

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini direncanakan mulai Desember 2008 sampai September 2009. Penelitian dilakukan di Laboratoria Pengkajian Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Sub. Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB) Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPP Teknologi), kawasan Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPIPTEK) Serpong, Tangerang.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

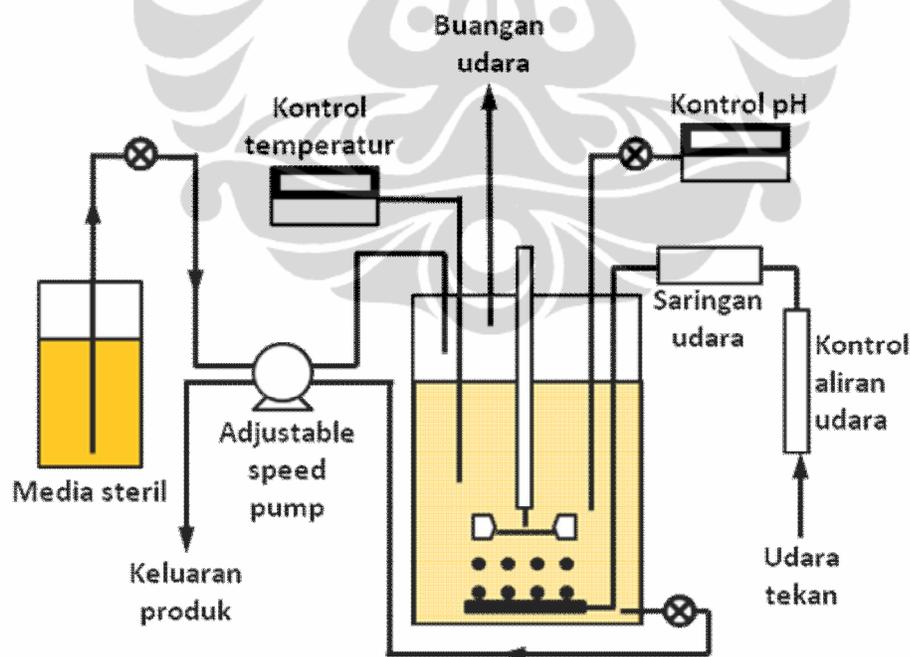
Mikroba yang digunakan adalah *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 (Koleksi Kultur Mikroba Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta) dan *Bacillus licheniformis* F11.1 (Koleksi Kultur Mikroba Laboratorium Bioindustri, BPP Teknologi), ke dua galur mikroba tersebut disimpan di suhu -80°C pada gliserol 10% (v/v) (BDH Laboratory Supplies, England). Untuk mempersiapkan inokulum, dari stok kultur dilakukan subkultur selama 16 jam pada dua labu Erlenmeyer 1 (satu) liter yang masing-masing mengandung 200 ml media pertumbuhan cair *Luria-Bertani* (LB) untuk *Bacillus licheniformis* F11.1 dan media *deMann Rogosa Sharpe* (MRS) untuk *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116, diinkubasi pada suhu 37°C , dengan tujuan supaya diperoleh biakan mikroba segar dengan konsentrasi sekitar 10^7 CFU/ml sebagai kultur stok yang disimpan pada temperatur -20°C .

Komposisi media fermentasi untuk proses demineralisasi kulit udang menggunakan mikroba *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 pada awal proses *batch* adalah glukosa 6% (b/v); ekstrak khamir 0.05% (b/v); dan kulit udang 30% (b/v). Sedangkan proses deproteinasi menggunakan mikroba *Bacillus licheniformis* F11.1 adalah ekstrak khamir 0.5% (b/v); KH_2PO_4 0.5% (b/v); CaCl_2 0.1% (b/v); NaCl 0.5% (b/v); dan MgSO_4 0,05 (b/v). Kondisi proses demineralisasi dilakukan pada pH 7 (pH awal); temperatur 30°C ; dengan agitasi

50 rpm, dan kondisi proses deproteinasi adalah pH 7,3 (pH awal); temperatur 37 °C; agitasi 250 rpm; dengan aerasi 2 vvm.

Kulit udang vannamei (*Penaeus vannamei*) diperoleh dari industri pengolahan udang beku PT Wirontono Baru, Jakarta Utara. Bahan kimia lainnya adalah glukosa, ekstrak khamir, pepton, NaCl, MgCl₂·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, NaOH, Azokasein, *Tri Chloro Acetic acid* (TCA), *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Alat yang digunakan yaitu fermentor berpengaduk *flat blade disk turbine* volume 12 liter (Biostat, B. Braun Biotech International, Germany); autoclave, tabung reaksi; pembakar bunsen; cawan petri; cawan porselin; sentrifuse Hitachi Nimac CR 21G; corong; pH-meter (Orion); spektrofotometer (Novaspec II & Hitachi UV-Vis 2000); erlenmeyer (Pyrex); beaker glass (Pyrex); alat pengering infra-red; tanur; *High performance liquid chromatography* (HPLC-Hitachi-Merck); inkubator *shaker*; *ependorf*; gelas ukur; dan lain-lain. Sedangkan skematik fermentor untuk fermentasi kontinyu proses demineralisasi dan deproteinasi dapat terlihat pada Gambar 3.1.

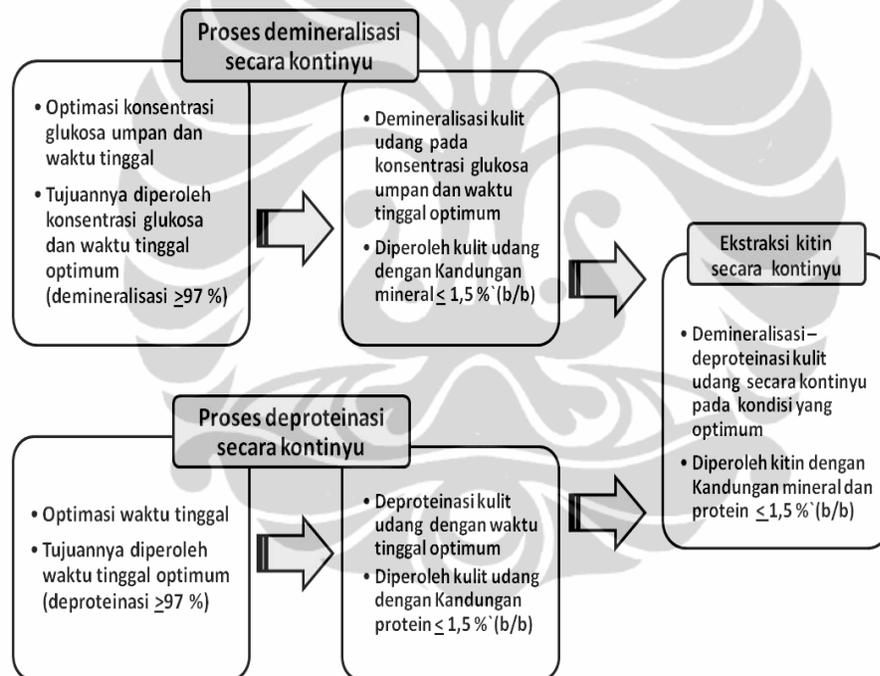


Gambar 3.1. Skematik fermentor untuk fermentasi kontinyu

3.3 Metode Penelitian

Percobaan proses demineralisasi dan deproteinasi kulit udang secara kontinyu sebagai tahapan ekstraksi kitin secara biologis menggunakan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 dan *Bacillus licheniformis* F11.1 didahului dengan percobaan demineralisasi dan deproteinasi dengan sistem *batch*, sebagai dasar untuk menentukan beberapa parameter yang akan digunakan untuk proses fermentasi kontinyu.

Penelitian proses demineralisasi dan deproteinasi secara kontinyu ini dilakukan melalui serangkaian tahapan percobaan sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Skematik tahapan penelitian

3.3.1 Percobaan Optimasi Demineralisasi Kulit udang Secara Kontinyu

Tujuan percobaan adalah untuk menentukan konsentrasi glukosa yang diumpankan dan waktu tinggal, sehingga diperoleh proses yang optimal dengan tingkat penyisihan mineral $\geq 98\%$. Proses fermentasi kulit udang secara kontinyu untuk menghilangkan kandungan mineral dilakukan pada fermentor Biostat

Universitas Indonesia

berpengaduk yang diawali dengan fermentasi *batch* dengan volume 5 liter (media glukosa 6%, ekstrak khamir 0.05%, kulit udang 30%, dan 10% inokulum *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116), fermentasi dilakukan tanpa aerasi, temperatur dipertahankan 30 °C dan pH 6 – 6.5 (pH dijaga dengan penambahan 10 M NaOH). Fermentor diaduk dengan menggunakan pengaduk jenis *flat blade disk turbine* dengan kecepatan 50 rpm, fermentasi *batch* dilakukan selama 12 jam, sebelum pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 memasuki fase stasioner dan penurunan kandungan glukosa di dalam media fermentasi belum sampai fase konstan, maka media fermentasi baru mulai diumpankan ke dalam fermentor untuk memulai fermentasi kontinyu pada volume tetap 5 liter.

Prosedur percobaan: Kulit udang yang diperoleh dari pabrik pembekuan udang PT Wirontono Baru - Jakarta Utara, dicuci bersih kemudian dilakukan pengecilan ukuran, setelah itu disaring dengan kawat saringan ukuran 0,5 – 1 cm. Selanjutnya ditimbang sebanyak 300 gram dan dikemas dalam kantong plastik untuk disimpan dalam *freezer* pada suhu -20 °C sampai siap digunakan dalam proses fermentasi.

Pembuatan *starter* bakteri *L. acidophilus* FNCC116 berdasarkan prosedur Jung *et al.* (2005) yang dimodifikasi, dengan mengambil sebanyak 10 ml biakan bakteri *L. acidophilus* FNCC116 dari kultur stok yang disimpan pada suhu -20 °C, kemudian dikulturasi dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml MRS (*deMann Rogosa Sharpe*). Proses inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 16-18 jam dalam inkubator shaker 50 rpm.

Selanjutnya, *starter* bakteri tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 5 (lima) liter yang berisi 900 ml larutan MRS. Kemudian diinkubasi pada kondisi yang sama sampai diperoleh nilai *optical density* (OD) 0,85 sebagai inokulum. Lama waktu yang diperlukan untuk mencapai nilai OD 0,85 sekitar 8 - 12 jam, dengan tingkat kepadatan sel adalah 10×10^8 cfu/ml.

Kemudian dilakukan proses demineralisasi awal (*batch*) terhadap kulit udang melalui proses fermentasi asam laktat (Rao dan Steven, 2005 yang dimodifikasi). Fermentasi dilakukan dalam fermentor ukuran 13 liter dengan volume kerja 5 liter. Proses demineralisasi dilakukan sebagai berikut: inokulum

Universitas Indonesia

500 ml (10 %, v/v) dimasukkan ke dalam fermentor yang telah diisi media fermentasi sebanyak 4500 ml dan 1500 gram (30 %, b/v) kulit udang. Komposisi media fermentasi tersebut terdiri dari glukosa 60 g/L dan ekstrak khamir 0,5 g/L. pH awal media fermentasi ditetapkan pH 7. Setelah itu difermentasi pada suhu ruang ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan diaduk dengan kecepatan 50 rpm dan pH dijaga 6 – 6.5 dengan penambahan 10 M NaOH, total waktu proses demineralisasi selama 48 jam (12 jam fermentasi *batch* dan \pm 36 jam fermentasi kontinyu).

Sebelum fermentasi *batch* memasuki fase stasioner, media baru diumpangkan ke dalam fermentor untuk memulai fermentasi kontinyu dengan volume fermentasi tetap 5 L, yang ditandai jumlah mikroba mulai naik dan kandungan glukosa di dalam media fermentasi turun segera sebelum mulai kosten (sekitar jam ke 12). Selama proses fermentasi kontinyu konsentrasi glukosa yang diumpangkan dan waktu tinggal dioptimasi untuk memperoleh kondisi fermentasi kontinyu yang optimal.

Setelah kondisi konsentrasi glukosa yang diumpangkan dan waktu tinggal yang optimal didapatkan, kemudian dilakukan proses demineralisasi kulit udang menggunakan *L. acidophilus* FNCC 116 secara kontinyu dengan kondisi optimum tersebut, secara singkat tahapan proses demineralisasi kulit udang secara kontinyu dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Proses demineralisasi kulit udang secara kontinyu

| Komponen | Optimasi demineralisasi kontinyu | Demineralisasi kontinyu |
|--------------------|---|---|
| Mikroba | <i>Lactobacillus acidophilus</i> FNCC 116 (mikroaerofilik) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> FNCC 116 (mikroaerofilik) |
| Jenis fermentor | STR; vol. 12 L; <i>Flat blade disk turbine</i> (vol. kerja 5 L) | STR; vol. 12 L; <i>Flat blade disk turbine</i> (vol. kerja 5 L) |
| Kondisi fermentasi | pH 6-6.5; temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 50 rpm; 48 jam (12 jam <i>batch</i> ; 36 jam kontinyu) | Kondisi fermentasi sama |
| Media (b/v) | Glukosa 6%; ekstrak khamir 0.05%; kulit udang 30% | Komposisi tetap (kecuali glukosa hasil optimasi) |
| Parameter optimasi | Konsentrasi substrat (glukosa 9%; 6,5%; 5%; 2,5%) dan wktu tinggal (16 jam dan 32 jam) | Konsentrasi glukosa dan waktu tinggal optimum |
| Pengamatan ferm. | Kons. Glukosa; as.laktat; abu; protein; jumlah sel | Kons. Glukosa; as.laktat; abu; protein; jumlah sel |

Untuk mengukur keberhasilan proses demineralisasi dilakukan pengamatan pada kulit udang meliputi kadar abu (AOAC, 1984) kemudian dilakukan penghitungan tingkat penurunan kadar abu kulit udang, sedangkan pada

media fermentasi diamati kandungan glukosa dan asam laktat (HPLC), dan jumlah bakteri metode ALT (Angka Lempeng Total), pengambilan contoh dilakukan setiap 6 jam sekali, contoh media fermentasi diambil dari dalam fermentor dan aliran ke luar (untuk memastikan bahwa sistem homogen), data hasil pengukuran dianalisis secara diskriptif dalam bentuk grafik.

3.3.2 Percobaan Optimasi Deproteinasi Kulit udang Secara Kontinyu

Tujuan percobaan adalah untuk menentukan waktu tinggal, sehingga diperoleh proses yang optimal dengan tingkat penyisihan protein $\geq 97\%$. Proses fermentasi kulit udang secara kontinyu untuk menghilangkan kandungan protein dilakukan pada fermentor Biostat, diawali dengan fermentasi *batch* dengan volume 5 liter (komposisi media fermentasi ekstrak khamir 0.5%, serta garam mineral, kulit udang 30%, dan 20% inokulum *Bacillus licheniformis* F11.1), fermentasi dilakukan dengan aerasi 2 vvm, temperatur dipertahankan 37 °C dan pH 7,5 – 8 (pH dijaga dengan penambahan 1 M Asam asetat). Fermentor diaduk dengan menggunakan pengaduk *flat blade disk turbine* dengan kecepatan 250 rpm, fermentasi *batch* dilakukan selama 24 jam, sebelum pertumbuhan *Bacillus licheniformis* F11.1 memasuki akhir fase stasioner dan pada saat aktivitas proteolitik dari enzim protease di dalam media mulai meningkat pesat, maka media fermentasi baru diumpankan ke dalam fermentor untuk memulai fermentasi kontinyu dengan volume konstan 5 liter.

Pembuatan *starter* bakteri *B.licheniformis* F11.1 berdasarkan prosedur Waldeck *et al.* (2006) yang dimodifikasi, diambil 5 ml bakteri *B. licheniformis* F11.1 dari kultur stok kemudian dikulturasi dalam erlenmeyer 1000 ml yang diisi 195 ml media LB (*Luria Broth*) steril. Komposisi media LB terdiri dari pepton 10 g/L; ekstrak khamir 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH ditetapkan pada 7,3. Setelah itu, diinkubasi dalam inkubator shaker 180 rpm selama 6 jam pada suhu 37 °C.

Penyiapan inokulun: *starter* 200 ml dimasukkan ke dalam 800 ml media LB steril pH 7,3. Kemudian diinkubasi dalam inkubator shaker agitasi 180 rpm, dan 37 °C, sampai diperoleh *optical density* (OD) inokulum 0,9 dengan tingkat kepadatan mencapai 10×10^8 CFU/ml.

Selanjutnya dilakukan deproteinasi kulit udang dengan kultivasi bakteri (Metode Waldeck et al. 2006 yang dimodifikasi), kultivasi dilakukan dalam fermentor ukuran 12 liter dengan volume kerja 5 liter. Prosedur proses deproteinasi sebagai berikut : larutan inokulum 1000 ml (20 %, v/v) dimasukkan ke dalam fermentor yang telah diisi media fermentasi sebanyak 4000 ml dan 1500 gram (30 %, b/v) kulit udang. Komposisi media fermentasi terdiri dari ekstrak khamir 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; CaCl_2 0,1%; NaCl 0,5% dan MgSO_4 0,05% (b/v). pH awal media diatur pada 7,3. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C dan selama fermentasi pH diatur pada kisaran 7,5 – 8,0 (dengan penambahan 1 M asam asetat), aerasi 2 vvm dan agitasi 250 rpm, total waktu proses deproteinasi 96 jam (24 jam fermentasi *batch* dan \pm 72 jam fermentasi kontinyu).

Fermentasi kontinyu dilakukan segera sebelum *B. licheniformis* F11.1 memasuki fase stasioner, yang ditandai dengan aktivitas proteolitik di dalam media fermentasi meningkat (sekitar jam ke 24), media fermentasi baru mulai diumpangkan ke dalam fermentor untuk memulai proses deproteinasi secara kontinyu pada volume konstan 5 liter. Selama proses fermentasi kontinyu waktu tinggal dioptimasi untuk memperoleh kondisi fermentasi yang optimal. Setelah waktu tinggal yang optimal untuk proses deproteinasi kontinyu didapatkan, dilanjutkan proses deproteinasi menggunakan *B.licheniformis* F11.1 secara kontinyu dengan kondisi optimum tersebut, secara singkat tahapan proses deproteinasi kulit udang secara kontinyu dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Proses deproteinasi kulit udang secara kontinyu

| Komponen | Optimasi deproteinasi kontinyu | Deproteinasi kontinyu |
|--------------------|---|---|
| Mikroba | <i>Bacillus licheniformis</i> F11.1 (aerob) | <i>Bacillus licheniformis</i> F11.1 (aerob) |
| Jenis fermentor | STR; vol. 12 L; <i>Flat blade disk turbine</i> (vol. kerja 5 L) | STR; vol. 12 L; <i>Flat blade disk turbine</i> (vol. kerja 5 L) |
| Kondisi fermentasi | pH 7,5-8; temp.37 °C; 250 rpm; 2 vvm; 96 jam (24 jam <i>batch</i> ; 72 jam kontinyu) | Kondisi fermentasi sama |
| Media (b/v) | Ekstrak khamir 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; CaCl_2 0,1%; NaCl 0,5% dan MgSO_4 0,05%; kulit udang 30% | Komposisi tetap |
| Parameter optimasi | Waktu tinggal (6 jam; 12 jam dan 24 jam) | Waktu tinggal yang optimum |
| Pengamatan ferm. | Kons. protein; aktiv.enzim; abu; jumlah sel | Kons. protein; aktiv.enzim; abu; jumlah sel |

Untuk mengukur keberhasilan proses deproteinasi dilakukan pengamatan terhadap kulit udang dan cairan fermentasi tiap 12 jam sekali. Parameter yang diamati pada kulit udang adalah kandungan protein (metode Lowry *et al.* 1954 dimodifikasi) serta penghitungan tingkat pengurangan kandungan protein, sedangkan pada cairan fermentasi adalah aktivitas enzim (metode Azokasein), dan total bakteri (metode ALT), pengambilan contoh dilakukan setiap 6 jam sekali, contoh cairan fermentasi diambil dari dalam fermentor dan aliran ke luar fermentor, data hasil pengukuran kandungan protein kulit udang, aktivitas enzim, dan total bakteri dianalisis secara diskriptif dalam bentuk grafik.

3.3.3 Percobaan Ekstraksi Kitin Secara Kontinyu

Prosedur percobaan untuk tahapan proses demineralisasi yang dilanjutkan dengan proses deproteinasi secara kontinyu dilakukan sebagai berikut : Menyiapkan kulit udang dan *starter* serta inokulum *L. acidophilus* FNCC 116 sebagaimana yang dilakukan pada percobaan 3.3.1. Langkah selanjutnya adalah proses demineralisasi *batch* dalam fermentor 12 liter dengan volume kerja 5 liter, inokulum sebanyak 500 ml (10%, v/v) dimasukkan ke dalam fermentor yang telah diisi media fermentasi sebanyak 4500 ml dan 1500 gram (30%, b/v) kulit udang segar, dengan komposisi media fermentasi terdiri dari glukosa 60 g/L dan ekstrak khamir 0,5 g/L.

Proses demineralisasi *batch* dilakukan pada suhu ruang ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan diagitasi dengan kecepatan 50 rpm, kemudian memasuki jam ke 12 media fermentasi baru dengan konsentrasi glukosa yang optimum diumpankan ke dalam fermentor dengan waktu tinggal sesuai hasil optimasi untuk memulai proses demineralisasi secara kontinyu selama ± 36 jam. Selesai fermentasi, kulit udang hasil demineralisasi dicuci bersih dengan air mengalir sampai air bekas cucian mempunyai pH 7, selanjutnya digunakan untuk proses deproteinasi.

Langkah berikutnya adalah kulit udang hasil demineralisasi dideproteinasi dengan prosedur sebagai berikut : Mempersiapkan inokulum *B. licheniformis* F11.1 sebagaimana yang dilakukan pada percobaan 3.3.2. Selanjutnya dilakukan proses deproteinasi *batch* dalam fermentor 12 liter dengan volume kerja 5 liter.

Universitas Indonesia

Inokulum bakteri sebanyak 1000 ml (20%, v/v) dimasukkan ke dalam fermentor yang telah diisi 4000 ml media fermentasi dan kulit udang hasil demineralisasi sebanyak 1500 gram (30%, b/v), komposisi media terdiri dari ekstrak khamir 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; CaCl_2 0,1%; NaCl 0,5% dan MgSO_4 0,05% (b/v). Setelah itu difermentasi pada suhu 37 °C, dengan aerasi 2 vvm dan agitasi 250 rpm, serta pH diatur pada kisaran 7,5 – 8,0. Kemudian setelah memasuki jam ke 24 dilakukan umpan media baru ke dalam fermentor sebagai awal dari proses deproteinasi secara kontinyu selama \pm 72 jam, dengan waktu tinggal hasil optimasi. Fermentasi kontinyu untuk demineralisasi menggunakan *L. acidophilus* FNCC 116 dan deproteinasi menggunakan *B. licheniformis* F11.1 secara simultan, dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Proses Demineralisasi dan Deproteinasi kulit udang secara kontinyu

| Parameter | Demineralisasi kontinyu | Deproteinasi kontinyu |
|--------------------|--|---|
| Mikroba | <i>Lactobacillus acidophilus</i> FNCC 116 (mikroaerofilik) | <i>Bacillus licheniformis</i> F11.1 (aerob) |
| Jenis fermentor | STR; vol. 12 L; Flat blade disk turbine (vol. kerja 5 L) | STR; vol. 12 L; Flat blade disk turbine (vol. kerja 5 L) |
| Kondisi fermentasi | pH 6-6.5; temp.30 °C; 50 rpm; 48 jam (12 jam batch; 36 jam kontinyu) | pH 7,5-8; temp.37 °C; 250 rpm; 2 vvm; 96 jam (24 jam batch; 72 jam kontinyu) |
| Media batch (b/v) | Glukosa 6%; ekstrak khamir 0.05%; kulit udang 30% | Ekstrak khamir 0,5%; KH_2PO_4 0,5%; CaCl_2 0,1%; NaCl 0,5% dan MgSO_4 0,05%; kulit udang 30% |
| Media kontinyu | Konsentrasi glukosa dan waktu tinggal hasil optimasi | Waktu tinggal hasil optimasi |
| Pengamatan ferm. | Kons. Glukosa; as.laktat; abu; protein; jumlah sel | Kons. protein; aktiv.enzim; abu; jumlah sel |

Untuk menentukan tingkat keberhasilan proses dilakukan pengamatan pada kulit udang dan media fermentasi dari kedua tahapan proses tersebut, selama proses dilakukan pengamatan kandungan abu (AOAC, 1984) dan protein (metode Lowry *et al*, 1954 dimodifikasi). Pengamatan pada media fermentasi untuk proses deproteinasi dilakukan terhadap total bakteri (ALT) dan aktivitas enzim (Azokasein), sedangkan untuk proses demineralisasi diamati total bakteri (ALT), glukosa dan asam laktat (HPLC), pengambilan contoh dilakukan dari dalam fermentor dan aliran ke luar, serta data hasil pengukuran dari parameter dianalisis secara diskriptif dalam bentuk grafik.

3.3.4. Parameter Pengamatan

Untuk menentukan keberhasilan proses demineralisasi dan deproteinasi secara kontinyu maka pada setiap tahapan proses dilakukan pengamatan beberapa parameter terhadap kulit udang dan cairan fermentasi baik sebelum, selama dan setelah proses demineralisasi maupun deproteinasi. Pada proses demineralisasi dilakukan pengamatan parameter kandungan glukosa, asam laktat, protein, abu dan jumlah sel. Pada proses deproteinasi dilakukan pengamatan aktivitas enzim, jumlah sel, kandungan abu dan protein. Sedangkan pada produk akhir dilakukan pengamatan parameter kandungan abu, protein dan kitin. Adapun cara kerja analisa berbagai parameter pengamatan tersebut adalah:

3.3.4.1. Penentuan Kandungan Glukosa dan Asam Laktat

Analisa glukosa dan asam laktat selama proses demineralisasi dilakukan menggunakan HPLC (Merck-Hitachi) dengan menggunakan kolom Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm), Suhu 65 °C (L-5025-Column Thermostat), fasa gerak isokratik menggunakan H₂SO₄ 0,005 N dengan laju alir 0.6 ml/menit (L-6200A-Pump, Merck-Hitachi), menggunakan detektor *Differential Refractometer* RI-71 (Merck). Standar yang digunakan adalah Glukosa 1% (Glucose, Sigma-Aldrich) Asam laktat 10% (L-Lactic Acid, Oxoid).

Contoh sebelum dianalisa disentrifuge 14.000 rpm, kemudian supernatan disaring dengan mikrofilter yang berukuran 0,2 μ supaya terbebas dari partikel pengotor. Contoh diinjeksikan ke dalam kolom sebanyak 10 μL, analit yang ke luar dari kolom dideteksi oleh RI detektor serta signal dari detektor diolah dan dicetak oleh integrator D-2500 (Chomato-Integrator, Merck-Hitachi) dalam bentuk kurva luas area dan data kadar glukosa dan asam laktat, perhitungan kadar glukosa dan asam laktat dalam contoh menggunakan persamaan 3.1.

$$\text{Analit (mg/L)} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \text{konsentrasi standar} \times F_p \quad (3.1)$$

Keterangan : F_p = Faktor pengenceran

3.3.4.2. Penentuan Kandungan Abu Kulit udang

Abu merupakan sisa hasil pembakaran suatu bahan organik, kandungan abu dan komposisinya tergantung pada macam bahan dan cara pengabuannya, kadar abu merupakan salah satu metode penghitungan jumlah mineral yang terkandung dalam suatu bahan (Waldeck et al. 2006). Adapun cara kerja penentuan kadar abu dari contoh kulit udang selama proses demineralisasi dan deproteinasi menurut AOAC (1984) adalah tempatkan 1 gram contoh kulit udang kering dalam cawan crucible yang telah distandarkan beratnya sampai konstan, tempatkan cawan crucible yang berisi contoh di dalam furnace dan panaskan pada suhu 800°C selama 3 jam, angkat dan biarkan sampai dingin pada pengering atau desikator, kemudian timbanglah crucible yang berisi abu dengan hati-hati. Perhitungan kadar abu hasil pengabuan pada furnace dihitung dengan menggunakan persamaan 3.2.

$$\text{Abu (\%)} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100\% \quad (3.2)$$

Keterangan:

- m_1 = Berat cawan crucible dan contoh (g)
- m_2 = Berat cawan crucible dan abu (g)
- m = Berat cawan (g)

$$\text{Tingkat penghilangan abu (\%)} = \frac{\text{kadar abu awal} - \text{kadar abu akhir}}{\text{kadar abu awal}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Tingkat penyisihan abu (demineralisasi) kulit udang kemudian dihitung dengan persamaan 3.3

3.3.4.3. Penentuan Kandungan Protein Kulit udang

Kadar protein tidak terlarut (protein kulit udang) selama proses demineralisasi dan deproteinasi diukur dengan metode Lowry yang dimodifikasi (Waldeck et al. 2006). Sebanyak 0,5 g contoh kulit udang dikeringkan terlebih dahulu kemudian ditambahkan 7,5 ml NaOH 1 M dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Filtrat protein kulit udang sebanyak 30 µl direaksikan dengan 270 µl larutan PBS (Phosphate Buffered Saline) dan 3 ml larutan Lowry, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Filtrat tersebut kemudian

Universitas Indonesia

ditambahkan 100 ml reagen Folin-Ciocalteus dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, selanjutnya pengukuran absorbansi dilakukan pada λ 750 nm.

Konsentrasi protein tidak terlarut diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi λ 750 nm pada kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin), selanjutnya kadar protein kulit udang dihitung berdasarkan persamaan 3.4.

$$P = \frac{\text{Konsentrasi protein} \times V_{\text{NaOH}} \times F_p}{1000 \times S} \times 100\% \quad (3.4)$$

Keterangan:

| | | | |
|-------------------|------------------------|----------------|------------------------|
| P | = Kadar Protein (%) | F _p | = Faktor Pengenceran |
| V _{NaOH} | = Volume NaOH (7,5 ml) | S | = Berat Contoh (0,5 g) |

$$\text{Tingkat penghilangan protein (\%)} = \frac{\text{Protein awal} - \text{Protein akhir}}{\text{Protein awal}} \times 100\% \quad (3.6)$$

Tingkat penyisihan protein (deproteinasi) kulit udang kemudian dihitung dengan persamaan 3.6.

3.3.4.4. Penentuan Aktivitas Protease

Aktivitas protease selama proses deproteinasi diukur dengan menggunakan metode azokasein (Waldeck et al, 2006). Buffer Tris/ HCl 0,1 M pH 7,8 sebanyak 225 μ l direaksikan dengan 25 μ l supernatan enzim dan 150 μ l larutan azokasein. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μ l TCA 6% (Tri Chloro Acetic Acid) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil sebanyak 750 μ l dan direaksikan dengan 250 μ l NaOH 0,5 M. Pengukuran absorbansi dilakukan pada λ 440 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai satu μ mol azokasein yang dihasilkan per menit. Aktivitas protease dihitung dengan persamaan 3.5.

$$P \text{ (U/ml)} = \frac{\left(\frac{A_{440} - LW}{\epsilon \cdot d} \right) \times \left(\frac{V_E}{V_P} \right) \times 1000 \times VF}{Z} \quad (3.5)$$

Keterangan:

| | | | |
|---|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| P | = Aktivitas protease (U/ml) | V _E | = Volume akhir (1 ml) |
|---|-----------------------------|----------------|-----------------------|

Universitas Indonesia

| | | | |
|------------|------------------------------------|-------|---------------------------------|
| A_{440} | = Absorbansi pada λ 440 nm | V_P | = Volume yang bereaksi (0,4 ml) |
| LW | = Absorbansi blanko | VF | = Faktor pengenceran (40) |
| ϵ | = Koefisien (38 L/mol cm) | Z | = Waktu inkubasi (10 menit) |
| d | = Ketebalan kuvet (1 cm) | | |

3.3.4.5. Penentuan Jumlah Sel Mikroba

Penghitungan jumlah sel bakteri dilakukan menggunakan metode ALT (Angka Lempeng Total). Sebanyak 100 μ L kultur bakteri diencerkan dalam 900 μ L akuades steril secara bertingkat dengan faktor pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} . Setiap pengenceran diambil sebanyak 100 μ L dan disebar di atas permukaan media MRS agar (*L. acidophilus* FNCC 116) dan LB agar (*B. licheniformis* F11.1) dengan menggunakan spatel gelas kemudian diinkubasi pada suhu 37°C sampai tumbuh koloni. Petri yang dapat dilakukan perhitungan yaitu petri yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300 koloni. Hasil yang diperoleh dari total plate count merupakan sel mikroba yang masih aktif tumbuh yang membentuk koloni disebut sebagai *colony forming unit* (CFU) (Brock et al. 1994), jumlah sel bakteri dihitung dengan menggunakan persamaan 3.6.

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah koloni pada cawan petri}}{\text{Pengenceran terakhir} \times \text{Volume yang disebar}} \quad (3.6)$$

3.3.4.6. Penentuan Kandungan Kitin

Kulit udang hasil proses demineralisasi dan deproteinasi ditentukan kandungan kitinnya (Waldeck et al. 2006) dengan cara sebagai berikut : contoh kulit udang kering hasil akhir proses ekstraksi ditimbang sebanyak 5 g, kemudian tambahkan 7,5 ml NaOH 1 M, inkubasikan pada suhu 50 °C selama 24 jam, setelah selesai saring dan buang supernatannya, contoh kemudian dibilas beberapa kali dengan aquades, pindahkan seluruh contoh ke dalam labu Kjeldahl, selanjutnya tentukan kandungan nitrogen total contoh menggunakan metode Kjeldahl, kandungan kitin ditentukan menggunakan persamaan 3.7.

$$\% (\text{kitin}) = w(N) * 14,5 * 100 \quad (3.7)$$

Keterangan:

$$w(N) = \text{Fraksi berat nitrogen}$$