

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

- Waktu : Bulan Februari – April 2001
- Tempat : Isolasi dan identifikasi Ragi Tape, dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi F. MIPA UNDIP.
Analisis kimia produk fermentasi (tape ketan) dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan UGM.

B. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat-alat

Tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, timbangan, botol sampel, batang pengaduk, sendok plastik, ose ujung tumpul, ose ujung runcing, aluminium foil, kapas, kertas saring, penyaring vacuum, cawan petri, drop pipet, pipet ukur, pipet tetes, gelas benda, gelas penutup, mikroskop, mikrometer, cawan porselin, labu erlenmeyer, labu ukur, autoklaf, inkubator, oven, vortex, kompor listrik, “laminair air flow”, corong gelas, lemari pendingin, pendingin balik (refluks), pH stik, beaker glass, water bath, termometer, cawan conway.

2. Bahan

a. Medium taoge ekstrak agar (TEA)

- | | |
|------------------------|-------------------|
| - 50 g taoge | - 30 g sukrosa |
| - 7,5 g agar | - 500 cc aquadest |
| - 50 mg Chloramfenikol | - HCl 1 N |

b. Medium wortel miring

- wortel
- aquadest

c. Medium untuk pengamatan morfologi kapang dan khamir, serta medium pewarnaan / pengecatan spora khamir

- laktofenol
- cat biru metilen 0,01 %
- larutan cat anilin crystal violet (cat A)
- larutan cat safranin (cat B)
- larutan alkohol asam 3 % (ZN B)

d. Bahan untuk analisis kimia produk fermentasi (tape ketan)

Tape ketan, aquadest, reagen Nelson, arsenomolibdat, glukosa standart, indikator fenoltalin 1 %, NaOH 0,02 N, NaOH 45 %, HCl 25%, kalium bikromat asam sulfat, kalium karbonat jenuh, etanol standart.

C. Cara Kerja

1. Persiapan

- a. Pencucian alat: alat-alat dari gelas dicuci dengan deterjen, kemudian di bilas dengan air mengalir sampai bersih.
- b. Sterilisasi alat: alat-alat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160 – 180 °C selama 2 – 3 jam.

2. Pembuatan Medium TEA (Taoge Ekstrak Agar)

- Taoge direbus dengan aquadest sampai mendidih selama \pm 2 jam sambil sesekali ditambah air jika volumenya menyusut.
- Disaring, kemudian ditambahkan sukrosa (gula pasir) dan agar.

- Direbus kembali sampai semua gula larut dan ditambahkan aquadest yang hilang, karena penguapan sampai volume 500 ml.
- pH medium diatur menjadi 5, dengan menambahkan setetes demi setetes HCl 1 N. Pengecekan menggunakan pH stik.
- Medium dimasukkan dalam erlenmeyer dan tabung reaksi, disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah steril, medium yang ada pada tabung reaksi diletakkan miring, setelah menjadi padat medium siap digunakan.

3. Pembuatan Medium Wortel Miring (medium alami untuk menumbuhkan spora khamir)

Wortel dibuat silinder dengan bur gabus, lalu direndam dalam aquades selama 3 menit, dipotong melintang terhadap sumbu silinder, dimasukkan dalam tabung reaksi dengan pinset, dan disterilkan pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Pembuatan Tape Ketan.

- Beras ketan dicuci, direndam 12 jam, kemudian ditiriskan.
- Beras bersih dikukus selama 1 jam sehingga didapat beras masak, kemudian didinginkan pada suhu ruang dengan jalan diangin-anginkan.
- Ditimbang masing-masing 200g ketan, ditempatkan pada kantong plastik sebanyak 18 kantong, 9 kantong diinokulasi dengan 0,3g ragi tape A dan sisanya diinokulasi dengan 0,3g ragi tape B.
- Diinkubasi selama 2, 4, dan 6 hari.

5. Isolasi Mikrobial Ragi Tape

- 1 gram bubuk ragi diencerkan dengan 9 ml aquadest (10^{-1}), kemudian dibuat suatu seri pengenceran dengan kelipatan 10 secara bertingkat.
- Larutan hasil pengenceran diambil 1 ml, dimasukkan pada petridish yang berisi beberapa tetes larutan chloramfenikol, kemudian dituangi TEA.
- Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 29°C .
- Isolasi mikrobial ragi tape dilakukan dengan memindahkan koloni kapang dan khamir yang berbeda pada cawan penaburan ke dalam medium TEA miring secara aseptik serta diinkubasi selama 48 jam pada suhu 29°C untuk mendapatkan biakan murni.
- Biakan murni khamir yang diperoleh, ditanam pada medium wortel miring untuk menumbuhkan askospora khamir

6. Pengecatan Spora Khamir

Metode pengecatan spora bertujuan untuk memberi warna kontras antara spora dengan bagian sel yang lain. Pada pengecatan ini badan sel akan berwarna merah, sedangkan spora tampak kebiruan. Prosedur pengecatan adalah sebagai berikut (Jutono, 1972):

- Biakan murni khamir yang ditanam pada medium wortel miring selama 7-14 hari, disuspensikan dalam aquadest, kemudian diambil satu ose dan diratakan di atas gelas benda seluas 1 cm^2
- Preparat dikering anginkan, setelah kering difiksasi dengan melewati preparat selama 5 – 7 kali di atas nyala lampu spiritus
- Noda ditetesi dengan larutan cat A (anilin crystal violet), selama 3 menit

sambil dipanaskan agar cat benar-benar masuk ke dalam spora khamir.

- Dicuci dengan air mengalir.
- Kemudian dilunturkan dengan menggunakan larutan alkohol asam (ZN B).
- Dicuci kembali dengan air mengalir dan dikering anginkan.
- Ditetesi larutan cat B (safranin) selama 10-15 detik.
- Dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan.
- Diamati dengan mikroskop perbesaran kuat menggunakan minyak emersi.

7. Identifikasi Khamir.

- Isolat khamir dalam medium TEA disuspensikan dalam cat biru metilen 0,01 %, dibuat preparat pada gelas benda, diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran lemah sampai kuat (1000X).
- Preparat khamir (dari medium wortel) yang sudah dilakukan pengecatan spora, diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran lemah sampai kuat (1000 X).
- Diamati bentuk sel vegetatif, cara reproduksi vegetatif, bentuk dan jumlah askospora dalam askus, serta ciri-ciri khusus lainnya, dan diidentifikasi menuju tingkat genus dengan panduan identifikasi khamir menurut van-Rij (1984).
- Uji biokimia (asimilasi nitrat dan fermentasi glukosa) dilakukan sebagai kriteria penentuan genus khamir (van-Rij, 1984)

8. Identifikasi Kapang.

- Isolat kapang disuspensikan dalam larutan laktofenol, dibuat preparat pada gelas benda, preparat kapang diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran lemah sampai sedang (Jutono dkk., 1980)

- Diamati bentuk hifa, spora seksual, spora aseksual, badan buah, dasar badan buah, tangkai (pendukung) badan buah, dan adanya bentuk-bentuk khusus, kemudian diidentifikasi menuju tingkat genus dengan panduan identifikasi kapang menurut Samson, dkk. (1981).

9. Pemeriksaan Kadar Pati dilakukan dengan Metode Hidrolisis Asam (Suhardi dan Sudarmadji, 1996)

- 10 gram tape ketan yang sudah dihancurkan, diencerkan dengan aquadest sampai volume 250 ml.
- Suspensi disaring dengan penyaring vacuum.
- Residu dicuci dengan aquadest untuk melarutkan gula reduksi yang mungkin masih tersisa.
- Residu pada kertas saring dicuci dengan eter 3 kali @ 10 ml, dan dibiarkan eter tersebut menguap untuk menghilangkan kandungan lemak pada bahan.
- Residu dicuci lagi dengan alkohol 10 % sebanyak 50 ml, untuk membebaskan karbohidrat yang terlarut.
- Residu dari kertas saring dipindahkan dalam erlenmeyer 250 ml, ditambah 200 ml aquadest dan 20 ml larutan HCl 25 %.
- Ditutup dengan pendingin balik dan dipanaskan diatas penangas air mendidih selama 2,5 jam.
- Didinginkan dengan air kran dan dinetralkan dengan larutan NaOH 45 % dengan indikator fenolptalin.
- Diencerkan sampai maximal mengandung gula reduksi 0,1 mg/ml

- Ditentukan kadar gulanya yang dinyatakan sebagai glukosa. Penentuan glukosa dengan metode Nelson Somogyi. Berat glukosa dikalikan dengan 0,9 dan merupakan berat pati.

10. Pemeriksaan Kadar Gula Reduksi dilakukan dengan Metode Nelson Somogyi (Suhardi dan Sudarmadji, 1996)

- Tape ketan ditimbang sebanyak ± 10 g, kemudian dihancurkan dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 250 ml.
- Diambil sebanyak 1 ml filtrat, diencerkan sampai 100 ml.
- Filtrat yang telah diencerkan diambil 1 ml, dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml reagen Nelson.
- Dipanaskan dalam air mendidih "water bath" selama 20 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar.
- Ditambahkan 1 ml reagen Arsenomolibdat, dikocok dengan vortex hingga tercampur rata.
- Ditambah 7 ml air suling, dan kembali dikocok dengan vortex, kemudian diukur absorbansinya atau Optical Densitynya pada λ 540 nm
- Konsentrasi gula reduksi sampel ditentukan dari kurva standar glukosa yang dibuat dengan konsentrasi 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; dan 0,1 mg/ml.

11. Pemeriksaan Kadar Etanol/ Alkohol dilakukan dengan Metode Mikro Conway (Taguchi, 1976)

- Dipersiapkan cawan Conway yang akan dipakai.

- Dimasukkan 1 ml larutan Kalium bikromat asam sulfat di ruang bagian tengah cawan, kemudian 1 ml larutan Kalium karbonat jenuh (K_2CO_3), dan 1 ml sampel yang sudah diencerkan pada ruang bagian tepi kanan dan kiri cawan.
- Ditutup dan dirapatkan dengan vaselin.
- Cawan digoyangkan hingga larutan K_2CO_3 dan sampel tercampur baik.
- Diinkubasi pada suhu $37\text{ }^\circ\text{C}$ selama 2 jam hingga terjadi perubahan warna pada larutan Kalium bikromat asam sulfat, yang menunjukkan adanya alkohol.
- Larutan Kalium bikromat asam sulfat diambil dengan drop pipet, ditambah aquadest untuk membilas agar semua terambil, dimasukkan dalam labu ukur 10 ml, ditambahkan aquadest sampai tanda.
- Diukur transmitansinya dengan spektrometer pada λ 470 nm.
- Dibuat kurva standar etanol dengan konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg/ml. Kadar etanol sampel dapat ditentukan dari kurva standar tersebut.

12. Pemeriksaan Total Asam (Suhardi dan Sudarmadji, 1996)

- 10 gram tape ketan yang sudah dihaluskan, dilarutkan dalam labu ukur dengan penambahan aquades sampai volume 250 ml.
- Disaring, filtrat dikembalikan pada volume 250 ml.
- Filtrat diambil 25 ml dan ditambah indikator PP 1 %.
- Dititrasi dengan larutan NaOH 0,02 N standar sampai berubah warna menjadi merah muda (tidak kurang dari 30 detik).

- Kadar asam asetat dihitung dengan rumus:

$$\frac{(\text{ml} \times N) \text{ NaOH} \times \text{F. Pengenceran} \times \text{greg As. Asetat}}{\text{Berat bahan (mg)}} \times 100\%$$

13. Penentuan Kadar Air (Suhardi dan Sudarmadji, 1996)

- Ditimbang botol sampel kosong yang telah dikonstankan pada suhu 105 °C (disebut a gram)
- Botol diisi dengan sampel (b gram)
- Dipanaskan dalam oven pada suhu 100 -- 105 °C sampai beratnya konstan (c gram), ditunjukkan dengan selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg. Maka kadar air = $(b - c / b - a) \times 100 \%$

D. Desain Penelitian dan Parameter Pengamatan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Faktorial (2 Faktor) dengan rancangan dasar RAL (Rancangan Acak Lengkap). Dua faktor yang dipakai yaitu jenis ragi tape dan lama waktu inkubasi (2, 4, dan 6 hari). Masing-masing kombinasi perlakuan dibuat 3 kali ulangan. Parameter yang diamati adalah: kadar pati, kadar gula reduksi, kadar alkohol, dan total asam.

E. Analisis Hasil Penelitian

Analisis data menggunakan Anova pada taraf uji 5 % dan dilanjutkan dengan penggunaan uji Duncan pada taraf uji 5 %. Model rancangan yang digunakan adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \Sigma_{ijk}$$



Dimana Y_{ijk} = Kadar pati, gula reduksi, alkohol, dan derajat keasaman tape ketan

μ = efek rata-rata

α_i = efek isolat ragi tape ke-i

β_j = efek waktu inkubasi ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efek interaksi antara isolat ragi tape ke-i dan waktu inkubasi ke-j

Σ_{ijk} = efek galat

(Gomez and Gomez, 1995)

