

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003). Objek dalam penelitian ini adalah produksi pigmen merah, kuning dan orange yang dihasilkan oleh *Monascus purpureus* dalam satuan unit absorbansi per gram substrat.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan desain RAL (Rancangan Acak Lengkap). Pada penelitian ini terdapat tiga variabel penelitian yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol. Variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi inokulum spora *M. purpureus*, variabel terikatnya adalah produksi pigmen *M. purpureus* dan variabel kontrolnya adalah Jenis substrat, jenis mikroorganisme yang digunakan, pH substrat, waktu dan suhu inkubasi. Penelitian ini akan dilakukan dengan 4 perlakuan (dengan kata lain ada 4 *treatment*) yaitu inokulum spora *M. purpureus* dengan konsentrasi 0%, 5%, 10% dan 15%. Untuk mengetahui banyaknya replikasi, digunakan rumus:

$$(t)(r-1) \geq 20$$

Keterangan: t = treatment

r = replikasi (Sumber: Gomez, 1995).

Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan, dengan demikian akan dilakukan 6 kali replikasi untuk setiap perlakuan. Sehingga terdapat 24 unit percobaan untuk setiap pengukuran. Peletakan tiap unit percobaan akan mengikuti aturan bilangan acak yang diperoleh dengan melakukan undian. Unit percobaan disusun seperti tabel 3.1

Tabel 3.1 Desain Rancangan Acak Lengkap

91	66	65	9	162	158	105	24	114	112	17	42
31	142	23	150	85	133	27	40	100	68	161	73
52	14	16	8	156	34	26	144	90	148	94	97
13	67	54	25	145	55	113	67	77	63	15	82
110	81	12	20	125	19	123	10	152	136	107	39
121	32	28	1	137	62	108	56	69	99	57	102
72	38	45	103	129	11	134	92	79	75	126	61
50	109	118	37	60	166	131	143	30	153	78	95
43	5	80	46	146	111	44	155	104	76	70	164
117	151	93	101	89	98	160	124	84	21	159	140
53	147	106	59	128	4	7	127	29	41	83	48
2	139	88	74	33	132	122	115	138	71	119	49
141	22	6	58	130	47	154	3	51	36	167	120
135	35	157	168	165	116	86	149	96	18	163	64

Keterangan :

Konsentrasi inokulum 0%

Hari ke 1 : nomor 1- 6

Hari ke 3 : nomor 7-12

Hari ke 5 : nomor 13-18

Hari ke 7 : nomor 19-24

Hari ke 9 : nomor 25-30

Hari ke 11 : nomor 31-36

Hari ke 13 : nomor 37-42

Konsentrasi inokulum 10%

Hari ke 1 : nomor 85-90

Hari ke 3 : nomor 91-96

Hari ke 5 : nomor 97-102

Hari ke 7 : nomor 103-108

Hari ke 9 : nomor 109-114

Hari ke 11 : nomor 115-120

Hari ke 13 : nomor 121-126

Konsentrasi inokulum 5%	Konsentrasi inokulum 15%
Hari ke 1 : nomor 43-48	Hari ke 1 : nomor 127-132
Hari ke 3 : nomor 49-54	Hari ke 3 : nomor 133-138
Hari ke 5 : nomor 55-60	Hari ke 5 : nomor 139-144
Hari ke 7 : nomor 61-66	Hari ke 7 : nomor 145-150
Hari ke 9 : nomor 67-72	Hari ke 9 : nomor 151-156
Hari ke 11 : nomor 73-78	Hari ke 11 : nomor 157-162
Hari ke 13: nomor 79-84	Hari ke 13: nomor 163-168

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Populasi : Seluruh substrat tepung biji nangka yang berada dalam botol fermentor
2. Sampel : Masing-masing 1 gram substrat yang diambil dalam botol fermentor untuk pengukuran produksi pigmen *M. purpureus*.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret sampai Juni 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 3.2 Alat

No.	Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	HL36AE	1 unit
2.	Jarum inokulasi		3 unit
3.	Tabung reaksi	Pyrex	10 unit
4.	Timbangan digital	PT25.221.03.018BF	1 unit
5.	Gelas ukur	Pyrex, 250 mL	3 unit
6.	Vorteks homogenizer	PT25.221.03.044BM	1 unit
7.	Shaker bath	PT25.2221.03004 BM	1 unit
8.	Spektrofotometer	PT25-221-03021BF (2/2)	1 unit
9.	Alumunium foil		1 pack
10.	Plastik tahan panas	Ukuran ½ kg	50 lembar
11.	Karet gelang		200 unit
13.	pH indikator		50 lembar
15.	Haemocytometer		1 unit
16.	Inkubator		1 unit
19.	Termometer	0-100°C	2 unit
20.	Wadah plastik		1 unit
21.	Mikroskop Listrik	Shimadzu BI-71- 16126	1 unit
22.	Spatula		4 unit
23.	Pembakar spirtus		1 unit
24.	Korek api		1 kotak
25.	Batang pengaduk		1 unit
26.	Botol gelas ukuran 50 ml		200 unit

27.	Papan miring		1 unit
28.	Hot plate & magnetic stirrer	PT25.221.03.023 BM (1/2)	1 unit

Tabel 3.3 Bahan Penelitian

No.	Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	<i>Monascus purpureus</i>	Kapang	1 isolat
2.	Tepung Biji Nangka	Serbuk	
4.	Medium PDA	Serbuk	100 mL
5.	Ethanol 95%	Cairan	3600 mL
6.	Aquades steril	Cairan	1000 mL

F. Prosedur Kerja

a. Tahap persiapan

1. Pembuatan medium PDA

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan *M. purpureus* adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*). Standar takaran yang digunakan untuk membuat medium PDA yaitu untuk 1 liter medium PDA dibutuhkan 39 gram serbuk PDA. Setelah dicampur, medium kemudian dipanaskan diatas *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga mendidih.

2. Sterilisasi

Semua alat dan bahan tahan panas yang akan digunakan disterilkan di *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit pada tekanan 1,5 atm.

b. Tahap Pra penelitian

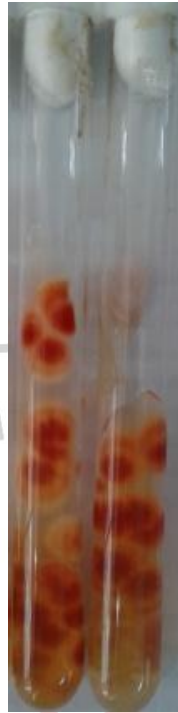
1. Identifikasi *Monascus purpureus*

Isolat kapang *M. purpureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi ITB, selanjutnya dibiakkan dalam medium kultur PDA miring di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

Identifikasi *M. purpureus* dilakukan melalui pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan cara melihat penampakan warna hifa dan koloni *M. purpureus*. Sedangkan untuk pengamatan mikroskopik dilakukan pembuatan *slide culture*, lalu dilakukan pengamatan terhadap bentuk spora, hifa, kleistetosia, dan aleiokonidia *M. purpureus* menggunakan mikroskop. Identifikasi mengacu pada jurnal Pattanagul *et al.* (2007), Tanya (1997) dan Hawsworth and Pitt (1983).

2. Pemeliharaan dan Perbanyakkan *Monascus purpureus*

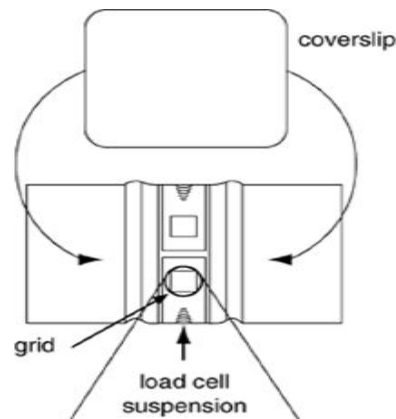
Kapang *M. purpureus* yang akan digunakan untuk penelitian disimpan pada suhu 30-32⁰C, sedangkan stok isolat kapang *M. purpureus* disimpan pada suhu 4⁰C. Berikut disajikan Gambar kapang *M. purpureus* yang dikultur dalam tabung reaksi.



Gambar 3.1 *Monascus purpureus* Usia Kultur Enam Hari
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

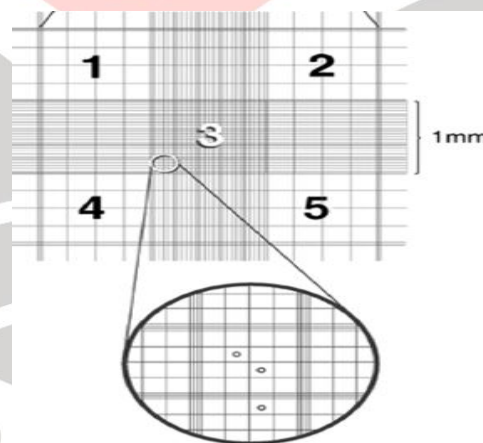
3. Pembuatan Kurva Produksi Spora

Pembuatan kurva produksi spora ini bertujuan untuk mengetahui jumlah spora yang diproduksi oleh *M. purpureus*. Kurva produksi spora dibuat dengan mengambil koloni *M. purpureus* yang dikultur dalam cawan Petri dengan menggunakan pelubang gabus yang berdiameter 0,6 mm. Koloni tersebut kemudian diinokulasikan pada medium PDA miring dan diinkubasikan pada suhu 30-32⁰C. Pengamatan jumlah spora dilakukan setiap hari dengan cara menambahkan 9 ml aquades steril pada setiap tabung yang berisi kultur *M. purpureus* yang berumur 6 hari. dengan menggunakan jarum ose, hifa yang menempel pada medium dikeruk perlahan hingga mendapatkan suspensi sporanya, setelah itu suspensi spora dipindahkan kedalam tabung kosong dan dihomogenkan dengan cara divortex, lalu dipipet dan diteteskan satu tetes kedalam bidang hitung *haemocytometer* dan ditutup dengan gelas penutup.



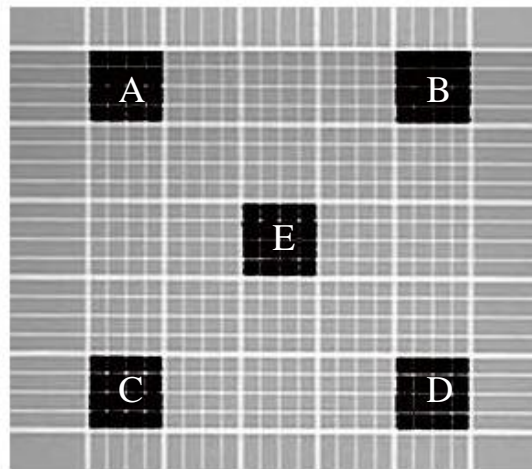
Gambar 3.2 Penutupan Alat *Haemocytometer* Dengan Gelas Penutup (Sumber : Janice, 2010)

Kemudian dengan menggunakan perbesaran 400x, spora *M. purpureus* dapat terhitung dibawah mikroskop. Spora yang dihitung hanya pada daerah dengan nomor 3 dengan bidang hitung (1+2+3+4+5) seperti yang tersaji pada Gambar 3.3



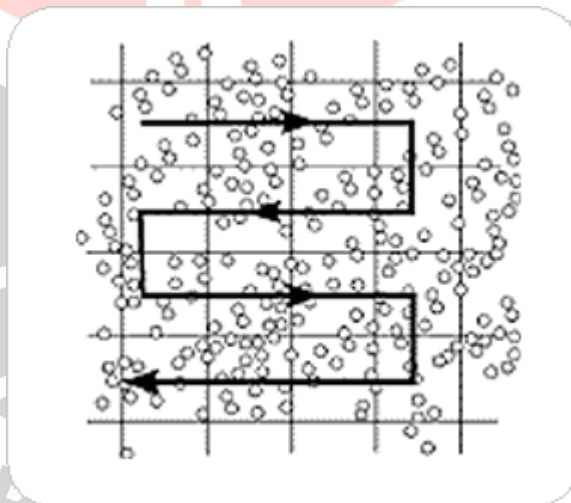
Gambar 3.3 *Haemocytometer* yang Diamati dengan Menggunakan Mikroskop (Sumber : Janice, 2010)

Pada daerah dengan nomor tiga terdapat 25 kotak. Dari 25 kotak tersebut dipilih lima kotak saja yang dijadikan tempat perhitungan spora *M. purpureus*, yaitu kotak A, B, C, D dan E. Seperti yang tersaji dalam Gambar 3.4



Gambar 3.4 Titik Perhitungan Spora
(Sumber: <http://www.vivo.colostate.edu>)

Setiap kotak A, B, C, D memiliki enambelas kotak kecil.
Perhitungan spora seperti yang terdapat pada Gambar 3.5



Gambar 3.5 Alur Perhitungan Spora
(Sumber: <http://www.celeromics.com>)

Setelah didapat jumlah spora, lalu dihitung jumlah spora/ml pada bidang hitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$S = \frac{X}{L (\text{mm}^2) \times t (\text{mm}) \times d} \times 10^3$$

Keterangan :

S: Jumlah spora/mL

X: Jumlah spora yang dihitung (A, B, C, D, E)

L: Luas kotak hiting ($0,04 \times 5 = 0,2 \text{ mm}^2$)

T: Kedalaman bidang hiting (0,1 mm)

d: Faktor pengenceran

10^3 : Volume suspensi yang diambil ($1 \text{ ml} = 10^3 \text{ mm}^3$)

(Sumber : Tim QC APH Golongan Jamur)

4. Pembuatan Tepung Biji Nangka

Biji nangka yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji nangka dari varietas buah nangka salak, yang diperoleh dari pasar induk di kota Bandung, Jawa Barat. Buah nangka yang sudah masak dikupas dan diambil bijinya. Kemudian biji nangka dilakukan pencucian dengan tujuan untuk menghilangkan lendir, lalu direbus selama 15 menit kemudian dilakukan pengupasan kulit arinya, dan kemudian dikeringkan di oven pada suhu $60-100^{\circ}\text{C}$ selama 4 jam atau dijemur di bawah terik matahari. Hal ini bertujuan untuk menurunkan kadar air. Setelah biji kering, biji dihaluskan sampai menjadi tepung dan diayak (Arna Diah 2011).



Gambar 3.6 Tepung Biji Nangka

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Tepung kemudian ditimbang dengan menggunakan timbangan digital, dengan berat 10 gr untuk setiap botol fermentasi. Setiap botol fermentasi kemudian ditambahkan 4 mL larutan nutrisi steril yang mengandung (dalam gr/L) 2 gr KH_2PO_4 , 5 gr NH_4NO_3 , 1 gr NaCl, dan 1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Selain itu, pH substrat diatur hingga mencapai 6 dan kelembaban substrat diatur hingga mencapai 65% dengan menambahkan aquades steril. Kemudian botol ditutup dengan aluminium foil (Babitha, 2006).

5. Persiapan Suspensi Spora *Monascus purpureus*

Suspensi spora *M. purpureus* dibuat dengan cara mengikis spora *M. purpureus* dari kultur yang berusia enam hari yang telah ditambah 9 mL aquades steril. Suspensi yang didapat kemudian divorteks hingga homogen.

Penentuan konsentrasi dibuat berdasarkan perbandingan konsentrasi dengan banyak substrat yang digunakan. Untuk konsentrasi 0%, substrat fermentasi tidak ditambahkan suspensi spora *M. purpureus*. Untuk konsentrasi 5 % (v/b), 10 gr substrat diinokulasikan dengan 0,5 mL suspensi spora *M. purpureus*.

Untuk konsentrasi 10 % (v/b), 10 gr substrat diinokulasikan dengan 1 mL suspensi spora *M. purpureus*. Untuk konsentrasi 15 % (v/b), 10 gr substrat diinokulasikan dengan 1,5 mL suspensi spora *M. purpureus*.

6. Analisis Kandungan Amilum dan Protein pada Tepung Biji Nangka

Analisis kandungan amilum dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan, Universitas Padjadjaran. Metode yang digunakan untuk menganalisis kandungan amilum adalah metode Luff-Schoorl, sedangkan untuk analisis kandungan protein dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan, Universitas Pasundan. Metode yang digunakannya adalah metode Kjeldahl

c. Tahap Penelitian

1. Fermentasi *Monascus purpureus* pada Substrat tepung Biji Nangka

Substrat yang telah disterilkan dibiarkan hingga suhunya turun mencapai suhu ruangan. Lalu diinokulasikan dengan suspensi spora *M. purpureus* yang jumlah sporanya 10^6 spora/mL dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, dan 15%. Botol fermentasi ditutup dengan kertas alumunium foil steril agar tidak terjadi kontaminasi. Fermentasi akan dilakukan pada suhu 30-32°C selama 14 hari dalam kondisi statis (Carvalho, 2007). Kondisi fermentasi tersaji dalam Gambar 3.7.



Gambar 3.7 Kondisi Fermentasi
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

2. Pengukuran Absorbansi Pigmen *Monascus purpureus*

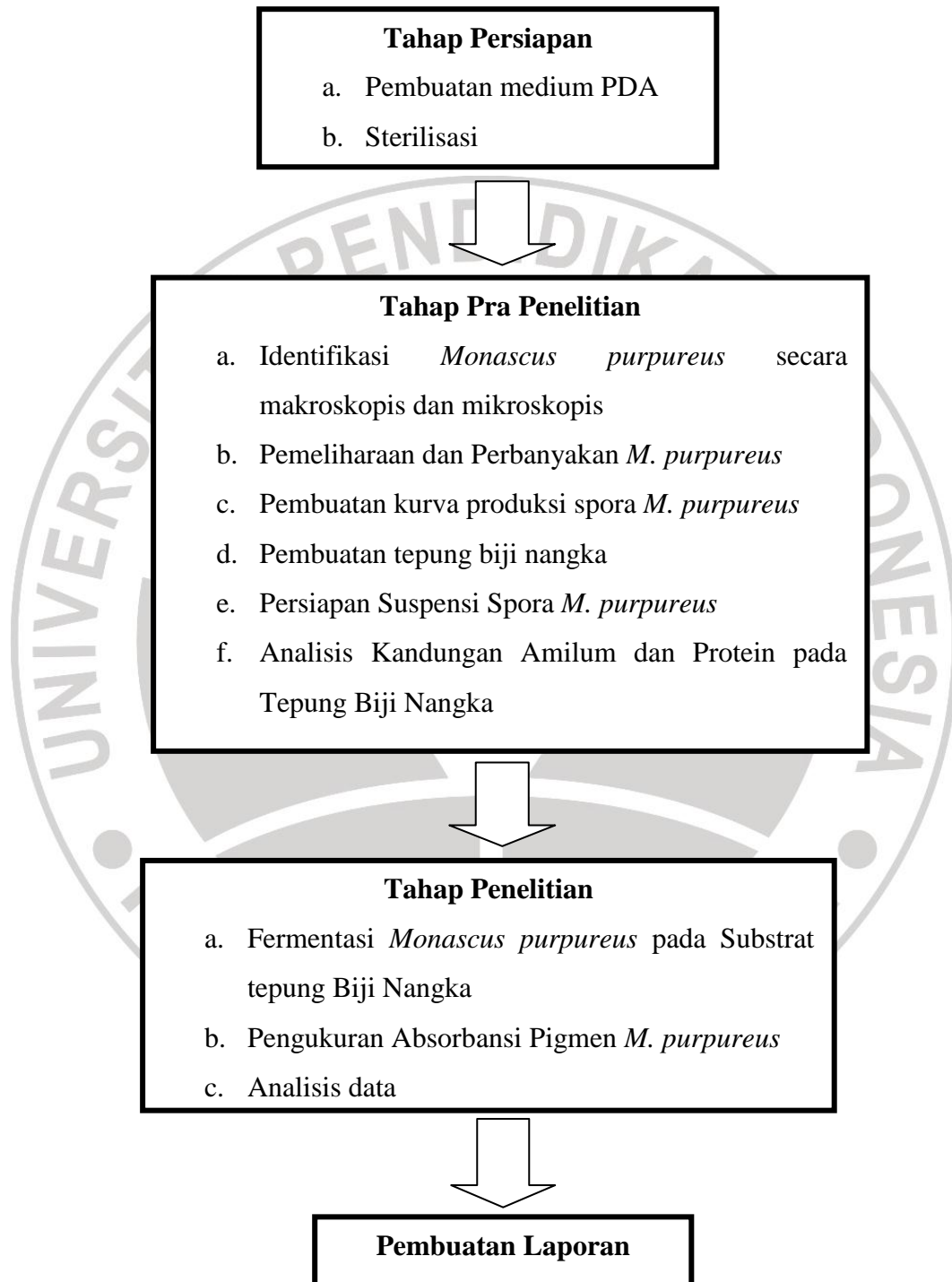
Pengukuran pigmen dilakukan setiap dua hari sekali, Pigmen yang diukur dalam penelitian ini meliputi pigmen merah (*Monaskorubramin*, *Rubropunktamin*), pigmen kuning (*Monascin*, *Ankaflavin*), dan pigmen jingga (*Rubropunktatin*, *Monaskorubrin*). Penghitungan asorbansi pigmen dilakukan dengan cara mengambil 1 gram sampel yang telah dikeringkan terlebih dahulu. Lalu ditambahkan dengan 5 ml ethanol 95%, kemudian dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit, supernatan dimasukkan ke dalam tabung cuvet dan diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm untuk pigmen merah, 400 nm untuk pigmen kuning dan 470 untuk pigmen jingga. Sebelumnya spektrofotometer dikalibrasi dengan menggunakan ethanol 95% sebagai blankonya (Pattanagul, 2007).

3. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa nilai absorbansi pigmen *M. purpureus*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *software* SPSS 16.0 *for Window*. Sebelum melakukan analisis parametrik atau nonparametrik, data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas, didapatkan hasil bahwa data untuk pigmen merah *M. purpureus* terdistribusi normal dan homogen maka selanjutnya analisis data secara parametrik dengan menggunakan uji One-Way Anova. Sedangkan untuk data pigmen kuning tidak terdistribusi normal namun homogen dan pigmen jingga tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka selanjutnya analisis data secara nonparametrik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Selanjutnya dilakukan pengujian lanjutan untuk melihat perbandingan rata-rata setiap konsentrasi terhadap kontrol dengan menggunakan uji Dunnet T3 untuk pigmen merah dan uji Mann-Whitney untuk pigmen kuning dan jingga.

G. Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 3.8 Alur Penelitian