

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

3.1.1 Tempat: Pengambilan sampel tanah dilakukan di perkebunan bunga dahlia di daerah Bandungan – Ambarawa pada bulan September tahun 2002. Isolasi khamir termotoleran, karakterisasi morfologi dan uji aktivitas enzim dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi, F MIPA, Universitas Diponegoro, Semarang

3.1.2 Waktu: Bulan Oktober 2002 – sampai dengan Februari 2003

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Bahan: Sampel tanah berasal dari tanah sekitar umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah perkebunan bunga dahlia Bandungan - Ambawara, inulin murni (Sigma Chem. Co), Medium diperkaya, medium PDA (Potato Dextrosa Agar), medium YMA (Yeast Malt Extract Agar), YMB (Yeast Malt Extract Broth), medium agar Gorodkova's, reagen untuk analisis gula reduksi DNS (Dinitro Salisilat) dan reagen untuk analisis protein (Lowry), biru metilen, Chloramphenicol, akuades,

3.2.2 Alat: Erlenmeyer, cetok, cawan petri, "incubator shaker", sentrifus, "incubator", timbangan analitik (Sartorius), pipet ukur, spektrofotometer, lampu spiritus, tabung eppendorf, autoklaf dan jarum ose.

3.3 Cara kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan cara menggali tanah disekitar tanaman dahlia hingga mencapai bagian umbinya dengan menggunakan cetok. Tanah yang menempel disekitar umbi dahlia tersebut di kumpulkan dalam satu kantong plastik, kemudian di masukan termos es untuk dibawa ke laboratorium untuk di isolasi khamirnya.

3.3.2 Isolasi Khamir Termotoleran Penghasil Inulinase

Sampel tanah diambil 1 gram kemudian dilarutkan kedalam 9 ml akuades steril, dikocok dan didiamkan 1-2 hari. Larutan tersebut selanjutnya diambil 2 ml dan di masukan kedalam 30 ml medium diperkaya yang telah ditambahkan 50 ppm "chloramphenicol" (Booth,1971) dalam erlenmeyer, diinkubasi pada suhu 40°C selama 48 jam. Setelah 48 jam dari cairan kultur tersebut diambil 2 ml kemudian di inokulasikan kembali kedalam medium per kaya, diinkubasikan pada suhu 40°C selama 48 jam. Isolasi khamir dilakukan dengan menginokulasikan 0,1 ml cairan kultur secara "spread plate" pada medium inulin padat dalam cawan petri, diinkubasi pada 40°C selama 48 jam. Koloni yang representatif diisolasi pada medium PDA miring, untuk mendapatkan isolat yang murni.

3.3.3 Pengamatan Karakteristik Morfologi Khamir (Kirshop *et al.*, 1984)

3.3.3.1 Persiapan inokulum standar

Isolat khamir yang didapatkan ditumbuhkan pada medium YMA (Yeast Malt Extract Agar) dan YMB (Yeast Malt Extract Broth) pada suhu kamar selama 72 jam untuk mendapatkan inokulum standar yang akan digunakan untuk semua uji morfologi.

3.3.3.2 Uji morfologi

A. Sel vegetatif dan karakteristik Kultur

Masing – masing isolat khamir dari inokulum standar diinokulasikan dalam medium YMA dan YMB, setelah 48 jam sel-sel yang tumbuh diamati dengan mikroskop untuk cara pertunasan, bentuk dan ukuran sel. Karakteristik kultur dari media cair setelah 48 jam dan 21 hari diamati untuk melihat adanya kenampakan pelikel atau cincin, sedangkan pada kultur agar dilihat warna, tekstur, dan permukaan koloni.

B. Ballistospora

Pada medium Potato Dextrosa Agar (PDA) dalam cawan petri dinokululasikan inokulum standar isolat khamir dengan goresan silang, cawan petri selanjutnya ditelungkupkan diatas cawan petri yang berisi medium YMA. Kedua cawan tersebut direkatkan dengan menggunakan selotip dan diinkubasi, dengan bagian yang dinokulasi disebelah atas. Diamati setelah 7 hari, 14 hari, dan 21 hari untuk mengetahui terjadinya pertumbuhan koloni bayangan pada cawan petri YMA yang berada dibawah, pertumbuhan terjadi karena adanya penyemburan ballistospora

yang dihasilkan oleh kultur pada PDA. Jika ada ballistospora, bentuknya (asimetri, simetri) dapat diamati dengan mikroskop

C. Reproduksi seksual

Medium miring Gorodkova's agar diinokulasi dengan inokulum standar, setelah 21 hari sel-selnya diamati dengan mikroskop, untuk melihat adanya askospora, bentuk askus dan askospora, jumlah spora tiap askus, dan keutuhan askus (apakah spora dengan mudah dipecah).

3.3.4 Produksi Enzim Inulinase

Media produksi inulinase dibuat dengan menempatkan 20 ml medium diperkaya (Lampiran 02.) ke dalam erlenmeyer 50 ml, di sterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Pada Media uji tersebut diinokulasikan 2 ose kultur isolat khamir dari PDA umur 48 jam, selanjutnya diinkubasi pada "incubator shaker" dengan suhu 40°C selama 30 jam dan diagitasi pada kecepatan 100 rpm. Setiap interval 6 jam selama 30 jam dilakukan pengukuran berat kering sel, aktivitas enzim dan kadar protein enzim.

3.3.5 Pengukuran Berat Kering Sel (Byun dan Nahm, 1978)

Diambil 1,5 ml cairan kultur dari media produksi inulinase dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, endapan yang diperoleh dicuci dengan air destilasi, selanjutnya disentrifugasi kembali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Pelet yang diperoleh dikeringkan pada suhu 70°C sampai beratnya konstan.

3.3.6 Pengukuran Aktivitas Enzim Dengan Metode DNS (Xiao *et al.*, 1988)

Enzim kasar hasil sentrifugasi dari media produksi inulinase diambil 1 ml dan direaksikan dengan 1 ml substrat (dilarutkan dalam buffer asetat pH 4,5), lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit, reaksi enzimatik ini dihentikan dengan jalan memasukkan tabung sampel ke dalam air mendidih selama 5 menit. Dibuat kontrol dengan campuran yang sama tanpa diinkubasi tetapi langsung dipanaskan pada air mendidih. Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan metode DNS. Gula reduksi sampel ditentukan dengan menghitung selisih gula reduksi yang diinkubasi dengan kontrol. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan 1 mikromol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu. Kandungan gula reduksi didasarkan pada kurva standar fruktosa dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/ml.

Aktivitas enzim = unit/ml substrat/menit

$$= \frac{P(X-Y)}{\text{BM fruktosa} \times 10}$$

Ket:

P = Faktor pengenceran

X = Kadar fruktosa sampel

Y = Kadar fruktosa blanko

10 = Waktu inkubasi

3.3.7 Pembuatan Kurva Fruktosa Standar

Larutan Fruktosa standar dengan konsentrasi berbeda (Lampiran 03.), masing – masing diambil 1ml, kemudian di tambahkan 1 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, kemudian didinginkan. Larutan tersebut di tambah 8 ml akuades steril dan segera diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan fruktosa standar. Berdasarkan garis regresi ini maka aktivitas inulinase isolat khamir dapat diketahui.

3.3.8 Kadar Protein Enzim (Metode Lowry)

Sampel diambil 0,5 ml dari supernatan hasil sentrifugasi pada penghitungan berat kering sel, kemudian ditambah 5 ml larutan Lowry A, campuran di gojog hingga homogen dan dibiarkan selama 10 menit. Larutan tersebut ditambah 0,5 ml larutan Lowry B dan dibiarkan selama 20 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Untuk pengukuran kadar protein enzim, dibuat kurva standar serum albumin dengan konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,24 dan 0,3 mg/ml sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan kadar protein. Hasil perhitungan kadar protein digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik enzim.

3.3.9 Pembuatan Kurva BSA Standar

Larutan BSA Standar dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran 05.) masing – masing diambil 1ml, kemudian ditambah 5ml larutan Lowry A. Larutan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambah dengan larutan Lowry B dan dibiarkan selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein. Berdasarkan garis regresi ini kadar protein dapat diketahui.

3.3.10 Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim

Aktivitas spesifik enzim inulinase dihitung dengan cara membagikan antara jumlah produk yang dihasilkan selama 1menit/setiap mg protein yang terkandung. Semakin besar aktivitas spesifik enzim inulinase yang dihasilkan, semakin murni enzim tersebut dan semakin besar pula aktivitas enzim tersebut dalam menghidrolisa inulin.

$$\text{Aktivitas enzim spesifik} = \text{Unit/mg protein.}$$

3.4 Parameter yang diamati

1. Aktivitas enzim inulinase
2. Berat kering sel
3. Kadar protein enzim
4. Aktivitas spesifik enzim inulinase
5. Karakteristik morfologi khamir