

BAB III

BAHAN, ALAT DAN METODA

3.1 BAHAN

Lactobacillus acidophilus FNCC116 (kultur koleksi BPPT yang didapatkan dari Universitas Gajah Mada), *Bacillus licheniformis* F11.4 (kultur koleksi BPPT yang didapatkan dari University of Hamburg, kerjasama IG-Biotech), limbah kulit udang (limbah PT Wironto Agung). Bahan kimia yang digunakan antara lain : Natrium alginat (Fluka), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), medium MRS (Pronadisa), ekstrak khamir (Pronadisa), pepton (Pronadisa), NaCl (Applichem), glukosa (Merck), agar bacto (Pronadisa), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na_2CO_3 (Merck), NaOH (Merck), CuSO_4 (Merck), $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), KCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ atau asam laktat (Merck), $\text{Na}_3\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_7$ atau natrium sitrat (Merck), buffer Tris (Merck), azokasein (Fluka), trikloroasetat (Fluka), reagen Folin (Merck), *Bovine serum albumin* (Fluka).

3.2 ALAT

Shaker Incubator, *refrigerated centrifuge* (Hitachi), *centrifuge* (Sigma), pHmeter (Inolab), spektrofotometer (UV, U-2001 Hitachi), thermomixer (Eppendorf), HPLC (Merck), timbangan, autoklaf, *hot plate magnetic stirrer*, pipet mikro, alat gelas seperti cawan petri, beker gelas, erlenmeyer.

3.3 METODA

3.3.1 Amobilisasi Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

3.3.1.1 Produksi Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

Sebanyak 1 ose kultur stok *Lactobacillus acidophilus* FNCC116 diinokulasikan pada 50 ml medium MRS cair, kemudian diinkubasi selama 12 jam pada temperatur 37°C. Prekultur ini diinokulasikan pada 500 ml medium MRS dalam Erlenmeyer 1000ml, kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18 jam. Kultur sel ini disentrifugasi pada temperatur 4°C selama 10 menit dengan kecepatan putaran 8000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan sel disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9% steril.

3.3.1.2 Proses Amobilisasi sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116

Sebanyak 50 ml suspensi sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116 dicampur homogen dengan 50 ml larutan natrium alginat konsentrasi 4% sehingga didapatkan konsentrasi akhir natrium alginat 2%. Campuran homogen ini diteteskan pada larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Butiran sel amobil yang terbentuk didiamkan selama 30 menit di dalam larutan, kemudian dipisahkan dan dicuci dengan larutan NaCl 0,9% steril.

3.3.2 Fermentasi Sel Amobil *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

3.3.2.1 Uji Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Sel terhadap pH dan Konsentrasi Asam Laktat.

Sebanyak masing-masing 15, 20, 25 dan 30 gram sel amobil dimasukkan ke dalam 4 Erlenmeyer 250 ml A₀, B₀, C₀ dan D₀ yang masing-masing berisi 100 ml medium yang mengandung glukosa 6%, ekstrak khamir 1,5%, MnSO_4 0,003% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,003% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% kemudian diinkubasi dengan putaran 100 rpm, temperatur 37°C. Pengamatan dilakukan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36 dengan mengukur pH dan jumlah asam laktat.

3.3.2.2 Analisa Asam laktat

Medium hasil sampling disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm pada temperatur kamar. Cairan supernatan disaring dengan mikrofilter berukuran 0,5 μm . Sebanyak 5 μl filtrat diinjeksikan pada kolom KCKT menggunakan kolom C18 dan dielusi dengan H_2SO_4 0,0005 N dalam aquadest pada kondisi analisis dengan kecepatan aliran 0,6 ml per menit dan temperatur 60°C. Absorbansi diukur menggunakan detektor UV.

3.3.3 Demineralisasi Menggunakan Sel Amobil *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

3.3.3.1 Uji Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kulit Udang terhadap pH, Konsentrasi Asam Laktat dan Kadar Abu pada Demineralisasi dengan Sel Amobil 30%

Sebanyak masing-masing 30, 60 dan 90 gram kulit udang basah (10%, 20% dan 30% b/v) yang telah diblender, dimasukkan ke dalam 3 wadah labu bulat A, B, C yang berisi 300 ml medium yang mengandung glukosa 6%, ekstrak khamir 1,5%, MnSO_4 0,003%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,003% dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%. Selanjutnya ke dalam wadah A, B dan C dimasukkan sel amobil sebanyak 90 gram (30% b/v) kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 48 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Pengamatan dilakukan dengan mengukur pH medium dan kadar asam laktat pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48. Setelah 48 jam kulit udang dicuci dengan aquadest kemudian dikeringkan dan diukur kadar abu akhirnya.

3.3.3.2 Uji Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kulit Udang terhadap pH, Konsentrasi Asam Laktat dan Kadar Abu pada Demineralisasi dengan Sel Amobil 20%.

Pada prosedur ini dilakukan sama dengan pada prosedur 3.3.3.1 dengan perbedaan pada konsentrasi sel amobil sebanyak 20% dimasukkan ke dalam 3 medium E, F dan G.

3.3.3.3 Pengukuran Kadar Abu dalam Kulit Udang.

Sebanyak 1 gram sampel yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam cawan keramik yang telah disiapkan, dan ditimbang beratnya terlebih dahulu kemudian kemudian dibakar di dalam tanur, pada temperatur 600°C – 800°C selama 3 jam Sampel didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang. Sampel dihitung kadar abunya dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar abu sampel \%} = \frac{\text{Berat abu setelah pengabuan}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

3.3.4 Amobilisasi Sel *Bacillus licheniformis* F11.4

3.3.4.1 Produksi Sel *Bacillus licheniformis* F11.4

Sebanyak 1 ose *Bacillus licheniformis* F11.4 diinokulasikan pada 50 ml medium LB cair , kemudian diinkubasi pada temperatur 55°C selama 6 jam dengan kecepatan putaran 180 rpm. Setelah 6 jam diinokulasikan pada 500 ml medium LB cair dalam Erlenmeyer dan diinkubasi pada temperatur 55°C selama 12 jam dengan kecepatan putaran 180 rpm, sehingga didapatkan biakan sel *Bacillus licheniformis* F11.4. Hasil pembiakan sel ini disentrifugasi pada temperatur 4°C selama 10 menit dengan kecepatan putaran 8000 rpm. Cairan filtrat dibuang dan endapan sel disuspensikan kembali dengan larutan NaCl 0,9% steril.

3.3.4.2 Proses Amobilisasi Sel *Bacillus licheniformis* F11.4.

Sebanyak 50 ml suspensi sel *Bacillus licheniformis* F11.4 dicampur dengan 50 ml larutan natrium alginat 4% sampai homogen sehingga diperoleh konsentrasi akhir natrium alginat 2%. Campuran homogen ini diteteskan pada larutan CaCl₂·2H₂O 0,2 M. Butiran yang terbentuk didiamkan selama 30 menit di dalam larutan, kemudian dipisahkan dan dicuci dengan larutan NaCl 0,9% steril.

3.3.5 Fermentasi Sel Amobil *Bacillus licheniformis* F11.4

3.3.5.1 Uji Pengaruh Konsentrasi Sel Terhadap Aktivitas Protease.

Sebanyak masing-masing 10, 20 dan 30 gram (10%, 20% dan 30% b/v) sel amobil dimasukkan ke dalam 3 Erlenmeyer 250 ml (A, B, C) yang berisi 100 ml medium yang mengandung ekstrak khamir 0,5%, NaCl 0,5%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, CaCl₂.2H₂O 0,1%, kemudian diinkubasi pada temperatur 40°C dengan kecepatan putaran 100 rpm. Pengamatan dilakukan jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 48, 72, 96 dengan mengukur aktivitas protease.

3.3.5.2 Pengukuran aktivitas enzim protease (Metoda Waldeck).

Sebanyak 25 µL sampel yang telah disentrifugasi ditambah 225µL larutan buffer tris 0,1 M pH 8, kemudian ditambah 150 µL larutan azokasein. Campuran diinkubasi didalam thermomixer pada temperatur 40°C selama 10 menit. Setelah 10 menit, sebanyak 400 µl trikloroasetat ditambahkan ke dalam campuran tadi. Endapan dan larutan dipisahkan dengan sentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit, pada temperatur 25°C. Sebanyak 750 µl supernatan dipipet dan ditambah 250 µl natrium hidroksida 0,5 M. Setelah dihomogenkan, diukur serapannya pada 440 nm menggunakan spektrofotometer UV Vis U-2001.

3.3.6 Deproteinasi Kulit Udang Menggunakan Sel Amobil *Bacillus licheniformis F11.4*.

3.3.6.1 Uji Pengaruh Perbedaan Temperatur terhadap Aktivitas Protease dan Kadar Protein Kulit Udang.

Sebanyak masing-masing 90 gram kulit udang basah (30% b/v) yang telah diblender dimasukkan ke dalam wadah labu bulat yang berisi 300 ml medium yang mengandung ekstrak khamir 0,5% NaCl, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,1% CaCl₂. 2H₂O 0,1% kemudian ke dalam kedua medium ditambahkan masing-masing 90 gram sel amobil *Bacillus licheniformis F11.4*, selanjutnya diinkubasi pada temperatur 37°C, 40°C, 55°C selama 96 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Pengamatan dilakukan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 28, 32, 36, 48, 52, 56, 60, 72, 96 dengan mengukur aktivitas enzim protease. Setelah 96 jam, kulit udang dipisahkan dari medium, dicuci dengan aquadest dan dikeringkan.

3.3.6.2 Uji Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Sel Amobil terhadap Aktivitas Protease dan Kadar Protein Kulit Udang.

Sebanyak masing-masing 90 gram kulit udang basah (30% b/v) yang telah diblender dimasukkan ke dalam 2 wadah labu bulat yang berisi 300 ml medium yang mengandung ekstrak khamir 0,5%, NaCl 0,5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1%. Kedua medium ditambahkan sel amobil *Bacillus licheniformis* F11.4. masing-masing sebanyak 60 gram (20% b/v) dan 90 gram (30% b/v). Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 40°C selama 96 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Pengamatan dilakukan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 28, 32, 36, 48, 52, 56, 60, 72, 96 dengan mengukur aktivitas enzim protease. Setelah 96 jam kulit udang dicuci dengan aquadest dan dikeringkan, kemudian diukur kadar protein dalam kulit udang.

3.3.6.3 Uji Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Kulit Udang terhadap Aktivitas Protease dan Kadar Protein Kulit Udang.

Sebanyak masing-masing 60 gram (20% b/v) dan 90 gram (30% b/v) kulit udang basah yang telah diblender dimasukkan ke dalam labu bulat yang berisi 300 ml medium yang mengandung ekstrak khamir 0,5%, NaCl 0,5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1%. Selanjutnya ke dalam kedua wadah dimasukkan sel amobil *Bacillus licheniformis* F11.4 sebanyak 90 gram (30% b/v) kemudian dinkubasi pada temperatur 40°C, selama 96 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Pengamatan dilakukan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 28, 32, 36, 48, 52, 56, 60, 72, 96 dengan mengukur aktivitas enzim protease. Setelah 96 jam kulit udang dicuci dengan aquadest dan dikeringkan,

3.3.6.4 Pengukuran Kadar Protein dalam Kulit Udang (metoda Lowry).

Kulit udang yang telah dideproteinasi, dikeringkan pada temperatur 105°C selama 24 jam. Sebanyak 0,5 gram kulit udang yang telah kering direndam dalam 7,5 ml larutan natrium hidroksida 1 M selama 24 jam pada temperatur 55°C. Sebanyak 200 µl larutan uji ditambahkan dengan 180 µl larutan buffer fosfat dan 2 ml larutan Lowry yang baru dibuat, kemudian campuran diinkubasi selama 10

menit pada temperatur ruang. Setelah diinkubasi ditambahkan 200 µl Folin, kemudian campuran diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruang, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis U-2001 pada panjang gelombang 750 nm. Pengujian blanko menggunakan larutan buffer atau aquades, sedangkan kurva standar dibuat dengan mengganti sampel dengan menggunakan larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*).



BAB IV.

HASIL PENELITIAN

4.1 Amobilisasi sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

Amobilisasi sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC116 berhasil dilakukan dan didapatkan bentuk butiran yang bulat. (Gambar 2.) serta hasil foto SEM dengan perbesaran 50 kali (Gambar 6) dan 500 kali (Gambar 7).

4.2 Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Sel Amobil terhadap pH dan Konsentrasi Asam Laktat pada Fermentasi Sel Amobil *Lactobacillus acidophilus* FNCC116.

Hasil pengamatan pH pada medium A₀ mulai dari jam ke 6 sampai jam ke 36 menunjukkan terjadi penurunan pH mulai dari 5,8 menjadi 3,25. Medium B₀ didapatkan penurunan dari 5,55 menjadi 2,78 sedangkan medium C₀ terjadi penurunan pH dari 5,45 menjadi 2,78 dan medium D₀ menghasilkan penurunan pH dari 5,45 hingga 2,73 (Tabel 1.)