut, sililasi merupakan metode yang paling umum digunakan untuk derivatisasi asam amino (Harris & Vernon, 2017). Sililasi merupakan

metode derivatisasi yang mengganti hidrogen asam atau aktif pada senyawa dengan gugus alkil seperti hidroksil, asam karboksilat, amina, tiol, dan fosfat yang menyebabkan senyawa menjadi kurang polar, lebih mudah menguap (volatil), dan lebih stabil terhadap panas. Reagen sililasi yang dapat digunakan cukup beragam. Secara umum, reagen dipilih berdasarkan reaktivitas dan selektivitas reagen terhadap senyawa, proses setelah derivatisasi, stabilitas dari turunan, serta sifat dan jumlah produk samping dari proses sililasi (Pawliszyn, 2012). Beberapa yang umum digunakan untuk derivatisasi asam amino adalah trimetilsilan (TMS), trimetilklorosilan (TMCS), heksanametildisilazana (HMDS), BSA (N,O-bis(trimetilsilil)-asetamida), BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroasetamida), atau MSTFA (N-metil-N-trimetil-silil-trifluoroasetamida) (Harris & Vernon, 2017; Pawliszyn, 2012).

Selanjutnya, berbeda dari detektor kromatografi cair, detektor kromatografi gas memiliki sensitivitas, batas deteksi atau konsentrasi minimum yang dapat dideteksi yang lebih tinggi (Worsfold et al., 2005). Mekanisme proses deteksi pada metode kromatografi gas yaitu senyawa dari kolom yang telah dilarutkan berinteraksi dengan detektor, lalu interaksi tersebut diubah menjadi sinyal listrik yang dikirim ke alat perekam atau penyimpanan data, dan selanjutnya kromatogram (hubungan intensitas sinyal dan waktu deteksi) dapat dibuat. Sama seperti kromatografi cair, detektor dalam kromatografi gas dipilih berdasarkan sensitivitas atau jumlah terendah senyawa target yang dapat dideteksi, serta selektivitas alat atau respon detektor terhadap senyawa target yang paling kuat terhadap senyawa target (Lees, 2003). Jenis detektor untuk kromatografi gas juga sangat beragam, tetapi yang paling sering digunakan adalah *flame ionization detector* (FID) dan spektrofotometri massa (MS; *tandem mass spectrometry*) (Atta-ur-Rahman, 2020).

1.3. Analisis Kesenjangan

Terdapat beberapa *review* yang sudah pernah dilakukan berkaitan dengan topik ekstraksi asam glutamat (*umami*). Jurnal *review* yang pertama berjudul "*Production & Purification of Glutamic Acid: A Critical Review*" (Kumar et al., 2014). Inti dari pembahasan jurnal tersebut yaitu mengenai potensi metode pemisahan baru berupa penyaringan dengan

membran (*membrane filtration*), yang dipercaya lebih ramah lingkungan untuk proses produksi monosodium glutamat (MSG). Penulis juga menyebutkan bahwa proses pemisahan (khususnya untuk pemurnian) sangat penting untuk dilakukan dalam proses produksi asam glutamat yang akan dijadikan penyedap (MSG). Menurutnya, beberapa metode pemisahan yang sering digunakan adalah ekstraksi, distilasi, evaporasi, dan sentrifugasi. Namun, pada bagian awal, penulis menjelaskan bahwa asam glutamat pada MSG yang beredar saat ini, diproduksi oleh bakteri melalui proses fermentasi sisa hasil pengolahan tebu (molase), bukan diambil dari bahan pangan yang kaya akan asam glutamat seperti *seaweed*.

Jurnal *review* selanjutnya berjudul “*Bioactive Peptides and Carbohydrates from Seaweed for Food Applications: Natural Occurrence, Isolation, Purification, and Identification*” (Lafarga et al., 2020). Inti dari pembahasan jurnal tersebut yaitu mengenai potensi *seaweed* sebagai sumber senyawa bioaktif berupa peptida dan karbohidrat untuk diaplikasikan pada produk pangan fungsional. *Review* diawali dengan membahas konsentrasi protein, komposisi asam amino, dan konsentrasi karbohidrat dalam *seaweed*. Kemudian dilanjutkan dengan membandingkan proses analisis yang meliputi proses pemurnian dan identifikasi senyawa bioaktif, serta membahas pengaruhnya terhadap aktivitas dan konsentrasi senyawa bioaktif tersebut. *Review* yang disusun oleh Lafarga dan kawan-kawan (2020) dapat dikatakan serupa dengan topik yang akan dibahas pada *review* ini, dimana keduanya sama-sama membahas tentang pemanfaatan *seaweed* sebagai sumber senyawa tertentu untuk dikembangkan menjadi suatu produk pangan. Namun senyawa yang akan dibahas pada *review* ini bukan senyawa bioaktif melainkan asam glutamat yang berperan sebagai komponen utama dari rasa *umami* yang akan digunakan sebagai bahan utama bumbu penyedap.

Jurnal *review* yang terakhir berjudul “*Umami Taste in Edible Seaweeds: the Current Comprehension and Perception*” (Milinovic et al., 2021). Inti dari pembahasan jurnal tersebut yaitu mengenai rasa *umami* yang dihasilkan oleh *edible seaweed*. *Review* diawali dengan membahas sejarah *umami* serta konsumsi dan pemanfaatan *seaweed* di seluruh dunia. Kemudian dilanjutkan dengan membahas konsentrasi asam glutamat dari berbagai spesies *edible seaweed*. Selain itu, pengaruh metode pengeringan, kondisi penyimpanan,

dan metode ekstraksi berupa suhu dan waktu pemanasan terhadap konsentrasi asam glutamat juga dibahas sedikit. *Review* yang disusun oleh Milinovic dan kawan-kawan (2021) dapat dikatakan serupa dengan topik yang akan dibahas pada *review* ini, dimana konsentrasi asam glutamat dari *seaweed* dikumpulkan, serta membahas pengaruh metode ekstraksi terhadap konsentrasi asam glutamat. Namun dalam jurnal tersebut metode ekstraksi bukanlah topik utama sehingga metode ekstraksi yang dibahas terbatas hanya pemanasan dengan perbedaan suhu dan waktu (ekstraksi secara fisik), sedangkan beberapa referensi menyebutkan bahwa ekstraksi juga dapat dilakukan secara kimiawi, dengan enzim, atau dengan ultrasonikasi.

Dari beberapa jurnal *review* tersebut, dapat diketahui bahwa penyedap saat ini diproduksi dari proses fermentasi molase oleh bakteri, bukan dari bahan pangan berpotensi seperti *edible seaweed*. Kemudian, dalam proses produksi asam glutamat, proses pemisahan sangat penting untuk dilakukan, sedangkan proses analisis secara umum perlu dilakukan untuk kontrol kuantitas dan kualitas senyawa target, atau dalam penelitian wajib dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode yang digunakan terhadap konsentrasi senyawa target yang diperoleh. Selain itu, metode untuk ekstraksi dan analisa beberapa senyawa diketahui cukup beragam sehingga beberapa jurnal juga membahas pengaruh perbedaan metode terhadap konsentrasi senyawa target yang diinginkan. Meskipun begitu, berdasarkan ketiga *review* tersebut diketahui bahwa masih belum ada yang mengumpulkan, membandingkan, dan membahas perbedaan metode ekstraksi dan analisa yang sudah pernah dilakukan, beserta pengaruh perbedaan tersebut terhadap konsentrasi asam glutamat dari *edible seaweed*.

1.4. Tujuan Penelitian

Review ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai faktor dalam proses ekstraksi dan analisis yang sudah pernah dilakukan terhadap konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh.