

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - Mei 2014 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai tempat pelaksanaan fermentasi dan Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Malang sebagai tempat analisis kandungan zat makanan berdasarkan analisis proksimat.

### **3.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah jenis inokulum yang terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu a1= *Bacillus mycoïdes*, a2= *Trichoderma sp* dan a3= kombinasi antara *Bacillus mycoïdes* dan *Trichoderma sp.*. Faktor kedua adalah lama fermentasi terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu b1= 3 hari, b2= 6 hari, dan b3= 9 hari. Dengan demikian dalam penelitian ini terdapat 9 kombinasi perlakuan yaitu 3x3 satuan percobaan atau unit eksperimen untuk setiap satu rancangan percobaan. Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus (Sastrosupadi, 2000) yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

keterangan : t = perlakuan r = ulangan

Perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan 3 kali ulangan yang diperoleh dari perhitungan rumus tersebut. Sehingga secara keseluruhan menghasilkan 27 kombinasi perlakuan yaitu 9x3 unit percobaan.

Tabel 3.1 Denah rancangan penelitian

Perlakuan		Kadar serat kasar onggok (%)			Kadar Protein Kasar onggok (%)		
Jenis inokulum	Lama fermentasi	Ulangan			Ulangan		
		I	II	III	I	II	III
a1 ( <i>Trichoderma sp.</i> )	b1						
	b2						
	b3						
a2 ( <i>Bacillus mycoides</i> )	b1						
	b2						
	b3						
a3 ( <i>Trichoderma sp.</i> + <i>Bacillus mycoides</i> )	b1						
	b2						
	b3						

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis inokulum dan lama fermentasi.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini merupakan variable yang diukur yaitu kadar serat kasar dan protein kasar.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rak tabung reaksi, *mikro pipet*, Erlenmeyer, beaker glass, ose bamata, kompor, hot plate, Bunsen, timbangan analitik, pembersih botol, *waterbath*, inkubator, oven, *autoklaf*, dandang pengukus, toples kaca, *blue tip*, *plastic zipp*, termometer suhu, LAF (*Laminar Air Flow*), dan seperangkat alat untuk analisa proksimat yang meliputi cawan porselin, oven 105 °C, labu kjeldahl, Erlenmeyer, beaker glas, alat destilasi, biuret titrasi, selongsong S porselin, alat pemanas untuk analisa serat kasar, gelas ukur, crucible dan pompa vakum.

#### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Onggok, *Bacillus mycoides*, *Trichoderma sp.*, NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), *peptone*, *yeast extract*, NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , *Aquades*, kertas label, sarung tangan, *aluminium foil*, tisu, karet gelang, alkohol 70%, spritus, *plastic wrap*.

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dan dikeringkan, selanjutnya alat-alat dan bahan dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

### **3.5.2 Peremajaan *Trichoderma sp.***

Metode peremajaan kapang *Trichoderma sp.* yaitu: PDA (*Potato Dextrose Agar*) dilarutkan dengan *aquades* dan dipanaskan sampai homogen, selanjutnya dituang kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dibiarkan memadat pada posisi miring, selanjutnya digores 1 ose isolat *Trichoderma sp.* secara aseptis dengan metode gores secara zig-zag, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 7 hari pada suhu 35°C.

### **3.5.3 Peremajaan *Bacillus mycooides***

Peremajaan bakteri dilakukan untuk memperpanjang umur biakan *Bacillus mycooides*. Peremajaan bakteri yaitu NA (*Nutrient Agar*) dilarutkan dengan *aquades* dan dipanaskan sampai homogen, selanjutnya dituang kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dibiarkan memadat pada posisi miring, selanjutnya digores 1 ose isolat *Bacillus mycooides* secara aseptis dengan metode gores secara zig-zag, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 35 °C.

### **3.5.4 Pembuatan Inokulum**

#### **3.5.4.1 Pembuatan Inokulum *Trichoderma sp.***

Pembuatan inokulum *Trichoderma sp.* yaitu 1 ose isolat kapang *Trichoderma sp.* yang telah berumur 7 hari diinokulasikan ke 10 ml medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan disuspensikan, kemudian diambil 6 ml suspensi kapang dan ditanam dalam 60 ml PDB dalam labu Erlenmeyer 125 ml, inokulum

diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 35°C 120 rpm selama 7 hari. 7 hari merupakan waktu eksponensial jamur (Pasaribu, 2010).

#### **3.5.4.2 Pembuatan Inokulum *Bacillus mycoides***

Satu ose *Bacillus mycoides* diinokulasikan kedalam 10 ml media *Nutrient Broth*, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam shaker inkubator 120 rpm pada suhu 35°C. kemudian diambil 6 ml suspensi bakteri dan dimasukkan kedalam 60 ml *Nutrient Broth* steril, diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 35°C 120 rpm selama 10 jam. Digunakan waktu inkubasi 10 jam karena pada waktu *Bacillus mycoides* berada pada fase eksponensial Mahmudah (2013).

#### **3.5.5 Pembuatan Media Fermentasi**

Metode pembuatan media fermentasi onggok yaitu: 1,5 kg onggok kering yang telah digiling dicampur secara merata dengan air 1500 ml, kemudian dikukus diatas air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang, kemudian dicampur secara merata dengan medium (*pepton* 15 g, *yeast extract* 10 g, Nacl 15 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,75 g) dalam 1500 ml *aquades*.

#### **3.5.6 Fermentasi Onggok dengan Menggunakan *Trichoderma sp.***

Metode inkubasi yaitu: disiapkan 9 buah toples gelas steril, setiap toples diisi 50 gr substrat onggok yang telah dikukus dan dicampur mineral serta didinginkan, selanjutnya ditambahkan inokulum cair *Trichoderma sp.* sebanyak 6%, diaduk sampai homogen, ditutup rapat dengan menggunakan plastik untuk mendapatkan kondisi anaerob, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 35°C

selama 3 hari, 6 hari dan 9 hari, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 45°C selama 1 hari, kemudian dianalisis kadar serat kasar dan protein kasar.

### **3.5.7 Fermentasi Onggok Menggunakan *Bacillus mycoides***

Metode inkubasi yaitu: disiapkan 9 buah toples gelas steril, setiap toples diisi 50 gr substrat onggok yang telah dikukus dan dicampur mineral serta didinginkan, selanjutnya ditambahkan inokulum cair *Bacillus mycoides* sebanyak 6%, diaduk sampai homogen, ditutup rapat dengan menggunakan plastik untuk mendapatkan kondisi anaerob, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 35°C selama 3 hari, 6 hari dan 9 hari, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 45°C selama 1 hari, kemudian dianalisis kadar serat kasar dan protein kasar.

### **3.5.8 Fermentasi Onggok dengan Menggunakan Kombinasi *Bacillus mycoides* dan *Trichoderma sp.***

Metode fermentasi onggok dengan menggunakan kombinasi *Bacillus mycoides* dan *Trichoderma sp.* yaitu: disiapkan 9 buah toples gelas steril, setiap toples diisi 50 gr substrat onggok yang telah dikukus dan dicampur mineral serta didinginkan, selanjutnya ditambahkan inokulum cair *Bacillus mycoides* sebanyak 3% dan *Trichoderma sp.* sebanyak 3%, diaduk sampai homogen, ditutup rapat dengan menggunakan plastik untuk mendapatkan kondisi anaerob, diinkubasi dalam pada suhu 35°C selama 3 hari, 6 hari dan 9 hari, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 45°C selama 1 hari, kemudian dianalisis kadar serat kasar dan protein kasar.

### 3.5.9 Analisa Kadar Protein Kasar

Analisa kadar protein kasar dilakukan sebagai berikut: sampel sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam labu kjeldhal, selanjutnya katalis ditimbang sebanyak 1 gram yang terdiri dari  $\text{CuSO}_4 : \text{Na}_2\text{SO}_4 = 1:1$ , kemudian ditambahkan 2,5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, didestruksi sampai cairan berwarna hijau jernih, pendidihan dilanjutkan selama 30 menit, selanjutnya labu dan isinya didinginkan sampai suhu kamar, kemudian isinya dipindahkan kedalam alat distilasi dan ditambahkan 15 ml  $\text{NaOH}$  50% (sampai dengan larutan menjadi basa). Untuk mengetahui larutan menjadi basa menggunakan pH meter, kemudian hasil sulingan ditampung kedalam Erlenmeyer 200 ml yang berisi  $\text{HCl}$  0,02 N sampai tertampung tidak kurang dari 50 ml destilat, kemudian hasil destilasi ditampung dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N disertai penambahan indikator mensele (campuran metil red dan metil blue) 3-4 tetes, Selanjutnya dititrasi dengan  $\text{NaOH}$  0,1 N hingga terjadi perubahan dari warna ungu menjadi biru kehijauan. Penetapan blanko dengan cara: 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N ditambah indikator PP, dan dititrasi dengan  $\text{NaOH}$  0,1 . Karena protein rata-rata mengandung 16% Nitrogen, maka  $100\% : 16\% = 6,25$  dipakai untuk mendapatkan nilai protein kasar (protein kasar =  $\text{N}\% \times 6,25$ ).

Perhitungan (Pasaribu, 2010) :

$$\% \text{ Protein} = \frac{(\text{ml blanko} - \text{ml sampel}) \times \text{N NaOH} \times 14 \times 6,25}{\text{Berat Sampel (mg)}} \times 100\%.$$

### 3.5.10 Analisa Kadar Serat Kasar

Analisa kadar serat kasar dilakukan sebagai berikut: sampel sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer 300 ml kemudian ditambahkan 100

ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,325 N, bahan selanjutnya dihidrolisis di dalam autoklaf bersuhu  $105^\circ\text{C}$  selama 15 menit, kemudian bahan disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah dikeringkan (diketahui beratnya). Setelah itu kertas dicuci berturut-turut air panas + 25  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,325 N dan air panas + 25 aseton atau alkohol, selanjutnya residu beserta kertas saring dikeringkan dalam oven bersuhu  $110^\circ\text{C}$  selama  $\pm 1-2$  jam, kemudian diangkat dan didinginkan dalam desikator lalu ditimbang (Y), selanjutnya dimasukkan ke dalam tanur  $600^\circ\text{C}$  selama 6 jam. Selanjutnya diangkat dan didinginkan dalam desikator dan ditimbang (Z).

Perhitungan (Pasaribu, 2010) :

$$\% \text{ Serat Kasar} = \frac{Y - Z - a}{X} \times 100 \%$$

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analisis of Variant* (ANOVA) *Two Way*. Apabila ada perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).