

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang. Dilaksanakan pada bulan Pebruari sampai Agustus 1997.

B. Bahan dan Alat

Bahan:

Teh merek 'Cangkir' kemasan kertas produksi bulan Pebruari, Maret, April, Mei diambil dari pasar, medium Taoge Ekstrak Agar (TEA) : taoge 100 g, glukosa 60 g, agar 15-20 g untuk 1 liter medium, Czapek's Dox Agar (CDA) : sukrosa 30,0 g, Na NO₃ 3,0 g, K₂ HPO₄ 1,0 g, KCl 0,5 g, MgSO₄ 7H₂ O 0,5 g, FeSO₄ 0,01 g, agar 15 g untuk 1 liter medium, Potato Dekstrosa Agar (PDA) : ekstrak kentang (200 g kentang dalam 1 liter air), dekstrose 20 g, agar 20 g, pH masing-masing medium 5-6, antibiotik (Kloramfenikol) 50 mg /liter (Gams dkk, 1987).

Alat :

Mikroskop, cawan petri, erlenmeyer, pipet 1 ml, gelas benda dan kaca penutup, ose.

C. Cara Kerja

C. 1. Pengambilan sampel

Sampel teh seduh diambil dari pasar, dengan bulan produksi berbeda yaitu Pebruari (Sampel 3), Maret (Sampel 2), April (Sampel 1), Mei (Sampel 0), masing-masing sampel berjumlah 5 kotak. Semua sampel diamati pada bulan Mei sehingga sampel mempunyai masa edar (3 bulan), (2 bulan), (1 bulan), (20 hari).

C. 2. Perhitungan Jumlah Mikroba

Perhitungan jumlah mikroba dilakukan dengan teknik lempeng total yaitu : teh seduh yang telah dihaluskan ditimbang secara aseptis sebanyak 1 gram. Dimasukkan dalam aquades steril 99 ml. Kemudian di inokulasikan pada medium TEA sebanyak 1 ml sebagai pengenceran dengan konsentrasi 10^{-2} dan di buat pengenceran bertingkat yaitu 1ml dari larutan teh dimasukkan ke 9 ml aquades steril sebagai pengenceran dengan konsentrasi 10^{-3} . Dilanjutkan 1 ml dari pengenceran dengan konsentrasi 10^{-3} dimasukkan ke 9 ml aquades steril sebagai pengenceran dengan konsentrasi 10^{-4} dan seterusnya sampai pada pengenceran dengan konsentrasi 10^{-6} . Dari masing-masing pengenceran diambil 1 ml dibuat taburan dalam petridish dengan menggunakan TEA. Di inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam untuk koloni selain kapang dan 2 - 4 hari untuk koloni kapang. Koloni mikroba yang tumbuh dihitung.

$$\text{Koloni/gram} = \Sigma \text{Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} \quad (\text{Fardiaz, 1992})$$

C. 3. Isolasi Kapang

3. 1. Cara tuang

Daun teh seduh seberat satu gram disuspensikan dalam 50 ml aquades steril kemudian dikocok. Dengan pipet diambil 0,1-0,5 ml dimasukkan kedalam medium TEA dengan ditambah kloramfenikol yang masih mencair dan digojog dengan baik, supaya suspensi sampel merata. Didiamkan hingga lapisan medium TEA padat. Diinkubasi pada suhu 25°C selama 3-5 hari. Pertumbuhan kapang diamati tiap 1 hari sekali. Untuk setiap bungkus teh diulangi 4 kali. Dari koloni-koloni yang tumbuh dipindahkan ke medium TEA untuk ditumbuhkan sebagai biakan murni. Sebelum diidentifikasi dipindahkan ke media khusus pada masing-masing kapang seperti PDA dan CDA (Jutono dkk, 1980).

3. 2. Cara tabur

Teh seduh seberat 0,5 gram ditaburkan pada agar yang masih cair kemudian diratakan. Didiamkan sampai lapisan agar padat. Diinkubasi pada suhu 25°C selama 3-5 hari, setiap 24 jam pertumbuhan kapang diamati. Dari koloni-koloni yang tumbuh dipindahkan ke medium TEA untuk ditumbuhkan sebagai biakan murni. Sebelum diidentifikasi masing-masing kapang dipindahkan ke medium khusus yaitu medium CDA untuk *Aspergillus sp.* medium PDA untuk *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.* (Jutono dkk, 1980).

C. 4. Penganatan Morfologi Kapang

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol sampai bebas dari lemak dan debu, kemudian ditetesi laktofenol pada bagian tengahnya. Biakan kapang diambil sedikit dengan jarum preparat dan diletakkan di atas gelas benda yang telah di beri larutan laktofenol. Kemudian ditutup dengan gelas penutup. Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lemah dan perbesaran sedang (Jutono dkk, 1980).

C. 5. Identifikasi Kapang

Identifikasi ini dilakukan dengan pengamatan morfologis, selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan buku-buku identifikasi menurut Raper dan Fennell (1977); Bennet dan Klich (1990); Samson dkk (1995).

C. 6. Jumlah jenis kapang

Menghitung jenis kapang dilakukan yaitu dengan cara menghitung semua jenis kapang yang ditemukan pada setiap petridish.

C. 7. Kadar air pada teh seduh

Teh seduh dikeringkan pada oven pada suhu 105-110°C selama 2 jam atau sampai beratnya konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan adalah banyak air yang diuapkan (Winarno, 1991).

D. Parameter yang diamati :

1. Jumlah total mikroba/gram
2. Jumlah jenis kapang
3. Kadar air.