

STUDI KINETIKA PRODUKSI GLUKOSAMIN DALAM *WATER-MISCIBLE SOLVENT* DAN PROSES SEPARASINYA
(Study on Kinetic and Separation Process of Glucosamine Production in Water-miscible Solvent)

Eko Hari Purnomo^{1,2)}, Azis Boing Sitanggang^{1,2)}, Dias Indrasti^{1,2)}

¹⁾Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

²⁾Pusat Pengembangan ILTEK Pertanian dan Pangan Asia Tenggara (Seafast Center), Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB.

ABSTRAK

Glukosamin (GlcN) umumnya diproduksi melalui hidrolisis eksoskeleton hewan laut dan fermentasi mikroorganisme. Akan tetapi, produksi dengan hidrolisis memiliki keterbatasan pada ketersediaan bahan baku, alergi, maupun kontaminasi lingkungan. Sementara, produksi menggunakan mikroorganisme terbatas oleh waktu produksi yang lama dan proses pemisahan. Oleh karena itu, pada studi ini produksi GlcN dilakukan secara kimia non-enzimatis antara sumber karbon (fruktosa atau glukosa) dan sumber amonium (campuran amonium asetat dan amonium klorida) dalam metanol dengan asam asetat sebagai buffer. Hasil menunjukkan bahwa fruktosa sebagai sumber karbon dapat membentuk solid GlcN dengan rendemen sebesar 544,79 mg/g karbon. Jumlah rendemen ini jauh lebih besar dibandingkan dengan hasil fermentasi (220 mg/g karbon). Akan tetapi, penelitian lebih lanjut terhadap proses pemurnian GlcN perlu dilakukan.

Kata kunci: Glukosamin, non-enzimatis, fruktosa, amonium

ABSTRACT

Glucosamine (GlcN) has traditionally been produced by hydrolysis of shellfish exoskeleton and microbial fermentation. However, production by hydrolysis has limitations including the availability of raw material, shellfish allergy, and environmental contamination. Meanwhile, production by microorganism is limited due to long fermentation time and separation process. In regards to these limitations, in this study, production of GlcN was conducted by non-enzymatic chemical reaction between carbon source (glucose or fructose) and ammonium source (mixture of ammonium acetate and ammonium chloride) in the presence of methanol containing acetate acid as buffer system. The result showed that production with fructose as carbon source can form solid GlcN with yield of GlcN was 544.79 mg/g carbon. The yield was much higher than production by fermentation (220 mg/g carbon). However, further study on purification process of GlcN is required.

Keywords: Glucosamine, non-enzymatic, fructose, ammonium

PENDAHULUAN

Osteoarthritis (OA, penyakit sendi degeneratif) adalah sindrom klinis dimana inflamasi tingkat rendah dihasilkan dari nyeri pada sendi. OA dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti (i) abnormalitas tulang rawan yang berfungsi sebagai bantalan dalam sendi dan (ii) kerusakan atau penurunan cairan

sinovial yang melumasi sendi tersebut (Conaghan, 2008). Ada sejumlah pilihan pengobatan yang tersedia untuk penderita OA, mulai dari perubahan gaya hidup yang sederhana sampai dengan penggunaan obat-obatan (obat anti-inflamatori) atau produk *nutraceutical* lainnya (Ishiguro *et al* 2002).

Glukosamin (GlcN; $C_6H_{13}NO_5$) dan N-asetil glukosamin (GlcNAc; $C_8H_{15}NO_6$) dapat disintesis dalam tubuh dari glukosa dan juga bertindak sebagai prekursor untuk biosintesis beberapa makromolekul, termasuk glikolipid, glikoprotein, glukosaminoglikan (mukopolisakarida) dan proteoglikan. Sebagai komponen dari makromolekul, GlcN memiliki peran dalam sintesis membran lapisan sel, kolagen, osteoid, dan tulang matriks. GlcN juga diperlukan untuk pembentukan cairan pelumas dan agen perlindungan. Karena konsentrasinya yang tinggi dalam sendi, hipotesis menyebutkan bahwa suplemen GlcN dapat membantu menurunkan gejala osteoarthritis (D'Ambrosio *et al* 1981).

GlcN hidroklorida (GlcN-HCl) dan sulfat umumnya digunakan sebagai suplemen. Selanjutnya, pada tahun 2004 GlcN termasuk ke dalam GRAS melalui pengumuman GRN 000150: 21 CFR 170.3(n) (3), (7), (16), (31), (36). Dengan demikian, GlcN dapat digunakan bukan hanya sebagai suplemen tetapi juga sebagai ingredien dalam pembuatan berbagai jenis pangan seperti yang disebutkan di dalam 21 CFR § 170.3-*Broad food categories* dan USDA's CSFII-*Food categories* (Mattia, 2004; Rogers, 2004).

Saat ini sebagian besar GlcN berasal dari hidrolisis dan deasetilasi eksoskeleton kerang kepiting yang mengandung kitin dengan menggunakan asam klorida pekat (Mojarrad *et al* 2007). Namun ada beberapa keterbatasan produksi GlcN menggunakan metode ini seperti: alergi, kontaminasi logam berat, waktu panen yang bersifat musiman maupun faktor sosial yang menggarisbawahi kontribusi terhadap penurunan sumberdaya laut dunia (Cao *et al* 2008). Produksi lainnya dapat juga menggunakan mikroorganisme seperti *E. coli* (Deng *et al* 2005) maupun kapang (Hsieh *et al* 2007; Liao *et al* 2008; Sitanggang *et al* 2010). Akan tetapi produksi GlcN menggunakan mikroorganisme ini juga memiliki beberapa kelemahan, yaitu waktu fermentasi yang cukup lama

(umumnya lebih dari lima hari) serta purifikasinya yang cenderung terlalu lama (Sitanggang *et al* 2011).

Penelitian ini bertujuan mencari alternatif pemecahan masalah terhadap produksi GlcN yang berasal dari laut maupun mikroorganisme melalui sintesis GlcN dari substrat yang sederhana (monosakarida dan senyawa amonium) dengan reaksi kimia. Beberapa hal yang ingin didapatkan pada penelitian ini adalah:

- a. Substrat spesifikitas, yaitu kecocokan jenis senyawa yang memiliki struktur monosakarida dan amonium yang dapat digunakan sebagai reaktan dalam memproduksi GlcN secara optimum dengan memperhatikan rasio molari tasnya.
- b. Kondisi optimum reaksi pembentukan GlcN dari reaktan (senyawa monosakarida dan amonium) yang meliputi suhu optimum reaksi (°C).

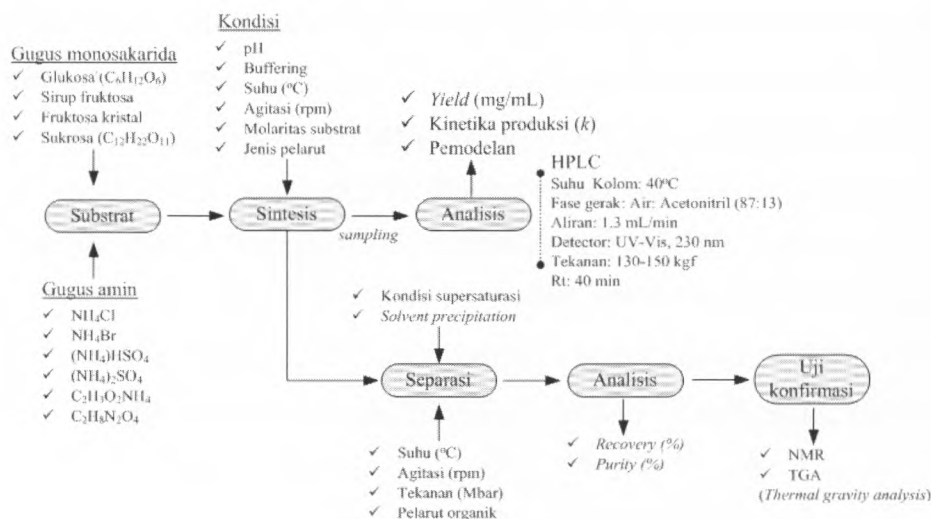
METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini GlcN disintesis melalui reaksi kimia non-enzimatis dengan molekul berstruktur monosakarida dan senyawa yang mengandung gugus amin sebagai substrat. Parameter proses sintesis berupa kecocokan substrat (*substrate fingerprint*), kondisi reaksi (suhu, agitasi) akan dikontrol. Larutan sistem berupa pelarut yang larut air (*water-miscible*) dengan nilai solubilitas GlcN lebih rendah di dalamnya digunakan dengan pertimbangan senyawa-senyawa substrat dapat larut dengan baik sehingga ketika proses pengadukan berlangsung masing-masing reaktan akan terdistribusi secara sempurna sehingga kontak diantara reaktan memiliki peluang yang lebih besar. Selanjutnya, karakteristik larutan ini akan memudahkan proses separasi karena GlcN yang terbentuk diharapkan secepat mungkin mencapai titik metastabil (kondisi supersaturasi), sehingga kristal GlcN dapat dipisahkan dengan mudah. Secara keseluruhan *roadmap* penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.

Validasi Metode Analisis GlcN dan Kurva Standar

Glukosamin dianalisis dengan menggunakan HPLC dengan metode yang diadopsi dari Sitanggang *et al* (2009a; 2010a). Sebanyak 0,1 mL sampel dan 0,1 mL internal standar berupa 0,1% (b/b) 3,5-dinitrobenzonitil di dalam

acetonitril dederivatisasi dengan menggunakan 0,3 mL 1-naftil isotiosianat di dalam piridin (40 mol/m^3) di dalam *constant bath shaker* selama 1 jam, 50°C , 100 rpm. Selanjutnya derivatif disaring menggunakan filter berukuran 0,45 μm . Sebanyak 0.1 mL sampel disuntikkan ke dalam kolom HPLC.



Gambar I. Roadmap produksi GlcN melalui sintesis kimia.

Kolom HPLC yang digunakan adalah Eclipse XDB yang berukuran 5 μm , 4.6 mm i.d.x150 mm. Detektor yang digunakan adalah UV-Vis detektor (Simadzu SPD-20A, Jepang) dan diatur pada panjang gelombang (λ) 230 nm. Tekanan diatur pada interval 130-150 kgf. Fase gerak yang digunakan adalah campuran antara acetonitril dan air dengan komposisi 87:13 dengan kecepatan aliran sebesar 1,3 mL/merit. Waktu analisis dilakukan selama 40 menit dengan kromatogram GlcN akan muncul pada menit ke-11 dan internal standar pada menit ke-29. Kondisi ini tidak berbeda jauh dengan kromatogram menggunakan metode Sitanggang *et al* (2010) dimana puncak GlcN dan internal standar pada menit ke 10 dan ke 25. Untuk pembuatan kurva standar, larutan stok dibuat dengan konsentrasi 0,25% (b/b) dan rentang titik kurva standar berada diantara 0,05-0,25% (b/b).

Sintesis GlcN

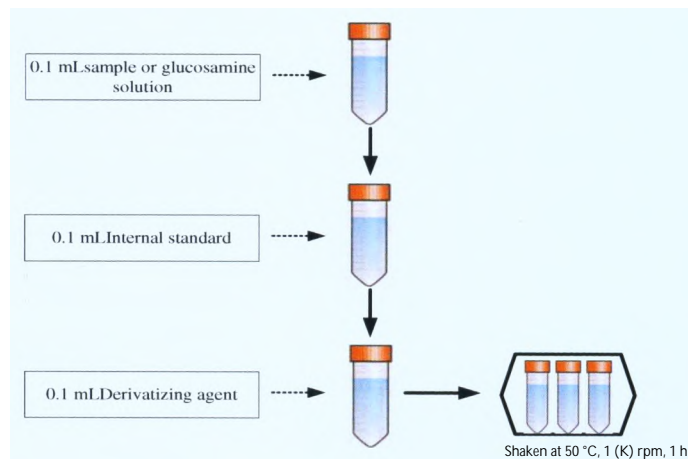
GlcN adalah molekul yang tersusun dari satu molekul yang bergugus glukosa dan satu molekul amin. Oleh karena itu sintesis GlcN non-enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan substrat seperti glukosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), sirup

fruktosa, fruktosa kristal, sukrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), serta molekul yang mengandung amin, seperti: NH_4Cl , NH_4Br , $(NH_4)HSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $C_2H_3O_2NH_4$, $C_2H_5N_2O_4$. Pada penelitian ini substrat yang digunakan adalah glukosa dan fruktosa kristal sebagai sumber karbon serta amonium klorida (NH_4Cl) dan amonium asetat ($C_2H_3O_2NH_4$) sebagai sumber amin. Pelarut yang digunakan adalah metanol pada berbagai konsentrasi dengan asam asetat sebagai buffer.

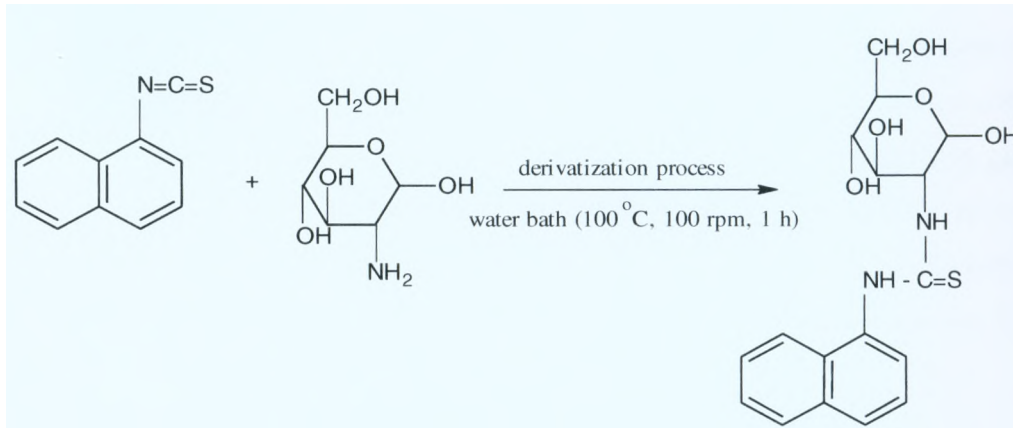
HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Metode Pengukuran GlcN: Derivatisasi Proses

Glukosamin (GlcN), atau 2-amino-2-deoxy-D-Glukosa, tidak memiliki kromofor, karena strukturnya yang hanya terdiri atas ikatan karbon tunggal (*single bond* -C-) (Hsieh *et al* 2007). Oleh karena itu, untuk dapat menganalisisnya pada panjang gelombang () visible (230 nm) maka GlcN harus direaksikan dengan suatu senyawa kimia kompleks yang memiliki ikatan ganda (*double bond*). Senyawa ini dapat disebut sebagai agen derivatisasi; dan senyawa kompleks GlcN dan agen derivatisasi akan dengan mudah menyerap cahaya pada panjang gelombang analisis (230 nm). Dalam hal ini, senyawa 1-Naphthylisothiocyanate dipilih berdasarkan studi literatur sebelumnya (Sitanggang 2009, 2010). Prosedur derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 2, sementara rekasi antara kedua senyawa (GlcN versus agen derivatisasi) tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Reaksi ini memerlukan panas, sehingga proses derivatisasi dilakukan dalam *water bath* dengan suhu $50^\circ C$, dengan kecepatan 100 rpm selama 1 jam



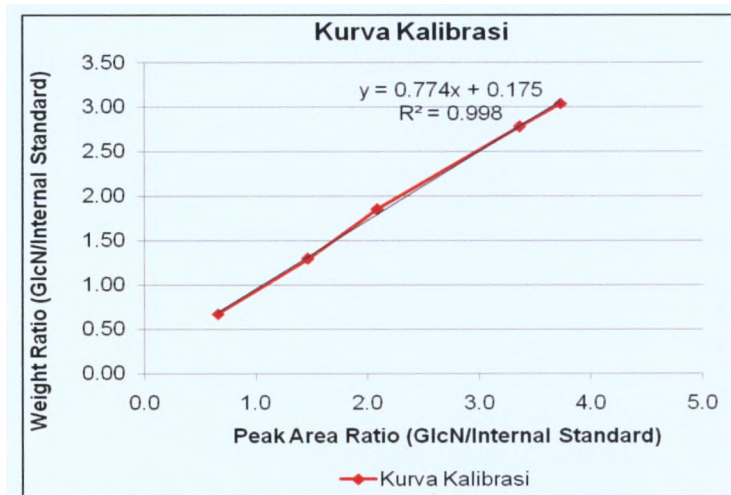
Gambar 2. Reaksi derivatisasi untuk analisis GlcN.



Gambar 3. Proses derivatisasi antara 1-naphthyl isothiocyanate dengan GlcN menghasilkan senyawa kompleks 1-naphthyl isothiocyanate-GlcN.

Selektivitas Metode

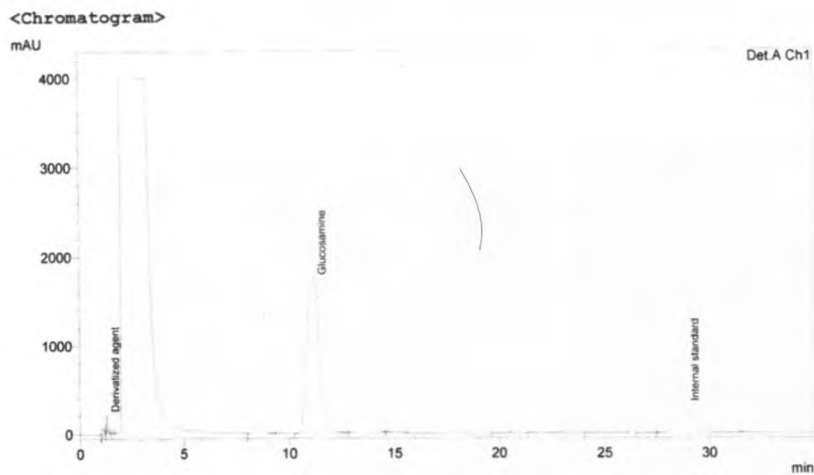
Hubungan yang linear antara persentasi rasio luas area antara GlcN dan internal standar pada berbagai konsentrasi GlcN (0.006-0.25% wt) dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Linearitas kurva GlcN.

Untuk melihat selektivitas dari metode, materi lain seperti GlcN, internal standar juga diderivatisasi menggunakan 1-naphthyl isothiocyanate. Dari hasil kromatogram HPLC didapatkan beberapa ~~nilai~~ pada waktu retensi lima (5) menit pertama, akan tetapi setelah itu tidak didapatkan puncak-puncak lainnya selain dari puncak agen derivatisasi, GlcN dan internal standar. Lebih lanjut, pemisahan puncak GlcN dan internal standar terjadi dengan baik dan jelas, yaitu sekitar

11 menit dan 29 menit untuk puncak GlcN dan internal standar. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Kromatogram dari agen derivatisasi, GlcN dan standar internal menggunakan analisis HPLC kolom Eclipse (4.6*150 mm) pada panjang 230 nm, 40 menit.

Validasi Metode Pengukuran GlcN: Akurasi dan Presisi Metode

Untuk analisis secara sederhana dari presisi dan akurasi metode, satu konsentrasi larutan GlcN standar dimana konsentrasinya berada pada rentang kurva linearitas dianalisis. Baik presisi dan akurasi dari metode menunjukkan nilai kesalahan relatif (*relative error*, RE) dan nilai relatif standar deviasi (*relative standard deviation*, RSD) di bawah dari 5%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini dan dibandingkan dengan literatur yang ada.

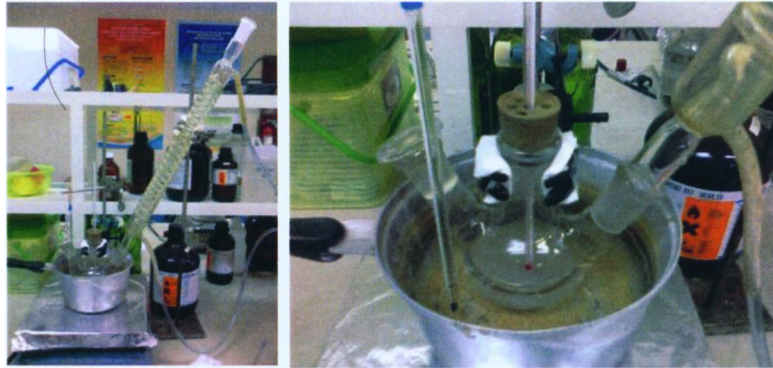
Tabel 1. Analisis presisi (% RSD) dan akurasi (% RE)

Nama larutan	Kon. (%wt)	Rataan (%wt)	RE (%)	RSD (%)	Pustaka
Larutan, std	0,06	0,06	4,65	2,99	Studi ini
Larutan std	0,10	0,10	3,99	2,53	Sitanggang <i>et al</i> 2009
Triple flex	0,08	0,08	3,07	1,25	Sitanggang <i>et al</i> 2009

Dari tahapan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis GlcN menggunakan HPLC pada panjang gelombang cahaya tampak (230 nm) dapat dilakukan dengan nilai presisi (% RSD) dan akurasi (% RE) di bawah 5%.

Sintesis Glukosamin (GlcN)

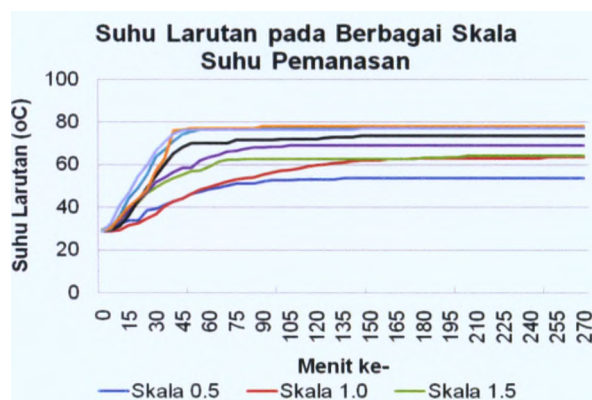
Sintesis GlcN dilakukan menggunakan rangkaian alat yang terdiri dari labu leher tiga yang ditempatkan di dalam penangas air dan dilengkapi dengan termometer, *magnetic stirrer*, dan kondensor (Gambar 6).



Gambar 6. Rangkaian alat sintesis GlcN.

Di dalam labu tersebut direaksikan sumber karbon dan sumber amonium untuk membentuk GlcN. Pengaduk *magnetic stirrer* berfungsi untuk melakukan pengadukan mekanis di dalam labu leher tiga. Pada penangas dan labu dipasang termometer untuk mengukur suhu masing-masing larutan. Penggunaan kondensor yang dipasang pada labu leher tiga diperlukan untuk mencegah larutan menguap selama pemanasan. Pada penelitian ini, *stirring hot plate* digunakan untuk memanaskan larutan.

Sebelum sintesis dilakukan kalibrasi suhu terlebih dahulu pada *stirring hot plate*. Alat *stirring hot plate* sebagai pemanas pada rangkaian alat sintesis GlcN tidak menunjukkan suhu larutan ketika dipanaskan. Oleh karena itu, kalibrasi suhu pada *stirring hot plate* perlu dilakukan untuk mengetahui suhu dan laju kenaikan suhu pada larutan GlcN dan penangas air selama pemanasan. Kalibrasi suhu dilakukan dengan memasang termometer pada penangas dan labu leher tiga untuk mengukur suhu masing-masing larutan. Pengukuran dilakukan setiap 5 menit sampai dengan menit ke-270 atau selama 4,5 jam pada setiap skala pemanasan pada tombol pengatur suhu yaitu dari skala 0,5 sampai dengan skala 4. Gambar 7 menunjukkan hasil pengukuran suhu larutan pada berbagai skala pemanasan.



Gambar 7. Suhu larutan pada berbagai skala suhu pemanasan

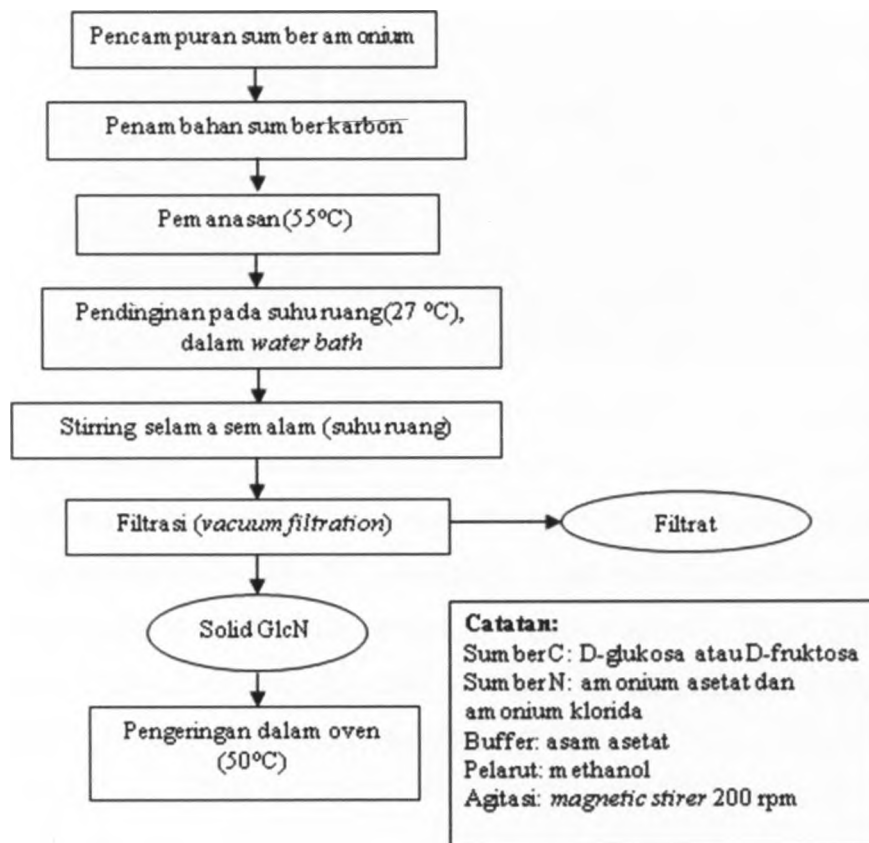
Dengan terkalibrasinya suhu pada labu leher tiga maka sintesis GlcN dapat dilakukan dengan menggunakan sistem ini.

Sintesis GlcN dilakukan mengadopsi metode Hubbs (2007) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan meliputi perlakuan 1) sumber karbon yang berbeda yaitu fruktosa dan glukosa, 2) konsentrasi metanol (50% dan 99.9%), dan 3) tanpa penambahan HC1 agar diperoleh GlcN murni. Diagram alir metode sintesis GlcN dapat dilihat pada Gambar 8. Sintesis GlcN dilakukan dengan mereaksikan substrat gula (glukosa atau fruktosa kristal) sebagai sumber karbon dan campuran amonium asetat ($C_2H_3O_2NH_4$) dan amonium klorida (NH_4Cl) sebagai sumber amonium.

Tahap awal sintesis dilakukan dengan cara mencampurkan amonium klorida (7.29 g 119 milimol), amonium asetat (9.27 g 12 mmol), asam asetat (7.13, 119 mmol), dan metanol (100.66 g) di dalam labu leher tiga. Pengaduk magnetik digunakan untuk mengaduk campuran tersebut. Kemudian pada campuran tersebut ditambahkan sumber karbon (fruktosa atau glukosa murni) sebanyak 24.03 g (133 mmol) dan kemudian dipanaskan sampai dengan suhu $55^{\circ}C$ dan suhu dipertahankan selama 5 jam.

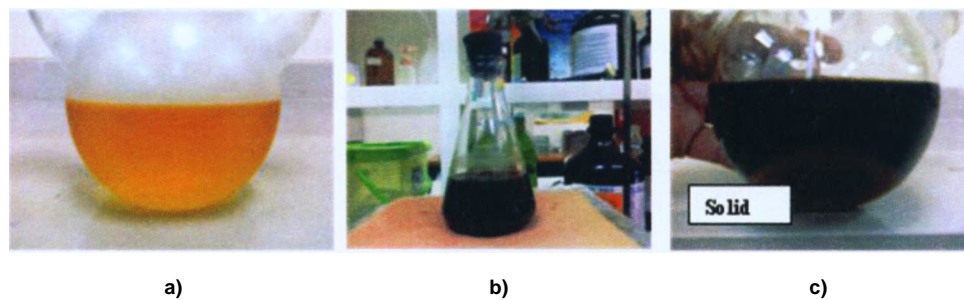
Setelah pemanasan selama 30 menit, pada campuran terbentuk padatan dengan jumlah yang terus bertambah selama waktu pemanasan. Kemudian campuran didinginkan dalam *water bath* dan selanjutnya diaduk selama semalam pada suhu ruang. Setelah pengadukan selesai, campuran disaring menggunakan pompa vakum untuk memperoleh padatan tersebut. Padatan tersebut kemudian

dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai diperoleh bobot konstan. Mengacu pada Hubbs (2007) padatan yang dihasilkan tersebut merupakan glukosamin. Selanjutnya padatan tersebut dihaluskan sehingga diperoleh serbuk glukosamin berwarna putih kecoklatan.



Gambar 8. Prosedur sintesis GlcN.

Untuk menentukan kecocokan substrat dan pelarut dilakukan pengamatan secara visual, yaitu ada tidaknya terbentuk solid selama proses sintesis. Dari hasil pengamatan visual tersebut didapatkan bahwa sintesis GlcN dengan glukosa sebagai sumber karbon tidak membentuk solid baik dengan pelarut metanol 50% maupun 99.9%, sedangkan sintesis GlcN dengan fruktosa sebagai sumber karbon membentuk solid yang diduga memuat kristal GlcN (Gambar 9). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fruktosa dapat dijadikan sebagai substrat dalam sintesis GlcN secara kimiawi.



Gambar 9. Perbandingan hasil sintesis GlcN a) glukosa+metanol SO² tidak membentuk GlcN, b) glukosa+metanol 99,9%, tidak membentuk GlcN; c) fruktosa+metanol 99,9%, membentuk solid GlcN.

Analisis dari solid yang terbentuk tersebut dipresentasikan serta dibandingkan dengan beberapa studi literatur yang ada dengan sistem yang berbeda dan dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

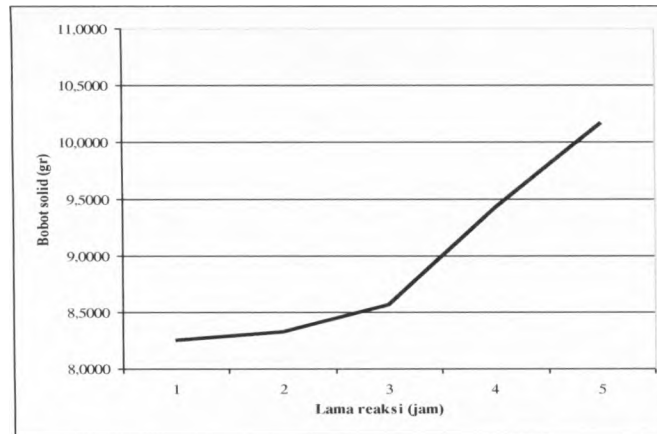
Tabel 2. Perbandingan produksi GlcN melalui proses fermentasi dan sintesis kimia

Metode	Medium	Konsentrasi GlcN (g/L)	Konten (mg/bk sel)	GlcN <i>yield</i> (mg/g carbon)	Sumber
<i>Rhizoglyphus</i> NRRL 2710	SDB	-	0,11	-	Sparringa and Owens (1999)
<i>Aspergillus.sp</i>	WBS	-	24,10	-	Carter <i>et al</i> (2004)
<i>M. pilosus</i>	RSA	0,26	-	13,20	Yu <i>et al</i> (2005)
<i>M. pilosus</i> BCRC31527	RSA	0,72	40,40	35,90	Hsieh <i>et al</i> (2007)
<i>R. oryzae</i> ATCC 20344	Limbah susu	-	160	-	Liao <i>et al</i> 2008
<i>Aspergillus.sp</i> BCRC 31742	WF	7,05	210	210	Sitanggang <i>et al</i> 2010
<i>Aspergillus.sp</i> BCRC 31742	WF-M	7,48	260	220	Sitanggang <i>et al</i> 2010
Secara kimiawi	Fruktosa dan amonium	-	-	544,79	Studi ini

Dari tabulasi di atas terlihat dengan jelas bahwa sintesis GlcN melalui reaksi kimia menghasilkan nilai *yield* yang lebih besar dibandingkan dengan proses fermentasi yang telah ada berdasarkan dari penggunaan karbon (nilai C).

Dari hasil analisis, GlcN kristal terinkorporasi di dalam solid yang terbentuk selama reaksi. Dengan demikian, kenaikan bobot dari solid yang terbentuk selama

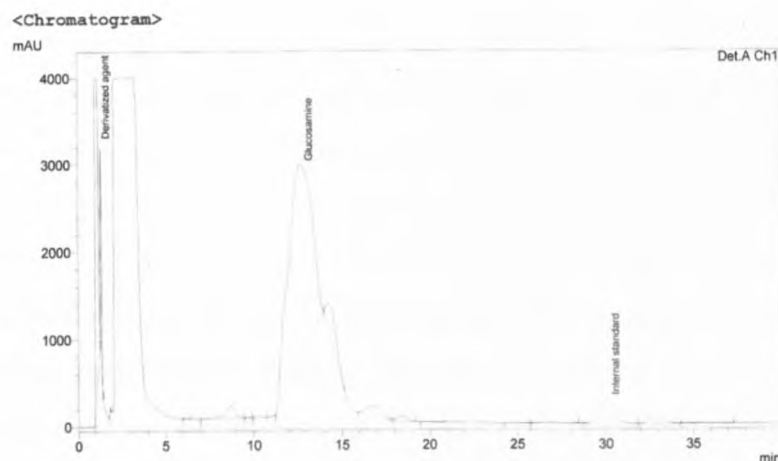
reaksi secara proporsional meningkatkan konsentrasi yang terbentuk. Kenaikan bobot solid dapat dilihat pada Gambar 10 di bawah ini.



Gambar 10. Kenaikan bobot solid yang mengandung kristal GlcN dalam selang waktu reaksi.

Kendala Proses Purifikasi Glukosamin (GlcN)

Seperti yang terlihat pada Gambar 10, seiring dengan berjalannya reaksi, terjadi kenaikan bobot solid yang mengandung kristal GlcN sepanjang reaksi sekitar 5 jam. Hal ini menunjukkan adanya indikasi kenaikan konsentrasi GlcN. Akan tetapi terdapat kendala di dalam proses purifikasi GlcN tersebut. Hal ini diindikasikan dengan adanya kesulitan selama menganalisis konsentrasi GlcN yang didapatkan karena proses pemisahan *peak* dengan kontaminan lainnya tidak dapat dilakukan dengan sempurna seperti yang ditunjukkan pada Gambar 11 berikut ini.



Gambar 11. Kromatogram analisis solid GlcN dan standar internal menggunakan analisis HPLC kolom Eclipse (4.6*150 mm) pada panjang 230 nm, 40 menit.

Untuk kelanjutan penelitian ini, proses separasi GlcN dari kontaminan solid lainnya merupakan sesuatu yang harus dapat dipecahkan. Pemisahan ini mungkin dapat dilakukan dengan cara pemansan atau destruksi menggunakan asam dengan molaritas tinggi.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan *yield* GlcN sebesar 544,79 mg/g karbon dengan sumber karbon berasal dari fruktosa dengan pelarut metanol 99.9% dan sumber amonium campuran dari amonium asetat dan amonium klorida di dalam buffer asam asetat. Sebagai penelitian awai hasil ini menunjukkan adanya peluang yang cukup besar untuk memproduksi (sintesis) GlcN menggunakan reaksi kimia sederhana dibandingkan dengan menggunakan metode ekstraksi asam/basa pada eksoskeleton atau cangkang dari binatang laut ataupun melalui proses fermentasi menggunakan mikroorganisme yang cenderung memakan waktu yang cukup lama (*time consuming*). Akan tetapi masih didapatkan beberapa kendala di dalam proses pemurnian GlcN yang dihasilkan dari padatan GlcN yang didapatkan selama reaksi berlangsung. Hal ini terlihat dengan jelas dari kromatogram analisis HPLC yang didapatkan, dimana *peak* GlcN berimpit dengan *peak* senyawa kontaminan lainnya yang terdapat pada padatan GlcN yang terbentuk selama proses sintesis. Kedepannya, masalah ini harus dipecahkan untuk menjadikan sintesis GlcN melalui reaksi kimia sederhana menjadi *feasible* dalam proses penggandaan skala (*scale up*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIPA IPB yang telah mendanai penelitian melalui program Penelitian Unggulan Strategis Perguruan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Alphen JV. 1929. Preparation of glucosamine hydrochloride. *Chem Weekblad* 26:602.

- Badan Pusat Statistik (BPS). 2011. Penduduk 15 tahun keatas yang bekerja menurut lapangan pekerjaan utama 2004-2010. http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subyek=06¬ab=2 [Diakses 10 Maret 2011].
- Bao W, TP Binder, Hanke PD, Solheim L. 2006. Cell-free production of glucosamine. US Patent No. 7,094,582 B2.
- Brooks PM. 1998. Rheumatology. Medical Journal of Australia (Practice Essentials) pp 8-45.
- Carter SB, Nokes SE and Crofcheck CL. 2004. The influence of environmental temperature and substrate initial moisture content on *Aspergillus niger* growth and phytase production in solid state cultivation, *Transaction American Society of Agricultural Engineers* 47(3), 945-949.
- Cao L, Jiang Y, Yu Y, Wei X, Li W. 2008. Methods for producing glucosamine from microbial biomass, US Patent 0188649 A1.
- Conaghan P. 2008. Osteoarthritis-National clinical guideline for care and management in adults. The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, *Royal College of Physicians of London* UK.
- D'Ambrosio E, Casa B, Bompani R, Scali B. 1981. Glucosamine sulfate: a controlled clinical investigation in arthrosis, *Pharmacotheputica*, 2, 504-508.
- Deng M, Severson KD, Grund DA, Wassink SL, Buringame RP. 2005. From concept to process: metabolic engineering for production of glucosamine and N-Acetyl glucosamine, *Metab Eng*, 7, 201-214.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Heyns K, Koch CM, Koch W. 1954. The behaviour of d-glucosamine in aqueous solutions. *Hoppe Seylers Z. Physiol Chem*, 296(3-4): 121-9.
- Houpt JB, Me Millan R, Wein C and Paget-Dellio SD. 1999. Effect of Glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee, *Journal of Rheumatology*, 26, 2423-2430.
- Hsieh JW, Wu HS, Wei Y and Wang SS. 2007. Determination and kinetics of producing glucosamine using fungi, *Biotechnol Prog*, 23, 1009-1016.
- Hubbs JK. 2007. Preparation of glucosamine. United States Patent Application 20070088157.
- Institute of Medicine (IOM). 2003. Safety review. Draft 3 prototype monograph on glucosamine. Pp Washington, DC, National Academy of Sciences.

- Ishiguro N, Kojima T dan Poole AR. 2002. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis, *Nagoya J. Med. Sci.*, 65, 73-84.
- Liao W, Liu Y, Frear C and Chen S. 2008. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material-dairy manure using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344, *Bioresour. Technol.*, 99, 5859-5866.
- Mattia A. 2004. Agency response letter GRAS Notice No. GRN 000150. CFSAN/Office of Food Additive Safety. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153990.htm> [accessed 14 July 2010].
- Mojanrad JS, Nemati M, Valizadeh H, Ansarin M. 2007. Preparation of Glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2246-2250.
- Murray CJL, Lopez AD. 1997. Mortality by Cause for Eight Regions of the World. Global Burden of Disease Study.
- Rogers BD. 2004. Notification of GRAS Determination for REGENASURE™ Glucosamine Hydrochloride, www.accessdata.fda.gov/scripts/cfr/gras_notices/400760A.PDF [accessed 14 July 2010].
- Shao Y, Alluri R, Mummert M. 2004. A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed.* 35, 625.
- Sitanggang AB, Wu HS and Wang SS. 2009a. Determination of fungal glucosamine using HPLC with 1-naphthyl isothiocyanate derivatization and microwave heating. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 14, 1-9.
- Sitanggang AB, Wu HS. 2009b. Developed strategy for production of fungal glucosamine using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *J. Biosci. Biotechnol.*, 108, S115.
- Sitanggang AB and Wu HS. 2009c. Developed strategy for production of fungal glucosamine using *Aspergillus* sp. BCRC 31742, Proceedings of 9th Conference on *Asia Pacific Biochemical Engineering* Kobe, Japan, pi 15.
- Sitanggang AB and Wu HS. 2009d. Strategy for production of fungal glucosamine from *Aspergillus* sp. BCRC 31742, Proceedings of 14th Conference on *Biochemical Engineering Society of Taiwan*, Taiwan, p26.
- Sitanggang AB. 2010. Optimization of Glucosamine Production Using *Aspergillus* sp. BCRC 31742 and Screening Zygomycotina Fungi as Potential Strain Cultivated in Submerged Fermentation. Thesis: Yuan Ze University, Taiwan.

- Sitanggang AB, Lin S, Wu HS and Wang SS. 2011. Review Paper: Aspects of glucosamine production using microorganisms, *Appl. Microbiol.*, *Submitted*
- Sitanggang AB, Wu HS, Wang SS, and Ho YC. 2010. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *Bioresour. Technol.*, 101 (10): 3595-3601.
- Spaninga RA and Owers JD. 1999. Short communication: glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 153-157 (1999).
- Symmons D, Mathers C, Pflieger B. 2003. Global burden of osteoarthritis in the year 2000. Geneva: World Health Organization
- Taha ML. 1961. The reaction of 2-amino-2-deoxy-D-glucose hydrochloride with aqueous ammonia, *J. Chem. Soc.*, 2468-2472.
- World Health Organization (WHO). 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva WHO Report, Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2004. WHO Scientific Group On the Assessment of Osteoporosis at Primary Healthcare Level. WHO Report, Belgium
- Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM. 2005. Macrophage stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Morascus pilosus*, *Appl. Biochem Biotechnol.*, 126, 35-48.
- Zamani A, Jeyhanipour A, Edebo L, Niklasson C and Taherzadeh MJ. 2008. Determination of Glucosamine and N-Acetyl Glucosamine in fungal cell walls, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8314-8318.