

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian dan Laboratorium Analisis Kimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Juli-Oktober tahun 2014.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan utama dalam penelitian ini adalah minyak sawit mentah (CPO) dan minyak inti sawit (PKO) PTPN VII Bekri Lampung. Bahan kimia terdiri dari: heksana, etanol, NaOH, HCl 35%, natrium sulfat anhidrat, dietil eter, asam formiat, etil asetat, iodium kristal, dan sejumlah bahan kimia penunjang analisis. Kultur mikroba yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Sacharomyces cerevisiae*. Media yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), PDB (*Potato Dextrrose Broth*), dan PDA (*Potato Dextrose*).

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *hotplate-magnetic stirrer*, *centrifuge*, labu pemisah, kertas saring, oven, corong Buchner, plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 F₂₅₄ 20x20 cm, chamber, autoklaf, mikropipet, inkubator, vorteks, jangka sorong, pipet kapiler dan alat-alat gelas penunjang.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan perlakuan tunggal yaitu pemurnian dengan metode kromatografi lapis tipis dengan komposisi eluen heksana/dietil eter/asam formiat (80:20:2) sebanyak 30 ml dan pengujian aktivitas antimikroba sebanyak 3 ulangan. Produk yang diujikan yaitu 10 produk terbaik dari fraksinasi produk etanolisis campuran CPO dan PKO dari penelitian sebelumnya yaitu pelarut etil asetat dengan sentrifus (1000, 1500, 2000, 3000 rpm); pelarut etanol dengan sentrifus (2000, 3000, 3500 rpm); pelarut etanol-etil asetat dengan sentrifus (1500, 2500, 3500 rpm). Data dianalisis dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel, grafik dan gambar.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam lima tahap yang meliputi: (1) Persiapan bahan CPO dan PKO, (2) Persiapan Pelarut Etanol-NaOH, (3) Produksi etanolisis kasar dari campuran CPO dan PKO, (4) Pemurnian produk etanolisis kasar dari campuran CPO dan PKO dengan sentrifugasi dan jenis pelarut dalam teknik fraksinasi dingin, dan (5) Kajian pola sebaran dan rendemen fraksi massa komponen terpisah dari produk fraksi 1 (cair) dari fraksinasi dingin campuran CPO dan PKO. Pengamatan yang terdiri dari perhitungan nilai Rf, rendemen, dan aktivitas antimikroba masing-masing fraksi 1 (cair) pada produk fraksinasi dingin yang diujikan.

3.4.1. Persiapan bahan utama

Bahan utama berupa CPO dan PKO segar yang diperoleh dari Perusahaan Persero (PT) Perkebunan Nusantara VII Unit Usaha Bekri, Lampung Tengah. Selanjutnya masing-masing CPO dan PKO disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam erlenmeyer, dikeringkan menggunakan oven (80°C) seharian hingga kandungan air dalam CPO atau PKO berkurang, lalu diwadahi dalam (jerigen plastik) terpisah dan disimpan ditempat yang sejuk, gelap, dan kering, sebagai stok CPO dan PKO untuk pelaksanaan penelitian (Murhadi dan Zuidar, 2009 dengan modifikasi).

3.4.2. Persiapan pelarut etanol-NaOH 1%

Pelarut etanol-NaOH 1% adalah bahan yang digunakan untuk produksi produk etanolisis kasar. Nisbah etanol yang telah mengandung NaOH 1% terhadap campuran CPO dan PKO yang digunakan adalah 1,6 (v/b) berdasarkan penelitian sebelumnya (Murhadi dan Zuidar, 2009). NaOH ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan yaitu 1,6 g ($1/100 \times 160$ g CPO-PKO). Reaksi etanolisis pada penelitian ini menggunakan etanol 96%. Pembuatan pelarut etanol-NaOH 1% diawali dengan mencampurkan NaOH dengan aquades yang telah ditimbang. Keduanya dilarutkan dalam gelas beker secara perlahan-lahan karena akan menimbulkan panas. Setelah NaOH larut dalam aquades maka larutan tersebut dimasukkan dalam etanol kemudian dihomogenkan. Pelarut tersebut disimpan di dalam botol erlenmeyer dan digunakan sebagai bahan proses etanolisis.

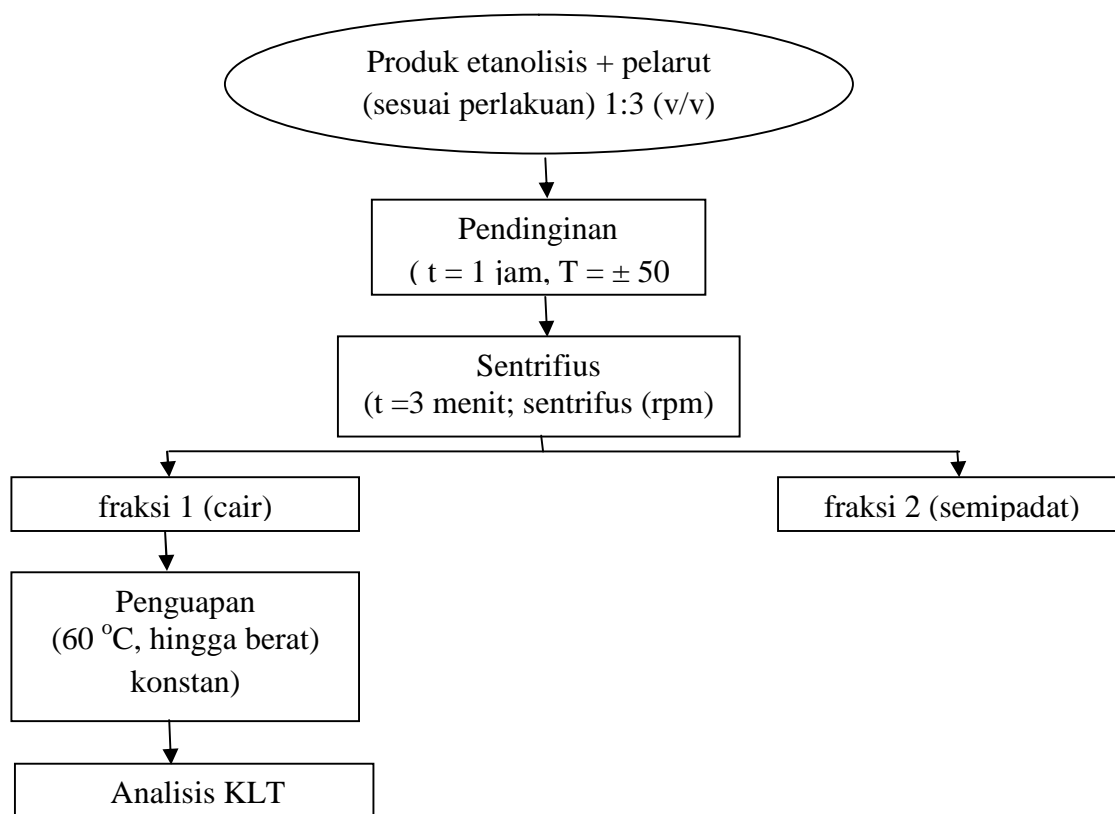
3.4.2. Produksi produk etanolisis kasar

Reaksi etanolisis dilakukan mengikuti metode yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Murhadi dan Suharyono, 2008 dengan modifikasi). Sejumlah 256 ml etanol 96% yang telah mengandung NaOH 1% (b/b CPO-PKO) ditambahkan 160 g CPO-PKO (nisbah = 0,8; b/b) di dalam Erlenmeyer 1000 ml dengan total volume reaksi etanolisis kurang lebih 420 ml (nisbah = 1,6; v/b), lalu diletakkan diatas *hotplate-magnetic stirrer* dengan sentrifus 1000 rpm selama 8 menit pada suhu 40 °C. Reaksi dihentikan dengan meneteskan sebanyak 42 tetes larutan HCL 35%. Campuran produk reaksi, dimasukkan kedalam labu pemisah dan dibiarkan selama 15-30 menit, sehingga telah terlihat jelas pemisahan antar lapisan atas dan lapisan bawah.. Produksi produk etanolisis ini dilakukan sebanyak 1 kali untuk mendapatkan produk etanolisis kasar yang cukup untuk penelitian tahap selanjutnya.

3.4.3. Fraksinasi

Fraksinasi produk etanolisis kasar dilakukan dengan metode sentrifius dingin pada suhu 5-10 °C dalam pelarut organik (Mappiratu, 1999 dengan modifikasi). Prosedur fraksinasi dilakukan dengan cara produk etanolisis kasar yang telah dicampur pelarut (etil asetat dengan sentrifus 1000, 1500, 2000, 3000 rpm, etanol dengan sentrifus 2000, 3000, 3500 rpm, etanol-etil asetat dengan sentrifus 1500, 2500, 3500 rpm) dengan perbandingan produk etanolisis dengan pelarut = 1:3 (v/v) dinginkan selama 1 jam di dalam lemari pendingan hingga mencapai suhu sekitar 5 °C, kemudian dilakukan sentrifius selama 2 menit. Fraksi 1 (cair) diuapkan pelarutnya di dalam oven 60 °C hingga berat konstan kemudian

digunakan untuk pengujian pola sebaran komponen gliserida pdengan metode kromatografi lapis tipis. Diagram alir proses fraksinasi dingin produk etanolisis kasar campuran CPO dan PKO disajikan pada Gambar 2.



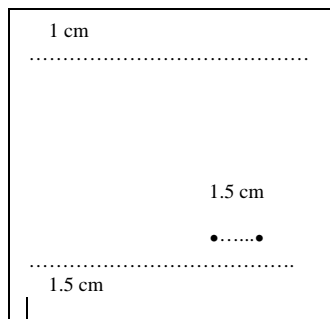
Gambar 2. Diagram alir fraksinasi dingin produk etanolisis kasar dari campuran CPO dan PKO

Sumber : Rangga *et al.* (2005) dengan modifikasi.

3.4.5. Identifikasi komponen gliserida

Identifikasi pola sebaran komponen gliserida diamati menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Mappiratu, 1999). Seluruh produk (10) hasil fraksinasi dingin sebanyak $\pm 0,5 \mu\text{l}$ dalam *spotting capiler* diaplikasikan pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel 60 F₂₅₄ (20x20 cm) dalam *batch*. Jarak

antar spot adalah 2 cm. Jarak batas bawah adalah 1,5 cm dan jarak batas atas 1 cm seperti terlihat pada Gambar 3.



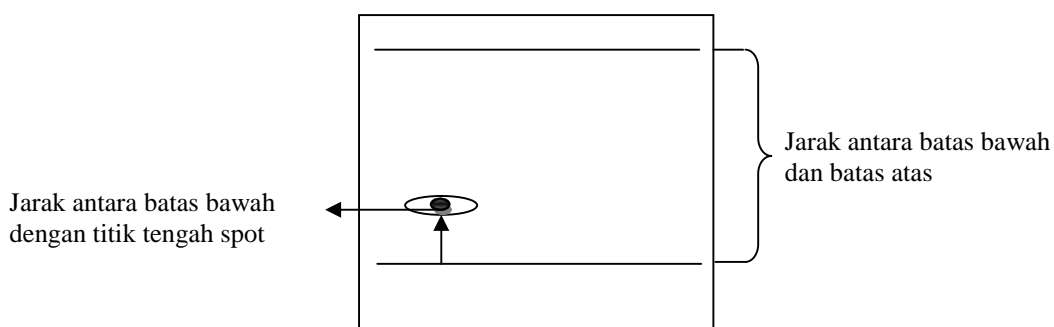
Gambar 3. Preparasi sampel pada lempeng KLT

Setelah *spotting* selesai dilakukan, lempeng KLT kemudian dikembangkan atau dielusi menggunakan eluen berupa campuran heksana/dietil eter/asam formiat, 80:20:2 (v/v/v) yang sebelumnya telah dijenuhkan di dalam *chamber*. Proses elusi berjalan dimulai dari bergerakanya eluen dari bagian bawah lempeng KLT dan dihentikan hingga eluen mencapai garis batas atas lempeng KLT. Waktu yang diperlukan untuk mengelusi $\pm 1,5$ jam. Lempeng kemudian dikeluarkan dari dalam *chamber* dan didiamkan selama beberapa menit sampai uap yang masih tertinggal hilang. Identifikasi komponen terpisah pada lempeng KLT ditampakan dengan zat penampak uap iodium hingga membentuk spot berwarna kuning.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Nilai Rf dan pola sebaran komponen terpisah

Setiap spot yang terbentuk pada lempeng KLT dihitung nilai Rf-nya. Nilai Rf beragam mulai dari 0 sampai 1. Posisi spot pada lempeng KLT diukur dari batas garis bawah sampai ke titik tengah spot seperti terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Rencana pengamatan spot pada lempeng KLT

Nilai R_f dapat dicari dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak } X}{\text{Jarak total}}$$

Keterangan :

Jarak X : Jarak antara garis batas bawah KLT dengan titik tengah spot

Jarak total : Jarak antara garis bawah KLT dengan garis batas atas KLT

Selanjutnya identifikasi pola sebaran komponen gliserida ditentukan dari nilai R_f yang kurang lebih mendekati pada penelitian sebelumnya (Murhadi dan Zuidar, 2010). Spot pada lempeng KLT yang memiliki nilai R_f tertinggi sampai terendah berturut-turut adalah TG, ALB, DG, dan MG (Mappiratu, 1999).

3.5.2. Rendemen fraksi massa komponen terpisah

Koleksi MG dan DG dilakukan menggunakan KLT silika gel preparatif. Batas setiap noda ditandai dengan pensil, kemudian dikerok dan ditampung dalam tabung raksi terpisah. Hasil kerokan noda TG sisa dan ALB/EE diekstrak dengan heksana, noda DG diekstrak dengan campuran heksana/dietil eter 1:1 (v/v), sedangkan noda MG diekstrak dengan dietil eter. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya (oven 50 °C) sampai diperoleh berat tetap. Rendemen fraksi massa

masing-masing komponen terpisah (TG, ALB/EE, DG, dan MG) dihitung dengan membagi berat (mg) semua komponen yang terpisah pada KLT, lalu dikali 100%.

Fraksi massa setiap spot dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Fraksi massa komponen (\%)} = \frac{\text{Berat X}}{\text{Berat total}} \times 100$$

Keterangan :

Berat X : Berat masing-masing spot produk etanolisis

Berat total : Berat keseluruhan spot produk etanolisis

3.5.3. Pengujian aktivitas antimikroba

Fraksi komponen terpisah dari masing-masing produk fraksinasi dingin CPO-PKO yang diujikan, dikumpulkan menjadi satu komponen masing-masing yaitu; MG, DG, ALB, dan TG berdasarkan nilai Rf yang berdekatan. Pengujian aktivitas antimikroba fraksi produk etanolisis campuran CPO dan PKO menggunakan difusi agar sumur (Murhadi dan Zuidar, 2009). Pengamatan didasarkan pada kemampuan senyawa antimikroba fraksi produk etanolisis campuran CPO dan PKO untuk menghasilkan zona penghambatan terhadap mikroba berupa diameter zona hambat (d, mm). Kultur bakteri murni dipindahkan ke dalam tabung agar miring NA steril dan diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam, selanjutnya sebanyak 1 ose kultur tersebut diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml medium NB steril, diinkubasi selama 24 jam pada 37 °C, dihomogenkan (vorteks), lalu diinokulasikan sebanyak 10-20 µL ke dalam cawan petri (100 x 15 mm) yang berisi sekitar 20 ml medium agar cair (NA, 44-45 °C) steril, digerakkan membentuk angka delapan hingga merata dan dibiarkan sampai membeku. Selanjutnya dibuat 2-4 lubang (sumur) secara aseptis dengan diameter sumur 6

mm. Ke dalam tiap lubang, diinokulasi dengan 60 μ L fraksi produk etanolisis kasar dari campuran CPO dan PKO.

Zona penghambatan yang diukur adalah radius (r , mm) penghambatan berupa areal bening di sekitar sumur uji, setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Pengukuran jari-jari (r , mm) zona hambat di sekeliling sumur uji dilakukan dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0.01 mm) pada beberapa sisi sumur uji, lalu dirata-ratakan. Selanjutnya dengan asumsi tinggi atau tebal media agar di dalam cawan petri uji adalah sama (9,0 cm) dan volume media agar cair yang ditambahkan sama (20 ml), maka perhitungan diameter zona hambat riil dapat menggunakan konsep dimensi luas lingkaran (dua dimensi). Perhitungannya sebagai berikut (Murhadi, 2010b):

1. Dihitung luas kotor (L_1 , mm²) lingkaran areal bening akibat daya hambat bakteri uji disekeliling sumur uji dengan persamaan luas :

$$L_1 = \pi \cdot r_1^2, \text{ dimana } r_1 = r_p + r_s$$

r_p = jarak dari lingkaran luar sumur ke lingkaran terluar areal bening di sekeliling sumur uji (mm),

r_s = jari-jari sumur uji (mm),

$$= 3,14$$

2. Dihitung luas kontrol (L_2 , mm²) areal bening akibat daya hambat pelarut organik yang digunakan sebagai pengencer dengan persamaan luas, yaitu :

$$L_2 = \pi \cdot r_2^2, \text{ dimana } r_2 = r_k + r_s$$

r_k = jarak dari lingkaran luar sumur ke lingkaran terluar areal bening di sekeliling sumur uji (mm) akibat daya hambat/pengencer organik,

$$r_s = \text{jari-jari sumur uji (mm)}, \\ = 3,14$$

3. Dihitung luas bersih (L_3 , mm^2) dengan persamaan : $L_3 = L_1 - L_2$
4. Dihitung jari-jari zona hambat riil (r_r , mm) dengan persamaan :

$$r_r = (L_3/3,14)$$
5. Dihitung nilai diameter zona hambat riil (d_r , mm) dengan persamaan :

$$d_r = 2 \cdot r_r$$
6. Akhirnya dapat dihitung nilai diameter zona hambat hasil konversi (d_c , mm) dengan persamaan : $d_c = 2 \cdot r_c$