

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November sampai Desember 2016 di Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Proses fermentasi dilakukan di Laboratorium Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Kadar serat kasar, protein kasar, lemak kasar dan kalsium sampel limbah tauge fermentasi dianalisis di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

3.2. Bahan Pakan dan Jenis *Starter*

Materi penelitian meliputi limbah tauge kacang hijau kering udara yang diperoleh dari beberapa pasar di Semarang, dan *starter T. harzianum* diperoleh dari Universitas Jendral Soedirman dengan nama produk BIO T10. Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik dengan tingkat akurasi 0,001 gram dan kapasitas 200 gram untuk menimbang limbah tauge kacang hijau, oven dengan suhu 60° C untuk mengeringkan sampel limbah tauge kacang hijau terfermentasi, eksikator untuk mendinginkan sampel dari oven.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian diawali dengan pengumpulan limbah taube kemudian dikering udarakan, selanjutnya menyiapkan *starter T. harzianum* BIO T10 untuk fermentasi. Limbah taube dibagi menjadi tiga bagian (A_1 , A_2 , dan A_3) dengan jumlah yang sama kemudian dimasukkan ke dalam baskom. *Starter T. harzianum* (BIO T10) ditambahkan sebanyak 2, 4, dan 6% dari bahan kering (BK bahan), masing-masing untuk A_1 , A_2 , dan A_3 . Kandungan air untuk fermentasi diatur menjadi sebanyak 60% dengan aquades, molases dan BIO T10 kemudian dicampur sampai homogen.

Campuran yang telah homogen dimasukkan kedalam plastik yang sudah diberi lubang dengan tujuan proses fermentasi berjalan secara anaerob fakultatif, kemudian diperam selama 2 hari (B_1), 4 hari (B_2), dan 6 hari (B_3). Bahan yang sudah difermentasi sesuai dengan waktu yang dikehendaki menurut perlakuan, selanjutnya dioven pada suhu 60°C untuk menghentikan proses fermentasi. Kandungan nutrisi limbah taube kacang hijau hasil fermentasi dianalisis di laboratorium meliputi serat kasar, protein kasar, lemak kasar, dan kalsium.

3.4. Parameter dan Metode Pengukuran

Parameter yang diamati meliputi serat kasar, protein kasar, lemak kasar, dan kalsium dengan prosedur pengukuran seperti diuraikan pada penjelasan berikut. Penentuan kadar serat kasar diawali dengan persiapan *beaker glass* dan *crucible porcelain* dicuci terlebih dahulu, kemudian dimasukkan kedalam oven pada suhu $105-110^\circ\text{C}$ selama 1 jam, didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan

ditimbang. Sampel ditimbang sebanyak ± 1 g (berat A g) dan dimasukkan kedalam *beaker glass*. H_2SO_4 0,3 N sebanyak 50 ml ditambahkan dan dididihkan selama 30 menit, kemudian dimasukkan 25 ml NaOH 1,5 N dan dididihkan selama 30 menit. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 41 yang sebelumnya sudah di oven pada suhu $105-110^\circ\text{C}$ selama 1 jam dan didinginkan dalam eksikator selama 15 menit kemudian ditimbang (berat B g). Larutan sampel disaring menggunakan labu penghisap dan berturut-turut disiram menggunakan 50 ml aquades panas, 50 ml H_2SO_4 0,3 N, 50 ml aquades panas, dan 25 ml aseton. Kertas saring dan isinya dimasukkan ke dalam *crucible porcelain*, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu $105-110^\circ\text{C}$ selama 1 jam, didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang (berat C g). Tahapan selanjutnya dipijarkan dalam tanur listrik suhu $400-600^\circ\text{C}$ selama 4-6 jam, kemudian didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang (berat D g). Kadar serat kasar dihitung dengan rumus menurut Sudarmadji *et al.* (1997) sebagai berikut:

$$\text{Serat kasar} = \frac{\text{C-D-B}}{\text{A}} \times 100\%$$

Keterangan :

A = sampel masuk (g)

B = bobot kertas saring (g)

C = bobot setelah oven (g)

D = bobot setelah tanur (g)

Parameter berikutnya adalah protein kasar diawali dengan menimbang sampel sebanyak ± 1 g (berat A g) dan dimasukkan kedalam labu kjeldahl. Sampel ditambah katalisator campuran (selenium + natrium sulfat + cupri sulfat)

sebanyak ± 1 g dan asam sulfat pekat sebanyak 15 ml. Proses desktruksi dilakukan di dalam almari asam sampai berwarna hijau jernih dan didinginkan. Proses destilasi menggunakan penangkap H_3BO_3 4% sebanyak 20 ml dan diberi 2 tetes indikator *methyl red* dan *methyl blue*. Sampel yang telah didestruksi kemudian dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambah 70 ml aquades serta 60 ml NaOH 45%. Sampel didestilasi sampai larutan berubah warna dari ungu menjadi hijau. Blanko disiapkan tanpa menggunakan sampel dan dititrasi dengan 0,1 N NaOH (sebanyak B ml) sampai warna berubah ungu. Hasil destilasi kemudian dititrasi menggunakan NaOH 0,1 N (sebanyak C ml) sampai menjadi warna ungu. Kadar protein kasar dihitung dengan rumus menurut Sudarmadji *et al* (1997) sebagai berikut:

$$\text{Protein kasar} = \frac{(B - C) \times N \text{ NaOH} \times 0,014 \times 6,25}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

B = volume titran blanko (ml)

C = volume titran sampel (ml)

A = sampel masuk (g)

Parameter selanjutnya adalah lemak kasar diawali dengan menyiapkan kertas saring yang sudah dioven pada suhu 105-110° C selama 1 jam dan ditimbang (berat A g). Sampel ditimbang sebanyak ± 1 g pada kertas saring (berat B g), kemudian dibungkus dan dioven pada suhu 110° C selama 6 jam. Sampel dikeluarkan dari oven dan didinginkan di dalam eksikator selama 15 menit, kemudian ditimbang (berat C g). Sampel dimasukkan ke dalam alat soxhlet yang telah terpasang dalam *water bath* dan lakukan penyaringan dengan N-

Hexan selama 3-4 jam. Selanjutnya, sampel dikeluarkan dari alat soxhlet dan diangin-anginkan sampai tidak berbau N-Hexan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 110° C selama 6 jam, didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang (berat D g). Kadar lemak kasar dihitung berdasarkan rumus Sudarmadji *et al.* (1997) sebagai berikut:

$$\text{Lemak kasar} = \frac{(C-A) - (D-A)}{(B - A)} \times 100\%$$

Keterangan :

A = bobot kertas saring (g)

B = bobot kertas saring berisi sampel sebelum di oven (g)

C = bobot kertas saring berisi sampel setelah di oven 1 (g)

D = bobot kertas saring berisi sampel setelah di oven 2 (g)

Parameter selanjutnya yaitu kandungan kalsium (Ca) dianalisis dengan metode spektrofotometri serapan atom (*Atomic Absorption Spectrophotometer* /AAS) yang diawali dengan sampel ditimbang sebanyak ± 25 g di dalam *crucible porcelain*, diarsangkan di atas *hot plate* pada suhu 200° C, lalu diabukan dengan tanur pada suhu awal 100° C dan dinaikkan perlahan-lahan hingga 500° C. Pengabuan dilakukan selama 24 jam dan dibiarkan hingga dingin di dalam tanur hingga suhu tanur mencapai suhu ruangan $\pm 27^\circ$ C. Abu ditambahkan 5 ml HNO (1:1), kemudian diuapkan pada *hot plate* sampai kering. *Crucible porcelain* dimasukkan kembali ke dalam tanur dengan temperatur awal 100° C dan perlahan-lahan temperatur dinaikkan hingga suhu 500° C. Pengabuan dilakukan selama 1 jam dan dibiarkan hingga dingin pada desikator. Sampel hasil destruksi ditambah 5 ml HNO₃ (1:1), dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml,

crucible porcelain dibilas tiga kali dengan aquabidest kemudian larutan dipenuhi dengan aquabidest hingga garis tanda dan dihomogenkan. Larutan disaring dengan kertas Whatman no. 42 dan 5 ml filtrat pertama dibuang untuk menjenuhkan kertas saring, filtrat selanjutnya ditampung dalam botol kaca. Absorbansi larutan sampel dibaca menggunakan spektrofotometri serapan atom (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) pada panjang gelombang 422 nm. kalsium dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kalsium} = \frac{\text{konsentrasi (mg/l)} \times \text{volume (ml)} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel (g)}}$$

3.5. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik

Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap pola faktorial 3 x 3 dengan 3 aras *starter* dan 3 waktu lama pemeraman. Faktor A yaitu aras *starter* sebanyak 2, 4, dan 6% dari bahan kering, masing-masing dinyatakan sebagai A1, A2, dan A3. Faktor B adalah lama pemeraman selama 2, 4, dan 6 hari, masing-masing diberi kode B1, B2 dan B3. Jadi, total terdapat 9 kombinasi perlakuan dengan 3 kali ulangan.

Adapun jenis perlakuan yang diterapkan sebagai berikut :

A1B1 : aras *starter* 2% dan lama pemeraman 2 hari

A1B2 : aras *starter* 2% dan lama pemeraman 4 hari

A1B3 : aras *starter* 2% dan lama pemeraman 6 hari

A2B1 : aras *starter* 4% dan lama pemeraman 2 hari

A2B2 : aras *starter* 4% dan lama pemeraman 4 hari

A2B3 : aras *starter* 4% dan lama pemeraman 6 hari

A3B1 : aras *starter* 6% dan lama pemeraman 2 hari

A3B2 : aras *starter* 6% dan lama pemeraman 4 hari

A3B3 : aras *starter* 6% dan lama pemeraman 6 hari

Perlakuan yang menunjukkan kombinasi faktor A dan B dapat digambarkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan Kombinasi Faktor A dan B

Aras <i>Starter</i> (%)	Lama Pemeraman (hari)		
	B1 (2)	B2 (4)	B3 (6)
A1 (2)	A1B1	A1B2	A1B3
A2 (4)	A2B1	A2B2	A2B3
A3 (6)	A3B1	A3B2	A3B3

Data dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (uji F) untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Apabila perlakuan menunjukkan pengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji wilayah ganda Duncan. Model linier aditif untuk rancangan acak lengkap pola faktorial adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

μ = Rataan umum kualitas nutrisi limbah kacang hijau terfermentasi

α_i = pengaruh taraf ke-i dari faktor A (aras *starter*)

β_j = pengaruh taraf ke-j dari faktor B (lama pemeraman)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = interaksi pengaruh taraf ke-i dari faktor A (aras *starter*) dan taraf ke-j dari faktor B (lama pemeraman)

ε_{ijk} = galat percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

Hipotesis statistik yang diuji dalam penelitian adalah sebagai berikut:

H0 : $(\alpha\beta)_{ij} = 0$: Tidak terjadi interaksi antara aras *starter* dan lama pemeraman terhadap kualitas nutrisi limbah taube kacang hijau yang difermentasi menggunakan *T. harzianum*

H1 : $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$: Terjadi interaksi antara aras *starter* dan lama pemeraman terhadap kualitas nutrisi limbah taube kacang hijau yang difermentasi dengan *T. harzianum*.

Kriteria pengambilan keputusan dari hasil analisis statistik dengan uji F pada taraf signifikansi 5% sebagai berikut:

F hit \leq F tabel: perlakuan tidak berpengaruh nyata, maka terima H0 yaitu tidak ada pengaruh aras *starter* dan lama pemeraman terhadap kualitas nutrisi limbah taube kacang hijau yang difermentasi dengan *T. harzianum*.

F hit $>$ F tabel: perlakuan berpengaruh nyata, maka terima H1 yaitu minimal ada satu perlakuan aras *starter* dan lama pemeraman yang berpengaruh terhadap kualitas nutrisi limbah taube kacang hijau yang difermentasi dengan *T. harzianum*.