

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April 2011 sampai dengan bulan Desember 2011, dengan tahapan kegiatan, yaitu : pengambilan sampel limbah kulit udang di Restoran Seafood Jumbo, Teluk Betung, preparasi kulit udang, pembuatan serta karakterisasi glukosamin di Laboratorium Biomassa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah alat gelas, *Orbital shaker*, Heating Magnetic Stirrer, indikator pH , mikropipet, inkubator Memmert-Germany/INCO₂, laminar air flow, *sentrifuse* Hitachi CF 16 RX II, digital waterbath Wigen Hauser, *autoclave*, Freez Dry Scavac Coolsafe, neraca digital, oven, HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*) Varian 940-LC, detektor ELS Varian 385-LC, kolom C18 Varian panjang 125 mm dan diameter 4,6 mm, FTIR (*Fourier Transform infrared*) Varian 2000 Scimitar series dan fermentor Atlas Syrris Scorpion. Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah yeast ekstrak, malt ekstrak, dekstrosa, agar, cycloheximide, nalidixic, air laut, (NH₄)₂SO₄ (p.a Merck), NaCl (p.a Merck), KH₂PO₄ (p.a Merck), K₂HPO₄ (p.a Merck), MgSO₄ (p.a Merck), CaCl (p.a Merck), kitosan, NaOH (teknis), HCl

(p.a Merck), buffer pospat pH 6,5, kertas saring, standar kitosan produksi WAKO, standar Glukosamin produksi WAKO dan kulit udang.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Kitosan

1.1 Preparasi Sampel

Limbah kulit udang yang telah didapatkan dibersihkan kemudian dikeringkan.

Kemudian dihaluskan menggunakan alat grinding pada kecepatan 500 rpm selama 5 menit.

1.2 Deproteinasi

50 gram kulit udang yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam labu bundar 1000 ml kemudian ditambah dengan 500 ml NaOH 20 % (b/v). Campuran kulit udang dan NaOH dipanaskan selama 1 jam pada temperatur 90°C sambil diaduk (Pareira, 2004). Setelah itu didinginkan, disaring dan residu dicuci dengan aquadest sampai pH netral, kemudian dikeringkan pada suhu 60°C selama 24 jam. Filtrat diuji menggunakan CuSO₄.

1.3 Demineralisasi

30 gram residu kulit udang setelah deproteinasi ditambah dengan 300 ml HCl 1,25 N dan dipanaskan selama 1 jam pada temperatur 90°C sambil diaduk (Pareira, 2004). Setelah itu disaring dan dicuci dengan aquadest sampai pH netral. Kemudian endapan dikeringkan pada suhu 60°C selama 24 jam dan diperoleh kitin. Filtrat diuji dengan ammonium oksalat.

1.4 Deasetilasi

200 ml NaOH 70 % (b/v) ditambahkan ke dalam 10 gram kitin, kemudian direfluks selama 90 menit pada suhu 140°C. Hasil refluks didinginkan, disaring dan dicuci dengan aquades sampai pH netral. Residu dikeringkan pada suhu 60°C selama 24 jam.

2. Karakterisasi kitosan dengan FTIR

Kitosan yang diperoleh diidentifikasi dengan Spektrofotometer FTIR. Kitosan 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 kitosan standar.

3. Pembuatan Media

3.1 Media ISP - 2

Medium ISP-2 terdiri dari 4 g *yeast ekstrak*, 10 g *malt ekstrak*, 4 g dekstrosa, dan 20 g agar dilarutkan dalam 1 L air laut steril kemudian diautoklaf. Setelah media sedikit dingin, ditambahkan *cycloheximide* (25 µg/mL) dan *nalidixic acid* (25 µg/mL) (Margavey *et al.*, 2004).

3.2 Larutan Mineral Garam

Larutan ini terdiri dari 0,4% (NH₄)₂SO₄, 0,6% NaCl, 0,1% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄, 0,01% CaCl, dan 0,5% kitosan. Larutan disterilkan pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3.3 Larutan Buffer Pospat pH 6,5

Sebanyak 0,964 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0.8078 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 100 mL air kemudian dicek pH-nya. Ditambahkan NaOH atau H_3PO_4 bila dibutuhkan. Ini merupakan buffer pospat pH 6,5 1 M.

4. Pertumbuhan Actinomycetes

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 $\mu\text{g/mL}$ *cycloheximide* dan 25 $\mu\text{g/mL}$ *nalidixic acid* ditambahkan untuk menghindari kontaminasi jamur dan bakteri (Amorso dan Clowell, 1998).

5. Persiapan Inokulum

Spora kultur 7–9 hari dipisahkan dan taruh dalam tabung Erlenmayer 250 mL berisi 100 mL larutan mineral garam. Tabung diletakkan pada shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 30°C selama 7 hari.

6. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (Batch)

Sebanyak 10 g substrat kitosan dimasukkan dalam Labu Duran 250 mL. Substrat 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% KH_2PO_4 , 0,01% MgSO_4 , 0,01 % CaCl. pH larutan dikondisikan pada 7,0 dan media disterilisasi pada 1 atm selama 15 menit.

Sebanyak 50 mL kultur awal diinokulasikan dalam media kitosan dan diinkubasi pada 30°C dengan *shaking* 250 rpm selama 45 hari (Chahal et al, 2001).

Sejumlah hasil dari fermentasi batch dipanaskan dengan waterbath pada suhu 70°C selama 45 menit. Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat di sentrifuse dengan kecepatan 11.000 rpm selama 40 menit pada suhu 4°C. Filtrat yang diperoleh difreeze dry sampai terbentuk kristal. Kristal yang terbentuk merupakan glukosamin.

7. Karakterisasi Glukosamin

7.1. Analisis dengan FTIR

Glukosamin yang diperoleh diidentifikasi dengan Spektrofotometer FTIR.

Glukosamin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan scanning pada daerah frekuensi antara 4000 cm⁻¹ sampai dengan 400cm⁻¹. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan hasil pembacaan glukosamin standar WAKO.

7.2 Analisis dengan HPLC

a. Pembuatan Standar Glukosamin

Larutkan 50 mg standar glukosamin ke dalam 25 mL aquabides. Kemudian larutan didiamkan selama 24 jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2000 ppm.

b. Pembuatan Larutan Sampel Glukoamin

Dibuat larutan stok yang terdiri dari 1 mL *fenilisothonosianate* dan 9 mL metanol dalam labu ukur 10 mL hingga batas ukur. Kemudian 10 mg sampel glukosamin dilarutkan dengan larutan CH₃COONa 0,1 M pada labu ukur 10 mL. Selanjutnya

masukkan 1mL sampel glukosamin hasil isolasi ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan 80 μ L larutan stok *fenilisothonosianate* dan 6 mL metanol serta akubides hingga tanda batas ukur. Campuran tadi diambil 5 mL, dipanaskan selama \pm 15 menit pada suhu 80⁰C lalu didinginkan pada suhu ruang. Larutan ini diekstraksi dengan 5 mL eter untuk membebaskan *fenilisothonosianate* yang tidak bereaksi.

Selanjutnya diambil masing – masing 10 μ L sampel glukosamin dan standar glukosamin, diinjeksikan kedalam kolom HPLC. Kondisi HPLC menggunakan kolom C18, fasa gerak adalah asetonitril/H₂O (65/35), laju alir gas nitrogen 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40⁰C, suhu evaporasi 30⁰C dan waktu run 10 menit (Jacyno, 2004).