

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi F MIPA UNDIP Semarang, pada bulan Mei – Juli 2003.

B. Perangkat Penelitian

B.1. Alat

Autoklaf, lampu spiritus, tabung reaksi, “petridish”, “hot plate & magnetic stirer”, penangas, erlenmeyer 100 ml, “loop ose”, mikroskop, “object glass & cover glass”, pipet tetes, pipet ukur 1 ml, pipet ukur 5 ml, mikropipet 500 μ l, inkubator Blue M, “shaker waterbath” Precision, oven, “vortex”, neraca analitik Sartorius, spektrofotometer Bausch & Lomb, “cuvet” spektrofotometer, tabung eppendorf, sentrifus Hettich Universal, haemositometer “Petroff-Hausser” dan pH meter.

B.2. Bahan

B.2.1. Mikroorganisme (Yulandi, 2003).

Isolat khamir penghasil inulinase (YD.2) dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan-Ambarawa umur 2 hari pada medium miring “Potato Dextrose Agar”.

B.2.2. Medium Identifikasi Khamir.

Medium “Potato Dextrose Agar”, medium “Yeast Malt Agar”, medium “Yeast Malt Broth”, medium “Gorodkova’s Agar”, medium fermentasi, ”Salt Medium” 10%, ”Salt Medium” 15%, ”Salt Medium” 20%, “Glucose Medium” 50%, “Glucose Medium” 60%, medium “Urea Agar”, medium “Tributyryn Agar”, medium “Glucose Chalk Agar”, “Metilen Blue”.

B.1.3. Medium dan Reagen Uji Aktivitas Inulinase.

Medium “Potato Dextrose Agar”, medium produksi inulinase, inulin dalam buffer asetat 1%, reagen DNS, reagen Lowry A dan Lowry B, reagen “Bovine Serum Albumin” (BSA), akuades steril.

C. Cara Penelitian

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

C.1.1. Persiapan Inokulum.

Isolat khamir YD.2 yang akan diidentifikasi ditumbuhkan selama 2 hari pada medium “Yeast Malt Extract Agar” dan “Yeast Malt Extract Broth” pada suhu ruang 28°C-32°C.

C.1.2. Inokulasi dan Inkubasi.

Semua medium uji diinokulasi dengan kultur inokulum menggunakan ose, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 28°C-32°C.

C.1.3. Uji Morfologi.

a. Sel Vegetatif dan Karakteristik Kultur.

Sel-sel vegetatif dari kultur pada medium “Yeast Malt Extract Agar” dan “Yeast Malt Extract Broth” berumur 2 hari diamati dengan mikroskop untuk melihat pertunasan, bentuk dan ukuran sel. Karakteristik kultur berupa flokulen pada medium “Yeast Malt Extract Broth” diamati setelah 2 hari, sedangkan untuk pengamatan pelikel atau cincin dilakukan setelah 21 hari. Karakteristik kultur berupa warna, tekstur, dan permukaan koloni pada medium “Yeast Malt Extract Agar” diamati setelah 2 hari.

b. Pertumbuhan Miselium, Arthrospora, Endospora, blastospora dan Khlamidospora.

Kultur isolat khamir diinokulasikan secara goresan dan titik pada medium “Potato Dextrose Agar”. Inokulasi secara titik ditutup dengan gelas penutup steril dan diinkubasi selama 21 hari. Pertumbuhan di bagian tepi goresan (aerob) dan dibawah gelas penutup (anaerob) diamati setelah 21 hari dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x.

c. Ballistospora.

Isolat khamir diinokulasikan secara goresan silang pada medium “Potato Dextrose Agar” dalam “petridish”. “Petridish” kemudian ditelungkupkan

diatas “petridish” yang berisi medium “Yeast Malt Agar”. Kedua “petridish” direkatkan dengan menggunakan “parafilm” steril. “Petridish” berisi medium “Potato Dextrose Agar” yang telah diinokulasi diletakkan di bagian atas, kemudian diinkubasi. Pola pertumbuhan pada medium “Yeast Malt Agar” yang disebabkan oleh penyemburan dari ballistospora yang tumbuh pada medium “Potato Dextrose Agar” diamati setelah 7, 14 dan 21 hari. Bentuk ballistospora (simetri, asimetri) diamati dengan menggunakan mikroskop.

d. Reproduksi seksual.

Isolat khamir diinokulasikan pada medium “Gorodkawa’s Agar” miring kemudian diinkubasi selama 21 hari. Pengamatan askospora diamati setelah 1, 2, 7, 14 dan 21 hari dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x.

C.1.4. Uji Fisiologi.

a. Fermentasi Senyawa Karbon.

Isolat khamir diinokulasikan pada tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham dan berisi medium fermentasi kemudian diinkubasi selama 21 hari. Gas yang diproduksi diamati setelah 1, 2, 7, 14 dan 21 hari.

b. Pertumbuhan pada Garam Konsentrasi Tinggi.

Isolat khamir diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi “Salt Medium” 10% kemudian diinkubasi selama 21 hari. Isolat khamir yang tumbuh pada “Salt Medium” 10% diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi “Salt Medium” 15 % dan tabung reaksi yang berisi “Salt Medium” 20% kemudian diinkubasi selama 21 hari. Pertumbuhan khamir diamati setelah 7, 14 dan 21 hari.

c. Pertumbuhan pada Glukosa Konsentrasi Tinggi.

Isolat khamir diinokulasikan pada “Glucose Medium Agar” miring 50% dan “Glucose Medium Agar” miring 60% kemudian diinkubasi selama 21 hari. Pertumbuhan khamir diamati setelah 7, 14 dan 21 hari.

d. Pertumbuhan pada Suhu 37° C.

Isolat khamir diinokulasikan pada medium miring “Yeast Malt Extract Agar” dan “Yeast Malt Extract Broth” kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 21 hari. Pertumbuhan khamir diamati pada umur 7, 14 dan 21 hari.

e. Aktivitas Urease.

Isolat khamir diinokulasikan pada medium miring “Urea Agar” kemudian diinkubasi selama 21 hari. Perubahan warna medium dari putih menjadi merah jambu diamati setelah 7, 14 dan 21 hari.

f. Aktivitas Lipolitik.

Isolat khamir diinokulasikan pada medium "Tributiryn Agar" dalam "petridish" dengan goresan silang kemudian diinkubasi selama 21 hari. Adanya zona jernih diamati setelah 7, 14 dan 21 hari. Zona jernih di sekitar koloni menandakan terbentuknya asam lemak karena aktivitas lipolitik.

g. Produksi Asam.

Isolat khamir diinokulasikan pada medium "Glucose Chalk Agar" dalam "petridish" dengan goresan silang kemudian diinkubasi selama 21 hari. Adanya zona jernih diamati setelah 7, 14 dan 21 hari. Zona jernih di sekitar koloni menandakan terbentuknya asam.

C.2. Uji Aktivitas Inulinase

C.2.1. Pembuatan Starter.

Starter yang digunakan sebagai inokulum mempunyai kepadatan 10^6 - 10^7 sel/ml pada umur inkubasi 18 jam. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan haemositometer (Brock *et al.*, 1994).

Medium produksi inulinase steril (Lampiran 01) diinokulasi dengan 1-2 ose biakan isolat khamir dari medium miring "Potato Dextrose Agar", kemudian diinkubasi pada suhu 28°C - 32°C selama 18 jam sampai diperoleh kultur dengan kerapatan 10^6 - 10^7 sel/ml (Xiao *et al.*, 1988).

C.2.2. Ekstraksi Inulinase dan Isolasi Sel.

Kultur starter diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) ke dalam medium produksi inulinase, kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam “shaker waterbath” pada suhu 40°C dan kecepatan agitasi 100 rpm (Xiao *et al.*, 1988). Setiap interval waktu 6 jam kultur diambil dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan “crude enzyme” inulinase ekstraseluler yang digunakan untuk penentuan aktifitas inulinase dan penentuan kadar protein (Byun & Nahm, 1978). Pelet hasil sentrifugasi merupakan sel khamir yang digunakan untuk penentuan berat kering sel (Rouwenhorst^a *et al.*, 1990).

C.2.3. Penentuan Pertumbuhan Sel dengan Metode Gravimetri (Berat Kering Sel).

Pelet yang didapat pada cara kerja C.2.2 dicuci dengan akuades steril dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit (Byun & Nahm, 1978). Selanjutnya pelet dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C dan ditimbang dengan neraca analitik Sartorius sampai diperoleh berat kering yang konstan (Rouwenhorst^a *et al.*, 1990). Berat kering yang diperoleh dikurangi dengan berat kering tabung eppendorf merupakan berat kering sel isolat khamir YD.2 (g/ml).

C.2.4. Pembuatan Kurva Fruktosa Standar dengan Metode DNS.

Larutan fruktosa standar dengan konsentrasi berbeda (Lampiran 02), masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih (suhu 100°C) selama 5 menit, lalu didinginkan. Larutan tersebut selanjutnya ditambah 8 ml akuades steril dan segera diukur absorbansinya atau "Optical Density" (O.D) pada panjang gelombang 550 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan fruktosa standar (Lampiran 03). Aktivitas inulinase isolat khamir ditentukan berdasarkan garis regresi yang diperoleh.

C.2.5. Penentuan Aktivitas Inulinase dengan Metode DNS.

Supernatan yang didapat dari cara kerja C.2.2 diambil 0.5 ml dan direaksikan dengan 0.5 ml inulin 1% dalam buffer asetat pH 4.5 dan 5 ml reagen DNS, selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi enzimatik ini dihentikan dengan memasukkan tabung sampel ke dalam air yang mendidih (suhu 100°C) selama 5 menit. Sebagai kontrol digunakan campuran sama yang langsung dipanaskan dalam air mendidih, tanpa diinkubasikan terlebih dahulu.

Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan metode DNS setelah sebelumnya diencerkan. Pembacaan absorbansi atau "Optical Density" (O.D) sampel dan kontrol dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm (Xiao *et al.*, 1988). Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar fruktosa.

Satu unit aktivitas inulinase dinyatakan sebagai sejumlah enzim yang mengkatalisis pembebasan satu mikromol fruktosa setiap menit pada pH 4.5 dan suhu 50°C (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990). Aktivitas inulinase dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml substrat/menit)} = P (X_s - X_k) / (\text{BM Fruktosa} \times 10)$$

Dimana :

| | | | |
|-------------|--------------------------|-------|--------------------------|
| P | = Faktor pengenceran | X_s | = Kadar fruktosa sampel |
| 10 | = Waktu inkubasi (menit) | X_k | = Kadar fruktosa kontrol |
| BM Fruktosa | = 180 | U | = Unit enzim |

C.2.6. Pembuatan kurva “Bovine Serum Albumin” (BSA) Standar dengan Metode Lowry.

Larutan BSA standar dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran 04), masing-masing diambil 1 ml dan ditambahkan 5 ml larutan Lowry B kemudian dihomogenisasi. Larutan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambah dengan 0.5 larutan Lowry A dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya atau “Optical Density” (O.D) pada panjang gelombang 600 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi BSA standar (mg/ml) (Lampiran 05). Kadar protein sampel (mg/ml) ditentukan berdasarkan garis regresi yang diperoleh.

C.2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.

Kadar protein terlarut dalam suatu filtrat enzim dapat digunakan sebagai parameter jumlah enzim yang terdapat dalam filtrat tersebut. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990).

Supernatan yang didapatkan dari cara kerja C.2.2 diambil 1ml dan ditambahkan 5 ml larutan Lowry B kemudian dihomogenisasi. Larutan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambah 0.5 ml Larutan Lowry A dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya atau "Optical Density" (O.D) pada panjang gelombang 600 nm. Kadar protein ditentukan berdasarkan kurva "Bovine Serum Albumin" (BSA) standar.

C.2.8. Penentuan Aktivitas Spesifik Inulinase (Schumm, 1993).

Aktivitas spesifik inulinase ditentukan berdasarkan persamaan sebagai berikut :

Aktivitas spesifik enzim (Unit / mg protein) = Aktivitas enzim / mg protein

D. Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi:

1. Morfologi khamir.

Sel vegetatif dan karakteristik kultur; pertumbuhan miselium, reproduksi seksual dan aseksual khamir,

2. Fisiologi Khamir.

Fermentasi senyawa glukosa; pertumbuhan pada garam (NaCl) dan glukosa konsentrasi tinggi; pertumbuhan pada suhu 37°C; aktivitas urease; aktivitas lipolitik dan produksi asam,

3. Pertumbuhan sel.

Pertumbuhan sel ditentukan dengan parameter berat kering sel (mg / ml),

4. Aktivitas inulinase (Unit / ml substrat / menit).

Absorbansi fruktosa sampel dan absorbansi fruktosa kontrol,

5. Kadar protein (mg / ml).

Kadar protein ditentukan dengan parameter absorbansi protein sampel,

6. Aktivitas spesifik inulinase (Unit / mg protein).

Aktivitas inulinase dan kadar protein.

E. Metoda Analisis Data

Metoda analisis data identifikasi isolat khamir YD.2 adalah menggunakan analisis deskriptif terhadap hasil uji morfologi dan fisiologi. Metoda analisis data uji aktivitas inulinase isolat khamir YD.2 adalah menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor yang dilanjutkan dengan perbandingan antara rata-rata perlakuan dari aktivitas inulinase, kadar protein dan aktivitas spesifik inulinase.