

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan bersifat deskriptif, yaitu mendeskripsikan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat, serta hubungannya terhadap objek yang diamati.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebasnya beberapa fungsi selulolitik hasil isolasi. Sedangkan variabel terikatnya yaitu produksi gula hidrolisat dari serbuk jerami padi.

Pada penelitian ini dilakukan uji kualitatif CMC dan uji produksi gula hidrolisat. Untuk uji kualitatif CMC terdiri dari 6 perlakuan yaitu isolat fungi hasil isolasi dari tanah pesawahan tempat terjadinya degradasi jerami padi, fungi tersebut terdiri dari *Monilia*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* dan *Penicillium*. Setiap perlakuan akan dilakukan pengulangan dengan mengikuti rumus $(t)(r) - 1 \geq 15$ (Gomez, 1995). Di mana t adalah perlakuan (*treatment*), sedangkan r adalah pengulangan (*replication*).

Dengan demikian:

$$(t)(r) - 1 \geq 15$$
$$(6)(r) - 1 \geq 15$$
$$6r - 6 \geq 15$$
$$6r \geq 21$$
$$r \geq 3,5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan untuk uji CMC dengan 6 perlakuan yaitu isolat fungi yang berbeda adalah 4 kali.

Pada uji gula hidrolisat terdiri dari 4 perlakuan yaitu isolat fungi selulolitik hasil seleksi melalui uji CMC. Isolat fungi tersebut terdiri dari *Monilia*, *Trichoderma*, *Fusarium* dan *Aspergillus*. Setiap perlakuan akan dilakukan

pengulangan dengan mengikuti rumus $(t)(r - 1) \geq 15$ (Gomez, 1995). Di mana t adalah perlakuan (*treatment*), sedangkan r adalah pengulangan (*replication*).

$$\begin{aligned} \text{Dengan demikian:} \quad & (t)(r - 1) \geq 15 \\ & (4)(r - 1) \geq 15 \\ & 4r - 4 \geq 15 \\ & 4r \geq 19 \\ & r \geq 4,75 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan untuk uji CMC dengan 6 perlakuan yaitu isolat fungi yang berbeda adalah 5 kali.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Populasi: Seluruh fungi yang tumbuh pada tanah pesawahan yang diisolasi dari Desa Ciburial, Kecamatan Cimenyan Kabupaten Bandung.
- b. Sampel: Fungi yang diisolasi pada tanah pesawahan yang telah teridentifikasi dari Desa Ciburial, Kecamatan Cimenyan Kabupaten Bandung.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari sampai bulan April 2014 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Alat-alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoklaf	Merek EYELA model HL36AE	1 unit
2.	Batang pengaduk,	-	Secukupnya
3.	Papan miring	-	3 buah

4.	Rak tabung	-	3 buah
No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
5.	Pinset	-	1 buah
6.	Jarum ose.	-	2 buah
7.	Blender	-	1 buah
8.	Tabung Erlenmeyer	25 ml	20 buah
9.	Gelas ukur	10 ml, 50 ml, 1000 ml	3 buah
10.	Cawan Petri	Pyrex, diameter 10 cm	20 buah
11.	Tabung reaksi	Pyrex, volume 15 ml	30 buah
12.	Corong	-	1 buah
13.	Pipet tetes	-	5 buah
14.	Hot plate dan magnetic stirrer	-	1 unit
15.	Incubator shaker	-	1 unit
16.	Kain kassa	-	1 paks
17.	Kamera Digital	Samsung	1 unit
18.	Kapas berlemak	-	2 bungkus
19.	Kertas label	-	10 lembar
20.	Tissue gulung	-	1 paks
21.	Plastic tahan panas	Ukuran 2 kg	1 paks
22.	Bunsen	-	1 buah
23.	Spiritus	-	Secukupnya
24.	Lemari pendingin	-	1 unit
25.	Makropipet	1 ml, 5 ml, 10 ml merek Efendorf	3 unit
26.	Mikroskop binokuler listrik	Shimadzu BI-71-16126	1 unit
27.	Objek glass dan penutup	-	1 boks
14.	Rotary shaker	-	1 unit
28.	Timbangan analitik	Merek AND	1 unit
29.	Vortex	Merek EYELA	1 unit

Tabel 3.2. Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Akuades	-	Secukupnya
2.	Alkohol	70%	Secukupnya
3.	Buffer Asetat	Merek Merck (<i>pa</i>)	Secukupnya
4.	CMC (<i>Carboxymethyl cellulose</i>)	Merek Merck (<i>pa</i>)	Secukupnya
4.	Kertas saring Whatman no.1	Whatman No. 1	Secukupnya
5.	Potato Dextrose Agar (PDA)	Merek Merck (<i>pa</i>)	Secukupnya
6.	NH ₄ OH 2.9 M	-	1000 mL
7.	Urea	-	1.2 g

8.	(NH ₄) ₂ .SO ₄	-	4.2 g
9.	KH ₂ PO ₄	-	8 g
10.	CaCl ₂	-	1.2 g
No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
11.	MgSO ₄ .7H ₂ O	-	1.2 g
12.	Bacto pepton	-	2.25 g
13.	Yeast ggar	-	0.75 g
14.	FeSO ₄ .7H ₂ O	-	20 mg
15.	MnSO ₄	-	6.4 mg
16.	ZnSO ₄	-	5.6 mg
17.	CoCl ₂	-	80 mg
18.	H ₂ SO ₄ pekat	-	200 MI
19.	NaOH padat	-	45.45 g
20.	NaOH	-	40 g
21.	pH universal	-	1 pack
22.	Malt extract	-	29 g
23.	Bacto pepton	-	6 g
24.	Bacto Agar	-	11

F. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

1) Penentuan lokasi pengambilan sampel

Penentuan lokasi sampel dengan melihat keadaan lingkungan dimana terdapat pesawahan yang dapat diambil sampel tanahnya.

2) Persiapan alat dan bahan yang digunakan

3) Pembuatan medium pertumbuhan fungi

Medium pertumbuhan fungi menggunakan *Potato Dextrose Agar* (PDA), cara pembuatannya adalah 35 gram *Potato Dextrose Agar* (PDA) dilarutkan dalam 1000 mL akuades, lalu dididihkan selama 1 jam. Kemudian medium diangkat dan didinginkan. Medium lalu ditambahkan larutan kloramfenikol 100 mg/L. Setelah itu medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan takaran masing-masing 15 ml untuk agar diri dan dan 5 ml untuk agar miring. Kemudian medium ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus dengan kain kassa, lalu diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰ C dengan tekanan sebesar 1,5 atm (Syulasmi, dkk. 2012).

4) Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang telah disiapkan selama proses persiapan kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Sterilisasi dengan autoklaf yang disebut sterilisasi basah yaitu dengan menggunakan uap air bertekanan pada suhu 121°C selama 15 menit (Syulasm, dkk. 2012).

2. Tahap Pelaksanaan Penelitian

1) Pengambilan sampel yang telah ditentukan lokasinya

Pengambilan sampel tanah pada lokasi yang telah ditentukan, yaitu dengan mengambil 5 macam sampel tanah dekat jerami sebanyak 5 sampel yang diambil secara random. Setelah itu, sampel dibawa ke laboratorium untuk diisolasi fungi yang terdapat pada sampel tanah tersebut.

2) Pengisolasian dan pengkulturan fungi pada medium

Setiap 1 gr sampel dilarutkan ke dalam 50 ml akuades steril lalu dihomogenkan dengan cara digoyang-goyangkan. Selanjutnya pengenceran sampel dengan metode cawan tuang yaitu dengan menyediakan 10 tabung reaksi masing-masing berisi 9 ml akuades steril, letakkan secara berurutan dan beri tanda 1-10. Kemudian masukkan 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi pertama kemudian kocok maka konsentrasi menjadi 10^{-1} , kemudian pipet 1 ml larutan dari tabung pertama masukkan kedalam tabung kedua dan kocok sampai homogen, konsentrasi menjadi 10^{-2} demikian seterusnya sampai tabung ke-10. Lalu ambil larutan dari tabung ke-5 sampai tabung ke-10 masing-masing 1 ml dengan menggunakan pipet steril dan memasukkannya ke dalam cawan Petri steril yang sudah diberi tanda. Setelah itu, masukkan masing-masing 9 ml PDA ke dalam cawan Petri dan goyangkan sampai homogen. Lalu letakkan di atas meja dan setelah mengeras inkubasikan pada suhu kamar (Syulasm, dkk. 2012). Fungi dibiarkan tumbuh sampai dapat dibedakan antar

satu jamur dengan yang lainnya. Isolasi fungi ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

3) Pembuatan kultur murni

Pembuatan kultur murni dengan cara membakar jarum inokulasi di atas api sampai seluruh kawatnya berpijar, biarkan jamur mendingin. Dengan jarum inokulasi tersebut, ambil satu koloni fungi dari koloni lain yang terpisah, masukkan jarum yang sudah mengandung koloni fungi ke dalam tabung yang berisi PDA miring secara zigzag, lakukan secara steril dengan memanaskan mulut tabung dan sumbat sebelum dan setelah di-streak. Pijarkan kembali jarum inokulasi sebelum disimpan dan digunakan lagi. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar sampai jamur tumbuh (Syulamsi, dkk. 2012). Pembuatan kultur murni ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

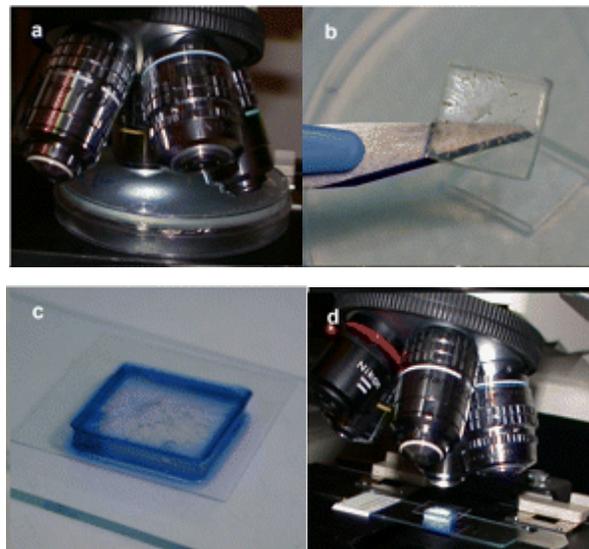
4) Pengamatan dan identifikasi isolat fungi

Setiap koloni mikroorganisme diamati bentuk morfologinya dengan melihat warna, tekstur, pertumbuhan, warna medium dan metabolit sekundernya. Ciri-ciri setiap isolate dibandingkan berdasarkan kunci determinasi pada *Moulds Isolation, Cultivation, Isolation* (Malloch, 1997), *Smith's Introduction to Industrial Mycology Seventh Edition* (Onions, dkk, 1981).

5) Pengamatan struktur jamur dengan menggunakan metode *slide culture*

Selain mengidentifikasi secara makroskopis dengan mengamati morfologinya, diamati juga secara mikroskopisnya dengan metode *slide culture* yang meliputi pengamatan terhadap hifa, bentuk spora, dan ukuran spora. Tahap pembuatan slide kultur dapat dilihat pada Gambar 3.1.

Siapkan sebuah cawan Petri steril yang di dalamnya diberi kertas saring steril yang dipotong bundar dan telah dilembabkan dengan menggunakan akuades steril untuk menjaga kelembaban kultur dalam cawan Petri. Pada cawan Petri tersebut disimpan batang penahan berbentuk segitiga, dan di atas batang penahan tersebut diletakkan sebuah objek gelas steril beserta penutupnya seperti terlihat pada Gambar 3.1. Blok agar steril kira-kira berikisan satu sentimeter kuadrat dipotong dari medium PDA dalam cawan Petri steril lain (Gambar 3.1 A) dan diletakkan di atas gelas objek dengan menggunakan pisau atau alat pemotong steril. Kemudian, fungi diinkubasi pada keempat blok agar (Gambar 3.1 C) dan ditutup oleh gelas penutup steril (Gambar 3.1 D). Setelah beberapa hari diinkubasi dalam suhu kamar, sllide dapat diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran rendah sampai tinggi, lalu diidentifikasi (Hamdiyati, 2012).



Gambar 3.1 Tahap pembuatan slide kultur : (a) Pengamatan bentuk mikroskopis fungi dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. (b) Agar dipotong menggunakan pisau steril, potongan agar yang diambil dari medium PDA, dan inokulasi fungi pada agar yang disimpan di atas gelas objek. (c) Agar yang telah diinokulasi ditutup dengan kaca penutup. (d) Setelah fungi pada potongan agar tumbuh kemudian lakukan pengamatan di bawah mikroskop.

6) Pengujian isolat fungi selulolitik

Pengujian isolat fungi yang memiliki enzim selulolitik dilakukan dengan menggunakan metode CMC agar (*Carboxy Methyl Cellulase*) (Pointing, 1999) yaitu dengan menyiapkan medium CBM (Cellulase Basic Medium) dengan kandungan (g/l): $C_4H_{12}N_2O_6$ 5, Yeast Extract 0.1, KH_2PO_4 1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.001, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5. kemudian ditambahkan 2% b/v CMC dan 1.6 % w/v agar, lalu diautoklaf. Secara aseptik medium dipindahkan ke dalam cawan Petri. Setelah itu, fungi diinokulasikan dan diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap sampai muncul koloni sebesar 33mm sekitar 4-5 hari. Setelah itu, siram agar dengan 2 % w/v aqueous congo red dan dibiarkan selama 15 menit. Cuci agar dengan akuades steril. Lalu siram kembali dengan IM NaCl dan diamkan selama 15 menit. CMC yang terdegradasi akan berwarna kuning di sekitar area agar dan jika tidak terdegradasi akan berwarna merah.

Hasil pengujian secara kualitatif menggunakan CMC, data ditampilkan pada Tabel 3.3:

Tabel 3.3. Contoh Tabel Hasil Pengujian Secara Kualitatif CMC

Jenis Fungi	Hasil Uji CMC	
	Terdapat Zona kuning	Tidak Terdapat Zona kuning

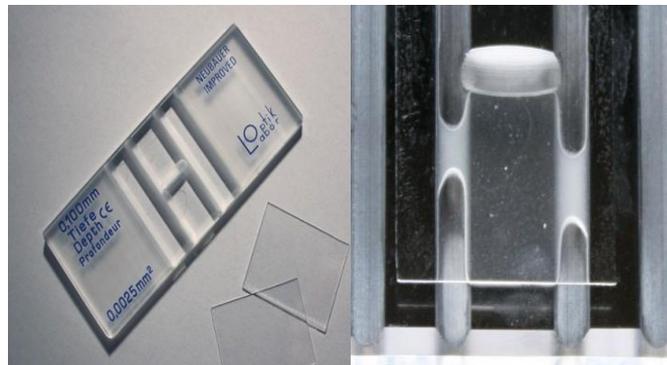
7) Pembuatan kurva produksi spora

Penentuan umur produksi spora fungi terbaik untuk inokulum dilakukan dengan membuat kurva produksi spora pada medium PDA yang diperoleh dari penghitungan jumlah dan viabilitas spora setiap hari selama 6 hari. Sebanyak 10 ml akuades steril dimasukkan ke

dalam isolat fungi yang telah dikultur dalam PDA miring. Kemudian digosok perlahan menggunakan jarum inokulasi untuk memisahkan spora dengan miselium. Suspensi spora di pindahkan ke dalam tabung reaksi steril lalu dihomogenkan dengan vorteks. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan Haemocytometer.

Penghitungan dilakukan dengan meneteskan suspensi spora sebanyak 1 tetes pada haemocytometer, lalu menutupnya dengan gelas penutup. Kemudian di amati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Setelah menemukan kotak pertama, diperbesar lagi pada pembesaran 400x sampai menemukan kotak ditengah yang berukuran 1 mm. Gambar Haemocytomer ada pada Gambar 3.2.

Setelah menemukan kotak berukuran 1mm, maka ditentukan lima titik penghitungan empat ditiap sudut dan satu ditengah, dapat dilihat pada Gambar 3.2. Kelima kotak tersebut kemudian dihitung mengikuti arah pada Gambar 3.3. Hasil pengamatan kurva tumbuh berupa data pada Tabel 3.4.



Gambar 3.2 Penggunaan Haemocytometer
(Sumber: Kim, 2010)

$$S = \frac{X}{L (mm^2) \times t (mm) \times d} \times 10^3$$

Keterangan:

S: Jumlah spora/mL

X: Jumlah spora yang dihitung (A + B + C + D + E)

L: Luas kotak hitung ($0,04 \times 5 = 0,2 \text{ mm}^2$)

t: Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d: Faktor pengenceran

10^3 : volume suspensi yang diambil ($1 \text{ ml} = 10^3 \text{ mm}^3$)

Tabel 3.4. Contoh Tabel Hasil Pengamatan Kurva Produksi Spora

Jenis Fungi	Hari Ke-	Rata-Rata Jumlah Produksi Spora	Log Jumlah Spora/ml

8) Pretreatment serbuk jerami padi

Jerami padi yang diperoleh dari area pesawahan, kemudian dikeringkan dengan dijemur dan dioven. Setelah itu, jerami padi digiling sampai berukuran 40 mesh. Lalu dilakukan pretreatment dengan 5% sodium hidroksida (10 ml/g substrat) (Fatma et al, 2010) selama 15 menit dalam autoklaf (121°C dengan tekanan 1 Atm). Hasil pretreatment kemudian didinginkan, disaring dan dicuci sampai pH netral yang kemudian dikeringkan pada suhu 60°C di dalam oven selama 12 jam. Jerami yang sudah kering siap digunakan.

9) Persiapan inokulum

Kultur jamur yang telah diinokulasi ke dalam medium PDA dalam cawan Petri. Setelah jumlah spora optimum yaitu 10^7 spora/ml, spora dipanen dengan menggunakan akuades steril (Mekala, dkk. 2008)

10) Hidrolisis jerami padi dengan beberapa fungi selulolitik

Medium yang digunakan adalah SSF yang terdiri dari garam mineral dan unsur mikro (g/l): urea 10, NH_4SO_4 0,25, CaCl_2 2, KH_2PO_4 1,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3, pepton 0,3, yeast extract 0,25 dan unsur mikro 3 ml yang terdiri dari (mg/l): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20. (Mendels, dkk, 1976). Kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit.

Jerami padi yang telah dipretreatment diambil 10 g dicampurkan dengan medium Mendels sebanyak 30 ml (Fatma, 2010). Kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit dan didinginkan. (Rodhe, 2011).

Suspensi spora ditransfer sebanyak 5 ml pada tiap tabung (Fatma, 2010). Jumlah inokulum spora fungi yang dimasukkan ke dalam medium adalah 10^7 spora/ml (Mekala, dkk. 2008). Inokulum spora yang dimasukkan telah dihitung pada saat membuat kurva tumbuh. Setelah inokulum ditransfer, kemudian diinkubasi selama 6 hari pada suhu ruang, dilakukan 3 kali pengulangan untuk setiap perlakuan (Fatma, 2010).

Pengujian sampel dilakukan setiap 24 jam sekali dengan pengambilan sampel sebanyak 1 gr, kemudian dicampurkan dengan 0,05 ml buffer sitrat pH 4.8 sebanyak 5 ml. Lalu dishaker selama 1 jam pada 150 rpm. Setelah itu substrat disaring menggunakan filtrat whatman no. 1 dan filtrat diukur kadar glukosanya dengan metode Smogyi-Nelson.

11) Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat untuk menganalisis kadar glukosa pada sampel. Kurva standar glukosa ini digunakan untuk menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (panjang gelombang 520 nm), kurva standar ini dapat menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran

transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Smogyi-Nelson (Kusnadi, 2001).

Pertama kurva standar ini dibuat dengan 20 mg glukosa yang dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian dipipet ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1 ml; 1,2 ml; 1,4 ml; 1,8 ml; dan 2,0 ml. Selanjutnya ditambahkan akuades dengan memasukkannya ke dalam tabung reaksi masing-masing 1,8 ml; 1,6 ml; 1,4 ml; 1,2 ml; 1 ml; 1,2 ml; 1,4 ml; 1,8 ml; dan 2,0 ml. Penambahan akuades ini dilakukan sebagai pengenceran sehingga terdapat deret konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mg/10ml.

Setelah itu, larutan Smogyi I dimasukkan sebanyak 1,6 ml dan Smogyi II sebanyak 0,4 ml. Kemudian ditutup dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan di dalam es. Setelah dingin, ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml akuades, sehingga total volume dalam tabung reaksi adalah 10 ml. Tabung reaksi ditutup dengan ibu jari dan dikocok dengan kuat hingga gas CO₂ tidak keluar lagi. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Pembuatan larutan Smogyi I dan II, serta Nelson ada pada Lampiran 2.

12) Pengukuran kadar glukosa dengan metode Smogyi-Nelson

Sampel 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan Smogyi 1 sebanyak 1,6 ml dan larutan Smogyi 2 sebanyak 0,4 ml. Kemudian dihomogenkan dengan cara divortex, disimpan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan.

Setelah itu, dimasukkan 4 ml akuades dan 2 ml larutan Nelson. Lalu dikocok dengan menutup mulut tabung menggunakan ibu jari sampai terasa tekanan udara pada jari kemudian dilepaskan. Hal ini dilakukan sampai tidak terasa tekanan udara pada ibu jari. Kemudian

diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm.

Hasil pengukuran kadar glukosa yang diproduksi oleh beberapa jamur, ditampilkan pada Tabel 3.5:

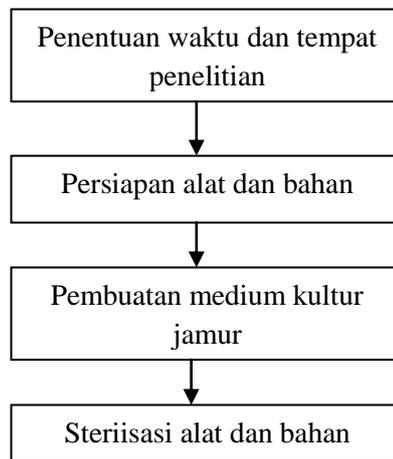
Tabel 3.5. Contoh Tabel Hasil Pengukuran Kadar Glukosa

Jenis Fungi	Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Hari ke- (mg/ml)						
	0	1	2	3	4	5	6

G. Alur Penelitian

Alur Penelitian dapat dilihat pada diagram di bawah ini:

1. Tahap Persiapan



2. Tahap Pelaksanaan

