

IV. METODA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

A.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

A.2. Waktu Penelitian

Agustus - Nopember 1995.

B. Materi dan Alat Penelitian

B.1. Materi Penelitian

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah ubi kayu yang telah berumur 8 - 10 bulan, biakan murni *C. utilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Universitas Gadjah Mada, Malt Ekstrak Agar, Aquades, bakto agar, urea, vitamin B_1 , asam sulfat, KH_2PO_4 , Bovine Serum Albumin (BSA), glukosa, larutan fenol 5%, bufer asetat pH 5 (asam asetat + natrium asetat), reagen Lowry B (Na_2CO_3 + NaOH 0,1 N + $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + Natrium-kalium tartrat), reagen Lowry A (reagen Folin Ciocalteu).

B.2. Alat Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan berbagai macam peralatan yang meliputi : pisau, alas pemotong, baskom plastik, kain saring/ayakan, autoklaf, inkubator suhu

ruang, tabung reaksi, cawan petri, gelas piala, kompor, blender, erlenmeyer, lampu spiritus, jarum inokulasi, spatula, spektrofotometer Spectronic 20, timbangan analitik, haemositometer dan mikroskop cahaya.

C. Analisa Laboratorium

C.1. Pembuatan Medium Malt Ekstrak Agar (MEA)

Bubuk pembuat Malt Ekstrak sebanyak 32 gram dilarutkan dengan akuades, lalu dimasukkan 1,5 gram bacto agar, diaduk dan ditambah aquades sampai volume 1000 ml. Kemudian dipanaskan hingga homogen lalu disaring dan diatur pHnya menjadi 4. Setelah itu medium dipipet masing-masing 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs.

C.2. Penyediaan Biakan Murni

Biakan murni yang diperoleh diperbanyak dengan menggunakan Medium Malt Ekstrak Agar miring di dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar.

C.3. Penyediaan Sampel

Ubi kayu yang telah disortir, kemudian dikupas dan dicuci lalu diiris. Setelah itu hasilnya dikeringkan di bawah sinar matahari dan setelah kering, digiling dan dilakukan pengayakan.

Tepung ubi kayu dibuat suspensi dengan konsentrasi 5%, 7.5% dan 10.5%. Ke dalam medium tersebut kemudian ditambahkan nutrisi tambahan seperti urea sebanyak 500 mg/l, KH_2PO_4 200 mg/l dan vitamin B_1 1 mg/l medium fermentasi (Tjokroadikoesoema, 1986). pH medium ditetapkan menjadi 4,0 dengan menggunakan H_2SO_4 , lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 100°C selama 30 menit. Setelah medium tersebut dingin ke dalamnya diinokulasikan suspensi khamir (starter) sebanyak 10% v/v medium (volume medium 150 ml).

C.4. Pembuatan *Starter*

Biakan murni *C. utilis* diinokulasikan pada 200 ml medium fermentasi sebanyak 20 ml dan diinkubasikan selama 24 jam di atas *shaker* dengan kecepatan 105 hentakan per menit (hpm) pada suhu ruang. *Starter* mengandung lebih kurang 10^6 sel per ml (Hariyun, 1986).

C.5. Perlakuan Lama Inkubasi

Setelah ubi kayu diinokulasi dengan khamir, maka langsung masuk pada periode inkubasi. Untuk masing-masing konsentrasi substrat 5%, 7.5% dan 10.5% diinkubasi selama 2, 3, 4 dan 5 hari. Fermentasi berlangsung secara aerob. Aerasi dan agitasi dilakukan dengan menggunakan *shaker*.

Setelah selesai fermentasi, medium fermentasi terlebih dahulu dipasteurisasi pada suhu $70 - 80^\circ\text{C}$

selama 15 menit. Kemudian medium fermentasi disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 10 menit, endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C, selama 24 jam selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan lumpang.

C.6. Cara Analisa Bahan

C.6.1. Analisa Kandungan Gula Reduksi

Kadar gula reduksi dianalisis dengan menggunakan metode "Phenol-sulfuric Acid" dari Meloan dan Pomeranz dalam Sudarmadji (1984), yang meliputi :

a. Penyiapan Kurva Standar

Dibuat larutan glukosa yang berturut-turut mengandung 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 dan 100 ug glukosa. Kemudian masing-masing larutan dipipet sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam 10 tabung reaksi. Pada masing-masing tabung reaksi ditambah 1 ml larutan fenol 5% dan 5 ml asam sulfat pekat. Tabung-tabung reaksi tersebut dikocok, kemudian dibiarkan selama 10 menit, lalu dikocok lagi dan diukur OD 'Optical Density'nya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Dari hasil pengukuran OD, dibuat kurva standar yang menghubungkan banyaknya ug glukosa (pada absis) dengan OD (pada ordinat).

b. Analisa Sampel

Pada akhir periode fermentasi, setelah dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 25

menit maka supernatan diambil sebanyak 2 ml dan diperlakukan sama seperti untuk pembuatan kurva standar glukosa dan ditetapkan ODnya pada panjang gelombang 490 nm. Kandungan gula reduksi sampel ditetapkan dengan menggunakan kurva kalibrasi. Untuk penetapan kadar gula reduksi mula-mula, tepung ubi sebanyak 1 gr kayu terlebih dahulu dilarutkan dalam 10 ml akuades baru dicentrifugasi, lalu dilakukan prosedur yang sama.

C.6.2. Analisa Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Spektrofotometer cara Lowry dalam Sudarmadji (1984) yang meliputi :

a. Penyiapan kurva standar larutan protein

Disiapkan larutan protein Bovine Serum Albumin (BSA) sebanyak 300 ug/ml, lalu larutan protein tersebut dibagi dalam 10 tabung reaksi dengan kadar bertingkat, mulai dari 30-300 ug/ml. Ke dalam masing-masing tabung ditambah 8 ml reagen Lowry B dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambah reagen Lowry A sebanyak 1 ml, lalu digojog dan dibiarkan selama 20 menit. Larutan protein pada masing-masing tabung diletakkan pada spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, OD (Optical Density) yang tampak dicatat, lalu dibuat kurva standar yang menunjukkan

hubungan antara OD (pada ordinat) dan konsentrasi protein (pada absis).

b. Penyiapan sampel

Sampel sebanyak 1 gr dilarutkan dengan menggunakan bufer asam asetat pH 5,0 sampai 10 ml. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 25 menit, lalu diambil supernatannya sebanyak 1 ml dan dilakukan prosedur seperti pada penyiapan kurva standar larutan protein. Dilakukan pembacaan OD pada spektrofotometer, kemudian kadar protein sampel dapat ditentukan dengan menggunakan kurva standar. Pengukuran kadar protein dilakukan pada sampel ubi kayu tanpa perlakuan dan pada sampel yang diberi perlakuan.

C.6.3. Penghitungan Populasi Khamir

Jumlah populasi khamir setelah fermentasi, dihitung dengan menggunakan haemositometer seperti yang dikemukakan oleh Hadioetomo (1990). Sampel diambil sebanyak 1 ml dan ditambah 9 ml aquades steril, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} dipipet 1 ml dan ditambahkan 9 ml aquades steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan demikian seterusnya sehingga diperoleh pengenceran 10^{-4} . Sampel yang telah diencerkan, diteteskan sebanyak 1 ml pada alat haemositometer,

kemudian jumlah sel dihitung di bawah mikroskop.

Populasi khamir dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$Y = X \cdot 50 \cdot P \cdot 10^3$$

Keterangan :

Y = Jumlah sel khamir dalam 1 ml sampel

X = Jumlah sel khamir dalam 5 kotak ruang kecil

P = Pengenceran.

Jumlah populasi yang didapat dari perhitungan tersebut, kemudian dikurangi dengan jumlah populasi sel awal pada masing-masing konsentrasi.

D. Rancangan Percobaan

Dalam penelitian ini, perlakuan yang diberikan meliputi :

D.1. Lama Periode Inkubasi :

2 hari (T_1), 3 hari (T_2), 4 hari (T_3), 5 hari (T_4)

D.2. Konsentrasi Substrat

5,0% (S_1), 7,5% (S_2), 10,5% (S_3)

D.3. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing perlakuan.

Macam peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Kandungan gula reduksi
- b. Kandungan protein
- c. Populasi khamir

Adapun rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dalam faktorial (Hanafiah, 1991). Faktor pertama adalah konsentrasi substrat yang terdiri dari tiga tingkat, yaitu 5, 7,5 dan 10,5%. Sedang faktor kedua adalah waktu fermentasi/inkubasi yang terdiri dari empat tingkat yaitu : 2, 3, 4 dan 5 hari. Dengan pengulangan tiga kali pada masing-masing perlakuan, maka didapatkan 36 unit percobaan.

Penelitian ini menggunakan model :

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + A_iB_j + E_k(ij)$$

Y_{ijk} = Nilai pengamatan karena pengaruh bersama perlakuan i faktor lama inkubasi dan perlakuan j faktor konsentrasi substrat.

u = Nilai rata-rata yang sebenarnya.

A_i = Pengaruh perlakuan ke i faktor lama periode inkubasi.

B_j = Pengaruh perlakuan ke j faktor konsentrasi substrat.

A_iB_j = Pengaruh interaksi antara perlakuan i lama periode inkubasi dengan perlakuan j faktor konsentrasi substrat.

$E_k(ij)$ = Nilai kesalahan dari unit ulangan ke k dalam kombinasi perlakuan.