

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan baku, bahan untuk kultur khamir laut, bahan dalam pembuatan hidrolisat protein, bahan untuk analisis protein, bahan untuk uji daya cerna secara invitro. Bahan baku yang digunakan penelitian ini menggunakan kepala udang vaname (*L. Vanname*) yang di dapatkan dari limbah PT. GMCP di jalan industri buduran sidoarjo. Bahan yang digunakan untuk mengkultur khamir laut yaitu, stok air laut, pupuk daun (Hortigo), aquadest dan gula pasir. Selanjutnya bahan yang diunakan dalam pembuatan hidrolisat protein merupakan kepala udang vaname, molase, dan hasil kultur khamir laut.

Bahan yang digunakan dalam analisis protein dengan menggunakan metode kjedhal yaitu kertas saring, asam borat, akuades, larutan o-phthaldehyde (OPA), methanol dan merkaptoetanol. Bahan yang digunakan untuk menganalisis protein antara lain tablet kjedhal, metil orange, NaOH, dan H₂SO₄. Bahan yang digunakan untuk uji daya cerna secaa invitro antara lain tripsin, pepsin, aseton, Larutan buffer (*Phospat Buffer Saline*), hidrolisat protein, dan akuades.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kultur khamir laut terdiri dari botol kaca, kompor, panci perebusan, spatula, pipet volume, bola hisap, timbangan digital, *aerator*, selang, corong, dan *beaker glass*. Peralatan yang digunakan untuk perhitungan kepadatan sel khamir laut terdiri dari mikroskop, Haemocytometer, mikropipet, *cover glass*, rak tabung reaksi, tabung reaksi,

vortex mixer, bolah hisap, pipet volume, erlenmeyer, gelas ukur, timbangan digital, spatula, dan *sprayer*. Perlatan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus terdiri dari kompor, panci, waterbath, *beaker glass*, timbangan digital, piring, bola hisap, pipet volume, botol, aerator, blender, dan *food processor*.

Alat-alat yang akan digunakan untuk analisis kimia terdiri dari oven, desikator, timbangan digital, kuvet, sentrifus, spatula, beaker glass, mortal, alu, gelas ukur, cawan petri, destruksi, destilasi, statif, biuret, *hot plate*, dan *magnetic stirer*.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Tujuan dari pelaksanaan metode eksperimen peneliti secara sengaja dilakukan oleh peneliti terhadap variable yang data-datanya belum ada sehingga perlu perlakuan tertentu terhadap subyek penelitian guna diamati pengaruhnya. Hal yang mendasari dari penelitian ini merupakan riset-riset yang telah terdahulu, studi kasus, literatur yang disebutkan serta data sekunder lainnya (William, 2007). Penelitian ini mejadi topik baru yang akan dikenal oleh masyarakat luas, memberikan gambaran dasar mengenai topik bahasan, mengembangkan topik tentatif, membuka kemungkinan akan diadakannya penelitian lanjutan terhadap topik yang dibahas, juga menentukan teknik dan arahan yang akan digunakan dalam penelitian berikutnya (Ida, 2004).

Penelitian ini dilakukan dengan menumbuhkan atau kultur khamir laut terlebih dahulu. Pada proses kultur dilakukan untuk mengetahui waktu pengambilan khamir laut yang sudah siap untuk dipanen atau pada fase logaritmik khamir laut. Dianggap pada fse logaritmik ketika pertumbuhan khamir

laut sangat tinggi. Selanjutnya melakukan pembuatan hidrolisat protein dengan cara fermentasi yang dilakukan dengan aerasi didalam botol yang berisi 200 mL molase, 100 g kepala udang vaname rebus, dan 10 mL khamir laut kemudian difermentasi selama 12 hari. Setelah proses pembuatan hidrolisat protein selesai kemudian dilanjutkan dengan menganalisis protein dan uji nilai cerna secara in vitro terhadap hidrolisat protein kepala udang vaname tersebut.

3.2.2 Variable

Variable merupakan suatu karakteristik yang memiliki dua atau lebih nilai atau sifat yang berdiri sendiri-sendiri. Variable terdiri dari variable bebas dan terikat. Variable bebas adalah faktor yang menyebabkan suatu pengaruh sedangkan variable terikat adalah faktor yang diakibatkan oleh pengaruh tersebut (hasil) (Sevilla *et al.*, 2006).

Penelitian ini terdapat dua variable yaitu variable bebas dan variable terikat. Variable bebas dari penelitian ini adalah penggunaan enzim yang berbeda yaitu enzim tripsin dan enzim pepsin, sedangkan variable terikat dari penelitian ini adalah analisis protein dan uji daya cerna protein.

3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang terdiri dari 3 perlakuan dan 3 kali ulangan. Model desain rancangan penelitian dapat dilihat Tabel 5.

Tabel 5. Rancangan Penelitian

Perbedaan Enzim	Ulangan			Total	Rata – Rata
	U1	U2	U3		
K	K 1	K 2	K 3		
T	T 1	T 2	T 3		
P	P 1	P 2	P 3		
TP	TP 1	TP 2	TP 3		

Keterangan : K : Kontrol
T : Tripsin
P : Pepsin

TP : Tripsin dan Pepsin (1:1)

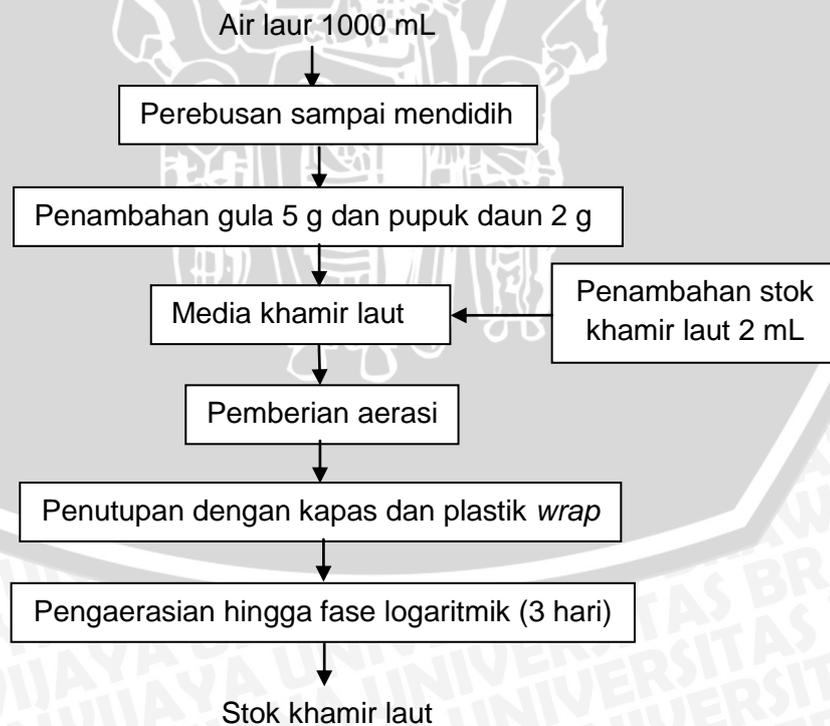
Langkah selanjutnya adalah membandingkan F hitung dan F tabel sebagai berikut:

- Jika F hitung < F tabel 5%, maka perlakuan tidak beda nyata
- Jika F hitung > F tabel 1%, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat beda nyata
- Jika F tabel 5% < F hitung < F tabel 1 %, maka perlakuan menyebabkan berbeda nyata.

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata (F hitung > F tabel 5%) atau (F hitung > F tabel 1%) perbedaan yang sangat nyata (maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan terbaik.

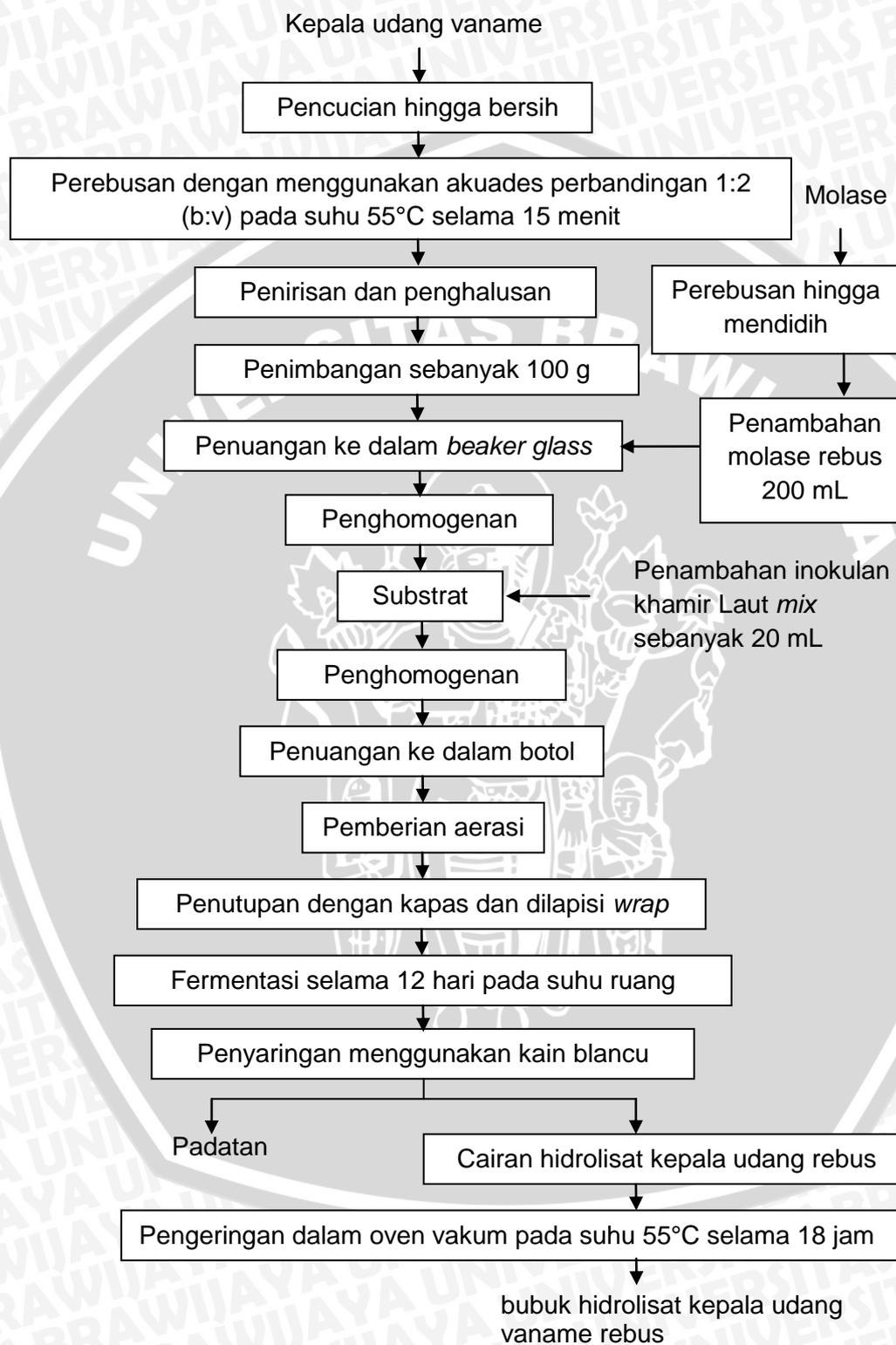
3.3 Skema Kerja Penelitian

3.3.1 Skema Kerja Kultur Khamir Laut



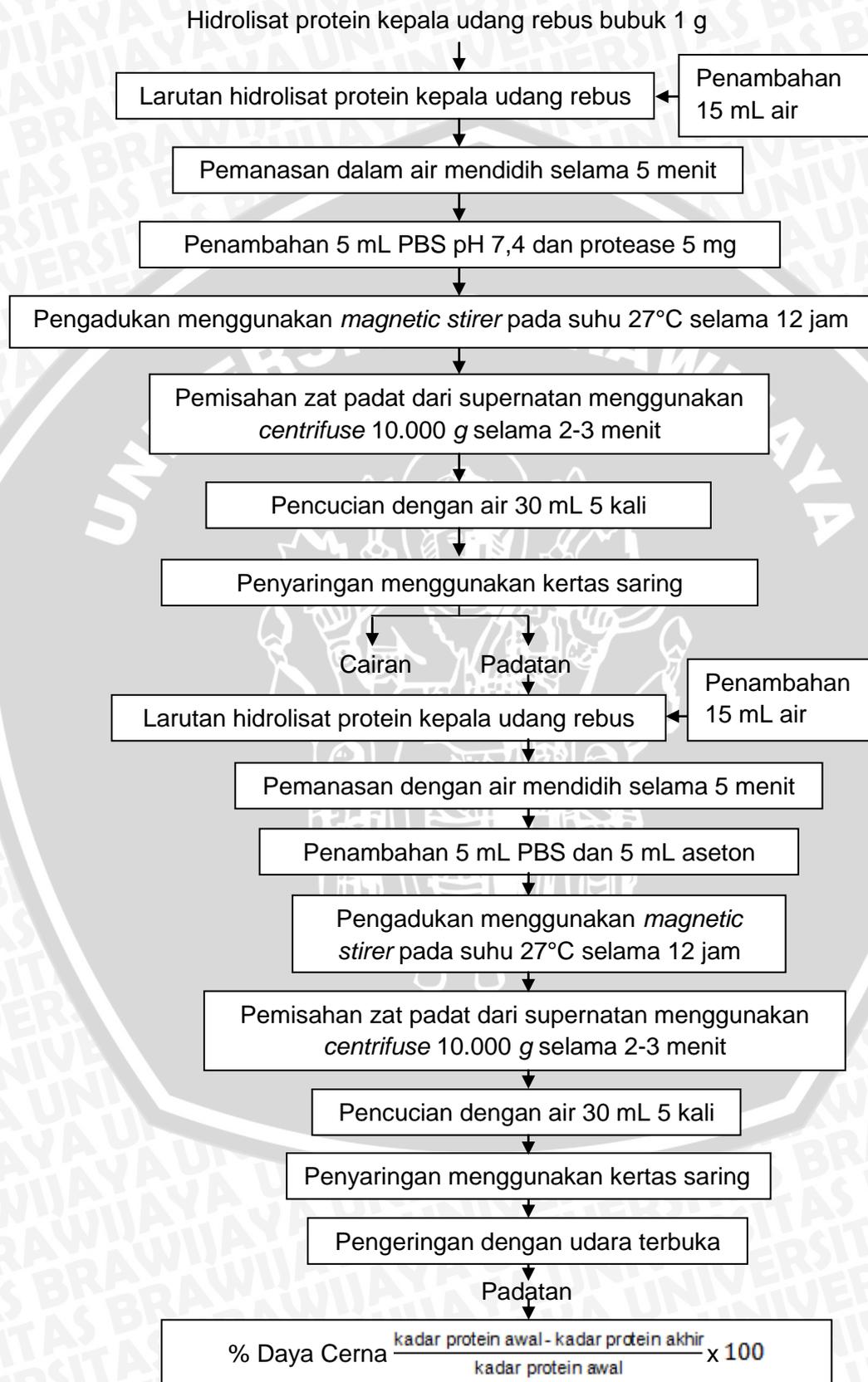
Gambar 1. Skema kerja kultur khamir laut (Sukoso, 2012)

3.3.2 Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname



Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname Rebus (Modifikasi Bueno-solano *et al.*, 2008)

3.3.3 Skema Kerja Uji Daya Cerna



Gambar 3. Prosedur Uji Daya Cerna (Saunders dan Kohler, 1971)

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja sebelum membuat hidrolisat protein kepala udang vaname rebus terlebih dahulu mempersiapkan bahan yang akan digunakan, seperti pupuk daun, gula dan khamir laut starter. Proses pengkulturan khamir laut dilakukan dengan prosedur kerja pada penelitian sebelumnya, untuk penentuan fase log khamir laut dilakukan pemanenan pada jam ke 48 karena, pada jam tersebut khamir laut merupakan titik tertinggi perkembang biakan khamir laut. Fase log adalah fase dimana mikroorganisme yang sangat tinggi dibandingkan pertumbuhan yang sangat cepat dan dapat dikatakan sebagai pertumbuhan experimental. Pada fase ini kebutuhan akan energi lebih tinggi dan sel menjadi lebih sensitif terhadap lingkungannya. Oleh sebab itu, pada fase saat ini dimana mikroba termasuk didalamnya memenuhi kebutuhan nutrisinya (Waluyo, 2007).

Prosedur kerja pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus terlebih dahulu mencuci kepala udang vaname hingga bersih lalu direbus dengan akuades dengan perbandingan 1: 2 untuk sampel dan akuades yang digunakan kemudian direbus pada suhu 55°C selama 15 menit. Setelah itu ditiriskan dan dihaluskan dengan menggunakan blender. Lalu ditimbang sebanyak 100 g dan dimasukkan ke dalam botol plastik, kemudian ditambahkan molase rebus sebanyak 200 mL dan dihomogenkan. Substrat yang sudah siap maka ditambahkan inokulan khamir laut sebanyak 20 mL, kemudian ditutup dan diberi aerasi yang cukup untuk menambah suplai oksigen dan pertumbuhan khamir laut. Lalu difermentasi selama 12 hari pada suhu ruang. Pada saat hari ke 12 maka di saring menggunakan kain blacu hingga mendapatkan cairan hidrolisat protein, kemudian dilakukan pengujian proksimat terhadap hidrolisat protein kepala udang vaname rebus.

Prosedur kerja nilai cerna pada hidrolisat protein kepala udang vaname rebus terlebih dahulu mengeringkan sampel dengan menggunakan oven vakum pada suhu 55°C sampai kering, setelah itu dihaluskan menggunakan mortal dan alu hingga menjadi bubuk dan ditimbang sebanyak 1 g. Setelah itu ditambahkan dengan 15 mL air lalu dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit kemudian didinginkan, setelah dingin ditambahkan 5 mL PBS dan 5 mg protease yang berbeda. Pengadukan menggunakan *magnetic stirer* pada suhu 27°C selama 12 jam setelah penghomogenan selesai maka dilakukan pemisahan zat padat dari supernatan menggunakan *centrifuse* dengan kecepatan 10.000 g selama 2-3 menit, setelah proses *centrifuse* dilakukan pencucian menggunakan 30 mL air sebanyak 5 kali dan disaring menggunakan kertas saring, kemudian dibiarkan pada udara terbuka.

Setelah padatan didapat maka ditambahkan 15 mL air lalu dipanaskan dengan menggunakan air mendidih selama 5 menit kemudian ditambahkan 5 mL PBS dan 5 mL aseton, pengadukan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirer* pada suhu 27°C selama 12 jam. Pemisahan zat padat dari supernatan menggunakan *centrifuse* dengan kecepatan 10.000 g selama 2-3 menit, setelah proses *centrifuse* dilakukan pencucian menggunakan 30 mL air sebanyak 5 kali dan disaring menggunakan kertas saring, kemudian dibiarkan pada udara terbuka. Residu yang masih tersisa digunakan sebagai sampel uji protein untuk mengetahui berapa kandungan protein yang masih ada pada residu. Setelah itu persentase nilai cerna dapat dihitung.