

III. METEDOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Maret sampai bulan Nopember 2013 di Laboratorium Instrumentasi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain autoklaf merek Speed Clave Model S-90 N, *Laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, inkubator merek *P-Selecta*, Spektrofotometer UV-VIS merek Agilent Cary 100, *shaker* merek Stuart model SSL2, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) FLD & RID merek KNAUER, viskometer Ostwald, sentrifugasi, *freeze drying*, oven, *rotary evaporator*, lemari pendingin, neraca analitik, jarum ose, *magnetic stirrer*, penangas air, *effendroft* dan tip, pH meter, dan peralatan gelas laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah media inokulum Yeast Maltosa Cair (YM), media *deMan*, *Ragosa*, and *Sharpe* (MRS) Cair, buffer fosfat, buffer asetat, asam sulfat (H₂SO₄), fenol 5%, natrium klorida (NaCl), asam asetat (CH₃COOH) 0,5M, sukrosa, *skim milk powder*, pereaksi dinitrosalisilat (DNS), etanol 96%, asam

trikloroasetik (TCA), air suling dan kertas saring. Sampel yang digunakan yaitu limbah jerami padi dan susu kambing segar berasal dari Batang Hari, Lampung Timur.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media dan Pereaksi

a. Pembuatan Larutan Garam Fisiologis (NaCl 0,85%)

Sebanyak 0,85 g NaCl dilarutkan dengan air suling hingga volume 100 ml.

b. Pembuatan Media Inokulum Yeast Maltosa Cair (YM)

Medium YM terdiri dari 4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt, 15 g glukosa per 1 liter media, kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

c. Pembuatan Media *de Man, Rogosa, Sharpe* (MRS) Cair

Media MRS sebanyak 52 g dilarutkan dalam 1 L air suling yang dipanaskan pada suhu 60°C. Diaduk sampai tercampur, kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

d. Pembuatan Pereaksi DNS

Larutan A: 3 g NaOH; 0,6 g fenol; 3 g DNS dalam 240 mL air suling.

Larutan B: 0,25 g Na-sulfit; 2 g Na-K-tartrat dan 5 mL air suling.

Sebanyak 3 mL larutan B ditambahkan pada 240 mL larutan A dan ditambahkan air suling hingga volume 300 mL.

e. Pembuatan Buffer Fosfat

1) Larutan Stok A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M)

Sebanyak 27,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

2) Larutan Stok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2M)

Sebanyak 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

f. Pembuatan Buffer Asetat

1) Larutan Stok A (CH_3COOH 0,2M)

Sebanyak 11,36 mL CH_3COOH dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

2) Larutan Stok B (CH_3COONa 0,2M)

Sebanyak 16,4 g CH_3COONa dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

2. Pembuatan Inokulum

Inokulum isolat *Actinomyces* AcP-1 dan Acp-7 dibuat menggunakan media yeast maltosa cair (YM) dengan komposisi 4 g ekstrak khamir ditambahkan 10 g ekstrak malt dan 15 g glukosa dalam 1 liter media, kemudian disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kedalam 10 mL media inokulum diinokulasikan 1 ose isolat dan diinkubasi selama 96–120 jam hingga jumlah sel mencukupi.

3. Fermentasi Jerami Padi

Sebanyak 10 mL inokulum isolat *Actinomyces* AcP-1 dan AcP-7 yang telah ditumbuhkan pada media YM selama 96–120 jam diinokulasikan ke dalam media fermentasi steril yang berisi 10 g substrat jerami padi hasil *bio-pretreatment* dengan ukuran ± 40 mesh, yang telah ditambahkan dengan 30 mL buffer fosfat pH 7,5 sebagai *moisture* (pelembab), kemudian diinkubasi sampai dengan 21 hari (Beg *et al.*, 2000). Kultur dilakukan dengan menggunakan wadah kaca dengan memperhatikan sisa ruang di atasnya untuk memberikan suasana fakultatif aerobik. Setelah periode fermentasi dilakukan pemanenan dengan cara penambahan 100 mL akuades yang telah disterilkan kemudian diaduk, dan disaring untuk mendapatkan filtrat yang akan digunakan sebagai media pada sintesis EPS.

4. Analisis Gula pada Media Filtrat

Filtrat yang diperoleh dianalisis kandungan gula pereduksi total. Kandungan gula pereduksi diukur menggunakan prosedur DNS (Miller, 1959). Sebanyak 1,5 mL filtrat ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS dan dipanaskan pada 100°C selama 15 menit lalu didinginkan pada suhu ruang. Larutan hasil reaksi diukur absorbansinya pada λ 540 nm, menggunakan spektrofotometer. Komponen gula pada filtrat dianalisis dengan menggunakan KCKT dengan kondisi reaksi pengukuran sebagai berikut:

- Kolom : Karbohidrat
- Detektor : Indeks bias
- Pelarut : akuabides

- Konsentrasi standar : 400 ppm
- Volume injeksi : 10-20 μ L
- Temperatur kolom : Suhu ruang

Standar yang digunakan adalah glukosa dan xilosa yang berkualifikasi proanalisa.

5. Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil EPS

Isolat-isolat bakteri asam laktat diperoleh dari penapisan bakteri asam laktat dari susu kambing segar. Sampel diencerkan dengan seri pengenceran 10^0 sampai 10^{-6} kali lalu sebanyak 100 μ L secara aseptis ditebar ke atas media MRS agar (difco). Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Koloni yang diperoleh dimurnikan untuk mendapatkan galur murni. Seleksi dilakukan pada media MRS yang diperkaya dengan susu skim (90 g/L), isolat diambil secara aseptis menggunakan tusuk gigi steril dan ditumbuhkan ke permukaan media. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C koloni yang tumbuh diseleksi berdasarkan fenotip yang ditunjukkan. Isolat-isolat yang menunjukkan aktivitas positif menghasilkan EPS secara fenotip tampak *ropy* dan *mucoïd*. Isolat-isolat yang menunjukkan aktivitas positif menghasilkan EPS diinokulasikan ke dalam 10 mL media MRS cair (Kimmel and Robert, 1988) dan diinkubasi secara aerobik selama 24-48 jam pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi sel dipisahkan dengan cara disentrifugasi, 1 mL filtratnya ditambahkan 2 mL etanol yang telah didinginkan (van Geel-schutten *et al.*, 1998). Isolat yang positif menghasilkan EPS akan menunjukkan terbentuknya lendir setelah

penambahan etanol dingin pada filtrat. Secara kualitatif EPS yang terbentuk ditimbang setelah dikeringkan menggunakan *freeze drying*. Isolat yang menghasilkan EPS terbanyak akan digunakan untuk memproduksi EPS pada tahap selanjutnya.

6. Optimasi Produksi EPS Skala Laboratorium

Media hasil fermentasi jerami padi oleh *Actinomycetes* dikarakterisasi kandungan gula, jenis gula, dan pHnya. Optimasi yang akan dilakukan adalah pengaruh pH awal media dengan memberikan pH awal fermentasi 4,0;4,5;5,0;5,5; 6,0; dan 6,5 yang diatur menggunakan buffer asetat. Sebanyak 100 mL media diinokulasikan dengan 1 mL inokulum bakteri asam laktat (18-24 jam kultur) yang telah dipersiapkan sebelumnya lalu diinkubasi secara aerobik pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan sel diketahui dengan melakukan sub-sampling setiap 2 jam mulai jam ke 6 inkubasi hingga diperoleh jumlah sel yang mulai menurun (fase kematian). Pertumbuhan sel dilihat menggunakan spektrofotometer dengan mengukur OD pada λ 610 nm. Hasil yang diperoleh diplotkan ke dalam bentuk grafik untuk mengetahui fase pertumbuhan sel dikaitkan dengan waktu inkubasi. EPS yang dihasilkan selama fermentasi diukur dengan melakukan sub-sampling pada mulai jam ke 12 setiap 4 jam sekali. Sebanyak 2 mL media hasil sub-sampling disentrifugasi lalu filtratnya ditambahkan 4 mL etanol yang telah didinginkan lalu disimpan pada suhu dingin. EPS akan terlihat seperti lapisan gel, kemudian dikeringkan menggunakan *freeze drying*. Secara kuantitatif EPS ditimbang lalu hasil yang diperoleh diplotkan ke dalam bentuk grafik untuk mengetahui pola

produksi EPS oleh bakteri asam laktat pada media. Sehingga diperoleh informasi pH optimum.

7. Isolasi dan Pemurnian EPS

Isolasi dan pemurnian EPS mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Garcia dan Marshall (1991). Sel bakteri asam laktat dipisahkan dengan cara sentrifugasi, filtrat yang diperoleh ditambahkan 1/3 volume 40% asam trikloroasetik (TCA) untuk mengendapkan protein, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, EPS diperoleh dengan menambahkan 3x volume etanol dingin atau aseton dingin dan dibiarkan selama satu malam pada suhu dingin. EPS akan mengendap dan dipisahkan dengan filtratnya lalu dikeringkan dengan menggunakan *freeze drying*. Secara kuantitatif berat EPS yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui perolehan rendemen hasil produksi.

8. Karakterisasi EPS

a. Pengukuran Berat Molekul Berdasarkan Metode Viskometri

Viskositas EPS diukur menggunakan viskometer Ostwald.

Sebanyak 0,1 g EPS dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 0,5M, kemudian diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam viskometer Ostwald untuk ditentukan waktu alirnya. Pengukuran dilakukan dengan konsentrasi berbeda dan waktu alir dibaca dengan tiga kali pengulangan (Tarbojevich and Cosani, 1996).

$$\text{Viskositas relatif} \quad : \quad \eta_r = \frac{t}{t_0} \approx \frac{\eta}{\eta_0}$$

Viskositas spesifik : $\eta_{sp} = \eta_r - 1$

Viskositas kinematika : $\eta_{kin} = t \times k_{kin}$

Keterangan:

k_{kin} = koefisien kinematika ostwald ($9,671 \times 10^{-3}$ cSt per detik)

t = waktu alir larutan sampel (detik)

t_0 = waktu alir pelarut (detik)

Berat molekul EPS diukur berdasarkan viskositas intrinsik (η).

Data yang diperoleh dipetakan pada grafik η_{sp}/C terhadap C .

Viskositas intrinsik adalah titik pada grafik yang menunjukkan

nilai $C = 0$. Berat molekul ditentukan berdasarkan persamaan

Mark-Houwink (Hwang *et al.*, 1997) yaitu:

$$[\eta] = kM^\alpha$$

Keterangan:

$[\eta]$ = viskositas intrinsik

k = konstanta pelarut ($k = 3,5 \times 10^{-4}$ mL/g)

α = konstanta ($\alpha = 0,76$)

M = berat molekul

b. Analisis Kandungan Gula Pereduksi Total

Sebanyak 40,0 mg EPS ditambahkan ke dalam 1 mL air suling

dalam tabung ulir kaca lalu ditambahkan 2 N H_2SO_4 sampai larut

dan dipanaskan pada suhu $100^\circ C$ selama 2 jam. Analisis total gula

pereduksi dilakukan menggunakan metode Dubois (Dubois *et al.*,

1956).