

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menerapkan pendekatan kuantitatif dengan metode eksperimental, yang melibatkan percobaan guna menguji hipotesis atau menjawab pertanyaan penelitian. Metode eksperimental dengan pendekatan kuantitatif digunakan ketika penelitian memerlukan pengawasan atau kontrol terhadap setiap variabel bebas, baik sebelum maupun selama penelitian berlangsung. Langkah ini bertujuan untuk meminimalkan pengaruh faktor lain yang berpotensi memengaruhi hasil penelitian.

Selain itu, metode ini memungkinkan peneliti untuk mengubah variabel independen dan mengontrol kondisi penelitian untuk menemukan hubungan sebab-akibat antara komponen yang diteliti.

3.2 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai pendekatan penelitian. Rancangan ini dipilih karena sesuai untuk kondisi di mana bahan percobaan dan faktor lingkungan bersifat homogen. Mengingat penelitian dilakukan dalam lingkungan laboratorium dengan standar keseragaman dalam penggunaan alat, bahan, dan media, RAL dianggap sebagai rancangan yang paling tepat. Disebut “acak” karena setiap unit percobaan memiliki peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan tertentu, sedangkan istilah “lengkap” menunjukkan bahwa seluruh perlakuan yang telah dirancang dalam eksperimen diterapkan pada setiap variabel yang diteliti.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari Desember 2024 hingga April 2025. Pelaksanaan diadakan di Laboratorium Riset Biologi di Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia, yang berlokasi di Jl. Dr. Setiabudi No.299, Bandung. Pengambilan sampel substrat kulit ubi kayu (*Manihot esculenta*) dilakukan di pabrik pengolahan ubi kayu spesies *Manihot esculenta* di Desa Cireundeu, Kel. Leuwigajah Cimahi.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang menjadi subjek penelitian ini adalah isolat jamur selulolitik *Aspergillus niger* hasil isolasi dari biakan murni *Aspergillus niger* yang diperoleh dari PT Agritama Sinergi dan Inovasi (AGAVI). Sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim selulase yang diproduksi oleh jamur selulolitik *Aspergillus niger* yang diperoleh dari hasil isolasi biakan murni *Aspergillus niger*.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dengan persiapan alat dan bahan, *pre-treatment* kulit ubi kayu, isolasi jamur pada media, seleksi jamur selulolitik pada media CMC agar, identifikasi karakteristik jamur selulolitik *Aspergillus niger*, pembuatan kurva tumbuh jamur selulolitik, produksi enzim dengan *submerged fermentation* (SmF), pembuatan larutan glukosa, pembuatan kurva standar glukosa, pengukuran parameter dan analisis data.

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Serangkaian alat dan bahan yang khusus diperlukan untuk penelitian ini. Pembuatan serbuk substrat dari kulit ubi kayu, isolasi jamur pada media, identifikasi jamur selulolitik, uji biokimia pada isolat jamur selulolitik, produksi enzim selulase dengan metode *fermentasi submerged* (SmF), dan optimalisasi produksi enzim selulase. Laboratorium Riset di Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia memiliki semua peralatan dan bahan yang diperlukan.

Semua alat dan bahan dikelola secara aseptik selama tahap persiapan. Alat yang dapat digunakan harus dibersihkan sebelum digunakan. Mereka harus dilapisi kertas, dimasukkan ke dalam wadah kaca yang bersih, ditutup rapat, dan dibungkus oleh plastik. Setelah semua alat dibungkus, mereka harus dimasukkan ke dalam autoclave dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Proses sterilisasi ini dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.

3.5.2 *Pre-treatment* Kulit Ubi Kayu dan Delignifikasi

Pretreatment ini bertujuan untuk membuka struktur kompleks lignoselulosa, sehingga meningkatkan aksesibilitas enzim terhadap selulosa. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi pretreatment kimia dan fisik dapat

memberikan hasil yang lebih baik dalam hal peningkatan aksesibilitas selulosa dan produksi enzim selulase.

Kulit ubi kayu terlebih dahulu dikeringkan dibawah sinar matahari selama 1 hari, setelah dikeringkan di bawah sinar matahari selama satu hari, kulit ubi kayu dipotong hingga ukuran 3 cm dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 100°C selama 16 jam. Kemudian, dihaluskan menggunakan blender dan disaring menggunakan saringan dengan ukuran 100 mesh (Shamsudin dkk., 2012). *Pretreatment* kulit ubi kayu membantu enzim melakukan hidrolisis dan memperluas permukaan kontak antara enzim dan substrat kulit ubi kayu. Ini memungkinkan enzim untuk mengubah glukosa dari selulosa yang ada pada kulit ubi kayu (Jayus dkk., 2019). *Pre-treatment* kimiawi bertujuan untuk menurunkan tingkat polimerisasi dan kristalinitas komponen selulosa dan meningkatkan biodegradasi selulosa dengan menghilangkan lignin dan atau hemiselulosa (Shamsudin dkk., 2012)

Delignifikasi serbuk kulit ubi kayu dilakukan dengan mencampurkan substrat dan larutan NaOH 6% perbandingan 1:10. NaOH dengan tujuan untuk merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf substrat. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, campuran disaring menggunakan kertas saring dan dicuci dengan H₂SO₄ hingga pH-nya netral (pH 7). Terakhir, hasil delignifikasi dikeringkan dengan memasukan kedalam oven suhu 105°C selama 8 jam. Hasil delignifikasi ini akan digunakan untuk hidrolisis enzimatik guna mengetahui kadar gula hidrolisat yang dihasilkan.

3.5.3 Isolasi Jamur pada Media

Jamur selulolitik *Aspergillus niger* yang diperoleh dari PT. Agritama Sinergi Inovasi (AGAVI), kemudian ditanam pada media pembiakan jamur yaitu *Potato Dextrose Agar* (PDA). Metode yang digunakan dalam isolasi adalah metode cawan sebar (*Spread plate*) yang merupakan proses yang dimana sampel mikroorganisme diletakan diatas media agar lalu diratakan menggunakan ose, dengan kelebihan menghasilkan koloni yang terpisah sehingga memungkinkan isolasi koloni murni yang berasal dari satu sel tunggal untuk memudahkan identifikasi dan karakterisasi (Damayanti dkk., 2020). Selanjutnya, biakan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu

37°C. Kemudian, untuk mendapatkan isolat murni jamur selulolitik, kultur yang telah tumbuh dipindahkan ke media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring dan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C (Yuliana & Taufiq, 2022)

Jamur yang telah diisolasi dan diidentifikasi sebagai produsen enzim selulase potensial dapat digunakan untuk fermentasi produksi enzim dalam skala laboratorium maupun industri. Proses fermentasi dapat dilakukan dalam kondisi kultur cair (fermentasi terendam).

3.5.4 Seleksi Jamur Selulolitik pada Media CMC Agar

Setelah pembiakkan isolat murni jamur selulolitik pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring, koloni jamur ditanam pada agar *Carboxymethyl Cellulose* (CMC). Setelah itu, diwarnai dengan *Congo red* 0,1% dan diinkubasi selama 30 menit dan dibilas dengan larutan natrium klorida 1% untuk menghilangkan pewarnaan yang tidak terikat. Indikasi positif jamur selulolitik ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar koloni dan pewarna *Congo red* molekul yang memiliki struktur yang kompleks, sehingga menyebabkan besarnya gaya tarik molekul antara pelarut dengan *congo red*. (Talantan dkk., 2018) Aktivitas jamur selulolitik dapat diidentifikasi berdasarkan Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Hasil uji aktivitas selulolitik menggunakan media CMC

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks Aktivitas Selulase	Kategori Indeks Aktivitas Selulase (IAS)

Indeks aktivitas selulolitik dihitung berdasarkan persamaan yang digunakan oleh (Talantan dkk., 2018) yaitu:

$$\text{Indeks Aktivitas Selulase (IAS)} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)} - \text{diameter koloni (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

3.5.5 Identifikasi Karakteristik Jamur Selulolitik *Aspergillus niger*

Identifikasi jamur selulolitik adalah proses penentuan jenis dan spesies jamur yang memiliki aktivitas selulolitik, yaitu kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase yang efektif dalam menghidrolisis selulosa. Proses ini melibatkan beberapa tahapan, mulai dari isolasi jamur dari lingkungan alami, penapisan aktivitas selulolitik, hingga identifikasi taksonomi menggunakan teknik morfologi, biokimia, dan molekuler (Hidayat & Isnawati, 2021)

3.5.5.1 Identifikasi Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis jamur selulolitik *Aspergillus niger* dilakukan dengan membuat preparat basah dari biakan murni yang ditumbuhkan pada media PDA miring. Biakan tersebut diletakkan pada kaca preparat, kemudian apusan difiksasi dan diamati di bawah mikroskop berdasarkan pengamatan yang tercantum pada Tabel 3.2. Identifikasi jamur menggunakan metode apusan merupakan cara yang umum digunakan untuk mengamati karakteristik morfologi jamur (Hidayat & Isnawati, 2021)

Tabel 3.2 Format pengamatan mikroskopis dan makroskopis isolat jamur selulolitik

Kode Isolat	Koloni			Hifa	Spora Seksual	Struktur Spora
	Bentuk	Warna	Tepi			

3.5.5.2 Identifikasi Makroskopis

Secara makroskopis dan mikroskopis, isolat jamur selulolitik dapat diidentifikasi. Bentuk hifa, warna, dan spora aseksual dapat diamati.

3.5.5.3 Uji Biokimia Isolat Jamur Selulolitik

Pengujian biokimia termasuk hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis gelatin, pelarutan fosfat, dan fermentasi glukosa dan xilosa. Pengujian ini menunjukkan kemampuan bakteri untuk melakukan semua proses metabolik dan reaksi kimia (Nuryanti dkk., 2021). Pengujian ini juga dapat membantu dalam identifikasi dan penentuan sifat-sifat unik dari jamur selulolitik *Aspergillus niger*.

1) Hidrolisis Pati

Koloni jamur ditumbuhkan dalam media pati agar dengan pH netral yaitu 7 yang telah memadat dalam cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu 22-37°C selama 3-5 hari. Setelah pertumbuhan terlihat, media dan sampel ditetesi dengan larutan iodin atau lugol. Indikator positif adanya aktivitas selulolitik adalah terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Kusnadi dkk., 2016). Uji ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim selulase, yang berperan dalam hidrolisis pati menjadi oligosakarida dan maltosa.

2) Hidrolisis Lipid

Media lipid padat dalam cawan petri ditanami jamur selulolitik dan diinkubasi pada suhu 22-37°C selama 3-5 hari. Selanjutnya, biakan tersebut ditempatkan

dalam inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit (Kusnadi dkk., 2016). Terbentuknya zona bening di sekitar koloni jamur dan kemerahan pada medium lipid merupakan tanda-tanda hidrolisis lipid yang menguntungkan (Cappucino & Sherman, 2014).

3) Hidrolisis Gelatin

Koloni jamur selulolitik ditumbuhkan pada media gelatin dan kemudian diinkubasi selama 3–5 hari pada suhu 22–37 °C. Setelah inkubasi, biakan tersebut tetap berada dalam inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit (Kusnadi dkk., 2016). Mikroorganisme yang menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler, atau gelatinase, akan menghidrolisis gelatin dalam medium. Akibatnya, medium akan tetap cair setelah inkubasi meskipun disimpan pada suhu rendah 4°C.

4) Uji Pelarut Fosfat

Uji pelarutan fosfat digunakan untuk mengukur kemampuan mikroorganisme, termasuk jamur, dalam melarutkan senyawa fosfat yang tidak larut dalam air. Prosesnya melibatkan penumbuhan koloni jamur pada media agar Pikovskaya padat dalam cawan petri, diikuti inkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Indikator positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni jamur (Pikovskaya, 1948).

5) Fermentasi Karbohidrat

Koloni jamur ditumbuhkan pada media yang mengandung kedua jenis karbohidrat ini, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Perubahan warna dan terbentuknya gelembung dalam tabung Durham merupakan indikasi positif (Kusnadi dkk., 2016). Berdasarkan pengamatan diatas hasil uji biokimia dimasukan kedalam Tabel 3.3

Tabel 3.3 Pengamatan aktivitas biokimia

No	Aktivitas Biokimia	<i>Aspergillus niger</i>		
		1	2	3
1.	Hidrolisis Pati			
2.	Hidrolisis Lipid			
3.	Hidrolisis Gelatin			
4.	Pelarut Fosfat			
5.	Fermentasi Glukosa			

No	Aktivitas Biokimia	<i>Aspergillus niger</i>		
		1	2	3
6.	Fermentasi Xilosa			

3.5.6 Pembuatan Kurva Tumbuh Jamur Selulolitik

Tujuan pembuatan kurva pertumbuhan adalah untuk menemukan umur ideal isolat jamur dalam medium aktivasi sebelum dipindahkan ke medium fermentasi. Kurva pertumbuhan, yang menggambarkan hubungan antara waktu (sumbu x) dan berat kering biomassa jamur (sumbu y), menentukan umur ideal (C. N. Sari & Kussuryani, 2013). Menentukan kurva tumbuh jamur dengan mengetahui fase eksponensialnya, dengan tujuan untuk mengetahui pertumbuhan jamur yang cepat dan menghasilkan jumlah sel yang banyak (Sumardi dkk., 2023)

Isolat jamur berusia 5 hari ditumbuhkan dalam 20 mL media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Inokulum sebanyak 2 loop kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam media steril. Media yang telah diinokulasi kemudian diletakkan di atas shaker dengan kecepatan 135 rpm selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam dengan mengambil sampel untuk menimbang massa miselium yang terbentuk. Pengukuran dilakukan dengan menyaring massa miselium dalam 20 mL kultur menggunakan kertas saring, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. (Sumardi dkk., 2023). Perhitungan diperoleh dengan rumus:

$$\frac{(\text{berat kertas saring} + \text{berat kering miselium}) - \text{berat kertas saring}}{\text{dalam 20 mL}}$$

3.5.7 Produksi Enzim dengan *Submerged Fermentation* (SmF)

Sebelum memulai produksi enzim melalui Fermentasi Terendam (SmF), inokulum dibuat dengan menginokulasi 3 loop jamur selulolitik *Aspergillus niger* ke dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) steril, lalu diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 135 rpm selama waktu optimum pertumbuhan *Aspergillus niger*. Tahap produksi enzim melalui *Fermentasi Submerged* membutuhkan medium yang mengandung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g; KH_2PO_4 2,0 g; urea 0,3 g; CaCl_2 0,3 g; MgSO_4 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014 g; CoCl_2 0,002 g; pepton 0,75 g; substrat kulit ubi kayu 7,5 g yang dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M dengan interval pH 4,5 dan 5,5 sebanyak 1000 mL dalam labu erlenmeyer 2000 mL dan media fermentasi tersebut disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit (Oktarani, 2017).

Setelah sterilisasi, labu Erlenmeyer yang berisi media fermentasi dibiarkan dingin pada suhu kamar. Setelah itu, 2% volume media fermentasi ditambahkan secara aseptik sebagai larutan media inokulum, dan campuran disentrifugasi selama 96 jam dengan kecepatan 135 rpm dalam inkubator waterbath shaker pada dua suhu berbeda: 29,5°C dan 30,5°C (Oktariani, 2017). Selanjutnya, Kertas saring tipe Whatman no. 1 digunakan untuk menyaring sampel yang diekstraksi dari media fermentasi. Setelah itu sampel disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 4000 rpm. Ekstrak enzim kasar diproduksi sebagai partikel transparan (supernatan) setelah sentrifugasi.

3.5.8 Pembuatan Larutan Glukosa

Pembuatan larutan standar glukosa, menggunakan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm. glukosa. Langkah pertama untuk membuat larutan glukosa 1000 ppm dengan ditamhakkannya 0,05 gram glukosa kedalam 50 mL tabung erlenmeyer berisi aquades. Kemudian larutan standar glukosa 1000 ppm diencerkan sesuai dengan kebutuhan penelitian.

3.5.9 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dengan konsentrasi yang sudah dibuat dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm disiapkan. Sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi larutan tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, 1 mL reagen DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) ditambahkan ke dalam setiap tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex. Tabung reaksi yang berisi campuran larutan glukosa dan DNS dipanaskan selama 5-15 menit hingga terjadi perubahan warna menjadi merah-coklat (Susilowati & Haryono, 2018)

Kurva standar glukosa dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm. Dengan menggunakan metode DNS, sebanyak 400 µl larutan standar glukosa, masing-masing konsentrasi ditambahkan 1200µl larutan DNS, dihomogenkan dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan dalam air es selama 5 menit. Dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Larutan blanko dibuat dari 400 µl akuades dan 1200 µl pereaksi DNS. Kurva standar dibuat antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.

Pembuatan kurva standar glukosa berfungsi sebagai acuan untuk mengukur jumlah glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase. Caranya adalah dengan membandingkan hasil absorbansi larutan sampel hasil hidrolisis dengan kurva standar. Dari perbandingan tersebut, dapat ditentukan konsentrasi glukosa dalam sampel. Konsentrasi glukosa ini kemudian digunakan untuk menghitung aktivitas enzim selulase. Semakin tinggi aktivitas enzim, semakin banyak glukosa yang dihasilkan dalam waktu tertentu (Chusniasih dkk., 2023). Setelah nilai absorbansi didapatkan lalu menggunakan persamaan regresi $y = ax + b$ untuk mengetahui konsentrasi gula pereduksinya.

3.5.10 Pengukuran Parameter

3.5.10.1 Uji aktivitas enzim selulase pada media Serbuk Kulit Ubi Kayu

Dengan mengamati aktivitas enzim selulase, peneliti dapat mengidentifikasi enzim yang lebih efisien atau lebih stabil dalam kondisi tertentu. Ini penting untuk pengembangan enzim rekombinan atau modifikasi enzim yang lebih efektif untuk aplikasi industri. Sebanyak 0,01 g serbuk kulit ubi kayu ditambahkan 1 ml buffer dengan pH 4,5 dan 5,5 jamur *Aspergillus niger* dan 1 ml enzim ekstrak kasar didalam tabung reaksi 10 ml diinkubasi selama 30 menit pada suhu 29,5 dan 30,5°C .Setelah pencampuran, reaksi dihentikan dengan menginkubasi dengan suhu 100°C selama 15 menit. Lalu suspensi di sentrifigasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 1 ml supernatan diambil dan ditambahkan 1 ml DNS lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit. Kemudian seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Aktivitas selulase diukur dalam 1 unit jumlah enzim menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit (Susilowati & Haryono, 2018). Hasil aktivitas enzim selulase dimasukkan kedalam Tabel 3.4. Pengamatan Aktivitas Enzim Selulase

$$\text{Aktivitas enzim selulase} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{C \times Fp \times 10}{t \times BM \text{ Glukosa}}$$

Keterangan :

- C = Konsentrasi gula pereduksi
- Fp = faktor pengenceran
- T = waktu inkubasi (30 menit)
- BM = BM glukosa (180 dalton)

Tabel 3.4 Pengamatan aktivitas enzim selulase

Sampel	Absorbansi	Gula Pereduksi (mg/L)	Aktivitas Enzim (U/mL)
--------	------------	--------------------------	---------------------------

3.5.10.2 Biomassa jamur *Aspergillus niger*

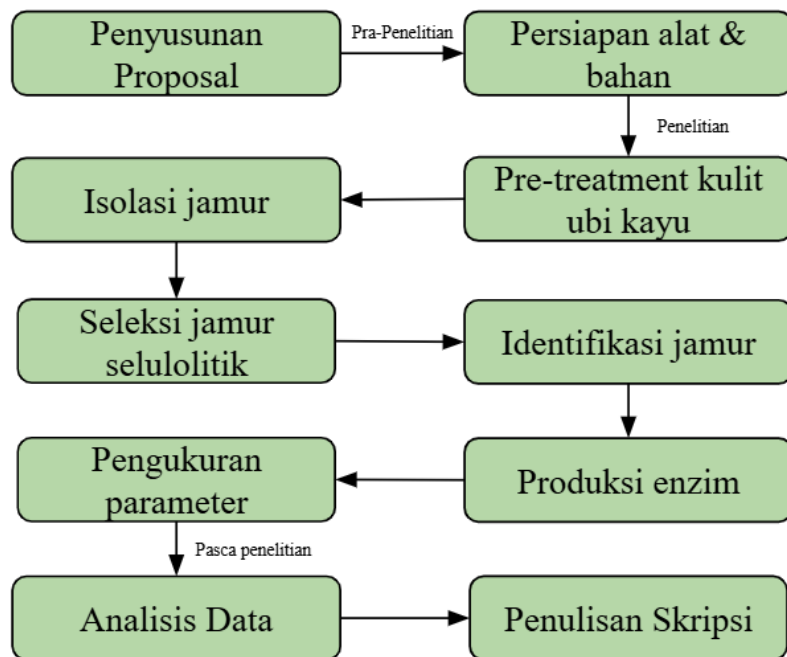
Pengukuran biomassa menggunakan metode *Optical Density* (OD) untuk menghitung populasi jamur *Aspergillus niger* selama proses fermentasi. Langkah awal pengukuran dengan mengambil 1 mL medium fermentasi dari masing-masing sampel dan dimasukkan kedalam kuvet. Sebagai pembanding, blanko dibuat menggunakan akuades untuk mengukur nilai penyerapan cahaya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 610 nm (Stephanie, 2019)

3.6 Analisis Data

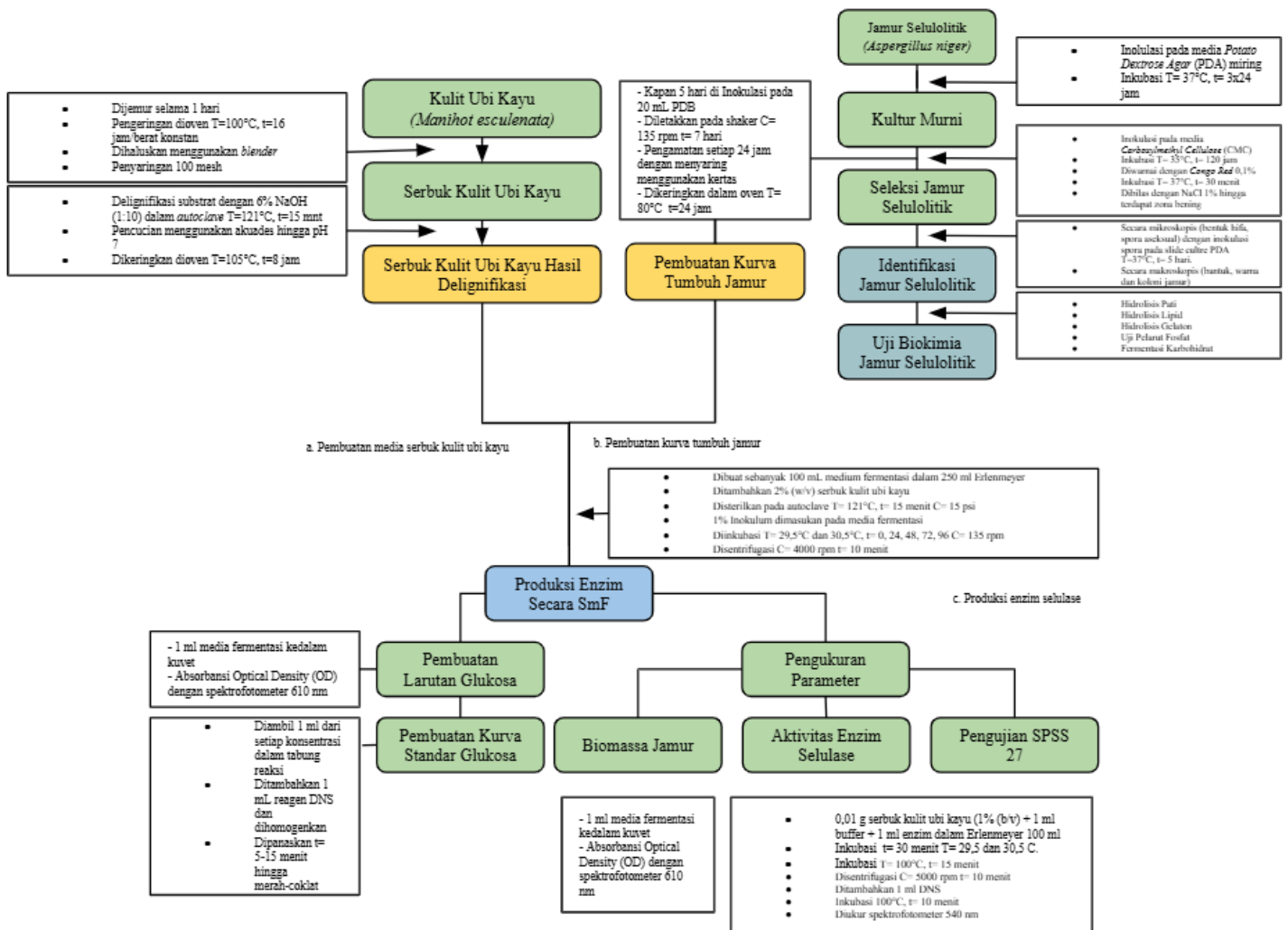
Analisis data dilakukan untuk memberikan makna dan interpretasi data yang telah didapatkan pada penelitian ini. Analisis data menggunakan program SPSS 25 *for Windows* untuk penelitian ini. Langkah pertama dengan menguji normalitas dan homogenitas data penelitian. Jika data yang dihasilkan normal dan homogen, dilanjutkan uji *Two Way Anova (Analysis of Variance)*. Namun, jika data yang dihasilkan tidak homogen dan tidak normal, lalu menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *Mann-Whitney*.

3.7 Alur Penelitian

Alur pada penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 3. 1 Diagram alir alur penelitian



Gambar 3. 2 Alur kerja produksi enzim selulase oleh jamur selulolitik *Aspergillus niger* pada substrat serbuk kulit ubi kayu (*Manihot esculenta*).