

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang.

3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2001 sampai dengan Juni 2002.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: mikroskop, penangas air, "sprayer", gelas benda, korek api, pipet tetes, cawan petri, erlenmeyer, ose, kertas label, tabung reaksi, lampu spiritus, gelas piala, jangka sorong, pengaduk magnetik, timbangan analitis, "timer", gelas ukur, LAF ("Laminer Air Flow"), autoklaf, "oven", gelas penutup dan pH "stick", mikrometer.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi roti tawar (3 merk yang berbeda, antara lain: merk B yang diperoleh dari Toko B di Semarang, P dari Toko T di Semarang dan M dari pasar J di Semarang), medium PDA (“Potato Dextrose Agar”), Tributirin Agar, “soluble starch” 0,2%, medium CDA (“Czapek’s Dox Agar”), larutan I₂KI, CMC (“carboxymethylcellulose”) 1%, gelatin, akuades, laktofenol, alkohol 96 dan 70%, spiritus, HCl 0,4% dan kloramfenikol, larutan H₂SO₄ 70%.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Isolasi Kapang

Ose runcing steril yang telah di basahi medium agar disentuhkan pada roti tawar yang telah berjamur, disesuaikan dengan pertumbuhan fungi yang ada. Spora yang melekat pada ujung ose disentuhkan satu titik pada medium PDA miring (Labeda, 1990), diinkubasi pada suhu 27°C selama 3-5 hari.

Apabila koloni masih tercampur, dilakukan pemurnian kembali (Pelczar and Chan, 1986). Koloni yang telah murni siap diidentifikasi.

3.4.2 Identifikasi Kapang

Identifikasi kapang *Aspergillus* dilakukan melalui pengamatan mikromorfologi dan makromorfologi (Bennett and Klich, 1992). Pengamatan makromorfologi adalah dengan mengamati penampakan koloni berumur 5 hari pada medium CDA. Penampakan koloni yang diamati terdiri dari diameter koloni,

warna koloni, warna “reverse of colony”, bentuk permukaan koloni, tekstur koloni, perubahan warna medium, adanya “radial furrows”, adanya “growing zone” dan adanya “exudate drop”. Pengamatan mikromorfologi untuk identifikasi menurut Raper and Fennel (1965) tertera pada Tabel 3.2 berikut ini.

Tabel 3.2. Pengamatan mikromorfologi *Aspergillus*

Pengamatan	Spesifikasi
Konidia	Bentuk Warna Ukuran Permukaan Susunan
Kepala konidia	Warna Bentuk Ukuran
Vesikel	Bentuk Diameter Warna
Fialid	Susunan Warna Ukuran Bentuk
Metula	Ukuran
Konidiofor	Panjang Diameter Permukaan Warna Septa
Kehadiran	“Hulle cell” Sklerotia Askospora Kleistotlesia

Data yang diperoleh dicocokkan dengan buku-buku identifikasi menurut Raper and Fennel (1965), Samson *et al.* (1984) dan Gandjar dkk (1999).

3.4.3 Uji Enzimatis

Uji Amilolitik

Isolat kapang *Aspergillus* dari medium PDA miring berumur 5 hari diinokulasikan di dua titik pada medium Amilum (0,2%) Agar dalam cawan petri berdiameter 9 cm, ketebalan medium 0,3 cm, inkubasi suhu ruang (27° C) selama 4 hari (posisi cawan terbalik). Hidrolisis amilum diamati dengan menuangkan larutan I₂KI secara merata ke dalam cawan petri. Diamati adanya daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni, diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya (Collins *et al.*, 1989).

Uji Lipolitik

Isolat kapang *Aspergillus* dari medium PDA miring usia 5 hari diinokulasikan di satu titik pada medium Tributirin Agar dalam cawan petri berdiameter 5,5 cm, ketebalan medium 0,3 cm, inkubasi suhu ruang (27° C) selama 7 hari (posisi cawan terbalik). Diamati adanya daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni, diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya (Vanderzant and Splittstoesser, 1992).

Uji Proteolitik

Isolat kapang *Aspergillus* dari medium PDA miring usia 5 hari diinokulasikan pada medium Gelatin (15%) sebanyak 15 ml dalam tabung reaksi yang panjangnya 16 cm dan diameternya 1,4 cm, inkubasi suhu ruang selama 5

hari. Uji positif bila medium gelatin berubah dari padat menjadi cair setelah disimpan pada suhu rendah ($\pm 4^\circ \text{ C}$).

3.4.3.4 Uji Selulolitik

Isolat kapang *Aspergillus* dari medium PDA miring berumur 5 hari diinokulasikan di dua titik pada medium CMC (1%) Agar (ketebalan medium 0,3 cm) dalam cawan petri berdiameter 9 cm (Gams, *et al.* 1987). Inkubasi suhu ruang (27° C) selama 6 hari (posisi cawan terbalik). Hidrolisis selulosa dapat diamati dengan menuangkan larutan H_2SO_4 70% secara merata ke dalam cawan petri (disekitar koloni) diikuti I_2KI (Fogarty and Kelly, 1990). Diamati adanya daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni, diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya.

3.5 Parameter

Parameter yang diamati adalah penampakan makromorfologi dan mikromorfologi serta besarnya hidrolisis amilum, CMC, gelatin dan tributirin.

3.6 Analisis Data

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif.