BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. WAKTU DAN TEMPAT

A.1 Tempat : Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi, F MIPA, UNDIP, Semarang.

A.2 Waktu : Bulan Agustus-Oktober 2002

B. PERANGKAT PENELITIAN

B.1. Bahan : Isolat khamir penghasil inulinase (DUCC Y4-W) hasil penelitian Widjanarka dkk. (2001), Medium produksi inulinase, inulin murni, DNS, reagen untuk analisis protein (Lowry),Buffer asetat, Medium Fermentasi, "Salt Medium", Medium 50% Glukosa, Medium 60 % Glukosa, "Tributiryn Agar", "Urea Agar", "Glucose Chalk Agar", "Gorodkowa Agar", "Potato Dextrose Agar", "Yeast Malt Extract Agar", "Yeast Malt Extract Broth"..

B.2. Alat : Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, sentrifus, timbangan analitik, pipet ukur, pH meter, spektrofotometer, lampu spiritus, autoklaf, "Laminar Air Flow", ose, botol, gelas benda, gelas penutup,"magnetic stirer".

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

C. CARA PENELITIAN

C.1. Identifikasi Khamir (Kirshop *et al.*, 1984)

a. Persiapan Inokulum

Isolat khamir DUCC Y4-W yang akan diidentifikasi ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Extract Agar (YMA), dan Yeast Malt Extract Broth (YMB) selama 48 jam, suhu (28°C – 32°C)

b. Inokulasi

Semua uji morfologi dan fisiologi, diinokulasi dengan menggunakan inokulum .

c. Inkubasi

Semua uji diinkubasi pada suhu kamar (28°C-32°C).

d. Uji Morfologi

-Sel Vegetatif dan Karakteristik Kultur

Sel-sel dari kultur padat (YMA) dan cair (YMB) berumur 48 jam diamati dengan mikroskop, untuk melihat pertunasan, bentuk, dan ukuran sel. Karakteristik kultur dari media cair diamati setelah 48 jam, untuk kenampakan pelikel atau cincin kultur diamati setelah inkubasi 21 hari. Pengamatan terhadap warna, tekstur, dan permukaan koloni dilakukan pada kultur padat.

-Pertumbuhan miselium, Artrospora, Endospora, dan Klamidospora.

Kultur isolat diinokulasikan pada medium Potato Dextrose Agar secara goresan dan titik. Inokulasi secara titik ditutup dengan gelas penutup steril dan diinkubasi selama 21 hari. Pertumbuhan di bagian tepi goresan (aerob)

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

dan dibawah gelas penutup (anaerob) diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x.

-Balistospora

Pada medium Potato Dextrose Agar dalam cawan diinokulasikan isolat khamir dengan goresan silang, cawan selanjutnya ditelungkupkan diatas cawan lain yang berisi medium YMA dan direkatkan menggunakan selotip. Cawan diinkubasi dengan bagian yang diinokulasi diletakkan disebelah atas. Cawan tersebut diamati setelah 7, 14, dan 21 hari untuk mengetahui terjadinya bayangan pertumbuhan pada YMA dari koloni isolat yan tumbuh pada PDA, akibat penyemburan balistospora dari koloni yang tumbuh pada PDA. Bentuk balistospora (asimetri,simetri) dapat diamati dengan mikroskop.

- Reproduksi seksual

Medium agar Gorodkowa miring diinokulasi dengan isolat khamir., Diinkubasi selama 21 hari dan diamati pada hari ke 1, 2, 7, 14, dan 21. Sel dilihat dengan perbesaran 100 x, diamati adanya askospora.

e. Uji Fisiologi

-Fermentasi senyawa karbon

Tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham diisi dengan medium fermentasi, diinokulasi dengan isolat khamir. Diinkubasi dan diamati produksi gasnya pada hari ke 1, 2, 7, 14, dan 21.

-Pertumbuhan pada garam konsentrasi tinggi.

Tabung yang berisi "Salt Medium" 10 % diinokulasi dengan isolat khamir, bila terjadi pertumbuhan, maka dilakukan inokulasi pada tabung yang berisi

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

medium dengan konsentrasi 15 % dan 20 %. Pertumbuhan diamati pada umur 7,14, dan 21 hari.

-Pertumbuhan pada glukosa konsentrasi tinggi.

Media miring glukosa 50% dan 60% diinokulasi dengan satu ose isolat khamir, kemudian diamati pertumbuhannya pada umur 7,14, dan 21 hari.

-Pertumbuhan pada suhu 37°C.

Medium miring YMA diinokulasi dengan satu ose isolat khamir dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada umur 7,14, dan 21 hari.

-Aktivitas Urease.

Medium miring agar urea diinokulasi dengan satu ose isolat khamir. Diamati adanya pembentukan warna merah muda pada medium pada umur 7,14,dan 21 hari.

-Aktivitas Lipolitik.

Medium Tributiryn Agar pada cawan petri diinokulasi dengan satu ose isolat khamir. Diamati pertumbuhannya pada umur 7, 14, dan 21 hari, daerah bening di sekitar koloni menandakan terbentuknya asam lemak karena aktivitas lipolitik.

-Produksi Asam.

Medium "Glucose Chalk Agar"diinokulasi dengan satu ose isolat khamir, kemudian diamati pada umur 7,14, dan 21 hari. Muculnya zona yang jernih di sekitar daerah pertumbuhan, menandakan terbentuknya asam.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

C.2. Pembuatan Starter

Medium Produksi Inulinase (Lampiran 01) dituang kedalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklav selama 15 menit pada suhu 121°C. Medium didinginkan, dan diinokulasi dengan isolat khamir, lalu diinkubasi sampai diperoleh kultur dengan kerapatan 10^6-10^7 sel/ml.

C.3. Pengukuran Pertumbuhan Sel

Isolat dengan kerapatan 10^6-10^7 sel/ml diinokulasikan sebanyak 5 % v/v ke dalam Medium Produksi Inulinase. Diinkubasi pada suhu 40° C, pH 4,5 selama 48 jam. Setiap interval waktu 6 jam dilakukan pengukuran absorbansi (OD) pada panjang gelombang 500 nm, kemudian dibuat kurva pertumbuhan.

C.4. Ekstraksi Inulinase

Isolat dengan kerapatan 10^6-10^7 sel/ml diinokulasikan sebanyak 5 % v/v ke dalam Medium Produksi Inulinase. Diinkubasi pada suhu 40° C, pH 4,5 selama 48 jam. Setiap interval waktu 6 jam kultur diambil, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi digunakan untuk uji aktivitas inulinase dan pengukuran kadar protein.

C.5. Penentuan Aktivitas Inulinase

C.5.1. Penentuan Aktivitas Inulinase dengan Metode DNS

Supernatan hasil sentrifugasi diambil 1ml dan direaksikan dengan 1 ml substrat dalam buffer asetat, diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi enzimatis ini dihentikan dengan memasukkan tabung ke dalam air yang mendidih selama 5 menit. Dibuat blangko dengan campuran yang sama tanpa diinkubasikan,lalu dipanaskan pada air yang telah mendidih. Gula reduksi yang

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

dihasilkan diukur dengan menggunakan metode DNS setelah sebelumnya diencerkan. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar fruktosa. Aktivitas nulinase ditentukan berdasarkan jumlah 1 μmol gula reduksi yang dibebaskan per menit oleh 1 ml enzim.

Aktivitas Enzim = Unit/ml

= P (Xs-Xb) / (BM Fruktosa x 10)

P : Faktor pengenceran 10 : Waktu inkubasi

Xs : Kadar fruktosa sample

Xb : Kadar fruktosa blanko

C.5.2. Pembuatan Kurva Fruktosa Standar

Larutan fruktosa standar dengan konsentrasi berbeda (Lampiran 02), masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu ± 100^0 C selama 5 menit, lalu didinginkan. Larutan tersebut selanjutnya ditambah 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.

C.6. Penentuan Kadar Protein

C.6.1. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry-Folin

Supernatan hasil sentrifugasi diambil 1ml, kemudian ditambah 5 ml larutan Lowry A. Campuran dibiarkan selama 10 menit. Larutan tersebut ditambah 0,5 ml larutan Lowry B dan dibiarkan selama 20 menit, diukur

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Kadar protein ditentukan berdasarkan Kurva BSA Standar.

C.6.2. Pembuatan Kurva BSA Standar

Larutan BSA standar dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran 03) masing-masing diambil 1ml, kemudian ditambah 5 ml 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 peotein sampel dapat diketahui.

C.7. Penentuan Aktifitas Spesifik Inulinase

Aktivitas spesifik inulinase dihitung dengan cara membagi aktivitas enzim dengan mg protein. Aktivitas Spesifik = Unit/mg Protein

D. Parameter

Parameter yang diamati meliputi :

a. Morfologi Khamir
b. Fisiologi Khamir
c. Pertumbuhan sel (kurva pertumbuhan)
d. Kadar Protein
e. Aktivitas Inulinase
f. Aktivitas Spesifik Inulinase

E. Metoda Analisis

Hasil dari penelitian ini dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)