# BAB III METODE PENELITIAN

* 1. **Rancangan Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat. Dimana variabel bebas yaitu perlakuan penambahan nutrisi dan lama fermentasi untuk melihat variabel terikat yaitu analisis kadar protein, analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa, analisis pH dan suhu.

# Variabel Penelitian

Penelitian ini, menggunakan tiga yang diuraikan sebagai variabel:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah media fermentasi kulit nanas dengan penambahan nutrisi KH2PO4 dan gula, media fermentasi kulit nanas dengan penambahan nutrisi KH2PO4, (NH4)2SO4 dan gula, dan lama waktu fermentasi yang digunakan, yaitu hari ke-0, 2, 4, dan 6.

1. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah analisis kadar protein, analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa, analisis pH dan suhu.

# Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini terdiri dari analisis kadar protein untuk mengukur kadar protein dengan metode Kjeldahl, analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa dengan menggunakan refraktometer, dan analisis pH dan suhu dengan menggunakan pH meter.

# Jadwal dan Lokasi Penelitian

32

# Jadwal Penelitian

Penelitian di lakukan pada bulan Januari hingga bulan April 2022.

# Lokasi Penelitian

Pengolahan sampel, pembuatan media fermentasi dan pembuatan starter dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan. Pengukuran kadar protein dilakukan di laboratorium Biokimia Universitas Sumatera Utara. Analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa dan pengukuran pH dan suhu dilakukan di laboratorium Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

# Bahan dan Alat

* + 1. **Bahan**

Aquadest, gula pasir, biakan murni jamur *Aspergillus niger*, 0,1 % KH2PO4, 0,1% (NH4)2SO4, selenium, asam sulfat pekat, NaOH 5%, indikator metil merah, asam klorida 0,1001 N, media Potato Dextrose Agar (PDA).

# Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator*,* autoklaf, erlenmeyer, kawat ose, *cling wrap*, pisau cutter, kertas saring, timbangan, pH meter, cawan petri, corong, *laminar air flow*, panci *stainless steel*, *refractometer*, cawan porselein, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, gelas ukur dan blender.

# Pembuatan Reagen

1. **Asam Klorida (HCl) 0,1 N**

Pembuatan larutan HCl 0,1 N sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Encerkan 8,3 ml HCl(p) dengan air suling hingga 1000 ml.

# Asam Borat (H3BO3) 3%

Pembuatan larutan Asam Borat (H3BO3) 3% sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Dilarutkan 3 g H3BO3 dengan air suling hingga 100 ml.

# Natrium Hidroksida (NaOH) 30%

Pembuatan larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 30% sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Dilarutkan 30 g NaOH dengan air suling hingga 100 ml.

# Indikaor Metil Merah 0,2%

Ditimbang 0,2 g indikator metil merah dilarutkan dengan etanol 96% sampai 100 ml.

# Indikator Metil Biru 0,2%

Ditimbang 0,2 g indikator metil biru dilarutkan dengan etanol 96% sampai 100 ml.

# Indikator Tashiro

Dicampurkan 2 bagian indikator metil biru 0,2% dan 1 bagian indikator metil merah 0,2% dalam etanol 96%.

# Prosedur Penelitian

* + 1. **Pengambilan Sampel**

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah *purposive sampling* (penunjukan langsung). Sampel limbah nanas diambil dari pasar Simpang Limun, Medan.

# Identifikasi Sampel

Tanaman nanas (*Ananas comosus* L. Merr.) diidentifikasi di *Herbarium Medanese* (MEDA) Universitas Sumatera Utara.

# Pengolahan Sampel

Kulit nanas dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir kemudian dihancurkan dengan cara diblender sampai halus. Kulit nanas yang sudah dihaluskan kemudian disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat kulit nanas yang sudah disaring disterilkan dengan cara dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit pada suhu 100oC. Filtrat kulit nanas yang sudah disterilkan didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang (Pawignya, 2011).

# Penyiapan Formulasi Media Fermentasi

Fomulasi pembuatan media fermentasi dapat dilhat pada tabel 3.1 berikut ini :

**Tabel 3.1** Fomulasi pembuatan media fermentasi

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Komposisi** | **Media Fermentasi** | |
| **MFKN1** | **MFKN2** |
| KH2PO4 | 0,1% (0,2 g) | 0,1% (0,2 g) |
| (NH4)2SO4 | -- | 0,1 % (0,2 g) |
| Gula | 2% (4 g) | 2% (4 g) |
| Filtrat limbah kulit nanas | ad 200 ml | ad 200 ml |

Pembuatan medium fermentasi dilakukan dengan cara erlenmeyer dikalibrasi terlebih dahulu kemudian disterilkan. Erlenmeyer pertama yang sudah steril dimasuk kan nutrisi KH2PO4 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram, ditambahkan gula pasir 2% dari 200 mL yaitu sebanyak 4 gram, ditambahkan

filtrat limbah kulit nanas yang sudah steril dan dingin sampai tanda batas kalibrasi (MFKN1), ditambahkan NaOH sampai pH dari medium fermentasinya 5, kemudian disterilkan dengan cara dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit pada suhu 100 ⁰C, kemudian didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang.

Erlenmeyer kedua yang sudah steril dimasuk kan nutrisi KH2PO4 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram, (NH4)2SO4 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram ditambahkan gula pasir 2% dari 200 mL yaitu sebanyak 4 gram, ditambahkan filtrat limbah kulit nanas yang sudah steril dan dingin sampai tanda batas kalibrasi (MFKN2), ditambahkan NaOH sampai pH dari medium fermentasinya 5, kemudian disterilkan dengan cara dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit pada suhu 100 ⁰C, kemudian didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang (Somaye dkk, 2008).

# Sumber Isolat

Isolat jamur *Aspergillus niger* diperoleh dari Laboratorium Biokimia Universitas Sumatera Utara.

* + 1. **Identifikasi jamur *Aspergillus niger***

Untuk mengidentifikasi jamur *Aspergillus niger* berdasarkan Cappucino (2002) dengn sedikit modifikasi dimana objek glass dibersihkan dengan alkohol hingga bebas lemak, kemudian dipanaskan pada nyala api bunsen atau api spiritus. *A.niger* diambil secara aseptis menggunakan jarum ose, kemudian ditaruh keatas objek glass yang ditetesi sedikit air kemudian ditutup deck glass. Diamati struktur kapang dengan menggunakan mikroskop, dimulai dari perbesaran rendah kemudian ke perbesaran tinggi (Cappucino, 2002).

# Regenerasi Jamur

Diambil satu koloni khamir *Aspergillus niger* dengan menggunakan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media Potato Dextrose Agar dengan menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36oC selama 18-24 jam (Silaban, 2009).

# Penyiapan Larutan NaCl 0.9%

Komposisi : Natrium klorida 0.9 g

Air suling steril ad 100 ml

Ditimbang sebanyak 0,9 gram Natrium klorida lalu dilarutkan dalam air suling steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril sampai garis tanda, dimasukkan dalam Erlenmeyer steril yang bertutup lalu disterilkan pada autoklaf suhu 121˚C tekanan 1 atm selama 15 menit.

# Penyiapan Standar McFarland 0,5

Suspensi standar yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi jamur sama dengan 1,5 x 108 CFU/ml.

Komposisi : Larutan asam sulfat 1 % 9,95 ml Larutan barium klorida 0,05 ml

Cara pembuatan :

Larutan asam sulfat 1% dan larutan barium klorida dicampurkan kedalam labu takar 100 ml steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi jamur sama dengan suspensi standar. Standar McFarland 0,5 setara dengan 1,5 x 108 CFU/ml (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penyiapan suspensi *Aspergillus niger***

Pembuatan suspensi khamir dilakukan dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9%. Suspensi dibuat dengan cara beberapa ose kultur khamir uji dimasukkan kedalam NaCl fisiologis 0.9% lalu divortex hingga homogen. Hasilnya dibandingkan dengan standar Mc.Farland. (Lay, 1994)

# Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan cara diambil 10% dari 200 mL media fermentasi yang steril yaitu sebanyak 20 mL, dimasukkan kedalam 2 erlenmeyer yang berbeda. Erlenmeyer ke-1 dimasukkan MFKN1 (Media Fermentasi Kulit Nanas + KH2PO4 + Gula) dan 1 ose isolat mikroba *Aspergillus niger.* Erlenmeyer ke-2 dimasukkan MFKN2 (Media Fermentasi Kulit Nanas + KH2PO4 + (NH4)2SO4) +Gula) lalu ditambahkan 1 ose isolat mikroba *Aspergillus niger,* kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30⁰C (Pawignya, 2011).

# Proses Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan dengan cara media fermentasi yang terdapat dalam erlemeyer pertama dan sudah diberi perlakuan, ditambahkan starter media MFKN1 yang sudah diinkubasi selama 2 hari, ditutup rapat, kemudian diinkubasi selama 6 hari dan dianalisis kadar proteinnya pada hari ke-0, 2, 4, dan 6 (Pawignya, 2011) selama proses fermentasi berjalan dilakukan analisis terhadap suhu dan pH pada hari ke-0, 2, 4, dan 6.

Proses fermentasi dilakukan dengan cara media fermentasi yang terdapat dalam erlemeyer kedua dan sudah diberi perlakuan, ditambahkan starter media MFKN2 yang sudah diinkubasi selama 2 hari, ditutup rapat, diinkubasi selama 6 hari dan dianalisis kadar proteinnya pada hari ke-0, 2, 4, dan 6 (Pawignya, 2011)

selama proses fermentasi berjalan dilakukan analisis terhadap suhu dan pH dihari ke-0, 2, 4, dan 6.

# Analisis Kadar Protein

Media fermentasi ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan kedalam beaker labu kjeldahl lalu ditambahkan selenium sebanyak 0,2 g dan H2SO4(P) 98% sebanyak 15 ml. setelah itu dipanaskan diatas kjeldahl apparatus sehingga diperoleh larutan berwarna bening kehijauan. Larutan tersebut kemudian didinginkan dan dimasukkan kedalam labu alas. Lalu ditambahkan aquadest sebanyak 100 ml dan NaOH(aq) 30% sampai pH menjadi basa. Kemudian didestilasi selama beberapa menit dan destilat yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer yang telah berisi H3BO3 3% dan indicator tashiro sehingga diperoleh larutan berwarna hijau. Larutan hijau yang diperoleh kemudian dititrasi dengan larutan standar HCl(aq) 0,1 N hingga berubah warna menjadi larutan ungu. Kemudian dihitung kadar proteinnya (SNI, 1992).

Kadar protein akan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

%P = (Vs−VB) x NHCl x BM Nitrogen x fk x 100% (Pawignya, 2011).

m x 1000

# Analisis Berat Kering Sel

Cawan porselein dibersihkan kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105oC selama 1 jam. Cawan porselein didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang untuk mengetahui beratnya.Pengukuran biomassa. Perhitungan biomassa jamur dilakukan dengan menentukan berat kering sel jamur. Dimasukkan 1 ml jamur yang diambil dari media fermentasi ke dalam mikrotube kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Isolat yang disentrifugasi akan menghasilkan supernatan dan endapan sel jamur.

Kemudian endapan sel jamur tersebut di masukkan kedalam cawan porselein kemudian di oven dengan suhu 100oC selama 30 menit kemudian didinginkan disuhu ruang dan ditimbang berat keringnya. Berat kering yang didapatkan dikurang dengan berat kosong cawan porselein maka didapat biomassa jamur tersebut (Nasution et al, 2021).

# Analisis Kadar Glukosa

Kadar glukosa filtrate limbah kulit nanas yang terdapat pada medium fermentasi diukur dengan alat refraktometer. Dipipet medium fermentasi dan diteteskan pada permukaan prisma sampai menutupi permukaan prisma. Kemudian dicatat kadar glukosanya (Jasman *et al,* 2021).

# Analisis pH dan Suhu

Analisis pH dan Suhu dilakukan menggunakan alat pH meter dengan cara dimasukkan pH meter kedalam media MFKN1 dan media MFKN2 lalu dicatat hasilnya. Analisis pH dan suhu dilakukan bersamaan pada saat hendak melakukan analisis kadar protein dan berat kering sel.

# Analisa Data

Data yang diamati meliputi kadar protein produk khamir *Aspergillus niger* dan berat kering sel pada media kultur dan media pemeliharaan lingkungan dilakukan dengan analisis sidik ragam (ANAVA), setelah itu dilakukan uji normalitas sebaran dan homogenitas ragam error. Jika diperoleh perbedaan signifikan diantara setiap perlakuan maka dilanjutkan dengan uji wilayah ganda dari Duncan/DMRT (Duncan`s new Multiple Range Test) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dan perlakuan mana yang memberikan pengaruh terbaik (Gomez, 1995).