

BAB IV METODE 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

Mei - Agustus 1997

B. Bahan dan Alat Penelitian

B.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah bekatul yang diperoleh dari rumah penggilingan padi, biakan murni *C. tropicalis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Universitas Gajah Mada, Medium Yeast Ekstrak Agar, Aquades, Asam Sulfat (H_2SO_4), Kalium dihidro fosfat (KH_2PO_4), Urea, glukosa, larutan fenol 5% (b/v), medium agar pati, campuran K_2SO_4 dan HgO (20:1), NH_4SO_4 , Zn, HCl, NaOH 0,1 N, indikator PP.

B.2. Alat Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi: saringan/ayakan, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus, jarum inokulasi, termometer, kompor, oven, 'hot plate', mortir, 'autoclaf', inkubator suhu ruang, 'laminair air flow', pipet ukur,

haemositometer, spektrofotometer Spectronic 20, timbangan analitik, mikroskop cahaya, 'shaker' dan sentrifus.

C. Analisis Laboratorium

C.1. Pembuatan Medium Kultur

Untuk medium kultur *C. tropicalis* digunakan medium Yeast Ekstrak Agar, yang tersusun atas : pepton 7,5 gr, glukosa 20 gr, yeast ekstrak 4,5 gr, agar 1,5 gr, Aquades 1 liter (Atlas, 1993).

Adapun cara pembuatan medium padat ini, setelah masing-masing bahan ditimbang maka ekstrak ragi dilarutkan dalam aquades sambil dipanaskan hingga larut dan homogen, serta diatur pHnya menjadi 4. Kemudian dalam keadaan masih panas dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 ml. Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah sterilisasi tabung reaksi tersebut dimiringkan dengan menggunakan penyangga sampai medium menjadi padat/dingin.

C.2. Penyediaan Biakan Murni

Biakan murni *C. tropicalis* diperbanyak dengan menggunakan medium Yeast Ekstrak Agar miring dalam tabung reaksi, dengan cara menggoreskan biakan murni dengan ose secara aseptis, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Biakan murni siap untuk digunakan.

C.3. Pembuatan Starter

Biakan murni *C. tropicalis* diinokulasikan pada 40 ml medium fermentasi dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang di atas pengocok ('shaker') dengan kecepatan 105 hentakan per menit (hpm). Kepadatan selnya adalah kurang lebih 10^6 sel/ml (Hermanto, 1994; Hariyun, 1986).

C.4. Penyediaan Medium Fermentasi

Dibuat suspensi bekatul dalam erlenmeyer dengan konsentrasi 5%, 7,5% dan 10% (b/v). Ke dalam medium tersebut kemudian ditambahkan nutrisi tambahan urea sebanyak 500 mg/l, KH_2PO_4 200 mg/l suspensi bekatul (Hermanto, 1994). Kemudian bahan yang telah dicampur ini ditetapkan pHnya menjadi 4 dengan menggunakan H_2SO_4 0,1 N, lalu disterilkan dengan sistem Arnold (sterilisasi dengan menggunakan uap air panas), yaitu : mula-mula medium disterilkan dengan menggunakan suhu 100°C selama 30 menit untuk membunuh sel-sel vegetatif mikroba. Kemudian medium tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam untuk memberi kesempatan tumbuhnya spora-spora. Selanjutnya dilakukan sterilisasi yang kedua pada suhu 100°C selama 30 menit. Untuk meyakinkan apakah bahan tersebut sudah steril maka bahan diinkubasikan lagi pada suhu kamar selama 24 jam dan setelah itu dilakukan lagi sterilisasi pada suhu 100°C selama 30 menit. Setelah medium tersebut dingin, ke dalamnya diinokulasikan suspensi khamir (starter) sebanyak 20% (v/v) medium fermentasi.

C.5. Perlakuan Lama Inkubasi.

Setelah medium diinokulasi dengan starter khamir kemudian diinkubasi. Untuk kontrol, medium tidak diinkubasi. Untuk masing-masing konsentrasi substrat 5%, 7,5%, dan 10% (b/v) diinkubasi selama 48 jam, 72 jam, dan 96 jam. Fermentasi dikerjakan dalam erlenmeyer yang berlangsung dalam keadaan aerob.

Setelah fermentasi berakhir, medium dipasteurisasi pada suhu 70 - 80°C selama 15 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, selanjutnya endapan yang terbentuk dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C selama 48 jam, kemudian dihaluskan menjadi tepung dengan mortir halus.

C.6. Analisis Bahan

C.6.1. Analisis Kandungan Gula Reduksi

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

a. Pembuatan kurva standar glukosa

Dibuat larutan glukosa yang berturut-turut mengandung 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 μg glukosa kemudian masing-masing larutan dipipet sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam sepuluh tabung reaksi. Pada masing-masing tabung reaksi ditambah 5 ml H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan fenol 5%. Tabung-tabung reaksi tersebut dikocok, kemudian dibiarkan selama 10 menit,

dikocok lagi dan diukur kerapatan optik (OD)nya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Dari hasil pengukuran OD, dibuat kurva standar yang menghubungkan banyaknya μg glukosa (pada absis) dengan OD (pada ordinat).

b. Analisis Contoh

Medium fermentasi disentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 25 menit, supernatan diambil sebanyak 2 ml dan diperlakukan sama seperti dalam pembuatan kurva standar glukosa. Kandungan gula reduksi contoh dapat ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

C.6.2. Penghitungan Jumlah Sel Khamir

Jumlah sel khamir dalam medium setelah fermentasi dapat dihitung dengan menggunakan Haemositometer. Pada penelitian ini yang digunakan adalah haemositometer tipe Neubauer. Untuk memudahkan perhitungan, contoh diencerkan hingga memungkinkan untuk dihitung di bawah mikroskop. Di sini contoh diencerkan sampai dua kali pengenceran, yaitu contoh yang diambil sebanyak 1 ml ditambah 9 ml aquades steril, sehingga didapatkan pengenceran dengan konsentrasi 10^{-1} . Dari konsentrasi 10^{-1} dipipet 1 ml dan ditambahkan ke dalam 9 ml aquades steril sehingga diperoleh pengenceran dengan konsentrasi 10^{-2} . Dari contoh yang telah diencerkan, diambil sejumlah volume tertentu kemudian diteteskan pada alat haemositometer sampai

memenuhi permukaan hitung. Kemudian dihitung jumlah sel yang ada di bawah mikroskop.

Jumlah sel khamir dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

Y = Jumlah sel khamir dalam 1 ml contoh

X = Jumlah sel khamir dalam 5 kotak ruang kecil

P = pengenceran

(Hadioetomo, 1990).

C.6.3. Analisis Kandungan Protein

Penentuan jumlah kandungan protein dilakukan secara proximat, yaitu melalui penentuan kandungan N yang ada dalam bahan. Metode yang digunakan adalah metode Kjeldahl (Sudarmadji, 1986). Analisis protein cara Kjeldahl pada dasarnya dapat dibagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap destruksi, destilasi dan tahap titrasi.

1. Tahap Destruksi

Bahan yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1 gr dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Kemudian ditambahkan K_2SO_4 dan HgO (20:1). Selanjutnya ditambahkan 15 ml H_2SO_4 pekat. Semua bahan dalam labu Kjeldahl dipanaskan dalam almari asam sampai berhenti berasap. Pemanasan diteruskan dengan api besar sampai mendidih dan cairan menjadi jernih. Kemudian ditambah lagi pemanasan kurang lebih satu jam. Api pemanas dimatikan dan bahan dibiarkan menjadi dingin.

2. Tahap Destilasi

Ke dalam labu Kjeldahl yang didinginkan dalam almari es ditambahkan 100 ml aquades dan beberapa lempeng Zn, juga ditambahkan 15 ml larutan K₂S 4% (dalam air). Kemudian ditambahkan secara perlahan-lahan larutan NaOH 50% sebanyak 50 ml yang sudah didinginkan dalam almari es. Labu Kjeldahl dipasang dengan segera pada alat destilasi. Labu Kjeldahl dipanaskan perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, kemudian dipanaskan dengan cepat sampai mendidih. Destilat ini ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCL (0,1N) dan 5 tetes indikator metil merah. Destilasi diakhiri apabila sudah semua ammonia terdestilasi sempurna dengan ditandai destilat tidak bereaksi basis.

3. Tahap Titrasi

Destilat yang diperoleh dititrasi dengan standar NaOH (0,1N) sampai warna kuning.

Supaya analisis lebih tepat maka dibuat juga larutan blanko dengan mengganti bahan dengan aquades dan dilakukan destruksi, destilasi dan titrasi seperti pada bahan contoh.

Perhitungan % N :

$$\% N = \frac{\text{ml NaOH (blanko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N.\text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

Setelah diperoleh % N, selanjutnya dihitung kandungan proteinnya dengan mengalikan suatu faktor. Besarnya faktor

perkalian untuk bahan berupa khamir / makanan ternak adalah 6,25. Jadi % N yang didapat dikalikan dengan 6,25.

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{faktor}$$

Dasar perhitungan penentuan protein ini adalah hasil penelitian yang menyatakan bahwa umumnya protein alamiah mengandung kadar N rata-rata 16%, maka jumlah protein diperhitungkan dengan :

$$\text{Jumlah N} \times 100/16 \text{ atau}$$

$$\text{Jumlah N} \times 6,25$$

D. Rancangan Percobaan

D.1. Parameter yang Diamati

Dalam penelitian ini, ada dua macam parameter yang diamati yaitu parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama adalah kandungan protein dan parameter penunjang adalah kandungan gula reduksi dan jumlah sel khamir.

D.2. Macam Perlakuan

Perlakuan yang diberikan meliputi:

a. Konsentrasi Substrat (% b/v)

terdiri dari tiga taraf:

$$S1 = 5 ; S2 = 7,5 ; S3 = 10$$

b. Lama Waktu Inkubasi (jam)

terdiri dari 4 taraf

$$T0 = 0 ; T1 = 48 ; T2 = 72 ; T3 = 96$$

D.3. Kontrol

Perlakuan waktu inkubasi nol jam berlaku sebagai kontrol, karena tanpa diinkubasi proses fermentasi tidak akan berlangsung. Peningkatan kandungan protein dapat terjadi karena adanya proses fermentasi.

D.4. Ulangan dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing perlakuan

D.5. Perlakuan waktu inkubasi nol jam juga digunakan untuk mengetahui peningkatan parameter pada masing-masing perlakuan.

Tabel 02 : Kombinasi Perlakuan antara Konsentrasi Substrat dan Waktu Inkubasi

Waktu Inkubasi (jam)	T0	T1	T2	T3
Konsentrasi Substrat (%)				
S1	S1T0	S1T1	S1T2	S1T3
S2	S2T0	S2T1	S2T2	S2T3
S3	S3T0	S3T1	S3T2	S3T3

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dalam faktorial, sehingga perlakuannya berupa kombinasi 2 faktor perlakuan yaitu konsentrasi substrat dan lama inkubasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan model Analisis Sidik Ragam. Sedangkan uji lanjutan yang dipakai adalah Uji Beda Nyata Jujur (Tukey) (Srigandono, 1989).