III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan April 2012 sampai dengan bulan September 2012, dengan tahapan kegiatan, yaitu: pengambilan sampel limbah kulit udang di Tambak udang PT. Central Pertiwi Bahari, Lampung Utara, pembuatan serta karakterisasi kitin dan glukosamin dilakukan di Laboratorium Biomasa Terpadu, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat–alat yang digunakan adalah peralatan gelas, *Orbital shaker*, *Heating Magnetic Stirer*, pH meter, mikropipet, *Laminar air flow*, inkubator Memmert-Germany/INCO$_2$, *centrifuge* Hitachi/CF 16 RX II, digital *waterbath* Wiggen Hauser, *autoclave*, *Freeze dry* Scanvac Coolsafe, *Frezeer*, neraca digital Wiggen Hauser, mortar, termometer, oven, HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*) Varian 940-LC, Detektor ELS Varian 385-LC, kolom C18 (125mm x 4,6mm) Varian, FTIR (*Foureer Transform Infrared*) Varian 2000 Scimitar series, *fermentor* Syrris Atlas Scorpion, dan penangas air.

Adapun bahan–bahan yang digunakan adalah standar Glukosamin WAKO Jepang, standar kitin produksi WAKO Jepang, *phenyl isothiocyanate, yeast extract*, *malt exstract*, dekstrosa, agar, *cycloheximide*, *nalidixic acid*, air laut, CH_3COONa, $(NH_4)_2 SO_4$, NaCl, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $NaH_2PO_4.H_2O$, $Na_2HPO_4.7H_2O$, H_3PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, NaOH, HCl, laktosa, bakto pepton, urea, asam sitrat, natrium sitrat, kertas saring, eter, metanol, akuabides, indikator universal, *Actinomycetes* ANL-4, *Mucor miehei*, asetonitril, akuades, dan kulit udang.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Kitin

Proses isolasi kitin sendiri terdiri atas tiga tahap, yaitu: deproteinasi yang merupakan proses pemisahan protein dari kulit udang, demineralisasi yang merupakan proses pemisahan mineral, dan depigmentasi yang merupakan tahap pemutihan kitin. Namun pada penelitian ini tidak dilakukan tahap depigmentasi karena kitin yang dihasilkan tidak untuk dikomersilkan. Depigmentasi bertujuan untuk menghilangkan zat warna (pigmen) yang terdapat pada sampel (kulit udang) dari kitin. Proses depigmentasi sesungguhnya telah berlangsung pada saat pencucian residu setelah proses deproteinasi dan demineralisasi (Sari, 2010).

1.1. Deproteinasi

Sebanyak 50 gram sampel ditempatkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi pengaduk dan termometer, dan diletakkan dalam penangas air. Kemudian sampel ditambahkan 500 mL NaOH 20 % dan didiamkan selama 1 jam pada suhu 90°C (Pareira, 2004). Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh residu dan filtrat. Filtrat diuji dengan $CuSO_4$ untuk membuktikan bahwa protein berhasil dipisahkan dari kitin melalui deproteinasi. Protein dengan $CuSO_4$ akan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Residunya dicuci dengan akuades hingga pH netral. Pencucian ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan (Sari, 2010). Kemudian residu dikeringakan dalam oven dengan suhu 60 ^{o}C selam 24 jam.

1.2. Demineralisasi

Kitin kasar hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan pengaduk, termometer dan diletakkan dalam penangas air. Kemudian sampel ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v) selama 1 jam pada suhu 90 ^{o}C (Pareira, 2004). Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh residu dan filtrat. Terjadinya pemisahan mineral ditunjukkan dengan terbentuknya gas CO_2 yang berupa gelembung-gelembung udara pada saat larutan HCl ditambahkan kedalam sampel. Filtrat diuji dengan

amonium oksalat untuk membuktikan bahwa mineral kalsium berhasil dipisahkan dari kitin melalui demineralisasi. Ion oksalat akan membentuk endapan putih dengan kalsium. Residunya dicuci dengan akuades sampai pH netral yang diukur dengan indikator universal. Pencucian dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan (Sari, 2010). Kemudian residu dikeringkan dalam oven pada suhu 60 ^{o}C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitin berwarna kuning kemerahan.

2. Karakterisasi Kitin dengan FTIR

Kitin murni yang diperoleh melalui dua tahap yaitu deproteinasi dan demineralisasi dibaca dengan Spektrofotometer IR. Kitin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1}. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan hasil pembacaan kitin standar.

3. Pembuatan Media

3.1. Media ISP-2 (*International Streptomyces Project*-2)

Media ISP–2 terdiri dari 4 gram *yeast exstract*, 10 gram *malt exstract*, 4 gram dekstrosa, dan 20 gram agar dilarutkan dalam 1 L air laut steril kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 ^{o}C dan tekanan 2 atm. Setelah media sedikit dingin, ditambahkan *cycloheximide* (25 µg/mL) dan *nalidixic acid* (25 µg/mL) (Margavey *et al*., 2004).

3.2. Larutan Mineral Garam *Actinomycetes* ANL-4

Larutan ini terdiri dari 0,4% $(NH_4)_2SO_4$, 0,6% NaCl, 0,1% K_2HPO_4, 0,01% $MgSO_4$, 0,01% CaCl, dan 0,5% kitin. Larutan disterilkan dengan *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121^oC dan tekanan 2 atm.

3.3. Media Fermentasi *Mucor miehei*

Larutan ini terdiri dari laktosa 0,1 gram, bakto pepton 0,3 gram, $(NH_3)_2SO_4$ 1,4 gram, urea 0,3 gram, KH_2SO_4 2 gram, $FeSO_4.7H_2O$ 0,3 gram, $CaCl_2$ 0,3 gram, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,287 gram, dan 1 gram kitin terakhir dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4 sampai 100 mL. Selanjutnya campuran dikocok dengan bantuan magnetik stirer sampai homogen lalu disterilisasi dalam *autoclave* dengan suhu 121 ^oC dan tekanan 2 atm selama 20 menit.

3.4. Media *Potato dextrose Liquid* (PDL) *Mucor miehei*

Sebanyak 200 gram kentang diiris halus lalu direbus dalam 500 ml akuades selama 1-1,5 jam serta disaring dengan kain tipis berlapis kapas, sehingga diperoleh cairan ekstrak kentang yang bening. Kemudian ditambahkan dekstrosa 10 gram lalu panaskan dan aduk hingga homogen. Aquades ditambahkan lagi hingga diperoleh volume akhir 1000 ml Sterilisasi medium dengan *autoclave* pada suhu 121 ^oC, 2 atm selama 20 menit.

3.5. Larutan Buffer Pospat pH 7

Sebanyak 0,964 g $NaH_2PO_4.H_2O$ dan 0.8078 g $Na_2HPO_4.7H_2O$ dilarutkan dalam 100 mL air kemudian dicek pH-nya. Ditambahkan NaOH atau H_3PO_4 bila dibutuhkan. Ini merupakan buffer pospat pH 7 1 M.

3.6. Larutan Buffer Sitrat pH 4

Campurkan 33 mL larutan stok asam sitrat 0,1 M dan 17 mL larutan stok natrium sitrat 0,1 M dan encerkan dengan akuades sampai 100 ml untuk mendapatkan larutan buffer pH 4.

4. Pertumbuhan *Actinomycetes* ANL-4

Strain *Actinomycetes* yang digunakan adalah ANL–4 yang telah berhasil diisolasi dari sedimen mangrove pantai, ciri–ciri strain ini memiliki miselium *aerial* berwarna putih keabuan dan miselium substratnya berwarna krem keabuan. Strain *Actinomycetes* ditumbuhkan dalam media ISP-2. 25 µg/mL *cycloheximide* dan 25 µg/mL *nalidixic acid* ditambahkan untuk menghindari kontaminasi jamur dan bakteri (Margavey *et al*., 2004).

5. Persiapan Inokulum *Actinomycetes* ANL-4

Spora kultur 7–9 hari dipisahkan dan diinokulasikan ke dalam tabung Erlenmayer 250 mL berisi 100 mL larutan mineral garam. Tabung diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30°C selama 7 hari.

6. Pertumbuhan *Mucor miehei* pada Media PDL

Pada media PDL diinokulasikan 1 ose biakan *Mucor miehei* kemudian diguncang dengan *shaker* selama 4 hari dengan kecepatan 120 rpm.

7. Persiapan Starter *Mucor miehei*

Starter dibuat dengan cara biakan *Mucor miehei* yang telah tumbuh pada media PDL, dimasukkan dalam campuran media fermentasi *Mucor miehei* sebanyak 100 mL, kemudian diguncang dengan *shaker* selama 4 hari pada kecepatan 120 rpm.

8. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*) Kitin Tahap I dengan *Actinomycetes* ANL-4

Fermentasi *batch* dilakukan dengan menggunakan *fermentor* dengan sistem tertutup. Substrat yang digunakan adalah kitin. Sebelum digunakan kitin direbus dengan 0,5% NaOH selama satu jam berdasarkan metode Gray *et al* (1978). Selanjutnya kitin dibilas dengan akuades, lalu disaring dan dikeringkan.

Sebanyak 10 g substrat kitin dimasukkan dalam Labu Duran 250 mL. Substrat kemudian direndam dengan 50 mL larutan mineral garam yang terdiri dari 0,4% $(NH_4)_2 SO_4$, 0,6% NaCl, 0,1% KH_2PO_4, 0,01% $MgSO_4$, 0,01 % CaCl. pH larutan dikondisikan pada 7,0 dengan menggunakan buffer pospat pH 7 kemudian media disterilisasi dengan *autoclave* pada 2 atm temperatur 121 ^oC selama 20 menit. Sebanyak 50 mL kultur awal diinokulasikan dalam media

kitin dan difermentasi pada 30 °C dengan *shaking* 250 rpm selama 45 hari (Chahal *et al*., 1996).

Sejumlah hasil dari fermentasi *batch* dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70 ^{o}C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 45 mL air destilasi dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm. Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 ^{o}C. Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam pendingin *frezeer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *frezee dryer* sampai terbentuk kristal Glukosamin.

9. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*) Kitin Tahap II dengan *Mucor miehei*

Substrat kitin pada fermentasi tahap I dengan *Actinomycetes* ANL-4 yang tidak terdegradasi dibilas dengan akuades kemudian dimasukkan dalam Labu Duran 250 mL. Substrat kemudian direndam dengan 50 mL media fermentasi *Mucor miehei* yang terdiri dari laktosa 0,1 gram, bakto pepton 0,3 gram, $(NH_3)_2SO_4$ 1,4 gram, urea 0,3 gram, KH_2SO_4 2 gram, $FeSO_4.7H_2O$ 0,3 gram, $CaCl_2$ 0,3 gram, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,287 gram,. pH larutan dikondisikan pada 4,0 dengan menggunakan buffer sitrat pH 4 kemudian media disterilisasi dengan *autocleve* pada 2 atm temperatur 121 ^{o}C selama 20 menit. Sebanyak 50 mL starter diinokulasikan dalam media kitin dan difermentasi pada 30 °C dengan *shaking* 250 rpm selama 7 hari (Chahal *et al*., 1996).

Sejumlah hasil dari fermentasi *batch* dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70°C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 45 mL air destilasi dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm. Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 ^{o}C. Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam pendingin *frezeer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *frezee dryer* sampai terbentuk kristal glukosamin.

Sedangkan substrat hasil pemisahan dari filtrat kemudian dicampurkan dengan asam asetat 5% dengan perbandingan 1:100 dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm. Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 ^{o}C. Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam pendingin *frezeer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *frezee dryer* sampai terbentuk kristal kitosan.

10. Karakterisasi Glukosamin

10.1. Analisis dengan HPLC

- Pembuatan Standar Glukosamin.

  50 mg standar glukosamin dilarutkan dalam 25 mL akuabides. Kemudian didiamkan selama ±24 jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2000 ppm.

- Pemeriksaan Sampel Glukosamin Hasil Isolasi.

  Dibuat larutan stok yang terdiri dari 1 mL *fenilisothiosianate* dan 9 mL metanol dalam labu ukur 10 mL hingga batas ukur. Kemudian dibuat sampel glukosamin dengan dilarutkan 10 mg sampel dalam larutan CH_3COONa 0,1 M pada labu ukur 10 mL. Dimasukan 1 mL sampel glukosamin hasil isolasi ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan 80 µL stok *fenilisothiosianate* dan 6 mL metanol serta akuades hingga tanda batas labu ukur. Selanjutnya diambil 5 mL, dipanaskan selama ± 15 menit pada suhu 80°C lalu didinginkan pada suhu ruang. Larutan ini diekstraksi dengan 5 ml eter untuk membebaskan *fenilisohtiosianate* yang tidak bereaksi. Lapisan air dibaca dengan HPLC-ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*) menggunakan kolom C18, fasa gerak adalah asetonitril/H_2O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40^oC, suhu evaporasi 30^oC, dan waktu run 6 menit (Jacyno, 2004).

10.2. Analisis dengan FTIR

Glukosamin yang diperoleh dibaca dengan Spektrofotometer IR. Sampel glukosamin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1}. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan hasil pembacaan glukosamin standar WAKO Jepang.