

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena dalam penelitian ini terdapat perlakuan dan kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, juga adanya replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003: 88).

B. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama yaitu tahap pendahuluan dan tahap kedua adalah penelitian utama, tahap penelitian utama terdiri dari tahap persiapan, *pretreatment* dan *treatment*. Tahap pendahuluan meliputi tahap persiapan, pembuatan larutan H₂SO₄, pembuatan kurva standar alkohol, pembuatan kurva standar glukosa, serta pengujian kadar gula tertinggi pada sampah organik dalam bentuk bubur, cacahan, sari dan ampas setelah pemberian H₂SO₄ 1%, 5% dan 10% (v/v) (Isarankura *et al.*, 2007). Tahap penelitian utama meliputi tahap *pretreatment* yaitu pemberian H₂SO₄ (%) sesuai penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, setelah itu dilanjutkan ke tahap *treatment* yakni fermentasi sari sampah dengan kadar gula paling tinggi dari hasil *pretreatment* dengan menggunakan inokulum *S. cerevisiae* dengan berbagai konsentrasi.

Rancangan dasar penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan faktor lingkungan relatif homogen. Untuk perlakuan perbedaan konsentrasi *S. cerevisiae* pada penelitian utama dilakukan dengan empat perlakuan kombinasi dengan lima replikasi (Gomez, 1995).

$$T(R-1) \geq 15$$

$$4R-4 \geq 15$$

$$4R \geq 19$$

$$R \geq 5$$

Penempatan sampel dilakukan secara acak berdasarkan pengundian. Variasi jumlah inokulum *S. cerevisiae* yang digunakan adalah 0, 3%, 5%, dan 7% (v/v) (Buckle, 2007). Lama waktu fermentasi ditentukan berdasarkan lama waktu fermentasi yang biasa dipakai pada proses pembuatan bioetanol sari sampah sebelumnya yaitu enam hari. Pengujian parameter pH, kadar glukosa, dan kadar alkohol dilakukan setiap dua hari sekali. Untuk penambahan gula awal yang digunakan adalah 5% berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Anggara, 2010).

Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara titrasi asam basa. Untuk mengetahui kadar alkohol pada sampel terlebih dahulu dibuat kurva standar alkohol yang menyatakan hubungan antara kebutuhan NaOH sebagai sumbu x dan kadar alkohol sebagai sumbu y. Prosedur titrasi yang dilakukan mengikuti Hidayat (1995: 44).

Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan metode Somogyi-Nelson. Sebanyak 2 ml sampel diambil kemudian ditambahkan reagen Somogyi-Nelson (pengerjaan sesuai dengan pembuatan kurva baku glukosa). Nilai absorbansi sampel dikonversikan ke dalam persamaan pada kurva baku glukosa, kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (panjang gelombang 520 nm). Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Kusnadi, 2001: 40) sehingga didapatkan kadar gula pereduksi dari sampel.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua sampah sayur dan buah-buahan yang berasal dari Pasar Ciroyom Bandung, sedangkan yang dijadikan sampel adalah sampah sayur dan buah-buahan yang digunakan dalam proses fermentasi.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Biologi Sementara Jl. Jaya Perkasa no. 12 dan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr Setiabudhi No 229 pada bulan April-Juni 2010.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1. Alat – Alat Penelitian

No	Alat-alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alat destilasi	-	1 unit
2.	Alkoholmeter	-	1 buah
3.	Autoclave	EYELA model HL36AE	1 unit
4.	Blender	Merk Nasional	1 unit
5.	Botol fermentasi	-	80 buah
6.	Botol penampung bioetanol	Pyrex	4 unit
7.	Bunsen	-	3 buah
8.	Buret dan Statif	-	1 buah
9.	Ember	-	5 buah
10.	Gelas Beaker	Pyrex	5 buah
11.	Hotplate	Eyela magnetic stirrer RCH 3	1 unit
12.	Inkubator	Gallenkamp Cooled Inkubator	1 buah
13.	Kain penyaring	-	5 buah
14.	Kamera digital	Kodak	1 unit
15.	Kompor gas	Rinai	1 unit
16.	Lemari es	National	1 buah
17.	Makropipet 2 ml	Eppendorf	1 unit
18.	Panci Penangas	-	2 buah
19.	Pipet tetes dan volum	-	6 buah
20.	Pisau	-	1 buah
21.	Shaker	EYELA model multi shaker MMS	1 unit
22.	Spektrofotometer	Milton Rey Spectronic 20 D	1 buah
23.	Termometer	-	2 buah
24.	Timbangan Analitik	AND HF-300	1 buah
25.	Water bath	Eyela Unithermo Shaker NTS-130	1 unit

Tabel 3.2. Bahan - Bahan penelitian

No	Bahan – bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alkohol absolut	p.a	100 ml
2.	Anhidrat asetat	p.a	200 ml
3.	Aquades.	Medilabs	10L
4.	Gula pasir	Gulaku	250 gram
5.	Inokulum <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kultur murni	5 tabung reaksi
6.	Medium PDA	p.a	200ml
7.	Medium PDB	-	200ml
8.	NaOH 1 M	p.a	3 liter
9.	pH Indikator	-	1 pak
10.	Phenolftalein	p.a	50 ml
11.	Reagent Somogyi-Nellson	p.a	2 liter
12.	Sampah organik	-	10 kg

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan:

1. Tahap Pendahuluan

a. Tahap Persiapan

1). Analisis Komposisi Kimia Sari Sampah

Analisis kandungan kimia sari sampah dilakukan di Laboratorium Balai Selulosa, Dayeuh Kolot Bandung.

2). Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa botol fermentasi, gelas ukur, tabung reaksi dll, dibersihkan dengan cara merendam botol-botol tersebut dengan detergen dan bilas, lalu botol-botol tersebut direndam dengan larutan disinfektan selama 30 menit dan dibilas lagi dengan air mengalir, tiriskan.

3). Pembuatan Sari Sampah

Sampah organik berupa sampah sayuran dan buah-buahan dibersihkan dan dibuat menjadi empat bentuk: ampas (A), bubur (B), cacahan (C), sari (D). Masing-masing substrat yang digunakan sebanyak 20 ml, dilakukan lima kali pengulangan.

b. Pembuatan Larutan H_2SO_4 1% , 5% dan 10 %

Konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan dalam *pretreatment* adalah 1%, 5% dan 10% (Isarankura *et al.*, 2007). Untuk pembuatan larutan H_2SO_4 1%, sebanyak 10 ml H_2SO_4 pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1 L, dan untuk pembuatan larutan H_2SO_4 5%, sebanyak 50 ml H_2SO_4 pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1 L. sedangkan untuk pembuatan larutan H_2SO_4 10% sebanyak 100 ml H_2SO_4 pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1 L.

c. Pembuatan Kurva Standar Alkohol

1). Pembuatan Larutan Blanko

Satu ml akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dimasukkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer tersebut sambil digoyang-goyangkan sampai warnanya berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

2). Pengujian Larutan Alkohol Standar

Sebanyak 1 ml larutan alkohol standar (1-10%) dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Sambil digoyang-goyangkan, ke dalam erlenmeyer tersebut ditambahkan NaOH 1 M sampai terjadi perubahan warna (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

d. Pembuatan Kurva Standar Gula

Sebelum dilakukan analisis kadar gula pereduksi pada sampel, maka terlebih dahulu dibuat kurva baku glukosa. Kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (panjang gelombang 520 nm). Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Kusnadi, 2001: 40).

Pembuatan kurva baku glukosa dimulai dengan menimbang glukosa murni sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam 1000 ml aquades dan dikocok sampai homogen. Dengan mikropipet larutan tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1,0 ml; 1,2 ml; 1,4 ml; 1,6 ml; 1,8 ml dan 2,0 ml. Selanjutnya ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan akuades masing-masing sebanyak 1,8 ml; 1,6 ml; 1,4 ml; 1,2 ml; 1,0 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,4 ml; 0,2 ml; dan 0 ml sehingga volume masing-masing tabung 2

ml. Maka pada masing-masing tabung diperoleh konsentrasi glukosa 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/ml.

Larutan Somogyi I sebanyak 1,6 ml dan Somogyi II sebanyak 0,4 ml ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi larutan glukosa. Larutan tersebut dikocok dan ditutup dengan kelereng. Kemudian dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 10 menit, lalu diangkat dan didinginkan dalam penangas es sampai mencapai suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml akuades, maka volume total adalah 10 ml. Tabung reaksi ditutup dengan ibu jari dan dikocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO_2 tidak keluar lagi. Masing-masing larutan diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dari kadar glukosa standar dibuat dengan grafik linier, kemudian kurva baku glukosa dapat dibuat dan diperoleh persamaan yang akan digunakan dalam penentuan kadar gula pereduksi dari sampel.

e. Penentuan Konsentrasi H_2SO_4 yang akan Digunakan (%)

Sebanyak 1 kilogram sampah yang terdiri dari kol, sawi, tomat dan wortel dicuci dengan air ledeng, sebanyak $\frac{1}{4}$ kilogram dicacah hingga halus, dan $\frac{3}{4}$ kilogram diblender hingga menjadi bubur sampah. $\frac{1}{4}$ kilogram bubur sampah dipisahkan, $\frac{1}{2}$ kilogram bubur sampah diperas hingga menghasilkan sari sampah dan ampas sampah. Sehingga didapat sampah dalam bentuk ampas (B), bubur (B), cacahan (C), dan sari (D). Konsentrasi H_2SO_4 yang diuji cobakan yaitu 1%, 5% dan 10%

(Isarankura *et. Al.*, 2007). Sebanyak 60 buah botol disiapkan dan diberi label, 20 botol pertama digunakan untuk sampah dengan pemberian Larutan H_2SO_4 1%, 20 botol kedua untuk pemberian Larutan H_2SO_4 5% dan 20 ketiga kedua untuk pemberian Larutan H_2SO_4 10%. Sebanyak 20g sampel ditambah 20 ml Larutan dimasukkan ke dalam botol, tutup rapat dan dididihkan selama 35 menit. Dilakukan pengulangan sebanyak lima kali dan untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat data yang diperoleh diolah dengan uji *Two Way Anova* untuk melihat perbedaan signifikan dari perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Post-hoc* untuk mengetahui bentuk substrat dan konsentrasi mana yang menghasilkan gula pereduksi paling tinggi.

A1 → 20 g Ampas sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 1%

B1 → 20 g Bubur sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 1%

C1 → 20 g Cacahan sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 1%

D1 → 20 ml Sari sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 1%

A2 → 20 g Ampas sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 5%

B2 → 20 g Bubur sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 5%

C2 → 20 g Cacahan sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 5%

D2 → 20 ml Sari sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 5%

A3 → 20 g Ampas sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 10%

B3 → 20 g Bubur sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 10%

C3 → 20 g Cacahan sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 10%

D3 → 20 ml Sari sampah + 20 ml Larutan H_2SO_4 10%

Panaskan

2. Tahap Penelitian Utama

a. Persiapan Bahan

Bahan utama yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sampah organik berupa sayur dan buah. Sebelum perlakuan terlebih dahulu sayur dan buah dicuci dengan air mengalir lalu ditiriskan untuk menghilangkan kotoran yang menempel.

b. Pembuatan Sari Sampah

Berdasarkan hasil percobaan *pretreatment* kadar gula paling tinggi terdapat pada sampah dengan bentuk bubur, maka sampah dibuat dalam bentuk bubur. Sebanyak 5 kg sampah diambil pada hari tersebut, sekitar pukul 6 pagi dari Pasar Ciroyom, Bandung. Sampah terdiri dari sampah kol, wortel, tomat dan sawi dengan perbandingan 1:1:1:1. Sampah dicuci dengan air mengalir, kemudian diblender hingga terbentuk bubur sampah.

c. Persiapan *Saccharomyces cerevisiae*

1). Pembuatan Media

Terdapat dua macam media yang digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara *S. cerevisiae* yaitu medium aktivasi *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) dan medium kultur *Potatoes Dextrose Borth* (PDB).

a). Medium Aktifasi PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)

Sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi, inokulum *S. cerevisiae* diaktivasi terlebih dahulu. Medium aktivasi yang digunakan adalah medium PDB (*Potatoes Dextrose Broth*). Medium PDB dibuat dengan cara sebagai berikut: 200 gram kentang dididihkan dalam akuades 1 L hingga volumenya tinggal 1/2 atau 2/3 nya, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring. Setelah disaring ditambahkan dextrose sebanyak 2 gram. Masukkan kedalam tabung Erlenmeyer kemudian ditutup dengan sumbat. Sterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121 °C selama 15 menit.

b). Medium Kultur PDA (*Potatoes Dextrose Agar*)

S. cerevisiae yang akan digunakan dalam penelitian ditumbuhkan dalam medium agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) yang dibuat dengan cara sebagai berikut: sebanyak 3,9 gram PDA instan dilarutkan dalam 100 ml akuades dan didihkan. Lalu masukan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5-7 ml kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan dalam keadaan miring.

c). Medium Fermentasi

Medium fermentasi merupakan medium yang terbuat dari sampah organik yang dibuat dengan cara sebagai berikut: sampah organik dibersihkan, dan diblender, lalu ditimbang. Kemudian sampah organik ditambah dengan H₂SO₄ 1% (1:1),

kemudian dipanaskan selama 30 menit. Selanjutnya disaring ditambahkan gula awal sebanyak 5% (w/v). Setelah dingin diatur keasamannya sehingga pH-nya 5. Lalu dimasukkan ke dalam botol sebanyak 100 ml dan ditutup dengan plastik.

2. Aktivasi *Saccharomyces cerevisiae*

a). Aktivasi I *Saccharomyces cerevisiae*

Persiapan alat dan bahan (alkohol, bunsen, medium PDB 10 ml, jarum ose), semua bahan disimpan di dalam laminar dan dipaparkan sinar UV selama 15 menit. Sebanyak 1 ose kultur murni *S. cerevisiae* diinokulasikan ke dalam medium PDB 10 ml, medium yang telah diinokulasikan ditutup rapat dengan sumbat dan plastik wrap kemudian disimpan *di shaker* 120 rpm selama 24 jam.

b). Aktivasi II *Saccharomyces cerevisiae*

Setelah *di-shaker* selama 24 jam (aktivasi I) medium PDB yang berisi *Saccharomyces cerevisiae* dipindahkan ke dalam medium aktivasi ke-II (PDB 90 ml), Setelah dipindahkan ke medium aktivasi ke-II, medium tersebut *di shaker* kembali selama 6 jam.

c. Pembuatan H₂SO₄ Sesuai Penelitian Pendahuluan (1%)

Untuk pembuatan larutan H₂SO₄ 1%, sebanyak 10 ml H₂SO₄ pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1 L.

d. Pretreatment Kimiawi

Bubur sampah diberi perlakuan kimiawi (direndam dengan H_2SO_4 1:1), konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan sesuai penelitian pendahuluan. Setelah itu diperas sampai didapat sari sampah lalu netralkan dengan NaOH 5M sampai pH menjadi 5. Masukkan ke dalam 20 botol fermentor masing-masing 100 ml.

e. Proses Fermentasi

Setelah diberi perlakuan kimiawi, ke dalam fermentor tersebut dimasukkan gula awal sebesar 5% sesuai penelitian pendahuluan (Anggara, 2010). Inokulasikan *S. cerevisiae* sebanyak 0% (sebagai kontrol hanya di beri PDB saja), 3%, 5% dan 7% dengan lima kali pengulangan untuk tiap konsentrasi. Dilakukan pengukuran kadar alkohol, glukosa, dan pH pada hari ke 0, 2, 4, dan 6.

f. Pengukuran Kadar Glukosa (Somogyi-Nelson)

Ambil 2 ml sampel ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 larutan Somogyi II kemudian homogenkan dengan menggunakan vorteks tabung ditutup dengan menggunakan kelereng lalu panaskan dalam penangas selama 10 menit. Setelah 10 menit pindahkan tabung ke dalam es kemudian tambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml Akuades, setelah itu homogenkan larutan, masukan larutan dalam cuvet kemudian ukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Jika larutan terlalu pekat dan tidak terbaca pada

spektrofotometer dilakukan pengenceran, ambil 1 ml larutan kemudian encerkan dengan menambahkan 9 ml ak uades.

g. Pengukuran pH

Pengukuran pH pada sari sampah dengan menggunakan pH indikator.

h. Pengukuran Kadar Alkohol (Titrasi alkohol)

Pada hari ke 0, 2, 4, dan 6, sari sampah hasil fermentasi dari fermentor diambil sebanyak 1 ml ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, tambahkan 1 ml anhidrat asetat dan 2 tetes phenolftalein kemudian titrasi dengan NaOH 1 molar dengan buret sampai terlihat perubahan warna menjadi warna merah muda. Catat kedudukan skala pada buret. Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara membandingkan NaOH yang dibutuhkan pada titrasi sampel dengan NaOH yang dibutuhkan pada alkohol standar.

3. Perlakuan II (Skala Pilot)

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa tabung Erlenmeyer besar (2 L), gelas ukur, tabung reaksi dll, dibersihkan dengan cara merendam alat-alat tersebut dengan detergen selama satu malam, lalu dibersihkan bagian dalam dan luarnya, setelah dibilas, botol-botol

tersebut direndam dengan larutan disinfektan selama 30 menit lalu bilas lagi dengan Akuades steril dan ditiriskan.

b. Perlakuan

Sebanyak 4 kg sampah dicuci dan dihaluskan (diblender) sampai halus. Kemudian tambahkan H_2SO_4 dengan perbandingan 1:1 lalu dipanaskan selama 30 menit. Tambahkan gula 5% ke dalam larutan, homogenkan. Masukkan ke dalam labu Erlenmeyer, setelah dingin inokulasi kan *S. cerevisiae* 3% lalu simpan pada inkubator dengan suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ selama 2 hari.

c. Destilasi

Alkohol yang terbentuk dari hasil fermentasi dari pilot plan kemudian didestilasi dengan menggunakan destilator.

d. Uji Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS)

Sampel hasil destilasi dibawa ke laboratorium riset kimia Universitas Pendidikan Indonesia untuk diuji kandungan etanolnya.

G. Pengolahan Data

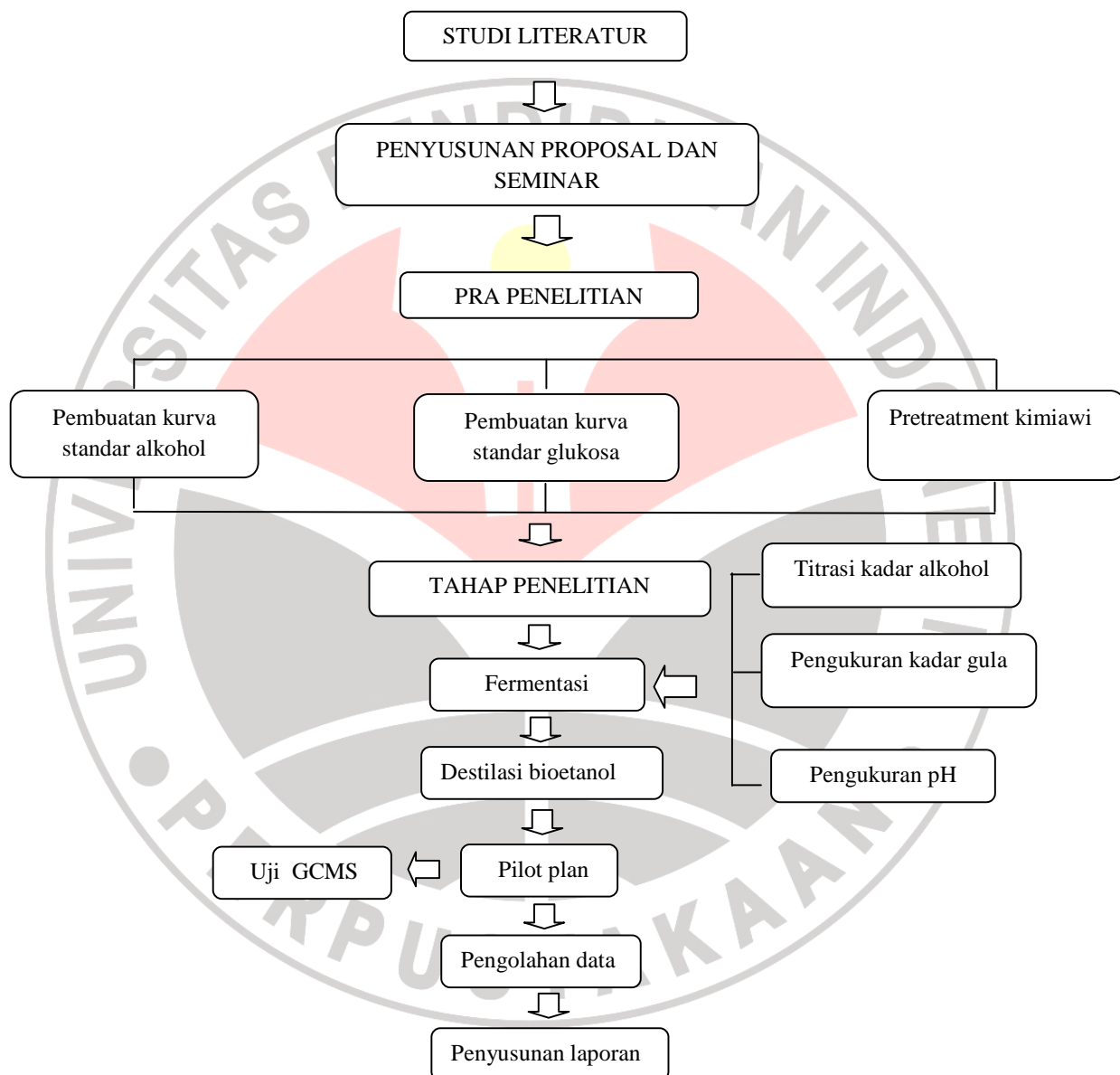
Pengolahan data dilakukan untuk mengetahui *pretreatment* mana yang menghasilkan kadar gula pereduksi paling tinggi dari konsentrasi asam (H_2SO_4) yang berbeda dan *treatment* mana yang menghasilkan kadar alkohol paling besar pada

fermentasi sari sampah organik dengan *pretreatment* kimiawi. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*.

Untuk olah data *pretreatment* terdiri dari beberapa faktor, yaitu kadar H_2SO_4 yang digunakan (0%, 1%, 5% dan 10%) dan bentuk substrat yang diuji-cobakan (ampas, bubur, cacah dan sari). Olah data *treatment* juga terdiri dari beberapa faktor, yaitu hari (0, 2, 4 dan 6) dan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* (0%, 3%, 5% dan 7%). Untuk itu dilakukan tahap pengujian seperti berikut:

1. Uji Normalitas dan Homogenitas.
2. Uji Anova dua jalur (*Two way ANOVA*), untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan banyaknya kadar gula pereduksi dan kadar alkohol yang diperoleh dari faktor-faktor dari setiap *treatment* yang diberikan.
3. Uji lanjutan dengan menggunakan Uji *Tukkey*, untuk menentukan faktor-faktor dari *treatment* mana saja yang menghasilkan kadar gula pereduksi dan kadar alkohol paling banyak.
4. Analisis Korelasi, untuk melihat tingkat signifikansi pengaruh antara kadar gula dengan kadar alkohol, kadar pH dengan kadar alkohol, dan kadar pH dengan kadar gula.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian