

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli sampai bulan November 2009 yang bertempat di Laboratorium Riset, Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan bahan

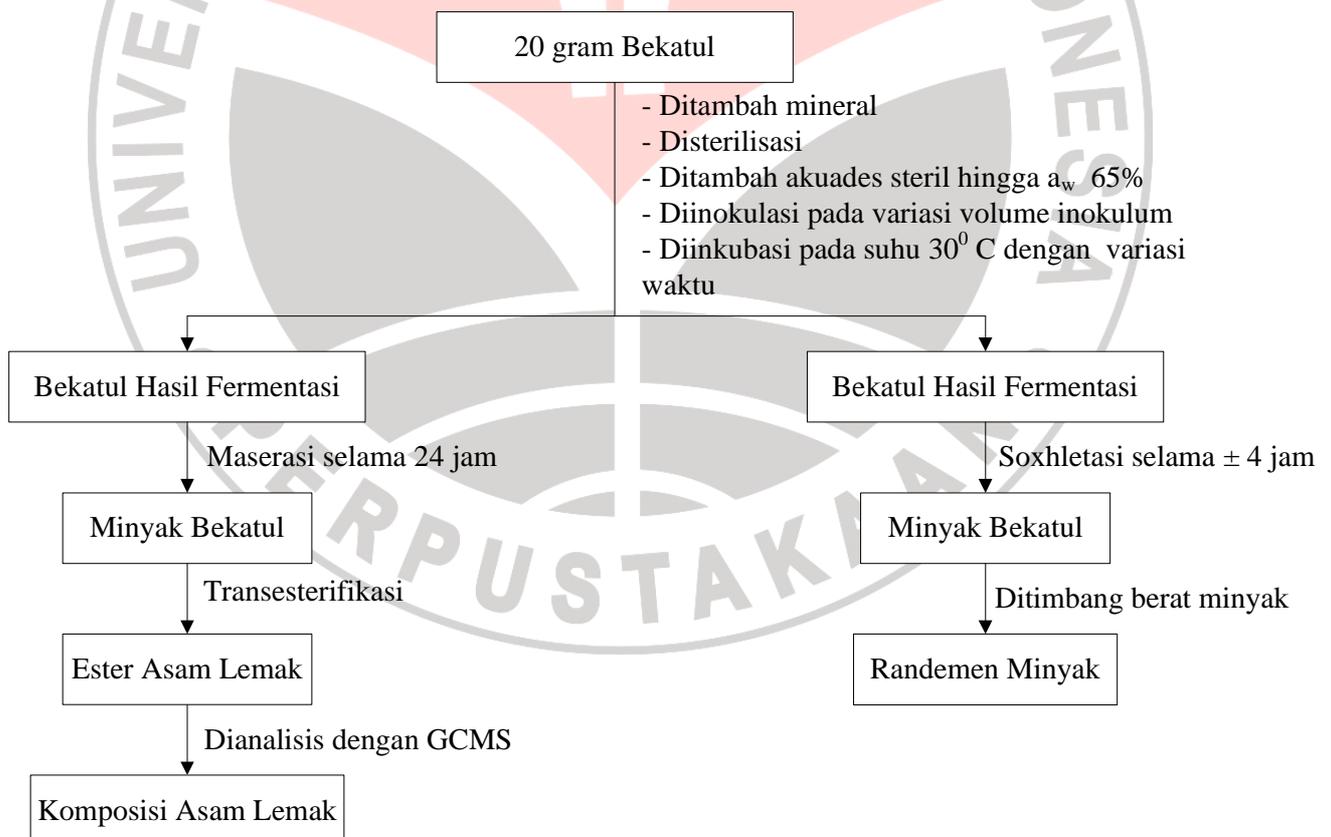
3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya tabung reaksi dan cawan petri untuk media nutrisi kapang, autoklaf untuk mensterilisasi alat dan bekatul yang akan difermentasi, jarum ose dan spirtus untuk proses inokulasi kapang, dua perangkat alat Soxhlet untuk mengekstraksi minyak bekatul, termometer, *magnetic stirrer*, botol vial, dan pemanas listrik untuk proses transesterifikasi minyak bekatul. Alat Laminar digunakan sebagai tempat untuk inokulasi kapang pada bekatul. Alat Inkubator digunakan untuk fermentasi bekatul. Alat GCMS (*Gas Chromatography Mass Spectroscopy*) digunakan untuk menganalisis komposisi asam lemak minyak bekatul. Alat-alat gelas lainnya yang umum digunakan dalam laboratorium kimia.

3.2.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul yang diperoleh dari tempat penggilingan padi di Kab. Bandung Barat, kapang *Aspergillus terreus* (*A.terreus*) strain LIPIMC 714 yang diperoleh dari Balitbang Mikrobiologi Puslitbang Biologi-LIPI Bogor, kentang, pepton, agar, dekstrosa, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KCl, n-heksan teknis, BF_3 -Metanol 20%, akuades steril, kertas saring, wrapping, dan aluminium foil.

3.3 Bagan Alir Penelitian



3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Kultur Kapang

3.4.1.1 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

200 gram kentang direbus dalam 1 L akuades selama 2 jam, kemudian ekstrak kentang disaring dan ditambahkan kembali akuades hingga volumenya menjadi 1 L. Ditambahkan 5 gram pepton, 15 gram agar, dan 20 gram dekstrosa. Campuran dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai homogen selama 15 menit. pH media diatur menjadi 5-6 dengan menambahkan HCl atau NaOH. Media dituang ke dalam Erlenmeyer dan 15 tabung reaksi, kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media siap untuk disterilisasi.

3.4.1.2 Pemeliharaan Biakan Murni

Pemeliharaan dan perbanyakan biakan murni *A.terreus* strain LIPIMC 714 dengan menginokulasi secara zig-zag pada media agar miring PDA menggunakan ose steril secara aseptis di dalam laminar. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-6 hari. Perbanyakan dari biakan murni ini digunakan sebagai kultur stok. Kultur stok yang siap digunakan dapat disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C untuk menghindari kontaminasi dan matinya kapang.

3.4.1.3 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dimulai dengan membuat larutan suspensi miselia kapang. Suspensi dibuat dari 4 kultur stok. Masing-masing kultur ditambahkan 10

mL akuades, kemudian miselia kapang dikikis secara halus menggunakan ose steril hingga terkikis seluruhnya. Semua larutan suspensi miselia kapang dimasukkan ke dalam gelas kimia steril lalu diencerkan hingga 100 mL. Kemudian dihomogenkan dengan cara diaduk.

3.4.1.4 Pengamatan Morfologi Kapang

Kultur stok yang telah dibuat diamati morfologinya dengan cara membuat preparat di atas objek gelas yang telah dibersihkan dengan kapas beralkohol, kemudian ditetaskan akuades ke atas kaca objek. Secara hati-hati, miselia kapang diambil menggunakan ose steril, kemudian dicampurkan dengan tetesan akuades pada objek gelas. Dikeringkan di udara terbuka dan pada bagian bawah kaca objek dipanaskan di atas api sebanyak 3 kali "fiksasi panas".

3.4.2 Fermentasi Bekatul

Bekatul disaring terlebih dahulu dengan ukuran partikel 60 mesh. Bekatul ditimbang 20 gram dan dimasukkan ke dalam botol kemudian ditambahkan dengan sejumlah mineral, yaitu 0,1 gram KH_2PO_4 ; 0,05 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 gram NaNO_3 ; 0,05 gram KCl. Setelah itu semua media fermentasi ditutup rapat dengan aluminium foil dan siap disterilisasi.

Di dalam laminar, semua media fermentasi yang telah disterilisasi ditambah akuades steril dan inokulum yang bervariasi yaitu 3 mL, 5 mL, dan 7 mL hingga a_w (*activity water*) 65% pada pH media 5-7. Apabila belum mencapai pH tersebut ditambah HCl atau NaOH, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 6 hari. Fermentasi ini dilakukan untuk menentukan volume

inokulum optimum, kemudian digunakan untuk fermentasi bekatul pada variasi waktu inkubasi yaitu 4 hari, 6 hari, dan 8 hari.

3.4.3 Ekstraksi Minyak Bekatul

3.4.3.1 Ekstraksi Minyak Bekatul dengan Maserasi

Sampel bekatul yang telah selesai difermentasi, dimaserasi dengan n-heksan selama 24 jam. Perbandingan massa bekatul dan pelarut 1 : 4. Setelah dimaserasi, ekstrak minyak dalam heksan disaring dengan corong Buchner untuk memisahkan ekstrak dari bekatul. Ekstrak minyak dalam pelarut heksan diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator. Pelarut jernih yang tertampung kemudian dimasukkan dalam botol penampung sisa pelarut.

3.4.3.2 Ekstraksi Minyak Bekatul dengan Soxhletasi

Sampel bekatul yang telah selesai difermentasi dilakukan ekstraksi dengan pelarut heksan menggunakan alat Soxhlet. Sebelum diekstraksi, sampel bekatul hasil fermentasi dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C-45°C, kemudian dibuat timbel yaitu berupa kertas saring yang dibuat seperti kantong dan ditutup dengan kapas. Labu yang berisi batu didih harus dikeringkan terlebih dahulu di dalam alat pengering kemudian didinginkan dan ditimbang. Timbel yang telah dibuat dimasukkan ke dalam badan Soxhlet kemudian diekstraksi selama ±4 jam menggunakan 150 mL pelarut n-heksan diatas penagas air. Pelarut dipisahkan dari minyak dengan cara mendestilasi pelarut secara langsung menggunakan Soxhlet. Pelarut jernih yang tertampung kemudian dimasukkan dalam botol penampung

sisa pelarut. Minyak yang terdapat dalam labu didih dipanaskan kembali di atas penangas air untuk menghilangkan sisa pelarut yang kemungkinan masih terdapat dalam minyak bekatul. Selanjutnya labu didih yang berisi minyak dikeringkan dalam desikator dan ditimbang. Pengeringan dan penimbangan diulang sampai diperoleh berat yang tetap. Untuk mengetahui kadar minyak dapat dihitung dengan menggunakan rumus seperti berikut :

$$\text{Kadar Minyak (\%)} = \frac{(B-A)}{\text{Bobot contoh (gram)}} \times 100\%$$

B = Bobot labu dan ekstrak minyak (gram)

A = Bobot labu kosong + batu didih (gram)

3.4.4 Penentuan Komposisi Asam Lemak Dalam Minyak Bekatul

Untuk mengetahui komposisi asam lemak yang terkandung dalam minyak bekatul hasil fermentasi dilakukan transesterifikasi pada minyak. Selanjutnya dilakukan analisis komposisi asam lemak menggunakan alat GCMS.

3.4.4.1 Transesterifikasi Minyak Bekatul

Pada proses transesterifikasi, minyak bekatul dicampur BF₃-metanol 20% dengan perbandingan 1:3, yaitu 10 tetes minyak bekatul dan 30 tetes BF₃-metanol 20% dimasukkan ke dalam botol vial. Selanjutnya ditempatkan pada penangas air dan dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Suhu larutan dijaga konstan pada suhu 60°C.

3.4.4.2 Analisis Komposisi Asam Lemak Pada Minyak Bekatul

Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GCMS) merupakan alat yang digunakan untuk menganalisis komposisi asam lemak yang terdapat dalam minyak bekatul. Analisis GCMS dilakukan di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI. Adapun kondisi GCMS yang digunakan adalah :

- Suhu kolom = 60°C
- Suhu Injektor = 310°C
- Suhu detector = 320°C
- Suhu awal 60°C ditahan selama 2 menit, kenaikan 10°C tiap menit sampai suhu 280°C kemudian ditahan selama 2 menit
- Volume injeksi = 0,2 µL
- Tekanan = 100kPa
- Laju alir = 36 mL
- Gas Pembawa = helium
- Kolom = DB-5ms
- Panjang Kolom = 30 m
- Diameter kolom = 0,25mm