

BAB III
BAHAN DAN CARA KERJA

A. BAHAN

1. Mikroorganisme

Isolat *Aspergillus flavus* NTGA7A4UVE10 hasil penelitian terdahulu berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI.

2. Medium dan Cara Pembuatan

a. Medium untuk Peremajaan

Medium untuk Peremajaan adalah Potato Dextrose Agar (PDA) [Difco]. Bahan medium PDA ditimbang secara seksama sebanyak 39 g, dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga larut sempurna, kemudian disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Larutan dibiarkan agak dingin pada temperatur kamar.

b. Medium untuk Prakultur

Medium untuk Prakultur adalah Medium YES (*yeast extract* 1% (b/v) [Difco] dan sukrosa 5% (b/v) [Merck]). Sebanyak 10 g *yeast extract* dan 50 g sukrosa dilarutkan dalam 1000 ml air suling steril, kemudian dipanaskan hingga medium mendidih. Setelah itu, disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Diperoleh medium YES untuk prakultur fermentasi. Medium YES dimasukkan ke dalam enam buah Erlenmeyer masing-masing 50 ml.

c. Medium untuk Fermentasi Tahap I

Fermentasi tahap I menggunakan medium yang mengandung *Yeast extract* [Difco], Sukrosa [Merck], dedak padi pandan wangi [penggilingan padi, Cianjur], asam-asam amino [PT Otsuka Indonesia], KH₂PO₄ [Merck] dan MgSO₄ [Merck].

Medium fermentasi dengan berbagai variasi dipersiapkan sebagai berikut:

1. Medium A (sebagai Medium Pembanding):

Sebanyak 100 g sukrosa, 0,5 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, dan 2,5 g *yeast extract* dilarutkan dalam 1000 ml air suling steril, dipanaskan hingga medium mendidih. Medium disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

2. Medium B (Medium Fermentasi Minimum):

Sebanyak 100 g sukrosa, 0,5 g $MgSO_4$, 1 g KH_2PO_4 , dan 10 g dedak pandan wangi dilarutkan dalam 1000 ml air suling steril, dipanaskan hingga medium mendidih. Medium disterilkan dengan otoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit.

3. Medium Fermentasi Minimum dengan Asam Amino:

- Medium C : MFM + AA1
- Medium D : MFM + AA2
- Medium E : MFM + AA3
- Medium F : MFM + AA4
- Medium G : MFM + AA5
- Medium H : MFM + AA1 + AA2
- Medium I : MFM + AA1 + AA3
- Medium J : MFM + AA1 + AA4
- Medium K : MFM + AA1 + AA5
- Medium L : MFM + AA2 + AA3
- Medium M : MFM + AA2 + AA4
- Medium N : MFM + AA2 + AA5
- Medium O : MFM + AA3 + AA4
- Medium P : MFM + AA3 + AA5
- Medium Q : MFM + AA4 + AA5

Keterangan: AA1 = L-triptofan dengan konsentrasi 20 mg/L

AA2 = L-arginin HCl dengan konsentrasi 20 mg/L

AA3 = L-lisin HCl dengan konsentrasi 30 mg/L

AA4 = L-asam glutamat dengan konsentrasi 100 mg/L

AA5 = L-valin dengan konsentrasi 150 mg/L

3. Bahan Kimia

Standar asam kojat [PT Ristra Indolab], kloroform [Merck], aseton [Merck], etil asetat [Merck], kalium dihidrogen fosfat [Merck], magnesium sulfat heptahidrat [Merck], toluen [Malincrodt], asam formiat [Merck], metanol [Merck], feri klorida [Merck].

B. ALAT

Alat-alat gelas, ose, bejana kromatografi [Camag], otoklaf [model 36 Ae Hirayama], KLT densitometer [Camag TLC Scanner 3], oven [Lab Line], corong pisah, pipa kapiler, *hood*, pipet Eppendorf, *hot plate* [Corning], *refrigerator*, *shaker* [Labline], sentrifugator [Kubota 5100], timbangan analitik [Acculab], vorteks [model VM 2000, *Digisystem Laboratory Instrument*], lempeng silika gel 60 F₂₅₄ [Merck], spektrofotometri IR [Shimadzu], spektrofotometri UV-Vis [Jasco V530].

D. CARA KERJA

1. Penyiapan inokulum dan fermentasi asam kojat

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan cara yang sesuai untuk masing-masing alat. Alat-alat yang disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, dikeringkan dahulu dalam lemari pengering selama 2 hari sebelum digunakan.

b. Peremajaan biakan *Aspergillus flavus*

Sebanyak 5 ml medium PDA yang masih cair dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah disterilkan. Tabung reaksi diletakkan pada posisi miring dengan sudut kemiringan kurang lebih 25⁰ dan dibiarkan hingga membeku. Pembuatan agar miring PDA ini dilakukan dibawah *Laminar Air Flow*.

Mutan *A.flavus* galur NTGA7A4UVE10 digoreskan pada medium PDA miring secara aseptis kemudian diinkubasikan pada suhu 28⁰C selama 7 hari. Sebagian biakan disimpan pada suhu 4⁰C sebagai *stock culture* dan sebagian pada 30⁰C sebagai *working culture*. Peremajaan *stock culture*

dilakukan setiap 2 bulan sekali, sedangkan *working culture* setiap 2 minggu sekali. Setelah inkubasi 7 hari, ke dalam biakan kapang dimasukkan 1,0 ml air suling steril, spora dikerik dengan ose dan dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi berisi 9,0 ml air suling steril, dihomogenkan dengan menggunakan vortex sehingga diperoleh suspensi spora dengan pengenceran 10 kali.

c. Penyiapan Inokulum dan Optimasi Waktu Inokulasi

Optimasi waktu inokulasi dilakukan dengan tiga macam waktu inkubasi yang berbeda, yaitu:

1. Inokulum A : 50 ml medium YES ditambah 5,0 ml suspensi spora hasil peremajaan, diinkubasi selama 18 jam pada suhu 30⁰C dengan pengocokan 180 rpm.
2. Inokulum B : 50 ml medium YES ditambah 5,0 ml suspensi spora hasil peremajaan, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30⁰C dengan pengocokan 180 rpm.
3. Inokulum C : 50 ml medium YES ditambah 5,0 ml suspensi spora hasil peremajaan, diinkubasi selama 30 jam pada suhu 30⁰C dengan pengocokan 180 rpm.

Berdasarkan hasil inokulasi dilakukan pengamatan biomassa sel. Waktu inokulasi yang menghasilkan biomassa sel terbesar dijadikan waktu inokulasi untuk tahapan fermentasi selanjutnya.

d. Fermentasi Tahap I (Variasi Asam Amino)

Sebanyak 10% (v/v) inokulum disuspensikan dengan 2 ml medium fermentasi di dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12 hari dengan pengocokan 180 rpm. Setelah itu, dilakukan pengamatan terhadap biomassa sel dan dilakukan skrining asam kojat dengan larutan FeCl₃ 1%. Medium yang menghasilkan konsentrasi asam kojat tertinggi digunakan sebagai medium terpilih untuk tahap fermentasi selanjutnya.

Medium terpilih dibandingkan dengan medium fermentasi minimum (medium B) dan medium dengan *yeast extract* (medium A) dalam Erlenmeyer 250 ml. Masing-masing medium dimasukkan sebanyak 100 ml ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Sebanyak 10% (v/v) inokulum disuspensikan dengan medium tersebut. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12 hari dengan pengocokan 180 rpm. Setelah itu, dilakukan pengamatan terhadap biomassa sel dan dilakukan skrining asam kojat dengan larutan FeCl₃ 1%.

e. Fermentasi Tahap II (Variasi Volume Medium Fermentasi)

Sebanyak 10% (v/v) inokulum disuspensikan dengan medium fermentasi terpilih dengan berbagai variasi volume medium fermentasi sebagai berikut:

1. Erlenmeyer 1 : volume medium sebanyak 100 ml dalam Erlenmeyer 250 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 28⁰C selama 12 hari dengan pengocokan 180 rpm.
2. Erlenmeyer 2 : volume medium sebanyak 300 ml dalam Erlenmeyer 1000 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 28⁰C selama 12 hari dengan pengocokan 150 rpm.
3. Erlenmeyer 3 : volume medium sebanyak 400 ml dalam Erlenmeyer 1000 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 28⁰C selama 12 hari dengan pengocokan 150 rpm.
4. Erlenmeyer 4 : volume medium sebanyak 500 ml dalam Erlenmeyer 1000 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 28⁰C selama 12 hari dengan pengocokan 150 rpm.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan biomassa sel dan dilakukan penetapan kadar asam kojat dengan KLT Densitometri.

2. Pemisahan biomassa sel dan penentuan bobot sel kering

Terhadap tiap kultur fermentasi dilakukan sampling pada hari ke 12. Sampling dilakukan dengan memipet cairan kultur fermentasi sebanyak 2,0 ml kemudian disaring dengan kertas saring yang telah ditimbang. Kemudian supernatan dimasukkan ke dalam tabung *sentrifuge* dan disentrifugasi pada kecepatan 3.800 rpm selama 60 menit. Endapan yang diperoleh digunakan untuk penentuan bobot sel kering (biomassa sel kapang), sedangkan supernatannya digunakan untuk analisis kuantitatif asam kojat dan analisis kualitatif aflatoksin B1. Kertas saring yang mengandung endapan endapan dikeringkan dalam oven dan ditimbang hingga bobot konstan. Selisih berat kertas saring sebelum dan sesudah berisi endapan biomassa sel adalah bobot sel kering dari *Aspergillus flavus*.

3. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Kultur Fermentasi

a. Skrining Pereaksi FeCl_3 1%

Pada hasil fermentasi, sebelum dilakukan analisis kuantitatif secara KLT dilakukan skrining terlebih dahulu menggunakan pereaksi FeCl_3 1% (b/v). Sebanyak 200 μl supernatan hasil sentrifugasi dipipet ke dalam plat tetes. Kemudian masing-masing ditetesi dengan satu tetes FeCl_3 1% (b/v). Kultur yang berubah warna menjadi merah coklat dan lebih pekat di antara

sampel lainnya dipilih untuk dilakukan analisis secara Kromatografi Lapis Tipis dan ditentukan kadarnya secara densitometri.

b. Penetapan Kadar Asam Kojat dari Kultur Fermentasi

1) Pembuatan larutan standar asam kojat

Standar asam kojat ditimbang secara seksama sebanyak kurang lebih 100,8 mg, dilarutkan dalam kloroform:metanol (2:1) dalam labu ukur 100 ml dan dicukupkan volumenya hingga batas. Dari larutan induk tersebut dibuat larutan standar asam kojat dengan konsentrasi 1008,0; 907,0; 806,0; 705,0; 604,0; dan 504,0 ppm.

2) Pembuatan spektrum serapan dan kurva kalibrasi standar asam kojat

Sebanyak 1 μ l larutan standar asam kojat dengan konsentrasi 1008,0; 907,0; 806,0; 705,0; 604,0; dan 504,0 ppm ditotolkan pada lempeng silika gel F₂₅₄. Lempeng dielusi dengan toluen : etil asetat : asam formiat (3:6:1) dengan jarak elusi 80 mm dalam bejana yang telah dijenuhkan selama 3 jam. Diamkan, lalu diukur serapannya dengan densitometer menggunakan lampu D₂ dan W, detektor UV-Vis dan panjang gelombang 200 – 400 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimum. Berdasarkan panjang gelombang

maksimum yang diperoleh dilakukan pengukuran terhadap masing-masing konsentrasi standar asam kojat dengan densitometer menggunakan lampu D_2 dan W , detektor UV-Vis dan panjang gelombang 200 – 400 nm. Luas puncak yang diperoleh diplot dengan konsentrasi zat dan dibuat persamaan dengan regresi linear.

3) Penetapan kadar asam kojat dalam kultur fermentasi

Supernatan yang diperoleh dari pemisahan biomassa sel dipipet sebanyak 200 μ l lalu dikeringkan dan ditambahkan pelarut kloroform : methanol (2 : 1) sebanyak 2 ml. Larutan sampel ditotolkan sebanyak 1 μ l pada lempeng silica gel. Lempeng dielusi dengan toluen : etil asetat : asam formiat (3 : 6 : 1) dengan jarak elusi 80 mm dalam bejana yang telah dijenuhkan selama 3 jam. Lempeng dikeringkan, diukur dengan densitometer menggunakan lampu D_2 dan W , detector UV-Vis. Luas area yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi.

c. Analisis Kualitatif dengan metode Spektrofotometri UV-Vis

1) Pembuatan larutan dan spektrum serapan standar asam kojat

Standar asam kojat ditimbang 25,2 mg, lalu dilarutkan dalam akuades dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan volumenya hingga batas. Dari

larutan induk tersebut dibuat larutan standar asam kojat dengan konsentrasi 252,0 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat larutan standar asam kojat dengan konsentrasi 25,2 ppm.

Larutan standar asam kojat diukur serapannya pada panjang gelombang 200 – 400 nm, dengan blangko akuades, kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

2) Pembuatan spektrum serapan asam kojat dalam kultur fermentasi

Filtrat hasil fermentasi dipipet sebanyak 1,0 ml ke dalam labu ukur 10,0 ml kemudian dicukupkan volumenya dengan akuades. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1,0 ml ke dalam labu ukur 50,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan akuades.

Filtrat hasil fermentasi tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 200 – 400 nm, dengan blangko akuades, kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

d. Analisis Kualitatif dengan Metode Spektrokolorimetri

1) Pembuatan larutan dan spektrum serapan standar asam kojat

Standar asam kojat ditimbang 104,0 mg, lalu dilarutkan dalam akuades dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan volumenya hingga batas.

Dari larutan induk tersebut dibuat larutan standar asam kojat dengan konsentrasi 104,0 ppm.

Larutan standar asam kojat dipipet sebanyak 8,0 ml dan ditambahkan 1,0 ml larutan FeCl_3 1%. Serapannya diukur pada panjang gelombang 400-700 nm dengan menggunakan blanko 8,0 ml akuades ditambah 1,0 ml larutan FeCl_3 1%. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

2) Pembuatan spektrum serapan asam kojat dalam kultur fermentasi

Filtrat hasil sentrifugasi dipipet sebanyak 1,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml dan diencerkan dengan akuades hingga batas. Sebanyak 8,0 ml larutan tersebut dipipet kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan FeCl_3 1% dan diukur serapannya pada panjang gelombang 400-700 nm dengan menggunakan blanko 8,0 ml akuades ditambah 1,0 ml larutan FeCl_3 1%. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.