

#### IV. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di dua laboratorium, yaitu :

1. Pembuatan protein sel tunggal dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Program Studi Biologi MIPA, Universitas Diponegoro. Pelaksanaannya mulai akhir Agustus sampai awal Desember 1993,
2. Analisis Proksimat dilakukan di Laboratorium Kimia, Program Studi Kimia MIPA, Universitas Diponegoro. Pelaksanaannya yaitu mulai pertengahan Oktober sampai pertengahan Desember 1993.

##### A. Bahan dan Alat Penelitian

- Bahan :
- biakan murni kapang *Rhizopus oryzae*
  - media PDA (Potato Dextrose Agar)
  - air kelapa
  - amonium klorida
  - HCl 0,1 N
  - NaOH 30%
  - CuSO<sub>4</sub>
  - asam borat
  - kertas saring
  - indikator phenolphthalein 1%
- Alat :
- gelas ukur 500 ml
  - erlenmeyer 1000 ml dan 200 ml
  - alat ekstraksi Soxhlet
  - glukosa
  - eter
  - akuades
  - KHSO<sub>4</sub>
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - silika gel
  - kapas
  - bunsen

- cawan porselin
- batang kaca penyebar
- pipet 1 ml dan 5 ml
- krus porselin
- timbangan
- labu Kjehdahl
- beker glass
- autoklaf
- cawan petri
- termometer
- eksikator
- tabung reaksi
- oven
- buret
- botol timbang
- ose runcing

## B. Cara Kerja

### 1. Penyediaan substrat.

Substrat yang digunakan dalam pembuatan protein sel tunggal adalah air kelapa tua, yang berumur kurang lebih 11 - 12 bulan.

### 2. Pembuatan suspensi spora kapang (Rumokoi, 1990)

Kapang *Rhizopus oryzae* dibiakkan pada media miring PDA selama 48 jam dengan suhu 35°C. Bila akan dipakai ditambahkan akuades ke dalamnya dan digojog selama kurang lebih satu menit.

### 3. Penghitungan jumlah spora kapang.

Akuades steril sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam biakan *Rhizopus oryzae* pada agar miring PDA, kemudian dikocok selama 1 menit. Lalu dibuat pengenceran bertingkat sampai pengenceran 1:1000000.

Sementara itu dibuat medium PDA. Medium dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri

steril untuk kultur kapang mulai seri pengenceran 1:100000 dan 1:1000000. Setelah medium dingin, dengan pipet steril diambil 1 ml suspensi pengenceran dan dimasukkan ke dalam petri. Untuk menyebarkan suspensi spora dalam medium digunakan batang kaca penyebar. Kemudian diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam.

Penghitungan koloni kapang dilakukan setelah koloni kapang tumbuh dan belum menyebar. Rumus penghitungan propagul kapang per ml adalah :

$$= \text{jumlah koloni} \times (1/\text{faktor pengenceran})$$

#### 4. Pembuatan Protein Sel Tunggal (Rumokoi, 1990)

Air kelapa disaring dari kotoran, dan pHnya diatur menjadi 6,5 dengan penambahan NaOH 0,1 N. Ke dalam erlenmeyer 1000 ml dimasukkan air kelapa sebanyak 500 ml. Masing-masing erlenmeyer ditambahkan sumber karbon dan nitrogen dengan perincian sebagai berikut :

C0 : glukosa 0%      N0 : amonium klorida 0%  
 C5 : glukosa 5%      N½ : amonium klorida ½%  
 C10 : glukosa 10%    N1 : amonium klorida 1%

Kombinasi perlakuannya adalah sebagai berikut:

C0N0	C5N0	C10N0
C0N½	C5N½	C10N½
C0N1	C5N1	C10N1

Setelah itu medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah dingin, ke dalam masing-masing erlenmeyer diinokulasi dengan suspensi spora kapang sebanyak 10 ml, dan diinkubasikan pada suhu 31°C selama 3 hari. Miselium kapang yang terbentuk disaring dengan kertas saring, lalu dicuci dengan akuades sampai air saringan jernih. Selanjutnya kapang dikeringkan untuk dianalisa.

5. Pengukuran biomassa (Sudarmadji, Haryono, dan Suhardi, 1981)

Miselium kapang dikeringkan dengan oven sampai diperoleh berat miselium yang konstan. Selisih maksimal adalah 0,2 mgr.

6. Analisa Nitrogen Total secara Kjeldahl (Sudarmadji, dkk, 1981).

Sejumlah sampel dimasukkan dalam labu destruksi. Kemudian dalam labu destruksi dimasukkan  $\text{KHSO}_4$  dan  $\text{CuSO}_4$  serta ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan dicampur. Semua bahan yang ada dalam labu destruksi dipanaskan secara perlahan-lahan dalam almari asam, dimana mula-mula dengan nyala kecil sampai tidak berasap atau tidak berbuih lagi. Baru kemudian nyala diperbesar. Pendidihan dilakukan sampai warna larutan menjadi jernih.

Setelah dingin, baru kemudian hasil destruksi dimasukkan dalam labu destilasi yang telah dipasang pada rangkaian alat destilasi. Hasil destilasi dipindahkan dalam labu erlenmeyer 200 ml setelah diencerkan dengan akuades. Sementara itu

pesawat Kjeldahl disiapkan. Larutan asam borat 3% sebanyak 10 ml dimasukkan dalam labu titrasi (erlenmeyer 200 ml) yang selanjutnya ditaruh sedemikian rupa sehingga ujung pesawat pendingin terendam dalam larutan asam. Sesudah destilasi berjalan selama 10 menit, maka labu titrasi ditempatkan sedemikian rupa sehingga ujung alat pendingin tidak terendam lagi dan tidak menyentuh larutan asam borat. Destilasi diteruskan kurang lebih dua menit. Kemudian bagian luar dari ujung alat pendingin dititrasi dengan akuades. Akhirnya hasil destilasi dititrasi dengan 0,1 N HCl yang diteteskan dari mikroburet. Kemudian dihitung kadar N total dengan rumus:

$$\text{Kadar N tot} = \frac{1/200 \times \text{ml HCl} \times \text{N HCl} \times 14 \times 100\%}{\text{berat zat (dalam mg)}}$$

$$\text{Kadar protein} = 6,25 \times \text{N total}$$

7. Analisa Kandungan Lemak secara Ekstraksi Soxhlet (Sudarmadji, dkk, 1981).

Bahan ditimbang sebanyak 1 gram (sampel kering dan telah dihaluskan). Bahan tersebut dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan dalam tabung ekstraksi Soxhlet. Kemudian air pendingin dialirkan melalui kondensor.

Tabung ekstraksi Soxhlet dipasang pada alat destilasi Soxhlet dengan pelarut eter secukupnya selama 4 jam. Eter yang telah mengandung ekstrak lemak dipindahkan ke dalam botol timbang yang

bersih dan diketahui beratnya, kemudian panaskan dalam penangas air sampai agak pekat, dan diteruskan dengan pengeringan dalam oven  $100^{\circ}\text{C}$  sampai berat konstan. Berat residu dalam botol timbang dinyatakan sebagai berat lemak.

#### 8. Analisa Kandungan Abu (Sudarmadji, dkk, 1981).

Bahan ditimbang seberat 2-10 gram dan dimasukkan ke dalam krus porselin yang kering dan diketahui beratnya, kemudian dipijarkan dalam oven atau tanur sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Selanjutnya krus yang berisi abu dimasukkan dalam eksikator dan ditimbang berat abu setelah dingin.

#### C. Analisa Data

Selanjutnya data-data yang didapatkan diolah. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok, dengan pola faktorial. Sebagai kelompok adalah ulangan pengamatan, dimana ulangan 1 dan 2 dilakukan pada hari yang berlainan dan menggunakan media air kelapa yang berlainan. Dan faktor yang digunakan adalah faktor glukosa pada konsentrasi 0%, 5%, dan 10%, serta faktor amonium klorida pada konsentrasi 0%,  $\frac{1}{2}\%$ , dan 1%. Analisa data menggunakan ANOVA, dengan pengujian lanjut Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf uji 5%.

Data dari kandungan protein, lemak, abu, dan biomassa adalah dalam persen. Oleh karena itu sebelum dianalisa dilakukan transformasi terlebih dahulu. Transformasi yang digunakan adalah Transformasi Arc. Sin  $\sqrt{P}$  dimana P adalah persen (Hanafiah, 1991).

