

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiogenetika dan Biokimia, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro dari bulan Juni 2004 sampai Maret 2005.

#### **4.2. Alat dan Bahan**

##### **4.2.1. Alat**

Mikroskop, cawan petri, erlenmeyer, pipet tetes, gelas benda, kaca penutup, kaca obyek, jarum ose, lampu spiritus, autoklaf, gelas beker, pengaduk magnetik, sprayer, inkubator, timbangan analitis, oven, kertas label, mikrometer, *pH stick*, korek api, kertas saring dan lampu UV.

##### **4.2.2. Bahan**

Sampel kopi bubuk, akuades, alkohol, *laktofenol cotton blue*, khlorampenikol, *Taoge Ekstrak Agar* (TEA), *Potato Dekstrosa Agar* (PDA), *Czapek Dekstrosa Agar* (CDA), *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), agar gelatin (15%), larutan I<sub>2</sub>KI, agar tributirin dan agar amilum (1%).

#### **4.3. Cara Kerja**

##### **4.3.1 Pengambilan Sampel**

Tempat Pengambilan sampel kopi bubuk ditentukan secara purposif dengan menggunakan tiga macam jenis kopi bubuk (Merk A, B, C) dengan

kriteria variasi harga dari kopi bubuk harga Rp 2000/ons, harga Rp 1000/ons dan kopi bubuk harga Rp 800/ons. Tempat pengambilan sampel yaitu Johar, Karang Ayu dan Bulu.

#### 4.3.2. Isolasi kapang.

Isolasi kapang dilakukan dengan teknik *direct plating*. Kopi bubuk sebanyak 0,5 gram ditaburkan pada cawan petri yang telah berisi media TEA yang mengandung klorampenikol 100 ppm, dilakukan secara triplo. Diinkubasi pada suhu kamar selama 5-7 hari, setiap 24 jam dilakukan pengamatan. Kapang yang representatif dipilih berdasarkan warna dan tekstur koloni, selanjutnya diisolasi ke media TEA. Kultur murni kapang *Aspergillus* dipindahkan ke medium CDA miring dan diinkubasikan pada suhu kamar untuk diidentifikasi (Samson *et al.*, 2004).

#### 4.3.3. Identifikasi Kapang

Identifikasi kapang dilakukan dengan pengamatan morfologi kapang *Aspergillus* meliputi struktur makroskopik dan mikroskopik (Lampiran 1.). Struktur makroskopik kapang meliputi warna koloni, diameter koloni, *growing zone*, *radial furrow* dan *exudate drop*, sedangkan struktur mikroskopik kapang meliputi: konidia (bentuk, permukaan, warna dan permukaan), konidiofor (permukaan dinding, ukuran, warna dan panjang diameter), vesikel (bentuk dan ukuran), metula dan fialid (Raper and Fennel, 1965). Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis kapang digunakan untuk melakukan identifikasi

menurut: Raper and Fennel (1965), Domsch *et al.*, (1980), Samson *et al.*, (1995), Gandjar *et al.*, (1999) dan Klich (2002).

#### **4.3.4. Aktivitas Enzimatis**

##### **4.3.4.1. Uji Aktivitas Amilolitik**

Isolat kapang *Aspergillus* pada media PDA miring berumur lima hari diinokulasikan pada medium agar amilum 0,1% dalam cawan petri steril, diinkubasi pada suhu ruang (28°C) selama empat hari. Selanjutnya ke dalam cawan petri dituangkan larutan I<sub>2</sub>KI secara merata. Hidrolisis amilum terlihat dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni ( Collins *et al.*, 1984).

##### **4.3.4.2. Uji Aktivitas Proteolitik**

Isolat kapang *Aspergillus* pada media PDA miring berumur lima hari diinokulasikan pada medium agar gelatin 15% dalam tabung reaksi, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (28°C) selama lima hari. Aktivitas protease diamati dengan cairnya medium gelatin pada suhu 4° C (Brock and Madigan, 1991).

##### **4.3.4.3. Uji Aktivitas Lipolitik**

Isolat kapang *Aspergillus* pada media PDA miring berumur lima hari diinokulasikan satu titik pada medium agar tributirin dalam cawan petri steril. Isolat diinkubasi pada suhu ruang selama tujuh hari. Aktivitas lipase diamati dengan terbentuknya daerah bening di sekitar koloni kapang (Smith and Haas, 1992).

#### 4.3.4.4. Uji Aktivitas Selulolitik

Isolat kapang *Aspergillus* pada media PDA miring berumur lima hari diinokulasikan satu titik pada medium agar 1% CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) dalam cawan petri steril, diinkubasi pada suhu ruang (28°C) selama empat hari. Selanjutnya cawan petri ditetesi dengan larutan I<sub>2</sub>KI secara merata. Hidrolisis selulosa diamati dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni (Doran, 2000).

#### 4.3.5. Deteksi Mikotoksin

Masing- masing sampel secara terpisah diletakkan pada cawan petri steri yang telah diberi alas tiga lembar kertas saring lembab dan kopi bubuk, kemudian diinkubasikan selama dua minggu pada suhu ruang (28°C). Sediaan ini selanjutnya disinari dengan sinar UV panjang gelombang 365 nm (Dharmaputra, 1988).

#### 4.4. Pengukuran Kadar Air

Sebanyak satu sampai dua gram sampel kopi bubuk, ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya, selanjutnya dipanaskan dalam oven 100-105°C hingga berat konstan (Arpah, 1993).

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Berat awal sampel} - \text{berat akhir sampel}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

#### 4.5. Parameter

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

Parameter pendukung berupa kadar air sampel, suhu dan kelembaban relatif lingkungan tempat pengambilan sampel.

