

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. Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain sampel rimpang temulawak kering, media Taoge Ekstrak Agar (TEA) yang mengandung kloramfenikol 100 ppm, media *Czapek's Dox Agar* (CDA), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media Agar Amilum, media Agar Trybutirin, media Gelatin 15%, media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), aquades, *lactophenol cotton blue*, minyak imersi, dan spiritus.

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, termometer, lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm, autoklaf, neraca analitis Sartorius, botol timbang, dan oven.

3.3. Cara Kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel Rimpang Temulawak Kering

Rimpang temulawak kering yang digunakan sebagai sampel diperoleh dari lima tempat penjualan yang berbeda, yaitu tiga pasar tradisional dan dua toko jamu di Semarang (Lampiran 6.). Masing-masing sampel dimasukkan dalam kantong plastik dan diberi label yang mencantumkan nama, tanggal, dan tempat pengambilan sampel (Kuswanto dkk, 1989). Kondisi lingkungan tempat pengambilan sampel diamati dan dicatat sebagai data pendukung penelitian.

3.3.2 Isolasi Kapang

Isolasi kapang dilakukan dengan teknik *direct plating*. Tiga potong sampel diletakkan di atas permukaan medium TEA yang mengandung kloramfenikol 100 ppm dalam cawan petri, dilakukan secara triplo. Biakan diinkubasi pada suhu kamar selama tujuh hari, setiap 24 jam pertumbuhan kapang diamati. Koloni-koloni yang tumbuh diisolasi sehingga diperoleh biakan murni. Sebelum diidentifikasi, masing-masing kapang *Aspergillus* dipindahkan ke medium CDA (Samson *et al.*, 2004).

3.3.3 Identifikasi Kapang

Identifikasi ini dilakukan dengan pengamatan morfologis, yaitu diamati secara makroskopis dan mikroskopis (Lampiran 1.). Pengamatan morfologi koloni meliputi: warna koloni, warna *reverse of colony*, diameter koloni, *radial furrow*, *growing zone*, *exudat drops*, dan *sclerotia*. Pengamatan mikroskopik meliputi: *conidial head* (bentuk), konidia (bentuk, ukuran, dan permukaan), konidiofor

(ukuran dan permukaan), vesikel (bentuk dan ukuran), sterigmata (susunan dan ukuran). Hasil pengamatan digunakan untuk melakukan identifikasi dengan menggunakan buku-buku identifikasi (Raper and Fennel, 1965; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2004).

3.3.4 Kadar Air pada Rimpang

Rimpang dikeringkan dalam oven pada suhu 105 – 110°C selama dua jam atau sampai beratnya konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air yang diuapkan. Untuk menghitung kadar air digunakan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\% \text{ (Winarno, 1992).}$$

3.3.5 Deteksi Keberadaan Mikotoksin

Sampel rimpang temulawak kering diletakkan dalam cawan petri yang telah diberi alas tiga lembar kertas saring lembab kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Sampel yang telah steril tersebut diinokulasi dengan isolat kapang *Aspergillus* dan diinkubasikan selama dua minggu pada suhu ruang. Kultur kapang selanjutnya disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 365 nm dan diamati. Jika fluoresensi sukar diamati, sampel dibilas dengan air hingga kapangnya tercuci kemudian diamati lagi setelah sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C (Dharmaputra, 1988).

3.3.6 Uji Aktivitas Enzim

3.3.6.1 Uji Aktivitas Amilolitik

Isolat kapang *Aspergillus* umur lima hari diinokulasikan (\pm satu ose) pada medium Agar Amilum (1%) dalam cawan petri, inkubasi suhu ruang selama empat hari. Hidrolisis amilum diamati dengan menuangkan larutan I₂KI secara merata ke dalam cawan petri. Daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni diamati kemudian diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya (Brock and Madigan, 1991).

3.3.6.2 Uji Aktivitas Lipolitik

Isolat kapang *Aspergillus* umur lima hari diinokulasikan (\pm satu ose) pada medium Agar Tributirin dalam cawan petri, inkubasi pada suhu ruang selama tujuh hari. Daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni diamati kemudian diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya. (Smith and Haas, 1992).

3.3.6.3 Uji Aktivitas Proteolitik

Isolat kapang *Aspergillus* umur lima hari di inokulasikan (\pm satu ose) pada medium gelatin (15%) dalam tabung reaksi, inkubasi pada suhu ruang selama lima hari. Uji positif bila medium gelatin berubah menjadi cair setelah disimpan pada suhu \pm 4°C (Brock and Madigan, 1991).

3.3.6.4 Uji Aktivitas Selulolitik

Isolat kapang *Aspergillus* umur lima hari diinokulasikan (\pm satu ose) pada medium *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dalam cawan Petri, inkubasi pada suhu ruang selama lima hari. Hidrolisis selulosa diamati dengan menuangkan larutan

I₂KI secara merata ke dalam cawan petri. Daerah bening (zona hidrolisis) di sekitar koloni diamati kemudian diukur diameter koloni dan diameter zona hidrolisisnya (Doran, 2004).

3.4. Parameter

Parameter utama yang diamati adalah morfologi makroskopis dan mikroskopis isolat kapang, deteksi mikotoksin serta aktivitas amilase, lipase, protease, dan selulase.

Parameter pendukung berupa kadar air sampel (%), suhu (°C) dan kelembaban relatif (%) lingkungan tempat pengambilan sampel.

