

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2014 sampai dengan bulan Juni 2014, dengan tahapan kegiatan yaitu pengambilan sampel di Gudang Lelang, Teluk Betung, pembuatan serta karakterisasi kitin, serta pengukuran konsentrasi glukosamin hasil fermentasi secara spektrofotometri UV-Vis, dilakukan di Laboratorium Biomassa Terpadu, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini, alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas, bejana tahan asam dan basa, termometer, oven, pipet mikro, neraca digital Wiggner Houser, *Heating Magnetic Stirrer*, Autoklaf Tomy SX-700, *Laminar Air Flow*, *Incubator Memmer-Germany/INCO2*, FTIR Varian 2000 Scimitar series, *Shaker incubator*, *Freezer*, *Waterbath* Wiggner Hauser, *Freezdryer* Scanvac, *Sentrifuge*, Spektrometer UV-Vis Varian, HPLC Varian 940-LC, detektor ELSD Varian 385-LC, kolom C18 (125 mm x 4,6mm).

Bahan-bahan yang digunakan adalah kitin dan glukosamin standar produk WAKO Jepang, *agar for microbiology*, dekstrosa, *yeast extract*, *malt extract*, isolat *Actinomycetes ANL-4*, air laut steril, *cycloheximide*, *nalidixic acid*, NaOH, HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , CH_3COONa , PITC (*phenyl isothiocyanate*), metanol, kertas saring, kapas, kain kasa, aquades, indikator universal, serbuk kulit udang.

C. Prosedur Penelitian

1. Isolasi Kitin

Proses ekstraksi kitin terdiri dari 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 akan dilakukan tahap depigmentasi karena kitin yang dihasilkan tidak untuk dikomersialkan.

a. Persiapan Sampel Kulit Udang

Limbah kulit dan kepala udang untuk bahan baku pembuatan kitin dikumpulkan dari pengepul udang di kecamatan Teluk Betung, Bandar Lampung. Limbah kulit dan kepala udang dipisahkan dari isi dan kotorannya kemudian dicuci bersih. Kulit dan kepala udang direndam dalam air dan dipanaskan selama ± 15 menit, lalu ditiriskan. Selanjutnya kulit dan kepala udang dijemur dibawah sinar matahari selama sehari dan sampel yang telah kering diblender atau dihancurkan hingga menjadi bubuk halus.

b. Deproteinasi

Sebanyak 100 g sampel kulit udang ditimbang dan dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan termometer dan batang pengaduk, dan diletakkan dalam penangas air. Kemudian sampel ditambahkan 1000 ml larutan NaOH 20% dan dipanaskan selama 1 jam pada suhu 90°C (Pariera, 2004). Selanjutnya dilakukan penyaringan hingga diperoleh residu dan filtrat. Untuk menguji apakah protein telah berhasil dipisahkan dari kitin, maka diambil 5 ml filtrat dan ditambahkan dengan CuSO₄. Protein dengan CuSO₄ akan membentuk kompleks berwarna ungu. Residunya dicuci dengan air suling hingga pH netral kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam.

c. Demineralisasi

Kitin kasar hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan batang pengaduk dan termometer, dan diletakkan dalam penangas air. Kemudian ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1 : 10 (v/v) dan dipanaskan pada suhu 90°C selama 1 jam (Pareira, 2004). Selanjutnya dilakukan penyaringan hingga diperoleh residu dan filtrat. Filtrat diuji dengan menambahkan ammonium oksalat untuk membuktikan bahwa mineral kalsium telah berhasil dipisahkan dari kitin. Ion oksalat akan membentuk endapan putih dengan kalsium. Kemudian residu dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam.

2. Karakterisasi Kitin dengan FTIR

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

3. Pembuatan Media

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

Media ISP-2 terdiri dari 0,4 g *yeast extract*; 1 gram *malt extract*; 0,4 gram dekstrosa, dan 2 gram agar, lalu dilarutkan dalam 100 ml air laut steril kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media disinari dengan sinar uv dalam *laminar air flow* selama 5 menit dan ditambahkan masing-masing 25 μL *cycloheximide* dan *nalidixic acid* (Margavey *et al.*, 2004).

b. Larutan Mineral Garam *Actinomycetes* ANL-4

Larutan ini terdiri dari 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6% NaCl, 0,1% K_2HPO_4 , 0,01% MgSO_4 , 0,01% CaCl_2 , dan 1% kitin. Larutan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

4. Pertumbuhan *Actinomyces* ANL-4

Media ISP-2 yang telah ditambahkan masing-masing 25 μ L *cycloheximide* dan *nalidixic acid* kemudian dituang secara hati-hati ke dalam cawan petri dan tabung reaksi (media agar miring) yang telah disterilisasi sebelumnya.

Cycloheximide dan *nalidixic acid* ditambahkan untuk menghindari kontaminasi dengan jamur (Margavey *et al.*, 2004). Setelah agar memadat, strain *Actinomyces* ANL-4 ditumbuhkan pada media ISP-2. Selanjutnya media ISP-2 tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C dan pertumbuhan *Actinomyces* diamati setelah \pm 7 hari waktu inkubasi.

5. Persiapan Inokulum

Spora kultur 7-9 hari dipisahkan dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml yang berisi 10 ml larutan mineral garam yang telah disterilisasi. Media inokulum ini dibuat 9 replikat. Labu erlenmeyer diletakkan pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 30°C selama 7 hari.

6. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*) Kitin dengan *Actinomyces* ANL-4

Fermentasi *batch* dilakukan dengan menggunakan *Shaker Incubator* sistem tertutup. Substrat yang digunakan adalah kitin. Sebelum digunakan, kitin dipanaskan dalam larutan 0,5% NaOH dengan perbandingan 1:1 selama 1 jam. Selanjutnya kitin dibilas dengan akuades hingga pH 7, lalu filtratnya dipisahkan dengan penyaringan, dan kemudian dikeringkan.

Sebanyak 1 g substrat kitin dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml. Substrat kemudian direndam dalam 10 ml larutan mineral garam yang terdiri dari 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6% NaCl, 0,1% K_2HPO_4 , dan 0,01% CaCl_2 . Media fermentasi ini dibuat 9 replikat. Selanjutnya media disterilisasi dengan autoklaf pada 2 atm temperatur 121°C selama 20 menit. Kultur awal diinokulasikan dalam media kitin dengan perbandingan 1 : 1, lalu media cair difermentasikan pada 30°C dengan kecepatan *shaking* 250 rpm selama 45 hari (Chahal *et al.*, 1996).

Sejumlah hasil dari fermentasi batch, pada tiap selang waktu 5 hari, dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70°C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 5 ml air suling dengan membiarkan labu erlenmeyer pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm. Campuran disaring menggunakan kertas saring dan filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Semua filtrat yang diperoleh, dibekukan dalam *freezer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi menggunakan *freeze dry* sampai terbentuk kristal glukosamin.

7. Analisis Glukosamin dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel yang digunakan merupakan rendemen hasil fermentasi tiap selang waktu 5 hari yang telah diliofilisasi dengan *freeze dryer*. Analisis dilakukan dengan tahapan pembuatan larutan standar PTH (fenil tiourea), optimasi panjang gelombang, pengukuran absorbansi glukosamin dalam sampel, dan kalibrasi hasil pengukuran dengan standar yang telah dibuat.

a. Pembuatan larutan standar PTH (fenil tiourea)

Larutan standar yang digunakan adalah larutan PTH, hasil reaksi glukosamin (Glc) standar WAKO yang dengan fenil isotiosianat (PITC) dalam metanol. Konsentrasi larutan Glc dan PITC yang dibuat masing-masing adalah 3, 6, 9, 12, dan 15 mg/L. Mula-mula ditimbang 0,1 gram sampel, lalu dilarutkan dalam 10 ml CH_3COONa dan didiamkan selama 24 jam agar larutan stabil. Larutan standar induk ini kemudian diencerkan secara bertahap hingga menjadi 100 ppm. Larutan standar 3, 6, 9, 12, dan 15 mg/L dibuat dengan dipipet secara teliti 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; dan 1,5 larutan standar 100 mg/L, masing-masing diencerkan dengan pelarut CH_3COONa dalam labu takar 10 ml hingga tanda batas tera, lalu dihomogenkan. Larutan PITC dibuat dengan variasi konsentrasi yang sama menggunakan pelarut metanol dalam labu takar 10 ml. Selanjutnya 10 ml larutan Glc dicampurkan dengan 10 ml larutan PITC dan dikocok dalam labu takar 25 ml selama ± 5 menit. Reaksi antara glukosamin dengan PITC menghasilkan senyawa derivat fenil tiourea (PTH).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum untuk analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan menggunakan larutan standar glukosamin yang telah direaksikan dengan PITC. *Scanning* panjang gelombang dilakukan dari panjang gelombang 200 nm sampai 350 nm.

c. Kalibrasi glukosamin sampel

Rendemen glukosamin dari setiap 5 hari inkubasi diambil 0,1 gram sebagai sampel yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Sampel ini dilarutkan dengan natrium asetat dalam labu ukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10.000 mg/L. Larutan ini diencerkan secara bertahap sampai diperoleh konsentrasi 12 ppm, kemudian larutan sampel 12 ppm ini direaksikan dengan PITC dengan konsentrasi yang sama.

Absorbansi glukosamin dalam sampel dikalibrasikan dengan kurva standar PTH menggunakan persamaan regresi linear. Hasil yang diperoleh dikalikan dengan faktor pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi glukosamin dalam rendemen hasil fermentasi tiap selang waktu 5 hari.

8. Analisis Kemurnian Glukosamin dengan HPLC

a. Pembuatan standar Glukosamin

Sebanyak 50 mg glukosamin standar dilarutkan dalam 25 ml akuabides. Kemudian didiamkan selama \pm 24 jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2000 mg/L.

b. Pemeriksaan Sampel Glukosamin Hasil Fermentasi

Sebanyak 50 mg glukosamin hasil isolasi dilarutkan dalam 25 ml akuabides selama \pm 24 jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2000 ppm. Larutan sampel dibaca dengan HPLC-ELSD (*Evaporating Light Scattering Detection*) menggunakan kolom C18, fasa gerak asetonitril/air (65:35) yang

merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit, laju gas N₂ 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40°C, suhu evaporasi 30°C, dan lama proses 6 menit (Jacyno *and* Dean, 2004).