

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini sudah dilaksanakan di laboratorium IPA terpadu Universitas Nahdlatul Ulama, Kecamatan. Karangklesem, Kabupaten Banyumas pada bulan November 2023. Analisis kualitas nutrisi dilakukan di laboratorium Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Jendral Soedirman.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah kulit kacang hijau, tomat busuk, gula merah, air mineral, air cucian beras, air kelapa, EM-4, dan molasses. Alat-alat yang digunakan alat pencacah/penggiling, baskom, timbangan digital, blender, gelas beker, gelas ukur, toples, spatula, selang, torong, plastik, cutter, lakban, nampan plastik, ember, terpal, lakban, Lebel, dan pulpen.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), 4 perlakuan dan 5 kali ulangan. Perlakuan penelitian sebagai berikut :

P0 = Fermentasi kulit kacang hijau tanpa *starter* (kontrol).

P1 = Fermentasi kulit kacang hijau menggunakan MOL limbah tomat dengan sumber glukosa gula merah 4%.

P2 = Fermentasi kulit kacang hijau menggunakan MOL limbah tomat dengan sumber glukosa molases 4%.

P3 = Fermentasi kulit kacang hijau menggunakan EM4 4%.

3.4 Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah kandungan protein kasar dan serat kasar fermentasi kulit kacang hijau menggunakan *starter* MOL berbasis limbah tomat dengan sumber glukosa yang berbeda dan EM-4. Metode yang digunakan untuk mengukur kadar protein kasar adalah metode *Kjeldahl* sesuai dengan

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2012). Kandungan serat kasar diukur melalui pendekatan Gravimetri (Aulia *et al.*, (2014).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan rancangan acak lengkap dengan model matematika sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke i , ulangan ke j

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke i

ξ_{ij} = pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

Data yang diperoleh kemudian diuji menggunakan uji analisis Variansi (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel maka langkah selanjutnya adalah melakukan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) (Maria, 2018).

3.6 Garis Besar Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Tahapan pembuatan *starter* MOL menggunakan limbah tomat.
 - a. Proses persiapan dimulai dengan mengumpulkan limbah tomat dari pasar, air cucian beras, air mineral, gula merah, dedak padi, air kelapa, dan molases.
 - b. Membuat campuran air yang terdiri dari air cucian beras, air kelapa dan air mineral dengan perbandingan (1 : 1 : 1).
 - c. Langkah-langkah pembuatan larutan mol dari limbah tomat yang ditambah dengan gula merah adalah sebagai berikut: persiapan wadah, masukkan 100 gram limbah tomat yang dihaluskan 40 gram dedak dan campur larutan 355mL, serta 140 gram gula merah. Aduk hingga merata sampai homogen, kemudian tuangkan campuran ke dalam wadah kedap udara. Selanjutnya, campuran tersebut difermentasi selama 14 hari.
 - d. Langkah-langkah dalam pembuatan larutan mol dari limbah tomat dengan penambahan molases adalah sebagai berikut: persiapan wadah, masukkan

100 gram jus limbah tomat, tambahkan larutan 355mL, tambahkan 40 gram dedak, serta 140 gram molases. Aduk campuran tersebut sampai merata, kemudian tuangkan ke dalam wadah yang kedap udara. Selanjutnya campuran tersebut difermentasi selama 14 hari.

2. Tahap pembuatan fermentasi kulit kacang hijau sesuai dengan perlakuan yang diberikan yaitu :

a. Kulit kacang hijau setelah dipanen kemudian dicacah dengan ukuran 3-5 cm, lalu dikeringkan melalui proses penjemuran.

b. Kulit kacang hijau selanjutnya selanjutnya dicampur dengan molases sesuai dengan perbandingan sebagai berikut:

R0 = Kulit kacang hijau 1 kg + 10% molasses (tanpa *starter*).

R1 = Kulit kacang hijau 1 kg + 10% molases + 40 gram MOL limbah tomat dengan sumber glukosa gula merah.

R2 = Kulit kacang hijau + 10% molases + 40 gram MOL limbah tomat dengan sumber glukosa molasses.

R3 = Kulit kacang hijau + 10% molases + 40 gram EM4.

c. Bahan tersebut dicampur sampai merata kemudian dimasukkan kedalam wadah yang kedap udara dan difermentasi selama 14 hari.

3. Tahap preparasi sampel

Kulit kacang hijau yang telah difermentasi selanjutnya dikeluarkan kemudian dikeringkan atau dijemur dibawah sinar matahari. Sampel yang sudah kering kemudian digiling halus untuk dianalisis kandungan protein kasar dan serat kasarnya.

4. Tahap Analisis Laboratorium

Menurut Udding dan Muning (2014) tahapan analisis laboratorium dilakukan untuk mengetahui kandungan sebagai berikut:

a. Kadar Protein Kasar

1. Timbah kurang lebih 0,5 gram sampel.

2. Masukkan kedalam labu Kjeldahl 100 ml.

3. Tambahkan kurang lebih 1 gram campuran selenium dan 10 ml H₂SO₄ pekat (teknis).

4. Labu Kjeldahl bersama isinya digoyangkan sampai semua sampel terbasahi dengan H₂SO₄.
5. Destruksi dengan lemari asam sampai jernih.
6. Setelah dingin dituang kedalam labu ukur 100 ml dan dibilas dengan air suling, kemudian tambahkan dengan aquades hingga mendekati skala kemudian dihomogenkan.
7. Pipet sampai 10 ml sampel dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan 5 ml larutan NaOH 30% dan 100 ml air suling.
8. Siapkan labu penampang yang terdiri dari 10 ml H₃BO₃ 2% ditambah dengan 4 tetes larutan indikator campuran (Bromo Cresol Green 0,1% dan metil merah 0,2% dalam alkohol) dalam Erlenmeyer 100 ml.
9. Suling hingga volume penampung menjadi lebih kurang 50 ml.
10. Bilas ujung penyuling dengan air suling kemudian penampung bersama isinya dititrasikan dengan larutan HCl atau H₂SO₄ 0,0222 N.

Rumus yang digunakan adalah :

$$\% \text{ Kadar Protein} = \frac{V \times N \times 0,014 \times 6,25 \times P}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

V : Volume titrasi

N : Normaliter larutan H₂SO₄

P : Faktor pengencer

b. Kadar Serat Kasar

Analisis kadar serat kasar berdasarkan SNI 01-2891-1992 sebagai berikut

1. Timbang sampel 2-4 gram lalu masukkan ke dalam neraca analitik digital.
2. Pindahkan sampel kedalam gelas piala 250 ml untuk pembebasan lemak, tambahkan etanol 96% sebanyak 15 ml, lalu aduk dan diamkan beberapa menit. Tuangkan larutan tersebut dengan kertas saring dalam Erlenmeyer 250 ml. Ulangi proses penyaringan dua kali dengan menggunakan etanol 96%, dan pada penyaringan ketiga, simpan endapan yang terbentuk. Angkat kertas saring yang mengandung padatan, dan keringkan.
3. Tambahkan kurang lebih 50 ml larutan H₂SO₄ 1,25 % kedalam Erlenmeyer dan diaduk.

4. Pasang pendingin tegak pada mulut Enlenmeyer. Panaskan larutan refluk selama 30 menit dengan pemanas air. Setelah selesai langsung tambahkan kurang lebih 50 ml larutan NaOH 3,25 % lakukan pemanasan larutan refluk Kembali selama 30 menit.
5. Saring larutan dalam keadaan panas dengan kertas saring yang telah di timbang konstan sebelumnya dengan menggunakan corong.
6. Lakukan pencucian dengan H₂SO₄ 1,25%, ari panas dan terhir dengan etanol 96% (25 ml).
7. Angkat endapan dan kertas saring kemudian pindahkan kecawan penguap yang telah dikonstankan beratnya terlebih dahulu dan keringkan pada suhu 105°C didalam oven kemudian dinginkan dan menimbang sampai bobot tetap.

Menurut Udding *at al.*, (2014), perhitungan persen kadar serat kasar pada bahan pakan dapat dihitung dengan cara berikut:

$$\% \text{ Kadar Serat Kasar } \frac{Y-z-a}{x} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Berat kertas saringan

B : Berat sudah ditanur

Z : Berat Setelah di oven

X : Berat sampel

5. Tahap Analisis Data

Analisis data diperoleh dari hasil analisis laboratorium kemudian disusun dalam bentuk tabel dan dianalisis menggunakan Analisis Variansi (ANAVA). Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengidentifikasi perbedaan yang signifikan diantara kelompok data yang berbeda. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel maka langkah selanjutnya adalah melakukan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) (Maria, 2018).