

### III. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Kimia serta Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau, penelitian berlangsung selama 3 bulan, mulai dari bulan September – Desember 2014.

#### 3.2. Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah mesin *Leaf Chopper*, plastik, timbangan analitik, botol selai kapasitas 250 g, erlenmeyer, kapas, *testube*, gelas piala, kompor *hot plate*, *Laminar Air Flow*, aluminium foil, lampu bunsen, spatula, batang pengaduk, *autoclave*, lemari steril, cawan *crucible*, oven, tanur, timbangan analitik, desikator, spatula, nampan besi, tang penjepit, *Digestion Tubes Straight*, *Kjeltec*, *Soxtec*, *Fibbertec*, kompor listrik, teko kaca erlenmeyer, aluminium cup dan timbel.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA), dedak padi, pelepah sawit, aquades, mineral  $\text{CaCl}_2$ , mineral  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$ , aquades, petroleum benzene dan octanol.

#### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Fermentasi dilakukan selama 10 hari (Rahayu 2014 dan Mariani 2014). Perlakuan adalah :

Perlakuan O : Pelepah sawit + kapang *P. chrysosporium* (tanpa penambahan mineral)

Perlakuan A : Pelepah sawit + kapang *P. chrysosporium* + Ca 2000 ppm (Rahayu,2014)

Perlakuan B : Pelepah sawit + kapang *P. chrysosporium* + Mn 100 ppm (Mariani,2014)

Perlakuan C : Pelepah sawit + kapang *P. chrysosporium* + Ca 2000 ppm + Mn 100ppm

### **3.4. Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1. Tahapan persiapan pelepah sawit**

Pelepah sawit diperoleh dari Kabupaten Kampar, kemudian pelepah sawit dicacah untuk memperkecil ukuran partikel hingga 2-3 cm menggunakan mesin *Leaf Chopper*, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. Selanjutnya digiling menjadi serbuk halus menggunakan mesin penggiling.

#### **3.4.2. Tahapan pembiakan kapang**

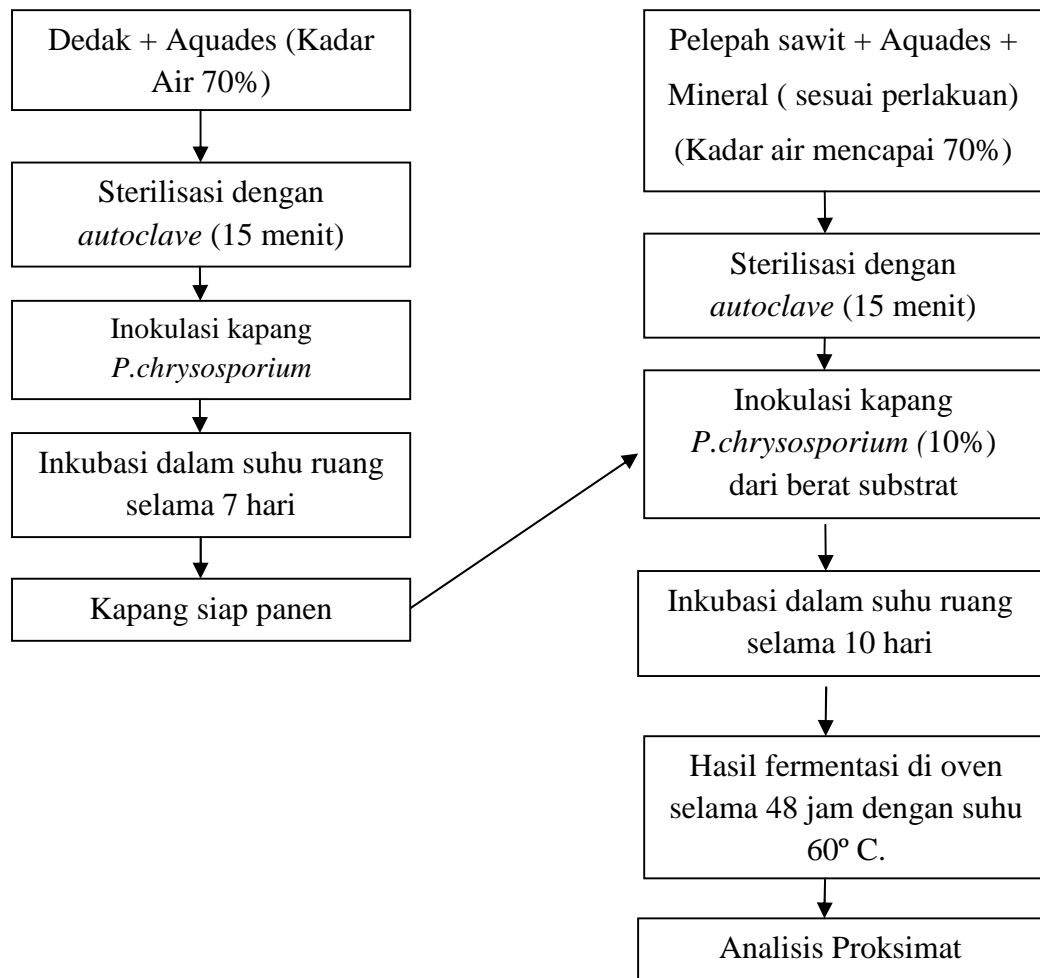
Tahapan pembiakan kapang menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada suhu 30° C selama 7 hari. Media PDA ditambahkan aquades kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer dan dimasak hingga warnanya bening menggunakan kompor *Hot plate*. Media yang telah dimasak hingga bening dimasukkan dalam *testube* dan ditutup dengan kapas yang sudah disterilkan dengan alkohol dan ditutup lagi dengan aluminium foil untuk meyakinkan tidak ada udara yang masuk. Media PDA disterilkan dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Proses sterilisasi bertujuan agar tidak tumbuh mikroorganisme lain yang tidak diinginkan dalam media. Setelah disterilkan media diangkat dari *autoclave* dan dimiringkan dengan kemiringan 20°. Setelah suhu media dingin lakukan tahap inokulasi kapang *Phanerochaete*

*chryso sporium* didalam lemari steril dan dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

### **3.4.3. Tahapan Inokulasi**

Tahapan pertama kapang yang sudah dibiakkan dalam media PDA dibiakkan pada dedak padi yang telah ditambah aquades (kadar air 70%) dimasukkan dalam botol media (diketahui kadar air dedak padi adalah 20% sehingga perlu ditambahkan 50% air untuk mencukupi kebutuhan air selama proses fermentasi). Botol ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil. Media dedak disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Substrat yang telah steril diinokulasikan kapang *Phanerochaete chryso sporium* dan diinkubasi selama 7 hari.

Tahapan kedua ditimbang pelepah sawit menggunakan timbangan analitik, ditambahkan mineral Ca dan Mn sesuai dengan perlakuan kemudian ditambahkan aquades (kadar air mencapai 70%) kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil. Sterilisasi sampel dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan dalam suhu kamar. Dilakukan inokulasi pada sampel dalam lemari steril kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 10 hari. Hasil fermentasi ditimbang kemudian dimasukkan dalam aluminium foil dan dimasukkan kedalam inkubator selama 48 jam dengan suhu 60° C. Prosedur kerja pelepah sawit dengan kapang *Phanerochaete chryso sporium* pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Prosedur Kerja Fermentasi Pelepah Sawit oleh kapang *Phanerochaete chrysosporium* dengan Penambahan Mineral

### 3.5. Peubah yang diukur

Peubah yang diukur meliputi kandungan:

1. Bahan kering
2. Bahan organik
3. Bahan anorganik / kadar abu
4. Protein kasar
5. Serat kasar dan
6. Lemak kasar

### 3.5.1. Penetapan Kadar Air (AOAC, 1993)

Prinsip : sampel dikeringkan dalam oven 105° C - 110° C sampai diperoleh berat yang tetap.

1. Cawan *crusible* dan tutupnya dikeringkan dalam oven selama 10 menit dan dinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang.
2. Ditimbang 5 gram sampel dalam cawan porselen, sampel disebar.
3. Cawan ditutup kemudian dimasukkan dalam oven pada suhu 105° C selama 8 jam. Produk yang tidak mengalami dekomposisi dengan pengeringan yang lama, dapat dikeringkan selama 1 malam (16 jam).
4. Cawan dan isinya dipindahkan kedalam desikator, lalu didinginkan selama 30 menit, setelah dingin ditimbang kembali.
5. Cawan dimasukkan lagi ke dalam oven pada suhu 105° C selama 8 jam didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Dilakukan sebanyak 3 kali atau sampai berat konstan.

Perhitungan :

$$\% \text{ Kadar Air} \quad : \quad \frac{X + Y - Z}{Z} \times 100\%$$

$$\% \text{ BK} \quad : \quad 100\% - \% \text{ Kadar Air}$$

Keterangan :

X : Berat Crusibel (gram)

Y : Berat Sampel (gram)

Z : Berat Cawan dan Sampel yang dikeringkan (gram)

BK : Bahan Kering

### 3.5.2. Penetapan Total Abu (AOAC, 1993)

Prinsip : Sampel dibakar dalam tanur dengan suhu 525-600°C

1. Cawan *crusible* dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam, didinginkan dalam desikator lalu timbang (a)
2. Ditimbang sebanyak 3-5 gram sampel kemudian dimasukkan ke dalam cawan *crusible* tersebut
3. Cawan *crusible* diletakkan dalam tanur pengabuan, dibakar pada suhu 525°C selama 3 jam
4. Dinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang (b)

Perhitungan :

$$\text{Kadar Abu} \quad : \frac{\text{Berat tanur (gram)} - \text{berat oven (gram)}}{\text{berat sampel (gram)}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Bahan Organik} \quad : \% \text{ Bahan Kering} - \% \text{ Kadar Abu}$$

### 3.5.3. Penetapan Kadar Protein Kasar (Foss Analytical, 2003a)

Prinsip: Sampel dipanaskan menggunakan destruksi dengan suhu 415°C

1. Ditimbang sejumlah kecil sampel  $\pm 1$  gram masukkan ke dalam *Digestion Tubes Straight*.
2. Ditambahkan katalis (1,5 gram  $K_2SO_4$  dan 7,5 mg  $MgSO_4$ ) sebanyak 2 buah.
3. Ditambahkan  $H_2SO_4$  sebanyak 6 ml.
4. Sampel didestruksi pada suhu 425°C selama 1 jam sampai cairan menjadi jernih (kehijauan).
5. Sampel didinginkan, ditambahkan aquadest 30 ml secara perlahan-lahan.
6. Sampel dipindahkan ke dalam alat destilasi, *Digestion Tubes Straight* dicuci dan dibilas 5-6 kali dengan 1-2 ml air, air cucian ini dimasukkan ke dalam alat destilasi.

7. Disiapkan erlenmeyer 125 ml yang berisi 25 ml larutan  $H_3BO_3$  7 ml metilen red dan 10 ml brom kresol green. Ujung tabung kondensor harus terendam di bawah larutan  $H_3BO_3$ .
8. Ditambahkan larutan NaOH 30 ml ke dalam erlenmeyer, kemudian dilakukan destilasi ( $\pm$  3-5 menit).
9. Tabung kondensor dibilas dengan air dan bilasannya ditampung dalam erlenmeyer yang sama.
10. Dilakukan titrasi dengan HCl 0,1 sampai terjadi perubahan warna menjadi ungu.
11. Dilakukan juga penetapan blanko.

Perhitungan :

$$\% N = \frac{(\text{ml titran} - \text{ml blanko}) \times \text{Normalitas } H_2SO_4 \times 14,007}{\text{berat sampel (gram)}} \times 100$$

$$\% \text{ Protein} : \quad \% N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan : Faktor Konversi untuk Makanan Ternak adalah 6,25

#### **3.5.4. Penetapan Lemak Kasar (Foss Analytical, 2003b)**

Prinsip: Sampel dipanaskan dengan suhu 135°C dan dioven dengan suhu 105°C.

1. Aluminium cup dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam, didinginkan dalam desikator lalu timbang (a).
2. Ditimbang sampel sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam timbel kemudian ditutup dengan kapas.
3. Timbel yang berisi sampel dimasukkan/diletakkan pada *Soxtec*, alat dihidupkan dan dipanaskan sampai suhu 135°C dan air dialirkan, timbel diletakkan pada *Soxtec* pada posisi *rinsing*.

4. Setelah suhu sampai 135°C/normal, dimasukkan aluminium cup yang berisi petroleum benzene 70 ml ke dalam Soxtec, lalu ditekan *start* dan jam dengan posisi *boiling* dilakukan selama 20 menit.
5. Kemudian pada posisi rinsing 40 menit, lalu *recovery* 10 menit dengan posisi kran Soxtec di melintang/dibuka.
6. Aluminium cup kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 135°C selama 2 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (b).

Perhitungan :

$$\% \text{ Lemak} = \frac{c - a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a : Berat Aluminium Cup (gram)

b : Berat Sampel (gram)

c : Berat Akhir setelah dioven (gram)

### 3.5.5. Penetapan Kadar Serat Kasar (Foss Analytical, 2006)

Prinsip : Sampel diekstraksi dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan NaOH

1. Larutan NaOH + Aquadest menjadi 1000 ml, NaOH 1,25 % = 12,5 gram H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$1000 . 96 = X . 1,25\%$$

$$1000 . 1,25\% = X . 96$$

$$1250 = 96X$$

$$X = 1250/96$$

$$X = 13,02 \text{ ml}$$



Larutan 13,02 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dengan aquades sampai menjadi 1000 ml

2. Ditimbang bahan yang telah dikeringkan, dimasukkan bahan ke dalam *crucible* (yang telah ditimbang beratnya).

Catatan: Untuk hijauan digunakan *crucible por 3* karena berserat kasar tinggi. Ditambahkan *celite* ke dalam rumput yang paling kasar untuk memudahkan penyaringan.

3. *Crucible* diletakkan di “*cold extraction*” lalu dimasukkan acetone ke dalam masing-masing *crucible* sebanyak 25 ml atau sampai sampel tenggelam, didiamkan selama 10 menit untuk menghilangkan lemak. Posisi “*cold extraction*” adalah *closed*.
4. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dipanaskan sampai mendidih.
5. Setelah selesai diekstraksi, dikeluarkan air/lemak dari *crucible*, “*cold extraction*” dalam posisi *vacum* dan kran air dibuka, Setelah airnya habis, ditutup kembali “*cold extraction*” (dilakukan ekstraksi sebanyak 3 kali berturut-turut).
6. Dilakukan pembilasan dengan aquadest sebanyak dua kali.
7. *Crucible* dipindahkan ke *Fibertec*.
8. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dimasukkan ke dalam masing-masing *crucible* pada garis ke 2, kemudian kran dihidupkan dan *crucible* ditutup dengan *reflector*.
9. *Fibertec* dipanaskan sampai mendidih (posisi *Fibertec* dalam keadaan *closed* dan kran dalam posisi terbuka/air mengalir). Aquades dipanaskan dalam wadah lain.
10. Setelah mendidih diteteskan octanol (untuk menghilangkan buih) 2 tetes lalu panasnya dioptimumkan, dibiarkan selama 30 menit, Apabila

masih terdapat buih ditetaskan octanol kembali. Setelah 30 menit *Fibertec* dimatikan.

11. Kemudian larutan tersebut disedot, posisi *Fibertec* vacum dan keran dibuka.
12. Dimasukkan aquades yang telah dipanaskan tadi ke dalam semprotan, lalu disemprotkan ke *crusibel*. Posisi *Fibertec* tetap vacum dan kran terbuka. Dilakukan pembilasan tersebut sebanyak 3 kali, NaOH dipanaskan dalam wadah lain (NB: Aquades harus dipanaskan terlebih dahulu, jangan dicampur air dingin karena bisa meledak).
13. Setelah dilakukan pembilasan, *Fibertec* ditutup lalu masukkan NaOH yang telah dipanaskan tadi ke dalam *crucible* pada garis ke 2, kran terbuka *Fibertec* dihidupkan dengan suhu optimum. Setelah mendidih ditetaskan octanol sebanyak 2 tetes ke dalam tabung yang berbuih. Dipanaskan selama 30 menit.
14. Setelah 30 menit matikan *Fibertec* dimatikan dan kran ditutup, suhu dioptimumkan. Dilakukan pembilasan dengan aquadest panas sebanyak 3 kali, *Fibertec* pada posisi vacuum. Setelah selesai membilas *Fibertec* pada posisi *closed*.
15. *Crusibel* dipindahkan ke dalam “*cold extraction*” lalu dibilas dengan aseton, “*cold extraction*” pada posisi vacum kran dibuka (lakukan sebanyak 3 kali), dengan tujuan untuk pembilasan.
16. Setelah itu dimasukan *crusibel* ke dalam oven selama 2 jam dengan suhu 130° C.

17. *Crusibel* didinginkan dalam desikator selama 1 jam selanjutnya ditimbang (W2).

18. Ditanur selama 3 jam pada suhu 525° C.

19. Didinginkan dalam desikator dan ditimbang (W3).

$$\% \text{ Serat kasar} \quad : \quad \frac{a - c}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a: Berat Cawan setelah dioven (gram)

b: Berat Sampel (gram)

c: Berat Abu setelah ditanur (gram)

### 3.6. Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan analisis ragam menurut Rancangan Acak Lengkap (Steel dan Torrie, 1992). Perbedaan pengaruh perlakuan diuji menurut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Model Linear Rancangan Acak Lengkap (Steel dan Torrie, 1991):

$$Y_{ij} : \mu + \tau_i + v_{ij}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Hasil pengamatan satuan percobaan yang memperoleh penambahan mineral pada level ke-i pada pengamatan ke-j

$\mu$  : Nilai tengah

$\tau_i$  : Pengaruh penambahan mineral pada level ke-i

$v_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan dari penambahan mineral ke-i pada pengamatan ke-j

Tabel 3.1. Analisis Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	-	-
Galat	t(r-1)	JKG	KTG	-	-	-
Total	tr-1	JKT	-	-	-	-

Keterangan :

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{Y^2 \dots}{r.t}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = Y^2_{ij} - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum Y^2_j - \text{FK}}{r}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

$$\text{Kuadrat Total Perlakuan (KTP)} = \frac{\text{JKP}}{t-1}$$

$$\text{Kuadrat Total Galat (KTG)} = \frac{\text{JKG}}{n-t}$$

$$\text{F.hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}}$$