III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan juni 2011 sampai Desember 2011, dengan tahapan kegiatan, yaitu: pengambilan sampel cangkang udang di PT. Indokom Samudra Persada, Lampung Selatan. Persiapan cangkang udang, pembuatan kitin dan kitosan serta karakterisasi kitosan dilakukan di Laboratorium Balai Riset dan Standardisasi Industri Perdagangan (BARISTAND) Bandar Lampung. Analisis spektroskopi IR dilakukan di Laboratorium LIPI dan Laboratorium Biomassa Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu alat gelas, *orbital shaker* (Memmert), statif, penangas air, batang pengaduk, pipet ukur, tanur, corong, oven, desikator, pH meter, pipet gondok, neraca analitik, penangas minyak, *magnetic stirrer* (Fisher Scientific), dan *hot plate*, mikropipet (BIOHTIP Oyj), *incubator* (Memmert), tabung s*entrifuge* (Eppendorf), *autoclave* (Sturdy), cawan pengabuan, labu kjeldal, Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infrared*) Varian 2000 Scimitar series, Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infrared*) -8010 PC.

Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu cangkang udang, tepung kitin komersial, ekstrak kasar enzim kitin deasetilase (CDA) dari penelitian pendahuluan (Isolasi enzim kitin deasetilase dari isolat tanah humus *Aspergillus Aculeatus* dan identifikasi enzim tersebut dalam produksi kitosan, Husniati dkk., 2012), asam klorida, natrium hidroksida, asam asetat, selenium, K_2SO_4, asam sulfat,H_2O_2, asam borat 4%, indikator metil merah, HCl 0,2 N, akuades, indikator universal, dan kertas saring.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel

Cangkang udang dibersihkan, kemudian dipotong-potong yang selanjutnya disebut sampel.

2. Pembuatan Kitosan Dengan Metode Kimia Murni

Proses pembuatan kitosan umumnya terdiri dari tiga tahap yaitu deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi, tetapi proses pembuatan kitin dari cangkang udang sendiri terdiri atas dua tahap, yaitu: deproteinasi yang merupakan proses pemisahan protein dari cangkang udang dan demineralisasi yang merupakan proses pemisahan mineral.

2.1. Deproteinasi (Modifikasi Muzzarelly, 1984)

Sebanyak 40 gram sampel dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan pengaduk dan termometer, kemudian ditambahkan 400 mL

NaOH 3 M dengan perbandingan (1:10). Kemudian sampel diletakkan dalam penangas air dan didiamkan selama 1 jam pada suhu 90 ^{0}C, sambil dilakukan pengadukan. Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh padatan dan filtrat. Padatannya dicuci dengan akuades hingga pH netral, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60 ^{0}C selama 24 jam atau sampai kering. Sehingga diperoleh kitin kasar yang berwarna kuning kemerahan.

2.2. Demineralisasi (Modifikasi Muzzarelly, 1984)

Kitin kasar hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan pengaduk dan termometer. Kemudian sampel ditambahkan larutan HCl 2 N dengan perbandingan 1:7 (w/v) dan diletakkan dalam penangas air selama 2 jam pada suhu 25-30 ^{0}C . Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh padatan dan filtrat. Padatannya dicuci dengan akuades sampai pH netral, kemudian diletakkan dalam oven pada suhu 60 ^{0}C selama 24 jam atau sampai kering. Sehingga diperoleh kitin.

2.3 Deasetilasi (Modifikasi Muzzarelly, 1984)

Kitin direndam dengan larutan NaOH 20% dengan perbandingan (1:5) selama 1 jam pada suhu 90^{0}C, sambil diaduk konstan. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan padatan dan filtrat. Padatannya dicuci dengan akuades sampai pH netral. Padatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam atau sampai kering. Sehingga diperoleh kitosan. Kitosan yang diperoleh dianalisis dengan spektrofotometer IR untuk mengetahui gugus fungsi utamanya.

3. Pembuatan Kitosan Dengan Metode Enzimatis

3.1. Deasetilasi Kimia Sebagian (Emmawati, 2004)

Sebanyak 20 gram tepung kitin komersial direndam dalam NaOH 60% selama 24 jam, kemudian dipanaskan selama 2 jam pada suhu 60°C. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan padatan dan filtrat. Padatannya dicuci dengan akuades sampai pH netral. Kemudian padatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam atau sampai kering.

3.2. Deasetilasi Enzimatis (Rochima, 2007)

Kitin hasil deasetilasi kimia dilarutkan dalam asam asetat 0,1 M , selanjutnya dicampurkan dengan ekstrak kasar enzim kitin deasetilase sebanyak 100 µL dalam larutan kitosan 1%. Kemudian di inkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Serapan dianalisis menggunakan spektrofotometer IR dan ditentukan derajat deasetilasinya.

4. Karakterisasi Kitosan

4.1 Karakterisasi Kitosan dengan Spektrofotometer FTIR

Kitosan yang diperoleh dibaca dengan Spektrofotometer IR. Kitosan dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1}.

Hasil dari spektrum IR digunakan untuk menentukan derajat deasetilasi yang diukur menggunakan metode garis dasar. Puncak tertinggi dicatat dan diukur dari garis dasar yang dipilih. Nilai absorbansi dihitung dengan rumus :

$$A = \log Po/P$$

Dengan : Po = % transmitansi pada garis dasar

P = % transmitansi pada puncak minimum

Perbandingan antara absorbansi pada $\nu = 1655\ cm^{-1}$ (serapan pita amina) dengan absorbansi $\nu = 3450\ cm^{-1}$ (serapan pita hidroksi) dihitung untuk N-deasetilasi kitin yang sempurna (100%) diperoleh A1655 = 1,33. Penggunaan nilai absorbansi puncak yang terkait derajat deasetilasi dapat dihitung dengan cara :

N- deasetilasi = 1- (A1655/A3450 x 1/1,33) x 100%

(Bastaman, 1989 dalam Haryanto 1995).

4.2 Kadar Air (AOAC, 1999)

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menimbang cawan yang akan digunakan, kemudian dimasukkan sebanyak 1 gram sampel. Selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga berat konstan.

Perhitungan :

$$\text{Kadar air} = \frac{b - a}{b} \times 100\%$$

a = berat sampel sesudah dikeringkan

b = berat awal sampel

4.3 Kadar Abu (AOAC, 1999)

Krus porselin untuk pengabuan ditimbang, kemudian dimasukkan sampel sebanyak 1 gram dibakar dalam tanur pada suhu 600°C selama 3 jam, selanjutnya didinginkan dalam desikator dan ditimbang setelah mencapai suhu konstan.

Perhitungan

$$\text{Kadar abu} = \frac{b - a}{b} \times 100\%$$

a = berat sampel sesudah dikeringkan

b = berat awal sampel

4.4. Kadar Nitrogen (SNI, 1996)

Sebanyak 1 gram kitosan dimasukkan dalam labu kjeldal, kemudian ditambahkan dengan 7 g K_2SO_4, 0,005 g selenium, 12 ml H_2SO_4, dan 5 ml H_2O_2. Kemudian campuran dipanaskan dalam labu kjeldal selama 2 jam pada suhu 400^0C dalam lemari asam sampai berhenti mengeluarkan asap, dan cairan menjadi jernih, cairan didinginkan lalu didestilasi dengan penambahan indikator metil merah sebanyak 4 tetes, dan sebagai blangko sebanyak 40 mL asam borat 4% ditambahkan indikator metil merah. Selanjutnya destilat dan blangko dititrasi dengan HCl 0,2 N.

Perhitungan :

$$\%N = \frac{\text{mL HCl x N.HCl x N. NaOH x VNaOH/ Vsampel x 100\%}}{\text{Berat sampel (gram) x 1000}}$$