BAB IV
METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Pelaksanaan


B. Alat dan Bahan


2. Bahan yang digunakan adalah biakan mumi C. utilis dari PAU Pangan dan Gizi UGM, molase dari PG-PS Madukismo Yogyakarta, urea, glukosa, HCl 0,1 N, HCl 0,02 N, NaOH 50 %, NaOH 0,1 N, kentang, katalis N (Na₂SO₃, CuSO₄, Se), asam borat, Difco Agar, kertas saring, kapas, H₂SO₄ pekat, aquadest, “silica gel”, indikator MR-BCG (coklat), spiritus dan NaOH-Tiosulfat.
C. Cara Kerja

1. Pembuatan medium PDA (Potato Dextrose Agar)

   Kentang dikupas dan diiris-iris kemudian ditimbang sebanyak 20 gram, lalu direbus dengan aquadest sebanyak 100 ml dan di biarkan selama ± 20 menit setelah air mendidih, selanjutnya filtratnya disaring dengan kapas, kemudian ditambah aquadest hingga volume semula. Difco Agar dan glukosa kemudian ditambahkan dalam filtrat masing-masing sebanyak 2 gram, lalu dipanaskan kembali hingga larut sempurna. Setelah itu ditambahkan HCl 0,1 N untuk mengatur pHnya menjadi 4, kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama ± 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atmosfer.

2. Penyediaan biakan murni


3. Penyediaan substrat


4. Produksi protein sel tunggal

   Medium starter dibuat dengan melarutkan molase sebanyak 18 gram dalam 900 ml aquadest, kemudian dipanaskan pada suhu 120-125°C selama ± 1 jam, angkat dan didinginkan kemudian disaring. Larutan
molase dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing sebanyak 300 ml dalam tempat yang terpisah, kemudian ditambahkan urea masing-masing 0,15 % (°/v) dan 0,3 % (°/v) sedangkan satu bagian dibiarahkan tanpa penambahan urea dan diaduk rata. Ketiga bagian larutan yang terdiri dari molase dan urea, masing-masing dibagi dalam 5 erlenmeyer @ 50 ml, kemudian tambahkan glukosa sesuai dengan perlakuan yaitu 0 % (°/v), 2 % (°/v), 4 % (°/v), 6 % (°/v), dan 8 % (°/v). pH media diatur menjadi 4 dengan penambahan HCl 0,1 N, kemudian ditutup dengan kapas, dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu ± 115,5°C, 10 lbs selama ± 20 menit.

Pembuatan medium perlakuan dilakukan sama seperti pembuatan medium starter dengan volume yang lebih besar yaitu 100 ml.

5. Pembuatan starter

Biakan murni C. utilis pada media PDA miring umur dua hari yang diinkubasi pada suhu 30°C dibuat suspensi dengan menambahkan aquadest steril 5 ml, kemudian diinokulasikan pada medium starter sebanyak 1 % (°/v) dengan menggunakan pipet ukur 1 ml yang steril. Diinkubasi pada “rotary shaker” selama 12 jam pada suhu kamar (Trismilah, 1995).

5. Inokulasi dan inkubasi

Ke dalam media perlakuan diinokulasikan sebanyak 10% (°/v) starter dengan kepadatan sel 10⁷ sel/ml, selanjutnya diinkubasi selama dua hari dengan agitasi 250 rpm (Trismilah, 1995; Priest and Campbell, 1996).
D. Parameter-Parameter yang Diamati

1. Biomassa

Sampel sebanyak 4,5 ml dimasukkan ke dalam tabung ependorff lalu disentrifugasi, sebelumnya tabung ependorff di oven dan ditimbang. Setelah supernatan dibuang, tabung yang berisi filtrat di keringkan dengan menggunakan oven pada suhu 70°C selama 24 jam sampai mencapai berat konstan (Sudarmadji dkk., 1997).

2. Kandungan protein

Kandungan protein ditentukan dengan mengukur kadar nitrogen total yang di analisis dengan cara Makro-Kjehdahl yang dimodifikasi (Sudarmadji dkk., 1997). Sampel dalam ependorff dipindahkan ke dalam labu Kjeldahl, kemudian ditambah dengan katalis N yang terdiri atas NaSO₄, CuSO₄ dan Se dengan perbandingan 250: 5: 1, setelah itu ditambah dengan H₂SO₄ pekat 97% sebanyak 3 ml. Semua bahan yang ada dalam labu dipanaskan (destruksi) secara perlahan-lahan dalam almari asam ± selama 1 jam sampai warna berubah menjadi jernih kehijauan. Setelah dingin diencerkan dengan 15 ml aquadest, dan dimasukkan kedalam alat destilasi Mikro-Kjeldahl. Destilat ditampung dalam 5 ml asam borat 4% yang telah ditambah dengan indikator MR-BCG (coklat) sebanyak ± 6 tetes, kemudian ditambah dengan 15 ml NaOH-tiosulfat dan destilasi dilanjutkan sampai warna berubah dari coklat menjadi biru jernih. Destilat ditampung ± sebanyak 60 ml dan dititrasi dengan larutan standar HCl 0,02 N sampai warna berubah kembali menjadi coklat.
Perhitungan kadar Nitrogen dalam bahan (%N) adalah:

\[ \% N = \left( \frac{\text{ml HCl x N HCl}}{\text{Berat sampel (mg)}} \right) \times 100\% \]

Kadar protein = 6,25 x \%N

E. Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok Faktorial, dengan dua faktor yaitu konsentrasi glukosa \((G_0 = 0 \% b/v, G_1 = 2 \% b/v, G_2 = 4 \% b/v, G_3 = 6 \% b/v, G_4 = 8 \% b/v)\) dan konsentrasi urea \((U_0 = 0 \% b/v, U_1 = 0,15 \% b/v, U_2 = 0,3 \% b/v)\). Setiap perlakuan diulang tiga kali. Data yang diperoleh di analisis dengan Anova pada taraf uji 5 %, bila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf uji yang sama.

Tabel 02. Kombinasi perlakuan glukosa dan urea

<table>
<thead>
<tr>
<th>Perlakuan</th>
<th>Kelompok (Ulangan)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>I</td>
</tr>
<tr>
<td>Glukosa (G)</td>
<td>Urea (U)</td>
</tr>
<tr>
<td>(G_0)</td>
<td>(U_0)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_1)</td>
<td>(G_0U_1)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_2)</td>
<td>(G_0U_2)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_0)</td>
<td>(G_1U_0)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_1)</td>
<td>(G_1U_1)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_2)</td>
<td>(G_1U_2)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_0)</td>
<td>(G_2U_0)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_1)</td>
<td>(G_2U_1)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_2)</td>
<td>(G_2U_2)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_0)</td>
<td>(G_3U_0)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_1)</td>
<td>(G_3U_1)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_2)</td>
<td>(G_3U_2)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_0)</td>
<td>(G_4U_0)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_1)</td>
<td>(G_4U_1)</td>
</tr>
<tr>
<td>(U_2)</td>
<td>(G_4U_2)</td>
</tr>
</tbody>
</table>