

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

A.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA - UNDIP.

A.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama bulan November sampai bulan Maret 1996.

B. Bahan Dan Alat Penelitian

B.1. Bahan

Sampel susu rusak, akuades, Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Cair, Media Fermentasi, Nutrien Agar, Nutrien Cair, Czapek's Dox Agar, Media Uji Antibiotik (Media Seed Agar Uji Penisilin dan Media Basal Uji Penisilin), Bahan untuk analisa protein (Fowlin Lowry yang terdiri dari Lowry A dan Lowry B), Biakan murni *P. chrysogenum* (FNCC 6009), *S. aureus* (FNCC 0047) yang yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi PAU -UGM, kertas saring, kertas Whattman nomer 42.

B.2. Alat

Erlenmeyer 250 ml, gelas piala 1000 ml, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, pipet ukur, pipet tetes, jarum ose tumpul, jarum ose runcing, pinset, lampu spiritus, oven, autoklaf, termometer, 'Shaker', sentrifuga, 'Vacuum pump', timbangan Sartorius, pH meter, Spektrofotometer Spektronik 20, Buret, 'Hotplate dan Stirer', 'Cylinder Disk', Corong Kaca, 'Desiccator', Inkubator.

C. Cara Kerja

C.1. Pembuatan Medium

C.1.1. Medium Nutrien Agar.

28 gram Nutrien Agar (Difco) dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dididihkan sampai semua bahan larut, pH diatur sampai dengan 7. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit (Difco Laboratories, 1974).

C.1.2. Media Czapek's Dox Agar .

45,5 gr media Czapek's (Difco) dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dididihkan sampai semua bahan larut, pH diatur sampai dengan 5. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit (Difco Laboratories, 1974).

C.1.3. Media Potato Dextrose Agar (PDA).

200 gr kentang dikupas, dipotong kecil-kecil dimasukkan ke dalam 1000 ml akuades, dididihkan kira-kira satu jam kemudian disaring dengan kapas, dikembalikan volumenya dengan akuades sampai 1000 ml, ditambahkan 15 gr agar dan 20 gr dextrosa, panaskan sampai larut, pH diatur sampai dengan 5. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit (Dharmaputra, 1981).

C.1.4. Potato Dextrose Broth (PDB)

200 gr kentang dikupas, dipotong kecil-kecil, dimasukkan ke dalam 1000 ml akuades, dididihkan kira-kira satu jam kemudian disaring dengan kapas, dikembalikan volumenya dengan akuades sampai 1000 ml, ditambahkan 20 gr dextrosa. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit (Dharmaputra, 1981).

C.1.5. Media Dasar Fermentasi

8 gr minyak kedelai, 0,6 gr CaCO_3 , 1gr Na_2SO_4 , 0,5 gr $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ dilarutkan kedalam 1000 ml akuades, dipanaskan diatas pemanas sambil diaduk. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit (Anonim, 1986).

C.1.6. Media Fermentasi

Media ini terdiri dari campuran media PDB dan media dasar fermentasi dengan perbandingan 1:1 (Anonim, 1986).

C.1.7. Media Kontrol

Untuk media kontrol digunakan media dasar fermentasi yang ditambah dengan 40 gram laktosa (Anonim, 1986).

C.1.8. Pembuatan Susu Rusak

1000 ml susu sapi segar dari KUD (Koperasi Unit Desa) Semarang Selatan, dimasukkan dalam gelas piala 1000 ml dan ditutup, diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang, pH akhir diukur, perubahan tekstur, bau dan warna diamati. Dipasteurisasi pada suhu 70°C selama 25 - 30 menit sambil diaduk.

C.1.9 Media Produksi.

Empat macam media produksi yang disiapkan (v/v) dari 50 ml media dasar fermentasi, meliputi :

1. Media Kontrol (MK)
2. Mengandung 25% susu rusak (M1)
3. Mengandung 50% susu rusak (M2)
4. Mengandung 75% susu rusak (M3)

(Anonim, 1986).

C.1.10 Media 'Seed' Uji Penisilin.

1,5 gr ekstrak daging, 3 gr ekstrak khamir, 6 gr pepton, dan 1 gr dextrosa dilarutkan ke dalam 1000 ml akuades, dipanaskan diatas pemanas sambil diaduk sampai semua bahan larut, pH diatur sampai dengan 7. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit (Difco Laboratories, 1974).

C.1.11. Media Dasar Agar Uji penisilin

1,5 gr ekstrak daging, 3 gr ekstrak khamir, 6 gr pepton, 1 gr dextrosa dan 15 gr agar dilarutkan kedalam 1000 ml akuades, dipanaskan diatas pemanas sambil diaduk sampai semua bahan larut, pH diatur sampai dengan 7. Disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit (Difco Laboratories, 1974).

C.2. Penentuan Kadar laktosa Susu.

- 25 ml susu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml ditambah 5 ml reagen ZnSO_4 kemudian dikocok. Ditambah 5 ml larutan NaOH 0,75N dikocok dan diencerkan sampai volume mencapai 50 ml. Kemudian suspensi ini didiamkan selama 10 menit, untuk mengendapkan semua protein.
- Disaring dengan kertas saring dan filtrat dikumpulkan, volume filtrat dihitung secara teoritis dengan mengurangkan volume awal dengan volume protein yang mengendap.
- Diambil 5 ml filtrat jernih dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml tertutup, ditambahkan 20 ml akuades, 20 ml KI 10% (w/v) dan 50 ml Khloramine T.
- Erlenmeyer ditutup, dikocok dan didiamkan selama 90 menit. Ditambahkan 10 ml HCl 2N sampai terlihat warna kuning pucat.
- Larutan ini selanjutnya dititrasi dengan larutan 0,1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sampai berwarna biru. Ditambahkan

indikator larutan pati beberapa tetes dan dititrasi sampai berubah warna menjadi abu-abu. Volume $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ yang digunakan dicatat sebagai hasil dari titrasi sampel (T_s).

- Pembuatan blanko untuk mendapatkan Titrasi blanko (T_b) dibuat dengan cara yang sama seperti diatas dengan menggunakan akuades 25 ml sebagai sampel.
- Dilakukan perhitungan kadar laktosa dalam filtrat (g/100 ml filtrat).

$$A = (T_b - T_s) \times N \times 0,171 \times \frac{100}{5}$$

Dimana,

A = gram laktosa/100 ml filtrat

T_b = Titrasi blanko

T_s = Titrasi sampel

N = Normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

(Sudarmadji, dkk, 1984)

C.3. Pembuatan Inokulum

C.3.1. *Penicillium chrysogenum* (FNCC 6009)

P. chrysogenum (FNCC 6009) dibiakkan pada medium PDA miring, dalam suhu kamar selama 7 hari. Biakan diinokulasikan ke dalam media fermentasi, diinkubasi pada suhu kamar diatas 'Shaker' selama 48 jam, dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 48 jam jumlah konidia kapang dihitung secara langsung dengan Haemocytometer untuk menemukan jumlah 10^6 konidia/ml (Pengamatan Pendahuluan).

C.3.2. *Staphylococcus aureus* (FNCC 0047)

Biakan *S. aureus* umur 24 jam pada media NA miring diinokulasikan ke dalam media Seed Uji Penisilin dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Kerapatan optiknya diukur dengan Spektronik 20 pada panjang gelombang 640 nm sampai mencapai $T = 70\%$. (jumlah $\pm 10^6$ sel/ml), (Pengamatan Pendahuluan).

C.4. Produksi Antibiotik

10% (v/v) inokulum kapang *P. chrysogenum* dimasukkan secara aseptik ke dalam setiap erlenmeyer 250 ml yang berisi 45 ml media fermentasi, pH awal diatur sampai 5 dengan penambahan NaOH 0,1N. Kemudian diinkubasi diatas 'Shaker' dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar, selama 7, 14, dan 21 hari. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali (Anonim, 1986).

C.5. Bioassay Hasil Fermentasi

Cairan hasil fermentasi disaring secara aseptik melalui kertas Whatman nomer 42 dengan menggunakan 'Vacuum pump'. 12 ml media basal uji penisilin dan 1 ml media seed uji penisilin yang telah mengandung *S. aureus* dituang kedalam cawan petri steril, diratakan. 'Cylinder Disk' steril diletakkan diatas permukaan media dengan sedikit ditekan. Untuk setiap cawan petri diletakkan 3 silinder. Setiap silinder diisi dengan filtrat hasil fermentasi masing-masing 50 μ l. Cawan-cawan

petri kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C . Diameter daerah hambatan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Sebagai kontrol digunakan hasil fermentasi dari MK, M1, M2 dan M3 tanpa inokulum *P. chrysogenum*.

C.6. Pengukuran kadar Protein Dan Pembuatan Kurva Standard

C.6.1. Pembuatan Reagen.

Lowry A. Dibuat dengan melarutkan folin ciocalteu dengan akuades dengan perbandingan 1:1.

Lowry B. Terdiri dari dua larutan, larutan pertama adalah larutan 2% Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N. Larutan kedua merupakan campuran 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dan 1 ml larutan NaKtartrat 2% (dibuat segera sebelum digunakan). Lowry B dibuat dengan mencampur larutan pertama dengan larutan kedua dengan perbandingan 100:1.

Buffer Asetat pH 5. Dibuat dengan campuran x ml larutan A 14,8 ml dan Y ml larutan B 35,2 ml yang diencerkan menjadi 100 ml. Larutan A terdiri dari 0,2 M asam asetat (11,55 ml asam asetat dalam 1000 ml), larutan B terdiri dari 0,2 M Na-asetat (16,4 gr $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \text{ Na}$ dalam 1000 ml), (Sudarmadji, dkk, 1984).

C.6.2. Persiapan sampel Protein.

Sampel diendapkan dahulu dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kristal mendekati jenuh, kemudian dipisahkan dari supernatan dengan sentrifuga pada kecepatan 11000 rpm, selama 10 menit. Presipitat protein kemudian dilarutkan lagi dengan

buffer asetat pH 5 (sampai 10 ml). Diambil 1 ml sampel dan diukur pada Spektrofotometer Spektronic 20 dengan panjang gelombang 600 nm (Sudarmadji, dkk, 1984).

C.7. Pembuatan Kurva Standar Protein.

Menyiapkan larutan protein standar Bovine Serum Albumin (BSA) sekitar 30-300 $\mu\text{g/ml}$. Pengenceran dilakukan sebagai berikut :

Tabung	ml larutan 300 μg protein/ml	ml H ₂ O	μg protein/ml
1.	0	1,0	0
2.	0,1	0,9	30
3.	0,2	0,8	60
4.	0,3	0,7	90
5.	0,4	0,6	120
6.	0,5	0,5	150
7.	0,6	0,4	180
8.	0,7	0,3	210
9.	0,8	0,2	240
10.	1,0	0,0	300

Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 8 ml reagen Lowry B dan dibiarkan paling sedikit 10 menit. Kemudian ditambahkan dengan 1 ml reagen Lowry A dikocok dan dibiarkan selama 20 menit. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer. Dibuat kurva standar pada kertas grafik yang menunjukkan

hubungan antara absorbansi pada ordinatnya dan konsentrasi pada absis (Sudarmadji, dkk, 1984).

C.8. Pengukuran Berat Kering Kapang.

Massa sel kapang hasil fermentasi disaring dengan kertas Whattman dan dicuci dengan akuades, dioven selama 8 jam pada suhu 110°C . Kemudian dimasukkan ke dalam desiccator selama 15 menit, ditimbang (Yudoamidjoyo, dkk, 1992).

D. Rancangan Percobaan.

Dalam penelitian ini, perlakuan yang diberikan meliputi :

1. Konsentrasi susu rusak
25% (M1), 50% (M2), 75% (M3), dan Media Kontrol (MK).
2. Lama Inkubasi
7 hari (W1), 14 hari (W2), 21 hari (W3).
3. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing perlakuan.

Kombinasi Perlakuan tertera pada Tabel 3., berikut ini :

Tabel 3. Susunan Kombinasi Perlakuan

	W1	W2	W3
MK	MKW1	MKW2	MKW3
M1	M1W1	M1W2	M1W3
M2	M2W1	M2W2	M2W3
M3	M3W1	M3W2	M3W3

4. Parameter yang diamati adalah diameter daerah hambatan di sekitar silinder dan berat kering kapang. Parameter yang lain adalah kadar protein media fermentasi.

5. Model Analisa Data

Model percobaan ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF), faktor pertama adalah konsentrasi susu rusak (M), yang terdiri dari 4 perlakuan variasi yaitu MK, M1, M2, dan M3, sedang faktor kedua adalah lama inkubasi terdiri dari tiga tingkat, yaitu 7, 14, dan 21 hari. Dengan pengulangan 3 kali pada setiap perlakuan sehingga didapat 36 unit percobaan. Model yang digunakan :

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + M_i W_j + EK_{(ij)} \quad \text{dimana :}$$

Y_{ijk} = Nilai pengamatan karena pengaruh bersama perlakuan i faktor konsentrasi susu rusak dan perlakuan j faktor lama inkubasi.

μ = Nilai rata-rata sebenarnya.

M_i = Pengaruh perlakuan ke-i faktor konsentrasi susu rusak.

W_j = Pengaruh perlakuan ke-j faktor lama inkubasi

$M_i W_j$ = Pengaruh interaksi antara perlakuan i konsentrasi susu rusak dengan perlakuan j faktor lama inkubasi.

$EK_{(ij)}$ = Nilai kesalahan dari unit ulangan ke-K dalam kombinasi perlakuan.

(Hanafiah, 1993).

