

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Juni 2004 sampai Maret 2005.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, 'beaker glass', gelas ukur, pipet ukur, pipet tetes, batang pengaduk, gelas benda, gelas penutup, jarum ose, mikroskop, 'Laminar Air Flow', autoklaf, inkubator, oven, mikrometer, lampu UV, botol timbang, jangka sorong, neraca analitis Sartorius, pinset, lampu spirtus dan korek api.

3.2.2 Bahan

Medium Czapek Dox Agar (CDA), medium Potato Dextrose Agar (PDA), medium Taoge Extract Agar (TEA), medium Tributirin Agar, medium Gelatin (15%), medium Agar Amilum (1%), medium 'Carboxy Methyl Cellulose' (CMC) Agar (1%), akuades, alkohol, kloramfenikol, 'lactofenol cotton blue', larutan I₂KI, dan kertas saring.

3.3. Cara Kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan yaitu jamu serbuk “Pegel Linu” dari 3 (tiga) merk jamu (merk A, B dan C). Jamu-jamu tersebut diperoleh dari 12 warung jamu di Semarang. Masing-masing sampel dimasukkan dalam kantong plastik dan diberi label yang mencantumkan nama, tanggal, dan tempat pengambilan sampel (Kuswanto *dkk.*, 1989).

3.3.2 Pengukuran Kadar Air

Sampel jamu serbuk ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam atau sampai beratnya konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan merupakan kadar air dalam bahan (Sudarmadji *dkk.*, 1984).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

3.3.3 Isolasi Kapang

Isolasi kapang dilakukan dengan teknik ‘direct plating’ (Samson *et al.*, 1995). Jamu serbuk sebanyak 0,5 gram ditaburkan di atas permukaan medium TEA pada cawan petri yang ditambah kloramfenikol 100 ppm, dilakukan secara triplo. Dibuat kontrol berupa medium TEA yang tidak diinokulasi sampel. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan dilakukan pengamatan setiap hari

terhadap koloni kapang yang tumbuh. Masing-masing koloni kapang dipindahkan ke medium TEA miring untuk ditumbuhkan menjadi biakan murni.

3.3.4 Identifikasi Kapang

Isolat kapang *Aspergillus* ditumbuhkan pada medium CDA (Czapek Dox Agar) untuk melakukan pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik meliputi koloni (warna, *reverse of colony*, permukaan, diameter, *growing zone*, *radial furrows* dan *exudate drops*). Pengamatan mikroskopik meliputi konidia (bentuk, warna, permukaan, ukuran), *conidial head*, konidiofor (permukaan, warna, panjang, diameter), vesikel (bentuk, diameter), fialid (susunan, warna, ukuran), metula dan sifat tambahan (*Hülle cell*, sklerotia, kleistothecia). Hasil pengamatan digunakan untuk identifikasi menurut Raper and Fennel (1965), Samson *et al.* (2004), Domsch *et al.* (1980), Gandjar *dkk.* (1999) dan Klich (2002).

3.3.5 Deteksi Mikotoksin

Masing-masing sampel jamu secara terpisah diletakkan pada cawan petri yang telah diberi alas tiga lembar kertas saring lembab, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Selanjutnya masing-masing isolat kapang *Aspergillus* diinokulasikan ke sampel jamu pada cawan petri tersebut dan diinkubasikan selama dua minggu pada suhu ruang. Masing-masing kultur kapang selanjutnya disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 365 nm selama beberapa

menit. Kapang yang menghasilkan mikotoksin akan berfluoresensi (Dharmaputra, 1988).

3.3.6 Uji Amilolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari diinokulasikan sebanyak \pm satu ose pada medium agar amilum (1%) dalam cawan petri. Setelah itu diinkubasikan pada suhu ruang (\pm 28°C) selama empat hari. Hidrolisis amilum diamati dengan menuangkan larutan I₂KI secara merata ke dalam cawan petri. Reaksi I₂KI dan amilum akan menghasilkan warna biru sedangkan daerah di sekitar koloni membentuk bagian yang bening yang menandakan terjadi hidrolisis amilum. Daerah bening (zona hidrolisis) dan koloni diukur diameternya (Brock and Madigan, 1991).

3.3.7 Uji Lipolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari diinokulasikan sebanyak \pm satu ose pada medium Tributirin Agar dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (\pm 28°C) selama tujuh hari. Diamati adanya daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni dan diukur diameter koloni serta diameter zona hidrolisisnya (Smith and Haas, 1992).

3.3.8 Uji Proteolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari diinokulasikan sebanyak \pm satu ose pada medium Gelatin (15%) dalam tabung

reaksi, kemudian diinkubasikan selama lima hari pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$). Uji positif bila medium gelatin berubah menjadi cair pada suhu rendah (4°C) (Brock and Madigan, 1991).

3.3.9 Uji Selulolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari diinokulasikan sebanyak \pm satu ose pada medium CMC Agar (1%) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) selama lima hari. Hidrolisis selulosa diamati dengan menuangkan larutan I_2KI di sekitar koloni, selanjutnya diukur diameter zona hidrolisis dan diameter koloninya (Doran, 2000).

3.4. Parameter

Parameter utama yang diamati adalah morfologi makroskopik dan mikroskopik dari isolat kapang, deteksi mikotoksin dan uji aktivitas enzimatik meliputi amilase, lipase, selulase dan protease. Parameter pendukung adalah kadar air sampel, suhu dan kelembaban relatif lingkungan tempat pengambilan sampel.

3.5. Analisis Data

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan analisis deskriptif.