

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan menguji kemampuan *Bacillus mycoides* dalam memfermentasi onggok untuk menurunkan serat kasar dan meningkatkan protein kasar. Rancangan penelitian menggunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah jumlah inokulum yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah lama fermentasi yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. 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

Dengan demikian berdasarkan rumus tersebut, perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam 3 kali ulangan. Sehingga secara keseluruhan menghasilkan 27 kombinasi perlakuan yaitu 9x3 unit percobaan. Denah rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.2.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juni 2013 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. Tabel denah rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1. Denah rancangan penelitian

Perlakuan		Kadar serat kasar onggok (%)			Kadar protein kasar onggok (%)		
Jumlah inokulum	Lama fermentasi	Ulangan			Ulangan		
		I	II	III	I	II	III
1%	2 hari						
	5 hari						
	8 hari						
3%	2 hari						
	5 hari						
	8 hari						
5%	2 hari						
	5 hari						
	8 hari						
Kontrol : inokulum 0% lama fermentasi 0 hari							

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah inokulum bakteri *Bacillus mycoides* dan lama fermentasi.

3.3.2 Variabel Terikat

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

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, kaca objek, rak pewarnaan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, erlenmeyer, beaker glass, spatula, ose bamata, kompor, hotplate, sprayer, bunsen, timbangan analitik, pembersih botol, waterbath, inkubator, oven, autoklaf, kuvet, spektrofotometer, dandang pengukus, toples, thermometer suhu, timbangan O'haus kapasitas 2610 g, LAF (*Laminar Air Flow*), dan seperangkat alat untuk analisa proksimat yang meliputi cawan porselin, oven 105 °C, eksikator, tang penjepit, timbangan satorius, tanur 550-600 °C, labu Kjeldahl, Erlenmeyer, beaker glass, alat destilasi, biuret titrasi, selongsong S porselin, beaker glass dan 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*, cat kristal violet, ligol iodine solution, etanol 95%, safranin, minyak imersi, NA (Nutrien Agar), NB (Nutrient Broth), kasein (PA), peptone (PA), yeast extract (PA), NaCl dan agar (PA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PA), K_2HPO_4 (PA), KH_2PO_4 (PA), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PA), aquades, kertas label, sarung tangan, aluminium foil, tissue, tali, alkohol 96%, spritus, *plastik wrap*, dan kertas indikator pH.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Alat- alat yang akan dipergunakan dicuci bersih dan dikeringkan

2. Alat-alat dan bahan dibungkus menggunakan aluminium foil dan dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.2 Peremajaan Bakteri *Bacillus mycooides*

Peremajaan bakteri dilakukan untuk memperpanjang umur biakan *Bacillus mycooides*. Peremajaan bakteri dilakukan dengan metode gores secara zig-zag sehingga menggunakan 1 ose.

1. Nutrien agar dilarutkan dengan aquades dan dipanaskan sampai homogen.
2. Disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
3. Dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml dan dibiarkan padat pada posisi miring.
4. Digores dengan 1 ose isolat *Bacillus mycooides* secara aseptis dengan metode gores secara zig-zag.
5. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Diagram alir Peremajaan Bakteri *Bacillus mycooides* dapat dilihat pada lampiran 1.

3.5.3 Kurva Pertumbuhan

Pengamatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui siklus pertumbuhan *Bacillus mycooides* dalam 1x24 jam sehingga dapat diketahui pada jam ke berapa fase eksponensial dari *Bacillus mycooides*. Pembuatan kurva dalam penelitian ini menggunakan metode *Optical Dencity* dengan metode spektrofotometer. Pembuatan Kurva pertumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Isolat bakteri *Bacillus mycoides* yang telah didapatkan dari media Nutrient Agar, diambil 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media Nutrient Broth sebanyak 10 ml.
2. Isolat tersebut kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C kecepatan 120 rpm.
3. Diambil 2,5 ml kemudian diinokulasikan ke dalam 250 ml media Nutrient Broth steril dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam.
4. Dilakukan pembacaan OD setiap 2 jam pada panjang gelombang 660 nm dan dibuat kurva pertumbuhan.

Diagram alir kurva Pertumbuhan dapat dilihat pada lampiran 2.

3.5.4 Fermentasi Ongkok dengan *Bacillus mycoides*

3.5.4.1 Pembuatan Media Fermentasi

Metode fermentasi onggok mengikuti metode Mursyid *et al.*, (2005) yang dimodifikasi. Pembuatan medium fermentasi dilakukan sebagai berikut:

1. 1 kg Ongkok kering yang telah digiling dicampur secara merata dengan air 1000 ml
2. Dikukus di atas air mendidih selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang
3. Dicampur secara merata dengan 0,1% (v/w) medium (Pepton 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, K_2HPO_4 3 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g) dalam 1000 ml aquades.

3.5.4.2 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan sebagai berikut:

1. Satu ose *Bacillus mycoides* diinokulasikan ke dalam 10 ml media Nutrien Brorth
2. Diinkubasi selama 24 jam dalam shaker inkubator 120 rpm pada suhu 37°C.
3. Diambil 2,5 ml dan dimasukkan ke dalam 250 ml media Nutrien Brorth steril.
4. Diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 10 jam.

3.5.4.3 Inkubasi dan Panen

Inkubasi dan panen dilakukan sebagai berikut:

1. Sebanyak 1%, 3% dan 5% inokulum cair dicampurkan secara merata dengan substrat onggok yang telah dicampur mineral dan dikukus serta didinginkan.
2. Dimasukkan ke dalam toples dan ditutup rapat untuk mendapatkan kondisi anaerob.
3. Diinkubasi dilakukan selama 2 hari, 5 hari dan 8 hari pada suhu 37°C.
4. Dikeringkan menggunakan oven pada suhu 35-45°C selama 1 hari.
5. Diambil sampel dan dimasukkan dalam freezer untuk keperluan analisis laboratorium.

Diagram alir fermentasi onggok dengan *Bacillus mycoides* dapat dilihat pada lampiran 3.

1.6 Analisa Kadar Protein Kasar

Analisa kadar protein kasar dilakukan sebagai berikut:

1. Sampel sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam labu kjeldhal.

2. Katalis ditimbang sebanyak 1 gram yang terdiri dari $\text{CuSO}_4 : \text{Na}_2\text{SO}_4 = 1:1,2$.
Kemudian ditambahkan 2,5 ml H_2SO_4 pekat
3. Didekstruksi sampai cairan berwarna hijau jernih, pendidihan dilanjutkan selama 30 menit.
4. Labu beserta isinya didinginkan sampai suhu kamar, kemudian isinya dipindahkan ke dalam alat distilasi dan ditambahkan 15 ml NaOH 50% (sampai dengan larutan menjadi basa). Untuk mengetahui larutan menjadi basa menggunakan pH meter.
5. Hasil sulingan ditampung ke dalam erlenmeyer 200 ml yang berisi HCl 0,02 N sampai tertampung tidak kurang dari 50 ml destilat, kemudian hasilnya didestilasi dengan NaOH 0,02 N disertai penambahan indikator mensel (campuran metil red dan metil blue) 3-4 tetes.
6. Perlakuan ini juga dilakukan pada blanko.

3.7. Analisa Kadar Serat Kasar

Analisa kadar serat kasar dilakukan sebagai berikut:

1. Sampel sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 300 ml kemudian ditambahkan 100 ml H_2SO_4 0,325 N. Bahan selanjutnya dihidrolisis di dalam autoklaf bersuhu 105°C selama 15 menit.
2. Bahan disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah dikeringkan (diketahui beratnya). Setelah itu kertas dicuci berturut-turut air panas + 25 H_2SO_4 0,325 N dan air panas + 25 aseton atau alkohol.
3. Residu beserta kertas saring dikeringkan dalam oven bersuhu 110°C selama \pm 1-2 jam.

3.8. Analisa statistik

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis menggunakan Analisis of Varian (ANOVA) Two Way. Apabila ada perbedaan antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan's.

