

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan April sampai dengan bulan Agustus 2012 dengan tahapan kegiatan, yaitu: persiapan sampel kulit udang, pembuatan glukosamin di Laboratorium Biomasa Terpadu, Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat-alat yang akan digunakan adalah peralatan gelas, *shaker-Incubator* Biosan/ES-20/60, *Heating Magnetic Stirrer*, indikator universal, mikropipet, *Laminar air flow*, inkubator Memmert-Germany/INCO<sub>2</sub>, *centrifuge* Hitachi/CF 16 RX II, *digital waterbath* Wiggen Hauser, *autoclave*, *Freeze dry* Scanvac Coolsafe, *Freezer*, neraca digital Wiggen Hauser, mortar, termometer, oven, *Fourier Transform Infrared (FTIR)* Varian 2000 Scimitar series, HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*) Varian 940-LC, Detektor ELS Varian 385-LC, kolom C18 (125mm x 4,6mm) Varian dan penangas air.

Adapun bahan-bahan yang akan digunakan adalah standar Kitin, kitosan, dan glukosamin produksi WAKO Jepang, *phenyl isothiocyanate*, *yeast extract*, *malt extract*, dekstrosa, agar, *cycloheximide*, *nalidixic acid*, PDA, ekstrak potato, air laut, CH<sub>3</sub>COONa, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$ , laktosa, bakto pepton, urea, asam sitrat, natrium sitrat, kertas saring, akuabides, asetonitril, akuades, TFA (*Trifluoroacetic acid*), indikator universal, strain *Actinomyces* ANL-4, *Mucor miehei*, dan kulit udang.

## **C. Prosedur Penelitian**

### **1. Pembuatan Kitin**

Proses pembuatan kitin dari serbuk kulit udang terdiri atas dua tahap, yaitu: deproteinasi dan demineralisasi (Sari, 2010).

#### **1.1. Deproteinasi**

Sebanyak 100 gram sampel ditempatkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi pengaduk dan termometer, lalu diletakkan dalam penangas air.

Kemudian sampel ditambahkan 1000 mL  $\text{NaOH}$  20% dan didiamkan selama 1 jam pada suhu  $90^\circ\text{C}$  (Pareira, 2004). Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh residu dan filtrat. Untuk membuktikan bahwa protein yang ada pada kitin telah dipisahkan pada tahap deproteinasi maka filtrat diuji dengan  $\text{CuSO}_4$ . Protein dengan  $\text{CuSO}_4$  akan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Kemudian residunya dicuci dengan akuades hingga pH akuades yaitu pH 5. Pencucian ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan (Sari, 2010). Residu dikeringkan dalam oven dengan suhu  $60^\circ\text{C}$  selama 24 jam sehingga diperoleh kitin kasar yang berwarna kuning kemerahan.

## 1.2. Demineralisasi

Kitin hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan batang pengaduk dan termometer lalu diletakkan dalam penangas air. Kemudian sampel ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan dipanaskan pada penangas selama 1 jam pada suhu 90 °C. Pada saat penambahan HCl kedalam sampel, terbentuk gas CO<sub>2</sub> yang berupa gelembung-gelembung udara, ini menunjukkan bahwa pemisahan mineral terjadi (Pareira, 2004). Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh residu dan filtrat. Untuk membuktikan bahwa mineral kalsium berhasil dipisahkan dari kitin melalui demineralisasi, filtrat diuji dengan amonium oksalat. Ion oksalat akan membentuk endapan putih dengan kalsium. Kemudian residunya dicuci dengan akuades sampai pH akuades yaitu pH 5 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 °C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitin berwarna kuning kemerahan.

## 2. Karakterisasi Kitin dengan FTIR

Kitin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara 4000 cm<sup>-1</sup> sampai dengan 400 cm<sup>-1</sup>. Hasil yang didapat dibandingkan dengan hasil pembacaan kitin standar.

### **3. Pembuatan Media Untuk *Mucor miehei***

#### **3.1 Media Potato Dextrose Agar (PDA) dan Pertumbuhan *Mucor miehei* Pada Media PDA**

Sebanyak 4,5 g PDA siap pakai dilarutkan dalam 100 ml akuades, diaduk hingga homogen. Kemudian media PDA ini disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah itu media PDA ini di UV selama 10 menit menggunakan *laminar air flow*, maka media pun siap pakai. Strain jamur *Mucor miehei* ditumbuhkan pada media PDA dan ditunggu kurang lebih 5 hari sampai spora jamur ini tumbuh dan siap dipanen.

#### **3.2 Media Potato Dextrose Liquid (PDL) dan Pertumbuhan *Mucor miehei* Pada Media PDL**

Sebanyak 200 gr kentang diiris halus lalu direbus dalam 500 ml aquades selama 1-1,5 jam serta disaring dengan kain tipis berlapis kapas, sehingga diperoleh cairan ekstrak kentang yang bening. Kemudian ditambahkan dekstrosa 10 gr, panaskan dan aduk hingga homogen. Aquades ditambahkan lagi hingga diperoleh volume akhir 1000 ml, sterilisasi medium pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm. Spora kultur 5 hari dipisahkan dan dimasukkan dalam tabung Erlenmayer 250 ml berisi 100 ml media cair potato dextrose. Tabung diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30 °C selama 5 hari.

### 3.3 Larutan Buffer Sitrat pH 4

Sebanyak 33 ml larutan stok A (asam sitrat 0,1 M) dan 17 ml larutan stok B (sodium sitrat 0,1 M) dilarutkan dalam 100 ml akuades kemudian dicek pH-nya. Ini merupakan buffer sitrat 1 M pH 4.

### 4. Pembuatan Starter *Mucor miehei*

Substrat yang digunakan adalah kitin yang direbus terlebih dahulu dengan 0,5% NaOH selama satu jam berdasarkan metode Gray *et al.*(1978). Selanjutnya kitin dibilas dengan akuades, disaring dan dikeringkan.

Sebanyak 1 g substrat kitin dimasukkan dalam Labu Bundar 250 ml, kemudian ditambahkan 0,1gr laktosa, 0,3gr bakto pepton, 1,4gr amonium sulfat, 0,3gr urea, 2gr kalium dihidrogen sulfat, 0,3gr besi (II)sulfat heptahidrat, 0,3gr kalsium klorida dan 0,287gr seng sulfat hepta hidrat, terakhir dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4 sampai 100 ml. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Sebanyak 5 ml kultur awal diinokulasikan dalam media kitin dan difermentasi pada 30 °C dengan *shaking* 250 rpm selama 3 - 4 hari (Chahal *et al.*,2001).

### 5. Fermentasi Cair Tertutup (*Batch*) Tahap I dengan *Mucor miehei*

Sebanyak 10 g substrat kitin dimasukkan dalam Labu Bundar 250 ml, kemudian ditambahkan 0,1gr laktosa, 0,3gr bakto pepton, 1,4gr amonium sulfat, 0,3gr urea,

2gr kalium dihidrogen sulfat, 0,3gr besi (II)sulfat heptahidrat, 0,3gr kalsium klorida dan 0,287gr seng sulfat hepta hidrat, lalu dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4 sampai 50 ml. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Sebanyak 50 ml starter diinokulasikan dalam media kitin dan difermentasi pada 30 °C dengan *shaking* 250 rpm selama 5 hari

(Chahal *et al.*,2001).

Sejumlah hasil dari fermentasi *batch* dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70 °C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 45 ml akuades dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm.

Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam pendingin *freezer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer* sampai terbentuk kristal glukosamin. Substrat hasil sisa fermentasi ini dilanjutkan kembali dalam fermentasi kedua.

## 6. Pembuatan Media Untuk *Actinomyces* ANL-4

### 6.1 Media ISP-2

Media ISP-2 terdiri dari 0,4g *yeast ekstrak*, 0,1g *malt ekstrak*, 0,4g *dekstrosa*, dan 0,2g agar dilarutkan dalam 100 ml air laut steril kemudian diautoklaf. Setelah media sedikit dingin, ditambahkan *cycloheximide* (25 µg/mL) dan *nalidixic acid* (25 µg/mL) (Margavey *et al.*, 2004).

### 6.2 Pertumbuhan *Actinomyces* ANL-4 pada Media ISP-2

Strain *Actinomyces* yang digunakan adalah *Actinomyces* 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 *Actinomyces* ANL-4 ditumbuhkan dalam media ISP-2. Untuk menghindari kontaminasi jamur dan bakteri ditambahkan 25 µg/mL *cycloheximide* dan 25 µg/mL *nalidixic* (Amorso dan Clowell, 1998).

### 6.3 Larutan Mineral Garam

Larutan ini dibuat dari 0,4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6% NaCl, 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01% MgSO<sub>4</sub>, 0,01% CaCl<sub>2</sub>, dan 1% kitin dilarutkan dalam 100 ml air laut steril. Larutan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm.

#### **6.4 Larutan Buffer Pospat pH 7**

Sebanyak 0,964g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dan 0.8078g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 100 ml akuades kemudian dicek pH-nya. Ditambahkan NaOH atau  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bila dibutuhkan. Ini merupakan buffer pospat pH 7 1 M.

#### **7. Persiapan Inokulum *Actinomyces* ANL-4**

Spora kultur 7–9 hari dipisahkan dan dimasukkan dalam tabung Erlenmayer 250 ml berisi 100 ml larutan mineral garam. Tabung diletakkan pada shaker dengan kecepatan 175 rpm pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

#### **8. Fermentasi Cair Sistem Tertutup (*Batch*) Tahap II dengan *Actinomyces* ANL-4**

Substrat yang digunakan adalah substrat hasil sisa fermentasi pertama dari fermentasi pertama dengan *Mucor miehei*. Sebelum digunakan substrat hasil sisa fermentasi dibilas dengan aquades sampai pH netral, lalu disaring dan dikeringkan.

Sebanyak substrat hasil sisa fermentasi dimasukkan dalam Erlenmayer 250 mL. Kemudian dilembabkan dengan 50 ml larutan mineral garam yang terdiri dari 0,4%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,6% NaCl, 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01%  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 %  $\text{CaCl}_2$ . pH larutan dikondisikan pada 7,0 dengan menggunakan buffer pospat pH 7 kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Sebanyak 50 ml kultur awal diinokulasikan dalam media kitin dan difermentasi pada  $30^\circ\text{C}$  dengan *shaking* 250 rpm selama 45 hari (Chahal *et al.*,2001).



Sejumlah hasil dari fermentasi *batch* dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 45 ml akuades dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm.

Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam pendingin *frezeer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *frezee dryer* sampai terbentuk kristal glukosamin.

## **9. Karakterisasi Glukosamin**

### **9.1 Analisis dengan FTIR**

Glukosamin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara  $4000\text{ cm}^{-1}$  sampai dengan  $400\text{ cm}^{-1}$ . Hasil yang didapat dibandingkan dengan hasil pembacaan glukosamin standar.

### **9.2 Analisis dengan HPLC**

#### **9.2.1 Persiapan Standar dan Sampel Glukosamin**

- Pembuatan Standar glukosamin

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

- Pembuatan Sampel Glukosamin

Dibuat larutan stok yang terdiri dari 1 mL *fenilisohtiosianate* dan 9 mL metanol dalam labu ukur 10 mL hingga batas ukur. Kemudian dibuat sampel glukosamin dengan dilarutkan 10 mg sampel dalam larutan  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1 M pada labu ukur 10 mL. Dimasukan 1 mL sampel glukosamin hasil isolasi ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan 80  $\mu\text{L}$  stok *fenilisohtiosianate* dan 6 mL metanol serta akuades hingga tanda batas labu ukur. Selanjutnya diambil 5 mL, dipanaskan selama  $\pm 15$  menit pada suhu  $80^\circ\text{C}$  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.

### 9.2.2 Pemeriksaan Sampel

Masukan 5  $\mu\text{L}$  standar dan sampel glukosamin masing-masing ke dalam botol vial kemudian diletakkan dalam rak yang selanjutnya akan diinjeksi. Kondisi HPLC-ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*) menggunakan kolom C18, fasa gerak adalah asetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$  (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas Nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi  $40^\circ\text{C}$ , suhu evaporasi  $30^\circ\text{C}$ , dan waktu run 6 menit. Pemeriksaan sampel dan standar glukosamin ini mengacu pada Jacyno (2004) yaitu menggunakan kolom karbohidrat ES yang bersifat nonpolar, fasa gerak adalah asetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$  (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 1,0 mL/menit, laju gas Nitrogen 1,7 L/menit, konsentrasi sampel 1000 ppm dan waktu run 13 menit.