

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2020 sampai Januari 2022 di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, serta Laboratorium Kimia Universitas Nasional, Jalan Bambu Kuning, Pasar Minggu, Jakarta Selatan.

B. Instrumen penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan adalah cawan Petri, gelas piala, batang pengaduk, autoklaf, ose, spiritus, korek, tabung reaksi, pipet (gondok, volumetrik dan tetes), labu Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, *laminar air flow*, inkubator, *vortex*, lemari pendingin, baskom, oven, evaporator, kompor, panci, kain saring, neraca analitik, *rotary evaporator*, ayakan, spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sorgum (*Sorghum bicolor*) dengan merek Beras Putih Sorgum non-kupas, jamur *Clavulina vanderystii*, *Geastrum saccatum*, *Pleurotus* sp., *Polyporus gramocephalus*, dan *Polyporus* sp. 6 dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Nasional, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), kentang, teh hijau dengan merk kepala djenggot, *bacto* agar, akuades, etanol 70%, asam tanat, reagen Folin Ciocalteu, dan Na_2CO_3 , kapas, tisu, kertas samson, alumunium foil, parafilm.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengukuran pertumbuhan jamur, pH larutan perendam, waktu perendaman, dan konsentrasi tanin. Definisi operasional variabel dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)

No.	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Sumber	Satuan
1.	Jamur makro	Sumber kultur jamur yang digunakan sebagai starter fermentasi sorgum	Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika	-

No.	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Sumber	Satuan
2.	Pertumbuhan jamur pada medium PDA dan PTA	Diameter miselium jamur (d) yang tumbuh pada media PDA dan media PTA, ditentukan dengan mengukur diameter di dua arah pertumbuhan (vertikal, d1 dan horizontal, d2) dengan rumus $d = (d1 + d2)/2$	Pengamatan secara langsung	cm
3.	Variasi pH perendaman	pH perendaman dibagi menjadi 4, 6, dan 8	<i>Central Composite Design</i>	-
4.	Variasi waktu perendaman sorgum	Waktu perendaman dibagi menjadi 12, 30, dan 48 jam	<i>Central Composite Design</i>	Jam
5.	Penurunan kadar tanin	Analisis kadar tanin sorgum setelah proses fermentasi oleh kultur jamur terpilih	Pemeriksaan dengan metode Folin-Ciocalteu	%

C. Cara kerja

1. Sterilisasi alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Nasional Jakarta. Alat dan bahan yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi kering dan sterilisasi basah. Sterilisasi kering dilakukan untuk mensterilkan cawan Petri yang dilakukan pada *oven* dengan suhu 160-170°C selama 2 jam. Sterilisasi basah digunakan untuk mensterilkan labu Erlenmeyer, botol kaca, dan media yang digunakan. Sterilisasi basah dilakukan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit (Andriani, 2016).

2. Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

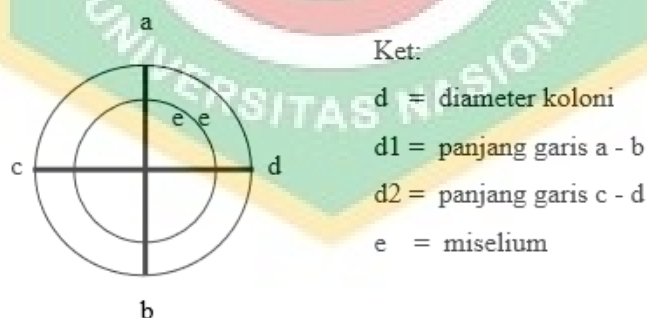
Media PDA dibuat dengan melarutkan 39 g media PDA dan 0,25 g kloramfenikol, lalu dilarutkan dengan 1 liter akuades di dalam labu Erlenmeyer, lalu dididihkan di atas kompor listrik sambil sesekali diaduk hingga larut. Mulut labu ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Kemudian media disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Lalu simpan di lemari pendingin sebagai media stok.

3. Pembuatan media *Potato Tea Agar* (PTA)

Kentang dipilih dengan kondisi yang bagus. Kentang dikupas dan dipotong bentuk dadu dengan ukuran sekitar 2×2 cm. Lalu kentang ditimbang sebanyak 100 g. Potongan kentang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 mL. Lalu ditambahkan 500 mL akuades. Kemudian ditambahkan 2,25 g kloramfenikol, dan 7,5 g *bacto* agar. Semua bahan kemudian direbus selama 20 menit sambil diaduk. Lalu ditambahkan 15 g teh hijau dan rebus kembali selama 10 menit sambil diaduk. Kemudian hasil rebusan disaring menggunakan kain saring. Selanjutnya media disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit.

4. Seleksi jamur dengan media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Seleksi ini menggunakan 5 jenis jamur makro yang telah diremajakan pada media PDA. Cawan Petri steril disiapkan lalu dituangkan 20 mL PDA. Lalu secara aseptik jamur dari peremajaan diambil dengan korborer berdiameter 1cm dan diletakkan di atas media tersebut. Cawan Petri ditutup dan disegel dengan parafilm. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (26-28°C) selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam dengan cara mengukur diameter pertumbuhan jamur menggunakan jangka sorong (Gambar 1). Dari hasil pengamatan diambil tiga jenis jamur yang pertumbuhannya paling baik.



Gambar 1. Pengukuran diameter miselium jamur (Syafiih A, 2016)

5. Seleksi jamur dengan media *Potato Tea Agar* (PTA)

Cawan Petri steril disiapkan lalu dituangkan 20 mL PTA. Kemudian secara aseptik jamur dari peremajaan media PDA diambil dengan korborer berdiameter 1cm. Kemudian diletakkan di tengah media PTA. Cawan Petri ditutup dan disegel dengan

parafilm. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (26-28°C) selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam dengan cara mengukur diameter pertumbuhan jamur menggunakan jangka sorong. Dari hasil pengamatan diambil satu jenis jamur yang pertumbuhannya paling baik. Hasil seleksi ini digunakan sebagai starter dalam fermentasi biji sorgum.

6. Perendaman biji sorgum

Biji sorgum masing-masing seberat 20 g direndam dengan akuades yang pH dan waktu perendamannya divariasikan dengan 3 level kombinasi menggunakan rancangan *Central Composite Design* (CCD) dan hasilnya dianalisis dengan menggunakan *Response Surface Methods* (RSM). Untuk keperluan ini, dipakai program statistik Design Expert 11 (DX 11). Derajat keasaman ditetapkan antara 4 dan 8, serta waktu perendaman ditetapkan antara 12 dan 48 jam dengan pergantian air rendaman tiap 12 jam. Rancangan penelitian berdasarkan *Central Composite Design* (CCD) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan penelitian berdasarkan *Central Composite Design* (CCD)

Run	Faktor 1: pH	Faktor 2: waktu perendaman (jam)
1	6	30
2	4	12
3	6	30
4	8	12
5	8	30
6	4	48
7	6	30
8	8	48
9	6	12
10	6	30
11	6	48
12	6	30
13	4	30

7. Fermentasi sorgum

Biji sorgum yang telah direndam kemudian ditiriskan hingga kering, lalu dimasukkan ke dalam cawan Petri untuk disterilkan dengan autoklav. Kemudian secara

aseptik jamur dari peremajaan media PTA diambil dengan korborer berdiameter 1cm. Kemudian diletakkan di tengah sorgum yang telah disterilkan. Cawan Petri ditutup dan disegel dengan parafilm. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (26-28°C) selama 9 hari.

8. Pengeringan dan penggilingan biji fermentasi sorgum

Setelah proses fermentasi selesai, selanjutnya sorgum hasil fermentasi dimasukkan ke dalam kantung dari kertas karton. Lalu dikeringkan menggunakan *evaporator* dengan suhu 65°C selama 18 jam. Setelah kering sorgum dihaluskan dengan mesin penggiling hingga berbentuk serbuk halus, kemudian serbuk tersebut diayak. Selanjutnya serbuk dikemas menggunakan plastik dan disimpan di tempat yang kering.

9. Ekstraksi tanin fermentasi sorgum

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan etanol 70%. Serbuk fermentasi sorgum sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam botol coklat, kemudian dituang dengan etanol 70% sebanyak 100mL, lalu ditutup dan dibiarkan selama 3 hari, diupaya terlindungi dari cahaya sambil diaduk beberapa kali setiap hari. Setelah 3 hari hasil maserasi disaring dan ampasnya diperas. Selanjutnya pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

10. Pembuatan larutan standard

Asam tanat ditimbang sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dengan akuades dalam gelas piala. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades sampai tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen. Larutan tersebut dijadikan sebagai larutan induk 100 ppm. Dari larutan tersebut dibuat larutan standard dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm.

11. Pembuatan reagen Folin Ciocalteu 1N

Reagen Folin 2N diambil sebanyak 20 mL dengan menggunakan gelas ukur, dimasukkan ke dalam gelas piala, lalu ditambahkan akuades sebanyak 20 mL, dan aduk

hingga homogen. Larutan reagen folin tersebut dimasukkan ke dalam botol cokelat agar tidak terkena cahaya langsung.

12. Pembuatan larutan Na_2CO_3 20% (b/v)

Na_2CO_3 ditimbang sebanyak 10 g kemudian dilarutkan dengan akuades di dalam gelas piala. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL selanjutnya ditambahkan akuades sampai tanda batas dan kocok hingga homogen.

13. Penentuan panjang gelombang spektrofotometer

Panjang gelombang spektrofotometer ditentukan dengan pembacaan absorbansi yang diperoleh dari larutan standar asam tanat 100 ppm. Panjang gelombang ditetapkan dari 560-640 nm dengan jarak masing-masing 10 nm. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi akan dipilih untuk analisis kadar tanin.

14. Analisis kuantitatif tanin

Analisis kuantitatif kadar tanin pada biji fermentasi sorgum menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Masing-masing konsentrasi larutan standar diambil sebanyak 0,5 mL ke dalam labu ukur 10 mL. Lalu ditambahkan 7,5 mL akuades dan 0,5 mL reagen Folin 1N, inkubasi selama 5 menit kemudian ditambah 1,5 mL Na_2CO_3 20% dan diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit untuk proses homogenisasi. Adsorban diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Hasil yang diperoleh digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi standar.

Ekstrak sampel ditimbang 10 mg, lalu dilarutkan dengan 1 mL akuades, kemudian diambil sebanyak 0,5 mL ke dalam labu ukur 10 mL. Lalu ditambahkan 7,5 mL akuades dan 0,5 mL reagen Folin 1N. Inkubasi selama 5 menit lalu ditambah 1,5 mL Na_2CO_3 20% dan diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit untuk proses homogenisasi. Adsorban diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditentukan.

D. Analisis data

Data yang diperoleh kemudian dihitung konsentrasi dan penurunan taninnya, lalu dianalisis menggunakan aplikasi Design Expert 11.