

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*) dan kondisi tersebut dibuat dan diatur. Penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi abjek penelitian serta adanya kontrol sebagai perbandingan dalam eksperimen (Nazir, 2003).

Objek dalam penelitian ini adalah produksi pigmen merah, kuning, dan jingga yang dihasilkan oleh *M. purpureus* dan dinyatakan dalam satuan Unit Absorbansi per gram substrat. Kontrol dalam penelitian ini yaitu substrat tepung kulit singkong yang tidak diberi inokulum spora *M. purpureus*.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian ini terdapat dua variabel penelitian yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Produksi pigmen merah, kuning, dan jingga oleh *M. purpureus* merupakan variabel terikat dalam penelitian ini. Sedangkan konsentrasi inokulum *M. purpureus* menjadi variabel bebasnya.

Terdapat 4 perlakuan dalam penelitian ini yaitu inokulum *M. purpureus* pada konsentrasi 0%, 5%, 10%, dan 15%. Pengulangan dilakukan untuk masing-masing konsentrasi dengan mengikuti rumus (Gomez, 1995), dengan t adalah perlakuan (*treatment*) sedangkan r adalah pengulangan (*replication*). Berdasarkan rumus, maka dapat diperoleh jumlah replikasi dengan perhitungan sebagai berikut:

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

$$(4) (r-1) \geq 20$$

$$(r-1) \geq 5$$

$$r \geq 6$$

Tabel 3.1 Desain Rancangan Penelitian

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	87	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	151	168	165	116	86	149	96	81	163	64

Keterangan:

Konsentrasi 0%= botol no.1-42

Konsentrasi 5%= botol no.43-84

Konsentrasi 10%= botol no.85-126

Konsentrasi 15%=botol no.127-168



Gambar 3.1. Penempatan Fermentor pada Inkubator

(Sumber: Dokumentasi pribadi)

Banyaknya pengulangan berdasarkan perhitungan di atas adalah sebanyak enam kali. Oleh karena itu, terdapat 24 unit percobaan dalam penelitian ini yang diletakkan secara acak. Pada masing-masing unit percobaan, terdapat 7 unit percobaan lagi yang dibedakan berdasarkan waktu pemanenan, yaitu pada hari ke 1,3,5,7,9,11, dan 13. Hal tersebut dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada substrat fermentasi. Penyusunan unit percobaan dilakukan mengikuti bilangan acak yang diperoleh dengan menggunakan Microsoft Excel. Unit rancangan disusun seperti pada tabel 3.1 di atas.

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah substrat tepung kulit singkong yang terdapat pada 168 botol fermentor. Sampel pada penelitian ini berupa 1 gram substrat tepung kulit singkong dari masing-masing botol fermentor yang telah diinkubasi selama 14 hari untuk pengukuran pigmen yang dihasilkan oleh *M. Purpureus*.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan bulan Mei di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Tabel 3.2 Alat-Alat

No.	Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	HL36AE	1 unit
2.	Jarum inokulasi		3 unit
3.	Tabung reaksi	Pyrex	25 unit
4.	Timbangan digital	PT25.221.03.018BF	1 unit
5.	Gelas ukur	Pyrex, 250 mL	1 unit
6.	Vorteks homogenizer	PT25.221.03.044BM	1 unit
7.	Shaker	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	40 lembar
11.	Karet gelang		50 buah
13.	pH indikator		1 pack
14.	Kapas sumbat		60 buah
15.	Haemocytometer		1 buah
16.	Inkubator		1 unit
18.	Erlenmayer	Pyrex 100 mL	1 buah
19.	Termometer	0-100°C	1 buah
20.	Wadah plastik		1 buah
21.	Mikroskop Listrik	Shimadzu BI-71-16126	1 unit
22.	Spatula		4 buah
23.	Pembakar spirtus		1 buah
24.	Korek api		1 kotak
25.	Batang pengaduk		1 buah
26.	Botol gelas ukuran 1 L		1 buah
27.	Papan miring		1 unit
28.	Hot plate & magnetic stirrer	PT25.221.03.023 BM (1/2)	1 unit
29.	Botol fermentasi		168 buah

Tabel 3.3 Bahan-Bahan

No.	Bahan	Jumlah
1.	Isolat <i>Monascus purpureus</i>	1 isolat
2.	Tepung kulit singkong	1680 gr
3.	Nacl	0,5 gr
4.	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 gr
5.	KH ₂ PO ₄	1 gr
6.	NH ₄ NO ₃	2,5 gr
7.	Platik tahan panas	1 pack
8.	Kertas saring	1 pack
9.	Medium PDA	100 mL
10.	Ethanol 95%	3600 mL
11.	Aquades steril	1000 mL

F. Prosedur Kerja

a. Tahap Persiapan

1. Pembuatan Medium PDA

Monascus purpureus ditumbuhkan dalam medium PDA yang dibuat dengan cara mencampurkan bubuk PDA dengan aquades sesuai standar yang telah ditentukan. Untuk 1 liter aquades dibutuhkan 3,9 gram bubuk PDA. Campuran bubuk PDA dan aquades kemudian di aduk menggunakan *magnetic stirer* dan dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih.

2. Sterilisasi

Semua alat dan bahan yang tahan terhadap panas disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk alat-alat yang tidak tahan terhadap panas disterilkan menggunakan alkohol 70%.

b. Tahap Pra Penelitian

1. Identifikasi *Monascus purpureus*

Pada Penelitian ini, isolat *M. purpureus* diperoleh dari SITH Institut Teknologi Bandung. Isolat kemudian dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

Depy Afiandiningsih, 2013

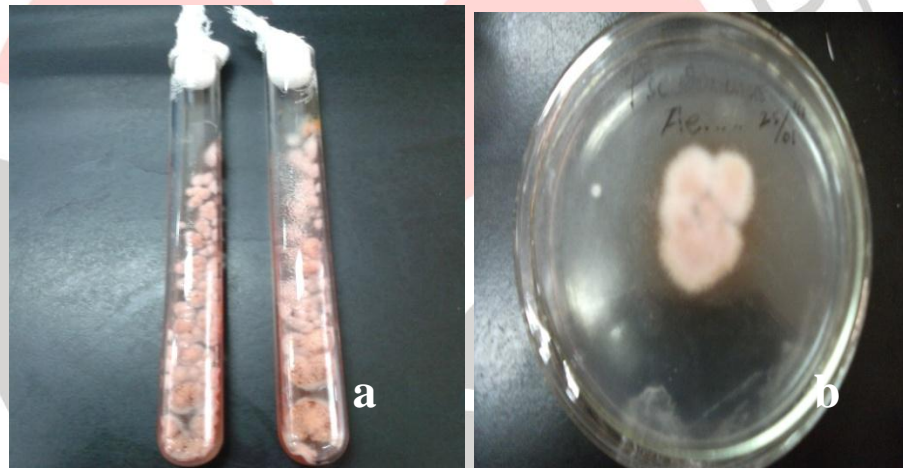
Pengaruh Konsentrasi Inokulum (*Monascus purpureus*) Terhadap Produksi Pigmen Pada Substrat Tepung Kulit Singkong (*Manihot esculenta*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

M. purpureus diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati bentuk koloni dan hifa dari *M. purpureus*. Sedangkan identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk hifa, spora, kleistotesia, dan aleurokonidia *M. purpureus* di bawah mikroskop. Sebelumnya, *M. purpureus* dibiakkan dengan menggunakan *slide culture*.

2. Pemeliharaan dan Perbanyakkan *Monascus purpureus*

Isolat *M. purpureus* yang diperoleh dari SITH ITB kemudian dibiakkan dan disimpan pada inkubator suhu 4°C. Kapang yang digunakan untuk penelitian disimpan pada inkubator suhu 30-31°C.

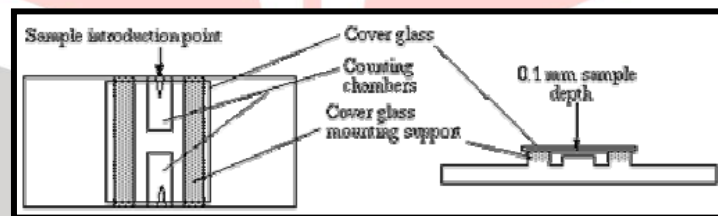


Gambar 3.2 Isolat *Monascus purpureus* pada PDA miring (a) dan Cawan Petri (b).
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

3. Pembuatan Kurva Produksi Spora *Monascus purpureus*

Sebelum ke tahap penelitian, kurva produksi spora *M. purpureus* perlu dibuat untuk mengetahui jumlah spora yang diproduksi. Setelah terbentuk kurva, kemudian dapat diketahui pada hari beberapa produksi spora *M. purpureus* yang terbanyak. Pembuatan kurva produksi spora dimulai dengan menumbuhkan isolat *M. purpureus* pada cawan Petri secara aseptik kemudian di simpan pada inkubator suhu 30-31°C. Setelah hari ke-6, koloni *M. purpureus* yang tumbuh di

cawan Petri kemudian di ambil menggunakan pelubang gabus berdiameter 0,6 mm. Potongan-potongan miselium kemudian diinokulasikan pada PDA miring dalam tabung reaksi lalu diinkubasi pada suhu 30-31°C. Jumlah spora diamati setiap hari dengan cara memasukkan 9 mL aquades steril ke dalam PDA miring (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009). Spora dilepaskan dengan cara mengeruknya secara perlahan menggunakan jarum ose sehingga diperoleh suspensi spora. Setelah itu dihomogenkan dengan menggunakan vorteks dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi kosong, lalu dipipet dan diteteskan pada bidang hitung *haemocytometer*. Setelah itu, ditutup menggunakan gelas penutup, seperti Gambar 3.3.

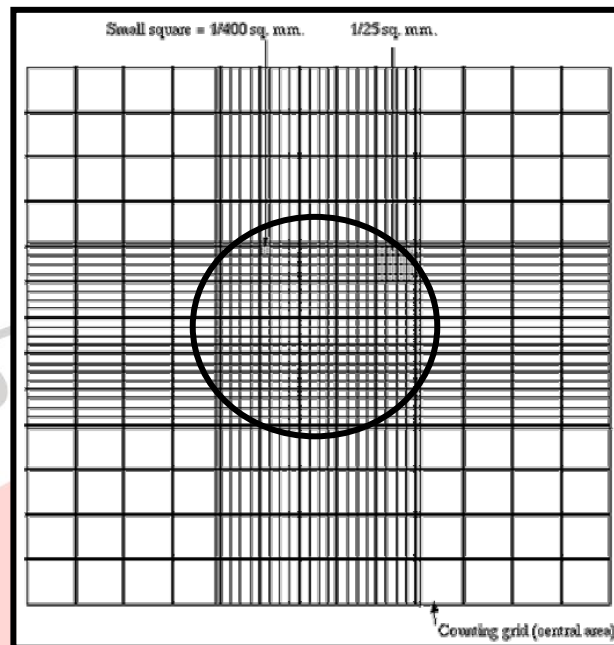


Gambar 3.3 Penutupan *Haemocytometer* dengan Gelas Penutup.

(Sumber: <http://weis.science.oregonstate.edu/>)

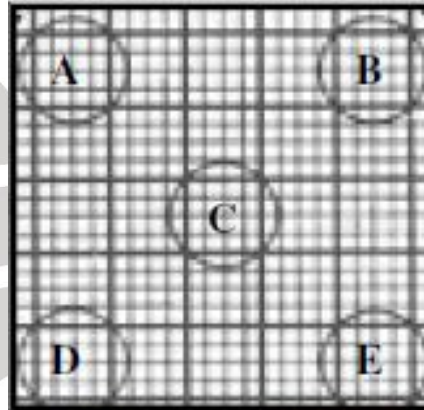
Haemocytometer ditaruh dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x hingga didapat bidang hitung seperti yang terlihat pada Gambar

3.4



Gambar 3.4 *Haemocytometer* yang Diamati Menggunakan Mikroskop.

(Sumber: <http://weis.science.oregonstate.edu/>)



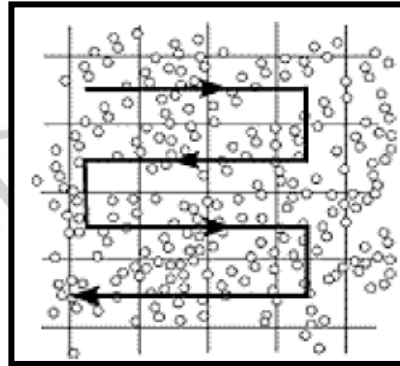
Gambar 3.5 Kotak Penghitungan Spora *Monascus purpureus*.

(Sumber: <http://www.ilri.org>)

Spora yang dihitung hanya yang terletak pada kotak hitung (A + B + C + D + E) dengan perbesaran 400 \times . Penghitungan spora hanya di daerah bertanda lingkaran seperti yang tersaji dalam Gambar 3.5

Dalam daerah yang diberi tanda lingkaran itu seperti pada Gambar 3.4, terdapat 25 persegi. Dari ke-25 persegi itu, dipilih lima kotak saja

untuk dijadikan tempat menghitung spora, yaitu kotak A, B, C, D dan E. Setiap kotak A, B, C, D, E memiliki empat kotak kecil. Perhitungan spora mengikuti aturan seperti yang dijelaskan dalam Gambar 3.5.



Gambar 3.6 Alur Penghitungan Spora *Monascus purpureus*

Setelah didapatkan jumlah spora *Monascus purpureus* pada kotak hitung A, B, C, D dan E, lalu dihitung jumlah spora/ml pada bidang hitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

S: Jumlah spora/mL

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

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

t: Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d: Faktor pengenceran

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

(Sumber: Modifikasi dari Tim QC APH Golongan Jamur dan Hadioetomo, 1993)

4. Pembuatan Tepung Kulit Singkong

Kulit singkong yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari daerah Cidadap, Lembang, Kabupaten Bandung. Kulit singkong yang

digunakan dalam pembuatan tepung kulit singkong adalah bagian dalam dari jenis singkong Adira 1 yang dipanen saat berumur 7-8 bulan. Pembuatan tepung kulit singkong dapat dilakukan dengan cara yang mudah dan menggunakan alat yang sederhana. Singkong diambil kulit bagian dalamnya lalu dicuci sampai bersih. Setelah proses pencucian, kulit singkong kemudian dipotong hingga ukurannya kecil agar lebih mudah pada saat perendaman dan penjemuran (Nebiyu *et al.*, 2011). Proses penjemuran dilakukan dibawah sinar matahari selama 48 jam (Nebiyu *et al.*, 2011). Kulit singkong yang sudah kering lalu dihancurkan hingga menjadi tepung kemudian diayak menggunakan saringan.



Gambar 3.7 Tepung kulit singkong setelah diayak. (Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Selanjutnya, tepung kulit singkong ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 10 gram dan disesuaikan kadar pH yaitu 5-6. Kemudian substrat tersebut ditambahkan 4 mL larutan nutrisi yang mengandung (dalam gr/L): 2 gr KH_2PO_4 , 5 gr NH_4NO_3 , 1 gr NaCl , dan 1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Babitha *et al.*, 2006). Sumber nitrogen didapat dari NH_4NO_3 , KH_2PO_4 dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ merupakan sumber mineral-

mineral yang berguna sebagai kofaktor dalam proses enzimatik. Sedangkan sumber garam didapat dari NaCl. Selain itu, kelembaban substrat ini diatur hingga mencapai 65% dengan menambahkan sejumlah aquades (Babitha *et al.*, 2006). Setelah semua selesai, setiap botol fermentasi ditutup dengan aluminium foil dan siap untuk disterilisasi di autoclave.

5. Persiapan Inokulum Spora *M. purpureus*

Pembuatan inokulum spora *M. purpureus* untuk fermentasi dibuat dengan cara mengeruk spora dari kultur *M. purpureus* yang berusia enam hari dengan jarum ose kemudian ditambahkan 9 ml aquades hingga terbentuk suspensi spora. Suspensi spora yang telah dibuat kemudian divorteks hingga homogen dan dihitung jumlah sporanya menggunakan *haemocytometer* hingga dalam setiap mL aquades mengandung $6,12 \times 10^6$. Salah satu syarat inokulum adalah terdapat dalam jumlah optimal. Jumlah minimal sel hidup dalam inokulum adalah 10^6 . Untuk konsentrasi inokulum 0%, substrat tepung kulit singkong tidak diinokulasikan dengan suspensi spora *M. purpureus*. Untuk konsentrasi 5%, substrat tepung kulit singkong sebanyak 10 gr diinokulasikan dengan 0,5 ml suspensi spora, Untuk konsentrasi 10%, substrat tepung kulit singkong sebanyak 50 gr diinokulasikan dengan 1 ml suspensi spora. Sedangkan untuk konsentrasi 15%, substrat tepung kulit singkong sebanyak 10 gr diinokulasikan dengan 1,5 ml suspensi spora. Perhitungan banyaknya suspensi spora ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$S = KS \times W_{\text{tepung kulit singkong}}$$

Keterangan:

S= Suspensi Spora

KS= Konsentrasi Spora

W_{substrat} = Berat substrat tepung kulit singkong (Musaalbakri, 2005)

6. Analisis Kandungan Amilum dan Protein Tepung Kulit Singkong

Analisis kandungan karbohidrat dan protein dilakukan di Laboratorium Kesehatan dan Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran. Metode yang digunakan untuk menganalisis kandungan karbohidrat adalah *Luff Schoorl*. Sedangkan metode yang digunakan untuk menganalisis kandungan protein adalah metode *Kjedahl*.

c. Tahap Penelitian

1. Fermentasi *M. purpureus* pada Substrat Tepung Kulit Singkong

Substrat tepung kulit singkong yang telah steril kemudian dikeluarkan dari autoclave dan dibiarkan hingga suhunya turun mendekati suhu ruang. Setelah itu, substrat tepung kulit singkong diinokulasikan dengan suspensi spora *M. purpureus* dengan konsentrasi inokulum yang meliputi 0%, 5%, 10% dan 15%. Botol ditutup dengan tujuan agar tidak terjadi kontaminasi. Fermentasi dilakukan pada suhu 30-31°C selama 14 hari dalam kondisi statis.

2. Sampling Substrat Fermentasi

Sampling substrat tepung kulit singkong dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, 7, 9, 11, dan hari ke-13 fermentasi. Substrat fermentasi kemudian dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ (Dikshit, R *et al.*, 2012).

3. Ekstraksi dan Penghitungan Absorbansi Pigmen Merah

Ekstraksi pigmen dalam substrat tepung kulit singkong dilakukan dengan cara melarutkan 1 gram sampel substrat fermentasi kedalam 5 ml ethanol 95% kemudian dikocok dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam (Babitha, S *et al.*, 2006). Setelah itu, hasil ekstraksi kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000rpm selama 15 menit hingga didapat supernatannya (Dikshit, R *et al.*, 2012). Supernatan kemudian dimasukkan ke dalam tabung cuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang tertentu. Panjang gelombang yang digunakan

adalah 500 nm untuk pigmen merah, 470 nm untuk pigmen jingga, dan 400 nm untuk pigmen kuning (Pattanagul, 2007).



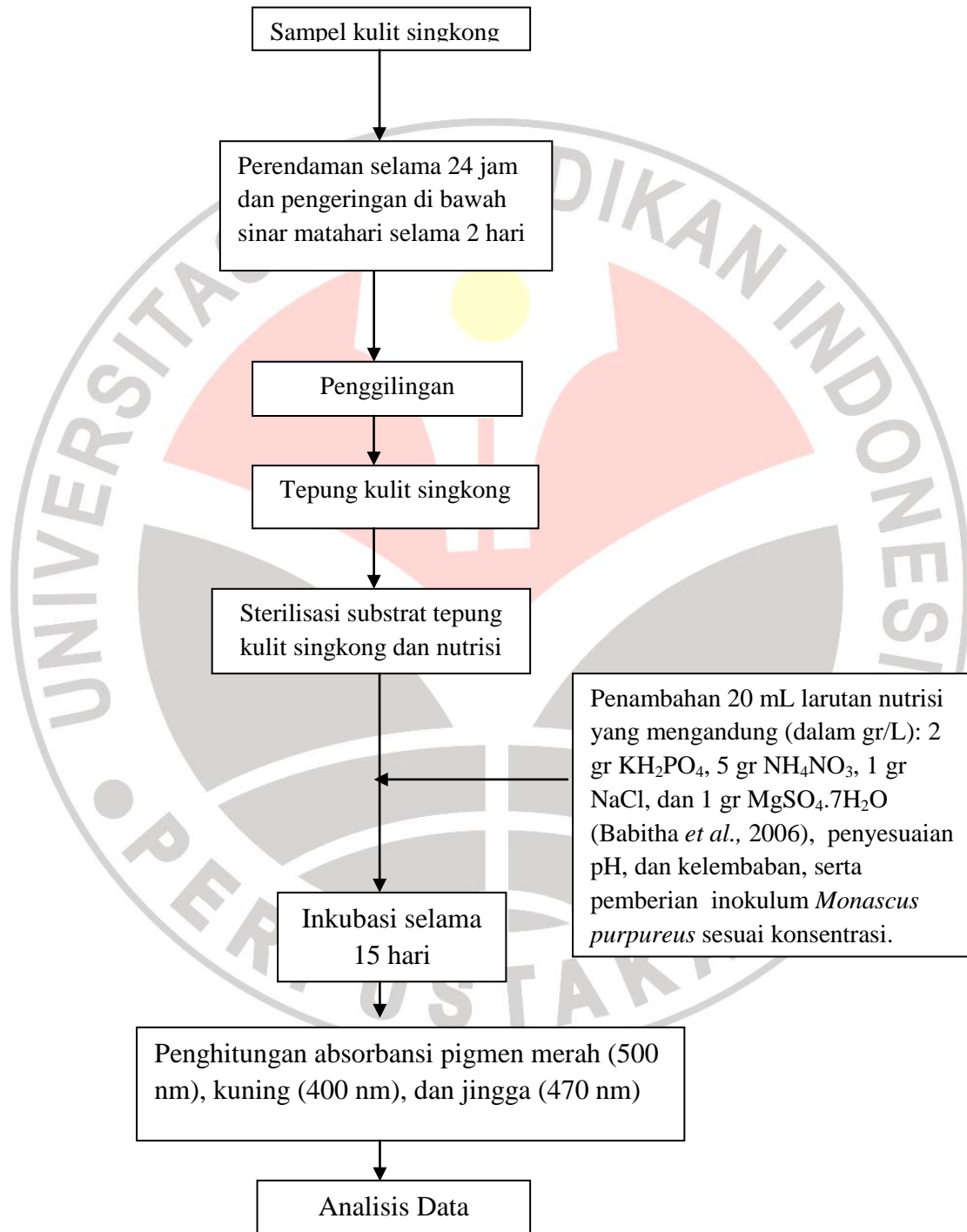
Depy Afiandiningsih, 2013

Pengaruh Konsentrasi Inokulum (*Monascus purpureus*) Terhadap Produksi Pigmen Pada Substrat Tepung Kulit Singkong (*Manihot esculenta*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

G. Alur Penelitian

Penelitian ini mempunyai alur penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.8 Alur Penelitian