

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam 6 tahap yaitu peremajaan jamur *Aspergillus niger*, pembuatan medium pembiakan dan medium fermentasi, tahap fermentasi amilum dan residu kering *Maranta arudinaceae* dan tahap analisa yang berupa analisa perubahan konsentrasi amilum, biomassa sel *Aspergillus niger*, asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat dan analisa perubahan pH selama proses, serta kristalisasi asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan gelas, blender, pompa vakum, corong buchner, penangas air, kapas, kasa, kertas sampul, kertas saring, jarum osse, pH meter, pengaduk magnet, thermometer, oven, timbangan analitik, autoklaf medical pretige TSI, orbital shaker TS -- 330, pemanas listrik merk Nuova, spektrofotometer UV – Vis, sentrifuse 3400 rpm model 228.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah biakan jamur *Aspergillus niger* 6088 IFO 6341 yang diperoleh dari laboratorium PAU-UGM, amilum p.a, residu *Maranta arudinaceae* kering, kecambah kacang hijau, aquades, argentum nitrat p.a, amonia p.a, iodium p.a, 0,1 % tween 80, kalium iodida p.a,

amonium nitrat p.a, kalium dihidrogen fosfat p.a, magnesium sulfat p.a, asam klorida 0,1 N, natrium hidroksida 0,1 N, kalsium klorida p.a, indikator fenol red, indikator fenol ftalein, indikator metilen blue, natrium karbonat p.a, amonium karbonat p.a, sukrosa, natrium sulfat anhidrat p.a, asam sulfat pekat p.a, kupri sulfat heptahidrat p.a, serbuk seng, petroleum eter, kalsium hidroksida p.a, kalium sulfat, etanol.

3.2. Sumber Karbohidrat

Karbohidrat yang diperlukan berasal dari: amilum umbi *Maranta arudinaceae* dan residu kering umbi *Maranta arudinaceae*

3.3. Variabel Penelitian

Variabel yang dikonstantakan dari penelitian ini yaitu konsentrasi biomassa sel *Aspergillus niger* awal, suhu, aerasi, konsentrasi amilum dan konsentrasi garam anorganik, sedangkan variabel bebasnya adalah pH medium dari 2 sampai 7 dengan selang 1 dan waktu Inkubasi 1 sampai 8 hari dengan selang 1 hari. Variabel yang dianalisa dalam penelitian ini adalah perubahan konsentrasi amilum, perubahan konsentrasi biomassa sel *Aspergillus niger*, perubahan pH dan perubahan konsentrasi asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat.

3.4. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro.

3.4.2. Preparasi

3.4.2.1. Pembuatan Media Pemiakan Taoge Ekstrak Agar (TEA)^[12]

Sebanyak 100 g kecambah direbus dengan 1 L aquades hingga mendidih dan volume larutan tinggal \pm 700 mL. Rebusan kecambah tersebut disaring dan filtrat yang didapatkan ditambah 60 g sukrosa dan direbus sampai sukrosa larut. Kemudian ditambah aquades hingga volume seperti semula. Sebanyak 20 g agar ditambahkan kedalam larutan dan dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit sambil diaduk hingga semua agar larut. Sebanyak 5 mL larutan TEA dituang kedalam tabung reaksi, tabung ditutup dengan kapas dan kertas sampul, diikat dengan benang. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 126 °C, kemudian didiamkan dalam posisi miring selama 24 jam pada suhu kamar. Medium siap digunakan.

3.4.2.2. Pembuatan Medium Residu Umbi *Maranta arudinaceae*^[6]

Sebanyak 150 g residu kering umbi *Maranta arudinaceae*, 2,06 g amonium nitrat, 1,2 g kalium dihidrogen fosfat dan 0,5 g magnesium sulfat heptahidrat dilarutkan dalam 1 L aquades. Mengatur pH medium dari 2 sampai 6 dengan menambah HCl dan untuk pH = 7 dengan menambah NaOH. Sebanyak 100 mL medium dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL, tutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas sampul, ikat dengan benang. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada 126 °C. Didinginkan dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Medium siap digunakan.

3.4.2.3. Pembuatan Medium Amilum Umbi *Maranta arudinaceae* ^[6]

Sebanyak 150 g amilum umbi *Maranta arudinaceae*, 2,06 g amonium nitrat, 1,2 g kalium dihidrogen fosfat dan 0,5 g magnesium sulfat heptahidrat dilarutkan dalam 1 liter aquades. Mengatur pH medium dari 2 sampai 6 dengan menambah HCl dan untuk pH = 7 dengan menambah NaOH. Sebanyak 100 mL medium dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian erlenmeyer tersebut ditutup dengan kapas dan kertas sampul, diikat dengan benang. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada 126 °C.

3.4.2.4. Pembuatan Reagen Iodium^[13]

Sebanyak 2,03 g iodium ditumbuk halus, kemudian serbuk iodium tersebut ditambah 4 g kalium iodida. Kedalam campuran tersebut ditambahkan 1 L aquades dan diaduk hingga serbuk campuran itu larut.

3.4.3. Persiapan Proses Fermentasi dalam Medium^[14,16]

Sebanyak 15 mL 0,1 % tween 80 ditambahkan dalam biakan *Aspergillus niger* dalam Medium TEA berumur 4 – 26 hari dan digojog hati-hati untuk mendapatkan suspensi spora. Sebanyak 0,5 mL suspensi spora dipindahkan dalam medium amilum umbi *Maranta arudinaceae* atau medium residu kering umbi *Maranta arudinaceae* dengan variasi pH antara 2 sampai 7 dengan selang 1. Masing-masing medium kemudian diinkubasi selama 8 hari pada suhu kamar dengan menggunakan shaker goyangan 200 rpm.

3.4.4. Pengujian Kadar Amilum [13]

3.4.4.1. Penentuan λ_{opt}

Sebanyak 30 mg amilum dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan selama 5 menit. Sebanyak 1 mL larutan amilum tersebut ditambah 0,5 mL reagen Iodium kemudian diencerkan dengan menambahkan 4,5 mL aquades, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 480 – 620 nm.

3.4.4.2. Pembuatan Kurva Standar

Sebanyak 30 mg amilum dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan tersebut diencerkan dengan konsentrasi 3 sampai 30 mg dengan selang 3 mg dalam 100 mL. Sebanyak 1 mL masing-masing larutan amilum, ditambah 0,5 mL reagen Iodium dan 4,5 mL aquades. Kemudian diukur serapannya pada λ_{opt} .

3.4.4.3. Analisa Perubahan Amilum selama Proses Transformasi

Sebanyak 5 mL medium amilum umbi *Maranta arudinaceae* dan medium residu kering umbi *Maranta arudinaceae* diencerkan hingga volumenya menjadi 50 mL. Sebanyak 1 mL larutan tersebut, ditambah 0,5 mL reagen iodium dan 4,5 mL aquades, kemudian diukur serapannya pada λ_{opt} .

3.4.5. Penentuan Biomassa Sel *Aspergillus niger*^[14]

3.4.5.1. Penentuan λ_{opt} Biomassa Sel *Aspergillus niger*

Sebanyak 10 mL larutan sel disentrifugasi 4000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 20 mg endapan hasil sentrifugasi dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dihomogenasi. Larutan sel ini kemudian diukur serapannya pada λ 550 – 700 nm.

3.4.5.2. Pembuatan Kurva Standar Biomassa Sel *Aspergillus niger*

Sebanyak 20 mL larutan sel disentrifugasi 4000 rpm selama 15 menit. Endapan yang dihasilkan divariasikan konsentrasinya antara 4 sampai 20 mg dengan selang 4 mg, kemudian masing-masing dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dihomogenasi. Larutan sel ini kemudian diukur serapannya pada λ_{opt} .

3.4.5.3. Analisa Perubahan Konsentrasi Biomassa Sel *Aspergillus niger*

Sebanyak 5 mL suspensi amilum atau suspensi umbi residu umbi *Maranta arudinaceae* diencerkan hingga 25 mL dengan penambahan aquades. Larutan ini kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Endapan yang dihasilkan terbagi menjadi 2 bagian yaitu medium dan biomassa sel. Endapan bagian atas yaitu endapan biomassa sel diambil, kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades dan diukur serapannya pada λ_{opt} .

3.4.6. Penentuan Asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat

3.4.6.1. Analisa kualitatif Asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat^[15]

Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian disaring. Kedalam filtrat ditambahkan larutan perak nitrat hingga terbentuk endapan putih susu, kemudian ditambahkan larutan amonia encer dan dididihkan. Adanya asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat diketahui bila endapan putih larut.

3.4.6.2. Analisa Kuantitatif Asam 2- hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat^[14]

Diambil 5 mL suspensi amilum atau suspensi umbi *Maranta arudinaceae* kemudian diencerkan hingga 25 mL dengan penambahan aquades. Kalsium klorida ditambahkan kedalam larutan tersebut hingga terbentuk endapan putih asam oksalat. Suspensi yang terbentuk disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah indikator fenol merah dan dititrasi dengan natrium hidroksida 0,1 M hingga terbentuk warna merah.

3.4.7. Kristalisasi Asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat^[18]

Suspensi residu umbi *Maranta arudinaceae* disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang didapatkan ditambah kalsium hidroksida dan dipanaskan hingga terbentuk endapan putih. Endapan tersebut disaring dan dilarutkan dalam aquades. Larutan tersebut kemudian ditambah asam sulfat dan dipanaskan hingga timbul endapan putih kekuningan. Kemudian dilakukan penyaringan dan didapatkan filtrat berupa larutan asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat. Filtrat didinginkan dan didiamkan hingga terbentuk kristal asam 2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat. Kristal yang terbentuk selanjutnya diuji titik lelehnya.