

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

##### 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

##### 2. Waktu Penelitian

April - Juli 1997

#### B. Bahan dan Alat Penelitian

##### 1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah pucuk tebu varietas BZ-48, biakan murni kapang *T. viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Universitas Gajah Mada, urea, aquades, TEA (Taoge Extract Agar), NaOH 0,313 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,255 N, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (w/v), alkohol 95% (v/v), Asam Borat 40% (w/v), HCl 0,15% (v/v), kertas saring, kertas pH

##### 2. Alat Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan berbagai macam peralatan yang meliputi: pisau, timbangan analitis, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, gelas beker, botol timbang, oven, haemositometer, mikroskop, pipet 1 ml, sprayer, autoklaf, inkubator suhu kamar, lampu spiritus, pendingin balik, *heater*, corong

### **C. Cara Kerja**

#### **1. Pembuatan Medium Taoge Extract Agar (TEA)**

Taoge sebanyak 100 gram ditambah 1000 ml aquades, direbus hingga mendidih selama lebih kurang dua jam, kemudian disaring. Selanjutnya ditambah sukrosa 60 gram dan agar 15 gram, dan direbus kembali hingga sukrosa dan agar larut. Kemudian ditambah aquades hingga volume 1000 ml (seperti semula), dan diatur pH-nya 3 - 4, kemudian dimasukkan ke dalam tabung dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf 121°C selama 15 menit.

#### **2. Penyediaan Biakan Murni**

Biakan yang diperoleh diperbanyak dengan menggunakan medium Taoge Extract Agar (TEA) miring di dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 - 8 hari.

#### **3. Persiapan Medium**

Pucuk tebu sebanyak 30 gram (untuk setiap sampel) dipotong-potong sepanjang lebih kurang dua centimeter, kemudian dikering udara selama 1 jam. Sampel sebanyak 2 gram dioven pada suhu 105°C hingga diperoleh berat konstan, untuk mengetahui kadar air akhir. Kemudian dilakukan amoniasi dengan cara menyemprotkan larutan urea dengan konsentrasi 0, 3, 6 dan 9% (w/v) pada pucuk tebu dan diratakan hingga dicapai kadar air pucuk tebu 40%. Kemudian ditempatkan dalam tabung erlenmeyer dan selanjutnya diperam selama tiga minggu. Pucuk tebu tersebut selanjutnya dikeringudarkan dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit.

#### 4. Pembuatan Starter

Pucuk tebu sebanyak 5 gram dengan kadar air 40% dan pH-nya diatur 3 - 4 dengan menggunakan asam asetat 0,1 N diinokulasi dengan suspensi spora kapang *T. viride* sebanyak 1% ( $\%w$ ). Diinkubasi selama lebih kurang tiga hari pada suhu kamar. Selanjutnya starter mikrobial tersebut diencerkan dan dikocok hingga semua spora tersuspensi. Kepadatan spora yang dipergunakan lebih kurang  $10^6 - 10^7$  sel per ml yang dihitung dengan menggunakan haemositometer. Starter ini siap untuk diinokulasikan (Widiyanto dkk, 1995).

#### 5. Perlakuan Fermentasi

Medium sebanyak 20 gram (untuk setiap sampel) yang telah dipersiapkan, diinokulasi dengan 1% suspensi spora *T. viride* ( $\%w$ ). diatur pH-nya 4 - 6 dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 0, 2, 4 dan 6 minggu. Setelah selesai difermentasi, pucuk tebu terlebih dahulu dipasteurisasi pada suhu 70 - 80°C selama menit kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sebelum dianalisa.

#### 6. Cara Analisis Bahan

##### 6.1. Analisis Kandungan Serat Kasar

Bahan dihaluskan dan diambil sebanyak 10 gram dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 600 ml, kemudian ditambahkan 200 ml larutan  $H_2SO_4$  mendidih ( $1,25 \text{ gr}H_2SO_4 \text{ pekat} / 100 \text{ ml} = 0,255 \text{ N } H_2SO_4$ ) dan ditutup dengan pendingin balik, dididihkan selama 30 menit, dengan kadang-kadang digoyangkan. Kemudian suspensi disaring melalui kertas saring dan residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih. Residu

dalam kertas saring dicuci sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (diuji dengan kertas lakmus). Residu dari kertas saring dipindahkan ke dalam erlenmeyer kembali dengan spatula, dan sisanya dicuci dengan larutan NaOH mendidih ( $1,25 \text{ gr NaOH}/100 \text{ ml} = 0,313 \text{ N NaOH}$ ) sebanyak 200 ml sampai semua residu masuk ke dalam erlenmeyer. Dididihkan dengan pendingin balik sambil kadang kala digoyang selama 30 menit. Kemudian disaring dengan kertas saring yang diketahui beratnya sambil dicuci dengan larutan 10% ( $\text{w/v}$ )  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Residu dicuci lagi dengan aquades mendidih dan kemudian dengan lebih kurang 15 ml alkohol 95% ( $\text{v/v}$ ). Kertas saring dikeringkan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  sampai berat konstan (1 - 2 jam), didinginkan dalam desikator dan ditimbang (Sudarmadji dkk, 1984).

## 6.2. Analisis Kandungan Protein

Sampel dibungkus kertas saring dan dimasukkan ke dalam botol Kjedadhl, kemudian ditambah 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 10 gr  $\text{K}_2\text{SO}_4$  dan katalis. Kemudian botol dijepit dan dipanaskan, pemanasan dilanjutkan hingga larutan tidak berwarna atau kuning muda. Kemudian botol didinginkan dan digoyangkan. Residu dilarutkan dengan 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Peralatan distilasi disiapkan, kemudian ditambahkan 50 ml asam borat 40% ( $\text{w/v}$ ) ke dalam botol penampung. Dimulai sirkulasi  $\text{H}_2\text{O}$  melalui kondensor. Kemudian ditambah larutan pendingin yang mengandung 45 gr NaOH dalam 75 ml  $\text{H}_2\text{O}$  untuk sampel. Larutan NaOH dituang dengan hati-hati melalui sisi botol Kjedadhl. Ditambahkan zinc dan sedikit kertas lakmus. Kemudian

botol dihubungkan dengan spray trap secara cepat. Larutan digoyang perlahan dan dipastikan larutan benar-benar basa. Distilasi dimulai hingga volume menjadi kurang dari setengah dari volume asal. Saat distilasi telah lengkap, pemanasan dihentikan dan diputuskan dari peralatan. Kemudian ditambah dua tetes bromocresol hijau dan dititrasi dengan 0,1 N HCl hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi hijau. Prosentase nitrogen diukur (Sudarmadji dkk, 1984).

### **6.3 Penentuan Berat Kering Pucuk Tebu Akhir Fermentasi**

Untuk menentukan berat kering pucuk tebu, maka pada akhir fermentasi, pucuk tebu ditempatkan pada cawan petri. Cawan petri sebelumnya ditimbang dahulu sebagai timbangan pertama. Kemudian pucuk tebu pada cawan petri tersebut dikeringkan di dalam oven pada suhu 70°C hingga diperoleh berat konstan. Kemudian dikeluarkan dan ditimbang sebagai timbangan kedua. Berat kering pucuk tebu merupakan hasil pengurangan timbangan kedua dan timbangan pertama (Sugiarso, 1983).

### **D. Rancangan Percobaan**

Dalam penelitian ini perlakuan yang diberikan meliputi:

#### **1. Lama fermentasi**

0 minggu ( $F_0$ ), 2 minggu ( $F_1$ ), 4 minggu ( $F_2$ ) dan 6 minggu ( $F_3$ )

#### **2. Kadar Amoniasi**

0% ( $A_0$ ), 3% ( $A_1$ ), 6% ( $A_2$ ) dan 9% ( $A_3$ )

#### **3. Ulangan dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing perlakuan.**

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- a. Kandungan serat kasar
- b. Kandungan protein
- c. Berat kering pucuk tebu akhir fermentasi

Adapun rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dalam faktorial. Penelitian ini menggunakan model:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i\beta_j + \Sigma_{ijk}$$

Keterangan :  $Y_{ijk}$  = angka pengamatan pada perlakuan  $\alpha$  ke-i, perlakuan  $\beta$  ke-j, ulangan ke-k

$\mu$  = nilai rata-rata seluruh perlakuan

$\alpha_i$  = pengaruh utama faktor  $\alpha$  taraf ke-i

$\beta_j$  = pengaruh utama faktor  $\beta$  taraf ke-j

$\alpha_i\beta_j$  = interaksi faktor  $\alpha$  taraf ke-i dan faktor  $\beta$  taraf ke-j

$\Sigma_{ijk}$  = galat acak yang ditimbulkan oleh perlakuan

Untuk mengetahui letak perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur pada taraf uji 1% (Srigandono,1987).