

BAB III

METODE PENELITIAN

3. 1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro dari bulan Juni 2004 sampai Maret 2005.

3. 2. Alat dan Bahan

3. 2. 1. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain: Sampel rimpang kunyit, medium Taoge Extract Agar (TEA), medium Potato Dextrose Agar (PDA), medium Czapek's Dox Agar (CDA), Akuades, Alkohol 70%, "laktophenol cotton blue", spiritus, minyak emersi, kloramfenikol 100 ppm, medium "Tributyryn agar", gelatin, medium Agar amilum, medium Agar CMC, I₂KI.

3. 2. 2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, corong, lampu spiritus, kaca obyek, kaca penutup, jarum ose, pinset, gunting, pipet tetes, mikroskop cahaya, jangka sorong, mikrometer, botol timbang, termometer, lampu UV, autoklaf, neraca analitik, dan oven.

3. 3. Cara Kerja

3. 3. 1. Pengambilan Sampel

Kunyit bahan jamu kering yang digunakan sebagai sampel diperoleh dari empat tempat penjualan yang berbeda yaitu: A (Pasar Peterongan), B (Pasar Johar), C (Pasar Karang Ayu) dan D (Toko Jamu). Masing-masing sampel dimasukkan dalam kantong plastik dan diberi label yang mencantumkan nama, tanggal, dan tempat pengambilan sampel (Kuswanto dkk., 1989).

3. 3. 2. Isolasi Kapang

Isolasi dilakukan dengan metode langsung (*direct plating*). Tiga potong sampel rimpang kunyit diletakkan pada cawan petri yang telah berisi medium TEA yang mengandung kloramfenikol 100 ppm, dilakukan secara triplo. Cawan-cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama tujuh hari hari, setiap dua puluh empat jam pertumbuhan kapang diamati. Kapang yang tumbuh di permukaan rimpang kunyit diisolasi sehingga diperoleh biakan murni. Isolat kapang *Aspergillus* selanjutnya dipindahkan ke medium CDA untuk identifikasi lebih lanjut (Samson, 2004).

3. 3. 3. Identifikasi Kapang

Identifikasi dilakukan dengan pengamatan terhadap morfologi kapang *Aspergillus* secara makroskopik dan mikroskopik (Lampiran 1.). Pengamatan koloni kapang meliputi: warna, diameter, tekstur, *Reverse of colony*, *Radial Furrows*, *Growing Zone* dan *Exudate Drop*. Pengamatan mikroskopis meliputi : Kepala konidia (Bentuk); Konidia (Bentuk, Ukuran, Permukaan, Susunan dan Warna); Phialid dan metula (Susunan dan Ukuran); Vesikel (Bentuk dan Ukuran); Konidiofor (Warna, Permukaan, Panjang dan Diameter) dan struktur tambahan yaitu : sklerotia, *hulle cells* dan kleistotesium (Raper and Fennel, 1965). Hasil pengamatan digunakan untuk melakukan identifikasi menurut kunci identifikasi Raper and Fennel (1965); Klich (2002) dan Samson *et al.* (2004).

3. 3. 4. Deteksi Mikotoksin

Masing-masing sampel secara terpisah diletakkan pada cawan petri yang telah diberi alas tiga lembar kertas saring lembab, kemudian diinokulasikan isolat *Aspergillus*. Inkubasi dilakukan selama dua minggu pada suhu ruang. Sediaan ini selanjutnya disinari dengan sinar UV, fluoresensi yang terjadi diamati. Jika fluoresensi sukar diamati sampel dibilas dengan air hingga kapangnya tercuci. Fluoresensi diamati setelah sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C (Dharmaputra, 1988).

3. 3. 5. Uji Amilolitik

Isolat kapang *Aspergillus* dari medium PDA miring berumur lima hari sebanyak kurang lebih satu ose diinokulasikan pada medium agar amilum dalam cawan petri, diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama empat hari. Selanjutnya ke dalam biakan ditetesi dengan larutan iodin secara merata. Terjadinya hidrolisis amilum dapat diketahui dengan pengukuran zona hidrolisis (Brock and Madigan, 1991).

3. 3. 6. Uji proteolitik

Isolat kapang dari media PDA miring berumur lima hari sebanyak kurang lebih satu ose diinokulasikan pada media gelatin 15% dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu ruang selama kurang lebih lima hari. Reaksi positif ditandai dengan cairnya gelatin pada suhu 4 °C (Brock and Madigan, 1991).

3.3. 7. Uji Lipolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari sebanyak kurang lebih satu ose diinokulasikan pada media Tributyrin Agar dalam cawan petri, diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama kurang lebih tujuh hari. Diamati adanya zona bening disekitar koloni, diukur diameter koloni dan zona bening (Smith and Haas, 1992).

3. 3. 8. Uji Selulolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada medium PDA miring berumur lima hari diinokulasikan pada medium Agar CMC dalam cawan petri, diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama kurang lebih enam hari, selanjutnya ditetesi dengan larutan, I₂KI secara merata. Terjadinya hidrolisis selulase dapat diketahui dengan pengukuran zona hidrolisis (Doran, 2004).

3. 3. 9. Penghitungan Kadar Air

Rimpang dikeringkan dalam oven pada suhu 105-110 °C selama 2 jam atau sampai beratnya konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air yang diuapkan (Winarno, 1992). Kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat kering}}{\text{Berat Awal}} \times 100 \%$$

3. 4. Parameter Pendukung

Parameter pendukung yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Suhu lingkungan tempat pengambilan sampel (°C)
2. Kadar air sampel (%)
3. Kelembaban relatif lingkungan tempat pengambilan sampel (%)