

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Sampel tempe gembus di peroleh dari pabrik tempe gembus 'Pak Hadi' di lingkungan Sentra Industri Tempe dan Tahu di Lamper Tengah Kecamatan Candisari Kodia Semarang. Isolasi dan identifikasi mikroorganisme dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi-Genetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, sedangkan pemeriksaan senyawa isoflavon di Laboratorium Bahan Alam Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 1999 – Maret 2000.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tempe gembus dengan ragi usar (laru dari daun *Tectona grandis*) dan ragi Raprima produksi LIPI Bandung, sedangkan bahan penunjang yang digunakan terdiri dari alkohol 70%, air pepton 0,1%, medium Taoge Ekstrak Agar, medium Potato Dextrosa Agar, medium Nutrien Agar, medium Nutrien Cair, larutan Gram A (larutan cat Hucker's Crystal Violet), larutan Gram B (mordan JKJ), larutan Gram C (alkohol – acetone), larutan Gram D (larutan cat penutup Safranin), larutan Klein A, B, dan C, medium KCN, medium OF, akuades steril, vaselin, medium laktosa, glukosa, fruktosa, dan sukrosa cair, indikator Merah Fenol, Larutan H₂O₂ 3%, antibiotik Kloramfenikol, anti jamur

Nystatin, medium NaCl, n-heksana, metanol, sikloheksan, diklorometan, etil format, asam format.

2. Alat Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan berbagai macam alat yang meliputi tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, timbangan, batang pengaduk, sendok plastik, ose ujung tumpul, ose ujung runcing, *aluminium foil*, kapas, kertas saring, cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, pipa kapiler, gelas penutup, gelas benda, gelas benda dengan cekungan tunggal, mikroskop, tabung Durham, cawan porselen, labu erlenmeyer, labu takar, *autoklaf*, inkubator, oven, *hot plate*, kompor listrik, peralatan *soxhlet* lengkap, *laminar air flow*, labu ukur, corong gelas, *chamber*, *rotary evaporator*, plat KLT silica gel MERCK 60F254, lampu UV, lemari pendingin, pH meter, oksidase stik.

C. Cara Kerja

1. Penghitungan Jumlah Bakteri Pada Tempe Gembus

Ditimbang sampel tempe gembus sebanyak 10 gram dan dimasukkan bersama dengan 90 ml air pepton 0,1% steril ke dalam blender yang telah disterilkan dengan alkohol, kemudian diblender sampai hancur dan menjadi cairan kental. Cairan ini dimasukkan kembali ke labu erlenmeyer ditutup dengan kapas dan digojog supaya homogen. Setelah itu diambil 1 ml suspensi sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air pepton dan digojog. Suspensi yang dihasilkan adalah dengan konsentrasi 10^{-1} . Selanjutnya dari tabung yang berisi suspensi dengan konsentrasi 10^{-1} diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 ml air pepton. Suspensi yang dihasilkan adalah dengan konsentrasi 10^{-2} . Demikian seterusnya

sampai dengan konsentrasi 10^{-7} , dan dari tiap pengenceran diambil 1 ml ditanam pada cawan petri dengan metode tuang dengan medium Nutrien Agar + 6,5 mg/l anti jamur Nistatin, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

Setelah 24 jam, dilakukan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh dalam cawan petri menggunakan colony counter yang memenuhi syarat sebagai berikut :

- Cawan petri yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300, namun bila lebih maka dipilih jumlah yang mendekati 300.
- Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (koloni 'spreader').
- Apabila dipakai ulangan, setelah hasilnya memenuhi syarat maka hasilnya dirata-rata.

Setelah itu ditentukan jumlah bakteri setiap gram bahan sampel tempe gembus. Perhitungan dilakukan dengan mengalikan jumlah koloni dengan kebalikan pengencerannya. Apabila perbandingan jumlah bakteri hasil pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya adalah sama atau lebih kecil dari dua maka jumlah bakteri dirata-rata, bila hasil perbandingan adalah lebih besar dari dua maka yang dipakai adalah jumlah bakteri pengenceran sebelumnya (Lay, 1994 ; Sriani, 1994 ; Anonim, 1984).

2. Isolasi Mikroorganisme Pada Tempe Gembus

2.1. Isolasi Bakteri

Sampel tempe gembus yang telah berupa cairan kental atau suspensi dengan ose tumpul digoreskan ke medium Nutrien Agar pada cawan petri beberapa garis yang sejajar, kemudian ose dipijarkan lagi dan setelah dingin digoreskan lagi beberapa garis yang sejajar pada cawan petri dan yang memotong garis-garis yang

terdahulu, setelah itu diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu 37° C. Koloni yang tumbuh diamati di bawah mikroskop atau kaca pembesar, dan tiap koloni yang berbeda dipindahkan dengan ose secara aseptis ke Nutrien Agar miring, diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Tiap koloni dilakukan pengecatan Gram (Lay, 1994 ; Anonim, 1984). Setelah diperoleh biakan murni dilakukan serangkaian uji untuk mengetahui ciri morfologi dan biokimia dari isolat.

2.2. Isolasi Kapang

Isolasi kapang dari tempe gembus dilakukan dengan cara : Tempe gembus dari masing-masing bungkus diiris dan diletakkan pada permukaan medium TEA pada cawan petri dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni kapang tempe gembus yang tumbuh pada medium TEA dipindahkan ke medium PDA miring untuk ditumbuhkan sebagai biakan murni dan diamati lebih lanjut secara mikroskopis (Rukmi, 1996)

3. Identifikasi Mikroorganisme pada Tempe gembus

3.1. Karakterisasi Isolat Bakteri Pada Tempe Gembus

3.1.1. Pengecatan Gram

Dilakukan dengan cara : Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70% dan difiksasi dengan cara dipanaskan di atas lampu spiritus. Diberi 1 tetes akuades steril, ditambahkan 1 ose isolat dan disuspensikan, kemudian difiksasi di atas lampu spiritus. Ditetesi Gram A sebanyak 1 – 2 tetes dan ditunggu selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir dan kemudian dikeringanginkan. Ditetesi dengan Gram B dan ditunggu selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram C selama 30 detik, dicuci

dengan air mengalir dan kemudian dikeringanginkan. Yang terakhir, ditetesi dengan Gram D selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan kemudian dikeringanginkan (Lay, 1994). Selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan perbesaran kuat kemudian difoto.

3.1.2. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan menurut metode Klein dimulai dengan pembuatan preparat apusan seperti pada pewarnaan Gram. Preparat ditetesi dengan larutan Klein A dan diuapi sampai nampak uap namun tidak mendidih selama lima menit. Preparat selanjutnya didinginkan dan dicuci dengan air mengalir. Preparat kemudian ditetesi dengan Klein B sampai warna cat luntur lalu dicuci dengan air mengalir. Preparat kemudian ditetesi dengan Klein C dan didiamkan selama dua menit lalu dicuci dengan air mengalir. Preparat dikeringanginkan lalu diamati di bawah mikroskop (Salle, 1971)

3.1.3. Pengamatan Motilitas Bakteri Dengan Cara Hanging Drop

Gelas benda cekung dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol dan disterilisasi di atas lampu spiritus. Diambil 1 ose isolat bakteri dan disuspensikan dengan setetes akuades steril dan diletakkan di atas gelas penutup. Diberi vaselin pada empat tepi cekungan gelas benda, kemudian gelas benda cekung ditutupkan di atas gelas penutup dengan menempatkan suspensi biakan isolat tepat di lubang cekungan. Gelas benda dan penutup yang telah berlekatan secara tepat dibalik sehingga posisi suspensi menjadi menggantung pada gelas penutup. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat adanya gerakan bakteri (Cowan dan Steel, 1975).

3.1.4. Uji Katalase

Diteteskan satu tetes H_2O_2 3% pada gelas benda. Diambil satu ose isolat bakteri dan diletakkan pada tetesan H_2O_2 tersebut. Diamati terjadinya gelembung udara dalam tetesan H_2O_2 yang menunjukkan reaksi positif (Cowan dan Steel, 1975).

3.1.5. Uji Oksidase

Oksidase stik ditotolkan pada permukaan koloni isolat bakteri yang ditumbuhkan pada medium Nutien Agar di cawan petri kemudian diamati adanya perubahan warna pada ujung oksidase stik dari putih menjadi ungu.

3.1.6. Fermentasi Karbohidrat

Diinokulasikan isolat bakteri ke masing-masing tabung reaksi yang berisi medium laktosa, glukosa, fruktosa, dan sukrosa cair yang telah diberi indikator Fenol Merah dan diisi dengan tabung Durham. Diinkubasi pada suhu $37 - 44^\circ C$ selama 24 – 48 jam dan diamati perubahan warna pada medium serta terbentuknya gas pada tabung Durham (Cowan dan Steel, 1975).

3.1.7. Uji Oksidasi Fermentasi (OF)

Isolat berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam dua tabung berisi medium OF dengan cara menusuk medium OF secara tegak menggunakan ose runcing yang lurus. Salah satu dari tabung ditambahkan parafin cair setinggi satu cm. Diinkubasi selama 14 hari dan diamati perubahan warna pada medium setiap harinya (Cowan dan Steel, 1975).

3.1.8. Pertumbuhan Pada KCN Cair

Uji dilakukan dengan menginokulasikan kultur isolat berumur 24 jam ke dalam KCN cair, diinkubasi selama 48 jam dan diamati perubahan kekeruhan

cairan untuk dibandingkan dengan standar yaitu KCN cair yang tidak diinokulasi (Cowan dan Steel, 1975).

3.1.9. Hidrolisis Pati

Uji dilakukan dengan menginokulasikan kultur isolat berumur 24 jam ke dalam medium pati agar lalu diinkubasi selama 24 – 48 jam. Petri ditambah dengan larutan yodium, setelah 15 – 30 menit pati yang tidak terhidrolisis akan menjadi biru. Keberadaan zona bening disekitar koloni menunjukkan terjadinya hidrolisis pati.

3.1.10. Pertumbuhan Pada Suhu Inkubasi

Kultur isolat pada medium nutrien agar miring diinkubasi pada suhu 15° C dan 45° C. Pertumbuhan kultur diamati selama 24 sampai 72 jam.

3.1.11. Pertumbuhan Dalam NaCl

Uji dilakukan dengan menginokulasikan kultur isolat berumur 24 jam ke tabung reaksi yang berisi nutrien agar yang mengandung 7% dan 7,5% (w/v) NaCl. Pertumbuhan diamati setelah inkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

3.2. Identifikasi Kapang

Identifikasi kapang dilakukan dengan mengamati morfologi kapang dengan menggunakan mikroskop. Gelas benda dibersihkan dengan alkohol sampai bebas dari debu dan lemak, dengan jarum preparat diambil sedikit biakan kapang, diletakkan diatas gelas benda yang telah diberi larutan laktofenol, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lemah sampai sedang (Jutono dkk., 1980). Identifikasi menggunakan buku identifikasi menurut Samson, dkk. (1984).

4. Pemeriksaan Kandungan Isoflavon Secara Kromatografi Lapis Tipis

4.1. Tahap ekstraksi

100 gram sampel serbuk tempe gembus yang telah dikeringkan di bawah sinar matahari selama 8 jam, dibungkus dengan kertas-saring dan diekstraksi dengan *n*-heksan menggunakan alat Soxhlet selama 2 jam atau sampai diperoleh ekstrak yang bebas dari lemak. Serbuk tempe gembus bebas lemak selanjutnya dicampur dengan larutan methanol 80% dengan perbandingan 1:10 (w/v), dan disimpan di dalam lemari es selama satu malam. Campuran disaring, pelarut selanjutnya diuapkan di bawah tekanan rendah dalam rotavapor pada suhu 50° C. Sisa padatan atau residu tempe dilarutkan kembali dalam methanol, kotoran dihilangkan dengan sentrifugasi. Supernatan selanjutnya diuapkan sampai ½ volume asal dan didinginkan dalam lemari es. Endapan dihilangkan dengan penyaringan. Sedangkan bagian filtratnya diuapkan dan disimpan sampai diperlukan (Wuryani, 1994).

4.2. Pemisahan Komponen Isoflavon

Disiapkan lempeng lapis tipis dengan media silica gel. Dengan pipa kapiler, filtrat tempe gembus ditotolkan di atas lempeng lapis tipis silica gel. Lempeng lapis tipis silica gel dimasukkan ke dalam ruang pengelusi yang berisi pelarut Sikloheksan-diklorometan-etil format-asam format (90%) dengan perbandingan 7 : 6 : 6 : 1. Didiamkan sampai kenaikan eluen mendekati bagian atas lempeng dan setelah itu dikeringanginkan lalu dilihat di bawah sinar UV untuk melihat bercak noda yang timbul. Noda-noda yang terjadi diukur Rf-nya dan dibandingkan dengan Rf larutan standar isoflavon (Wuryani, dkk., 1997). Pengamatan yang lebih teliti dilakukan dengan menggunakan alat *TLC Scanner*.

D. Analisis Data

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisa dengan menggunakan metode analisis deskriptif.