

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari 2014 sampai dengan bulan Juni 2014 dengan tahapan kegiatan, yaitu pengambilan sampel di Gudang Lelang; Teluk Betung; pembuatan serta karakterisasi kitin dengan FTIR; dan fermentasi kitin serta analisis produk fermentasi menggunakan Spektrometer UV-VIS dan HPLC-ELSD di Laboratorium Biomassa Terpadu, Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Dalam penelitian ini alat-alat yang akan digunakan adalah peralatan gelas *Pyrex*, termometer, oven, neraca digital *Wiggen Houser*, *Heating Magnetic Stirrer*, *Laminar Air Flow*, *autoclave*, *Incubator Memmer-Germany/INCO2*, *Shaker Incubator Biosan/ES-20/60*, *FT-IR Varian 2000 Scimitar Series*, *Centrifuge Hitachi/CF 16 RX II*, *Freezer dry Scanvac Coolsafe*, Spektrofotometer *Ultraviolet-Visible Varian 50 Probe*, HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*) *Varian 940-LC*, detektor *ELS Varian 385-LC*, dan kolom *Varian Pursuit C18* (125mm x 4,6mm).

Adapun bahan-bahan yang akan digunakan adalah serbuk kulit udang, kitin standar produk WAKO Jepang, glukosamin standar produk WAKO Jepang,

kentang, *agar for microbiology*, dekstrosa, laktosa, bakto pepton, amonium sulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ , urea, kalium hidrogen sulfat  $(\text{KHSO}_4)$ , besi (II) sulfat heptahidrat  $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ , kalsium klorida  $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , seng (II) sulfat heptahidrat  $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ , asam sitrat, natrium sitrat, isolat *Mucor miehei*, NaOH, HCl, kertas saring, aquades, akuabides, natrium asetat, metanol, *phenyl isothiocyanate*, dan indikator universal.

## **C. Prosedur Penelitian**

### **1. Pembuatan Kitin**

Proses pembuatan kitin dari serbuk kulit udang dilakukan secara kimiawi melalui tahapan deproteinasi yang menggunakan basa kuat dan demineralisasi yang menggunakan asam kuat (Sari, 2010).

#### **1.1 Persiapan Sampel**

Limbah kulit dan kepala udang untuk bahan baku pembuatan kitin dikumpulkan dari pengepul udang di kecamatan Teluk Betung, Lampung Selatan. Limbah udang (kulit dan kepala) dibersihkan, direbus, dan dikeringkan di bawah sinar matahari lalu dihaluskan menggunakan blender. Setelah itu diayak menggunakan ayakan sehingga diperoleh serbuk kulit udang halus yang siap digunakan sebagai sampel.

## 1.2 Deproteinasi

Sebanyak 100 gram sampel serbuk kulit udang ditambahkan 1000 mL NaOH 20% ditempatkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi pengaduk dan termometer lalu diletakkan dalam penangas air dan dipanaskan selama 1 jam pada suhu 90 °C (Pariera, 2004). Setelah kondisi tercapai, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian diuji dengan  $\text{CuSO}_4$ . Protein yang berhasil terpisahkan akan berikatan dengan Cu membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Adapun residunya dicuci dengan akuades hingga pH 7 yang diukur dengan indikator universal dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 24 jam (Sari, 2010).

## 1.3 Demineralisasi

Kitin kasar hasil deproteinasi ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v) dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan pengaduk dan termometer dan dipanaskan di atas penangas air selama 1 jam pada suhu 90 °C (Pariera, 2004). Terjadinya pemisahan mineral ditunjukkan dengan terbentuknya gas  $\text{CO}_2$  yang berupa gelembung-gelembung udara pada saat penambahan larutan HCl pada sampel. Setelah kondisi tercapai, dilakukan penyaringan sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian diuji dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ . Mineral kalsium yang berhasil terpisahkan ditandai dengan terbentuknya endapan putih akibat reaksi dari ion oksalat dengan kalsium. Adapun residunya dicuci dengan akuades hingga pH 7 yang diukur dengan indikator

universal dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 24 jam (Sari, 2010).

## **2. Karakterisasi Kitin dengan FT-IR**

Kitin yang diperoleh setelah melalui kedua tahapan tersebut dikarakterisasi gugus fungsinya dengan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR). Kitin dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah bilangan gelombang antara 4000 cm<sup>-1</sup> sampai dengan 400 cm<sup>-1</sup> (Mardiana, 2002; Limam, 2010).

## **3. Persiapan Isolat *Mucor miehei***

### **3.1 Pembuatan *Potato Extract***

Sebanyak 200 gram kentang dikupas kulitnya lalu dipotong seperti dadu dan direbus dalam 1000 mL akuades selama 1 jam setelah mendidih. Setelah kondisi tercapai, disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak kentang yang bening. Ekstrak kentang disimpan dalam botol reagen lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Ekstrak kentang yang telah disterilisasi, didinginkan pada suhu kamar kemudian disimpan dalam lemari pendingin (kulkas) (DZMZ, 2013).

### **3.2 Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan Pertumbuhan *Mucor miehei* pada Media PDA**

Sebanyak 100 mL *potato extract* ditambahkan 4 gram dekstrosa dan 3 gram agar dalam labu Erlenmeyer 250 mL lalu disterilisasikan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit (DSMZ, 2013). Setelah itu media PDA ini di-UV selama 10 menit dalam *Laminar Air Flow* dan dituang ke dalam cawan petri. Strain jamur *Mucor miehei* ditumbuhkan kurang lebih selama 5 hari sampai spora jamur ini tumbuh (Alves *et al.*, 2005).

### **3.3 Media PDL (*Potato Dextrose Liquid*) dan Pertumbuhan *Mucor miehei* pada Media PDL**

Sebanyak 100 mL *potato extract* ditambahkan 4 gram dekstrosa dalam labu Erlenmeyer 250 mL lalu disterilisasikan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Setelah itu media PDL ini di-UV selama 10 menit dalam *Laminar Air Flow*. Spora kultur 5 hari dipisahkan dan dimasukkan dalam media PDL dan diletakkan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30°C selama  $\pm 5$  hari (Alves *et al.*, 2005).

## **4. Larutan Buffer Sitrat pH 4**

Sebanyak 0,96 gram asam sitrat dilarutkan dalam 50 mL akuades dalam labu takar 50 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan ini merupakan larutan stok A. Kemudian dilarutkan sebanyak 0,65 gram natrium sitrat dalam 25 mL akuades dalam labu volumetrik 25 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan ini merupakan larutan stok B.

Sebanyak 33 mL larutan stok A (asam sitrat 0,10 M) dan 17 mL larutan stok B (natrium sitrat 0,10 M) dilarutkan dalam 100 mL akuades dalam labu volumetrik 100 mL dan kemudian dicek pH-nya. Ini merupakan larutan buffer sitrat pH 4 (Mardiana, 2002).

## 5. Pembuatan Media Inokulum *Mucor miehei*

Substrat yang digunakan adalah kitin yang telah dicuci terlebih dahulu dengan 0,5% NaOH selama satu jam berdasarkan metode Gray *et al.* (1978). Selanjutnya kitin disaring, dibilas dengan akuades, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam.

Sebanyak 0,1 gram substrat kitin dimasukkan ke dalam 7 labu Erlenmeyer 100 mL, kemudian ditambahkan 0,01 gram laktosa; 0,03 gram bakto pepton; 0,14 gram amonium sulfat; 0,03 gram urea; 0,2 gram kalium dihidrogen sulfat; 0,03 gram besi (II) sulfat heptahidrat; 0,03 gram kalsium klorida; dan 0,029 gram seng (II) sulfat heptahidrat, serta dilarutkan dalam 10 mL buffer sitrat pH 4. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Kemudian media didinginkan pada suhu ruang dalam *Laminar Air Flow*. Sebanyak 1 mL kultur awal dari media PDL diinokulasikan ke dalam media ini dan difermentasi pada 30 °C dalam *shaker-incubator* dengan kecepatan 250 rpm selama 7 hari (Chahal *et al.*, 2001).

## 6. Fermentasi Cair Tertutup (*Batch*)

Sebanyak 1,00 gram substrat kitin dimasukkan masing-masing ke dalam 7labu Erlenmeyer 100 mL, kemudian ditambahkan 0,02 gram laktosa; 0,06 gram bakto pepton; 0,28 gram amonium sulfat; 0,06 gram urea, 0,4 gram kalium dihidrogen sulfat; 0,06 gram besi (II) sulfat heptahidrat; 0,06 gram kalsium klorida; dan 0,057 gram seng (II) sulfat heptahidrat, serta dilarutkan dalam 10 mL buffer sitrat pH 4. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Kemudian media didinginkan pada suhu ruang dalam *Laminar Air Flow*. Sebanyak 10 mL *starter* diinokulasikan ke dalam media ini dan difermentasi pada 30°C dalam *shaker-incubator* dengan kecepatan 250 rpm selama 1-7 hari (Chahal *et al.*, 2001).

Hasil dari fermentasi *batch* setiap 1 hari sekali dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70 °C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 5 mL akuades 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 supernatan (filtrat) yang diperoleh dibekukan di dalam lemari pendingin *freezer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *freeze-dryer* sampai terbentuk kristal glukosamin.

## 7. Analisis Glukosamin dengan Spektrometer UV-Vis

Analisis glukosamin menggunakan spektrometer ultraviolet-visible (UV-VIS) dilakukan setelah diperoleh kristal glukosamin kering hasil *freeze-dryer*.

## **7.1 Persiapan Standar dan Sampel Glukosamin**

### **7.1.1 Pembuatan Standar Glukosamin**

Sebanyak 10 mg glukosamin standar dilarutkan dalam 100 mL natrium asetat 0,10 M dan didiamkan selama  $\pm 24$  jam sehingga diperoleh konsentrasi akhir 100 mg/L. Kemudian larutan glukosamin standar 100 mg/L ini diencerkan hingga diperoleh konsentrasi akhir masing-masing 3, 6, 9, 12, dan 15 mg/L.

### **7.1.2 Pembuatan Sampel Glukosamin**

Kristal-kristal glukosamin yang diperoleh dari proses fermentasi yang telah dikeringkan dengan *freeze-dryer* masing-masing dilarutkan sebanyak 10 mg dalam 10 mL natrium asetat 0,10 M dan didiamkan selama  $\pm 24$  jam sehingga diperoleh konsentrasi akhir 1000 mg/L. Kemudian larutan sampel ini masing-masing diencerkan hingga diperoleh konsentrasi akhir 100 mg/L. Kemudian masing-masing larutan sampel glukosamin 100 mg/L diencerkan dan didiamkan hingga selama 24 jam diperoleh konsentrasi akhir 12 mg/L.

### **7.1.3 Pembuatan Larutan Stok *Phenyl isothiocyanate* (PITC) 100 mg/L**

Sebanyak 0,92 mL *phenyl isothiocyanate* (PITC) pekat dimasukkan dalam labu volumetrik 10 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 10.000 mg/L. Lalu 1 mL larutan PITC 10.000 mg/L diencerkan lagi dalam 10 mL metanol dalam labu volumetrik 10 mL. Kemudian 10 mL larutan PITC 1.000 mg/L diencerkan lagi dengan metanol hingga volumenya 100 mL dalam labu volumetrik 100 mL dan diperoleh konsentrasi akhir 100 mg/L.



## 7.2 Pemilihan Panjang Gelombang Maksimum

Pemilihan panjang gelombang ( $\lambda$ ) dilakukan dengan menggunakan larutan glukosamin standar, larutan *phenyl isothiocyanate*, dan larutan *phenyl thiourea* hasil derivatisasi glukosamin dengan *phenyl isothiocyanate* pada konsentrasi 10 mg/L lalu dilakukan *scanning* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang ( $\lambda$ ) 200-350 nm.

## 7.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosamin

Larutan glukosamin standar dengan konsentrasi 3 , 6 , 9 , 12 , dan 15 mg/L masing-masing ditambahkan *phenyl isothiocyanate* (konsentrasi 3 , 6 , 9 , 12 , dan 15 mg/L) dengan perbandingan campuran 1:1. Kemudian campuran larutan dikocok hingga homogen dan diukur absorbansinya dengan spektrometri UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm. Kemudian nilai absorbansi tersebut diplot terhadap konsentrasi untuk mendapatkan kurva standar dan persamaan garis yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi glukosamin.

## 7.4 Analisis Kadar Glukosamin

Masing-masing 10 mL larutan sampel glukosamin di derivatisasi dengan larutan 10 mL larutan *phenyl isothiocyanate* dengan perbandingan 1:1. Kemudian campuran larutan dikocok hingga homogen dan diukur absorbansinya dengan spektrometri UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi linear dari kurva standar glukosamin dan diperoleh konsentrasi sampel glukosamin.

## **8. Analisis Glukosamin dengan HPLC**

Analisis glukosamin menggunakan HPLC dilakukan untuk menguji kemurnian glukosamin yang diperoleh.

### **8.1 Persiapan Standar dan Sampel Glukosamin**

#### **8.1.1 Pembuatan Standar Glukosamin**

Sebanyak 50 mg glukosamin standar dilarutkan dalam 25 mL akuabides.

Kemudian didiamkan selama  $\pm 24$  jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2.000 mg/L.

#### **8.1.2 Pembuatan Sampel Glukosamin**

Sampel yang digunakan dalam analisis ini adalah glukosamin hasil fermentasi hari pertama dan hari keempat. Sebanyak 50 mg glukosamin hasil fermentasi hari ke-1 dan hari ke-4 masing-masing dilarutkan dalam 25 mL akuabides. Kemudian didiamkan selama  $\pm 24$  jam dan diperoleh konsentrasi akhir 2.000 mg/L.

### **8.2 Pemeriksaan Standar dan Sampel**

Masing-masing standar dan sampel glukosamin yang akan dianalisis, dimasukkan ke dalam botol vial kemudian diletakkan dalam rak yang kemudian akan diinjeksi. Kondisi HPLC diatur dengan menggunakan detektor ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*), kolom C18, fasa gerak asetonitril/H<sub>2</sub>O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/ menit, laju gas nitrogen 1,6

L/menit, suhu nebulisasi 40 °C, suhu evaporasi 30 °C, dan waktu *run* 6 menit (Jacyno and Dean, 2004).

## **9. Pengaruh Penambahan Jumlah Substrat Kitin, Volume Media Inokulum, dan Media Fermentasi terhadap Produksi Glukosamin**

Metode yang digunakan sama seperti metode fermentasi awal. Hanya pada fermentasi ini dilakukan penambahan substrat kitin, volume media inokulum, dan media fermentasi sebanyak 2 kali fermentasi awal.

Substrat yang digunakan adalah kitin yang telah dicuci terlebih dahulu dengan 0,5% NaOH selama satu jam berdasarkan metode Gray *et al.* (1978). Selanjutnya kitin disaring, dibilas dengan akuades, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam.

### **9.1 Media Inokulum *Mucor miehei***

Sebanyak 0,2 gram substrat kitin dimasukkan ke dalam 7 labu Erlenmeyer 100 mL, kemudian ditambahkan 0,02 gram laktosa; 0,06 gram bakto pepton; 0,28 gram amonium sulfat; 0,06 gram urea; 0,4 gram kalium dihidrogen sulfat; 0,06 gram besi (II) sulfat heptahidrat; 0,06 gram kalsium klorida; dan 0,0547 gram seng (II) sulfat heptahidrat, serta dilarutkan dalam 20 mL buffer sitrat pH 4. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Kemudian media didinginkan pada suhu ruang dalam *Laminar Air Flow*. Sebanyak 1 mL kultur awal dari media PDL diinokulasikan ke dalam media ini dan difermentasi pada 30 °C dalam *shaker-incubator* dengan kecepatan 250 rpm selama 7 hari (Chahal *et al.*, 2001).

## 9.2 Fermentasi Cair Tertutup (*Batch*)

Sebanyak 2,00 gram substrat kitin dimasukkan masing-masing ke dalam 7 labu Erlenmeyer 100 mL, kemudian ditambahkan 0,04 gram laktosa, 0,12 gram bakto pepton, 0,54 gram amonium sulfat, 0,12 gram urea, 0,80 gram kalium dihidrogen sulfat, 0,12 gram besi (II) sulfat heptahidrat, 0,12 gram kalsium klorida, dan 0,11 gram seng (II) sulfat heptahidrat, serta dilarutkan dalam 20 mL buffer sitrat pH 4. Selanjutnya campuran diaduk sampai homogen lalu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Kemudian media didinginkan pada suhu ruang dalam *Laminar Air Flow*. Sebanyak 20 mL *starter* diinokulasikan ke dalam media ini dan difermentasi pada 30°C dalam *shaker-incubator* dengan kecepatan 250 rpm selama 1-7 hari (Chahal *et al.*, 2001).

Hasil dari fermentasi *batch* setiap 1 hari sekali dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 70 °C selama 45 menit. Kemudian dicampurkan dengan 5 mL akuades 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 supernatan (filtrat) yang diperoleh dibekukan di dalam lemari pendingin *freezer* selama 24 jam, kemudian diliofilisasi dengan menggunakan *freeze-dryer* sampai terbentuk kristal glukosamin. Setelah itu dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan prosedur 7 di atas.