

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk pada kategori penelitian kuantitatif yang mengandalkan pendekatan eksperimental. Metode eksperimental dalam penelitian digunakan dengan tujuan utama untuk menguji kebenaran suatu hipotesis yang telah dirumuskan sebelumnya atau untuk menemukan jawaban atas pertanyaan penelitian secara sistematis. Dalam prosesnya, penelitian ini melibatkan pelaksanaan suatu eksperimen atau percobaan yang terkontrol guna mengamati pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lainnya. Menurut Setyanto (2013), penelitian eksperimental dilakukan dengan cara sengaja memanipulasi satu atau lebih variabel bebas untuk mengamati pengaruhnya terhadap variabel terikat. Tujuan utamanya adalah meneliti hubungan sebab-akibat dengan membandingkan kelompok yang diberi perlakuan (eksperimen) dengan kelompok kontrol yang tidak dimanipulasi. Metode ini memungkinkan peneliti mengontrol kondisi penelitian, mengidentifikasi variabel yang relevan, mengukur perubahan yang terjadi, dan menyelidiki pengaruh langsung suatu perlakuan atau kondisi tertentu terhadap variabel yang ingin diteliti.

Sedangkan penelitian kuantitatif merupakan penelitian yang dalam proses penelitian, hipotesis, observasi lapangan, analisis data, kesimpulan, hingga penulisannya menggunakan aspek pengukuran, perhitungan, rumus dan disajikan dalam bentuk angka, tabel, grafik, bagan, dan lain-lain. Pendekatan kuantitatif digunakan untuk menjelaskan observasi pada suatu variabel. Metode penelitian ini berfokus pada pengumpulan, analisis, dan interpretasi data dalam bentuk angka atau statistik untuk mencari hubungan sebab-akibat (Musianto, 2002).

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai pendekatan penelitian. Penggunaan metode ini didasarkan pada asumsi bahwa kondisi percobaan, baik dari segi bahan maupun lingkungan bersifat homogen. Selain itu, penelitian dilakukan di lingkungan laboratorium yang terkendali yang menjamin keselarasan alat, bahan, dan media, sehingga metode

Rancangan Acak Lengkap (RAL) diasumsikan sebagai pilihan yang tepat. Menurut Sunandi dkk. (2013) metode RAL dinamakan “acak” karena pada setiap satuan percobaan mempunyai kemungkinan yang setara untuk mendapatkan salah satu perlakuan. Sementara itu, istilah “lengkap” digunakan karena seluruh jenis perlakuan yang telah dirancang pada suatu eksperimen akan diaplikasikan secara menyeluruh ke semua kelompok uji.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam jangka waktu mulai dari Desember 2024 hingga April 2025 di Laboratorium Riset Bioteknologi, Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia yang berada di Jalan Dr. Setiabudi No. 299, Bandung.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian, yaitu isolat jamur selulolitik *Aspergillus niger* hasil isolasi dari biakan murni *Aspergillus niger* yang diperoleh dari PT Agritama Sinergi dan Inovasi (AGAVI). Sampel penelitian yang dipakai, yaitu enzim selulase yang diproduksi oleh jamur selulolitik *Aspergillus niger* yang didapatkan dari hasil isolasi biakan murni *Aspergillus niger*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian yang dilakukan menggunakan pendekatan yang memakai peralatan dan bahan tertentu. Tahapan-tahapan dari penelitian ini meliputi pembuatan substrat dari tongkol jagung dengan proses delignifikasi, isolasi jamur selulolitik, seleksi jamur selulolitik pada media CMC, identifikasi morfologi dan karakter jamur selulolitik, produksi enzim selulase menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF), uji aktivitas enzim selulase, dan optimasi produksi enzim selulase. Semua alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian disiapkan, dipastikan ketersediaannya dan keberfungsian.

Alat-alat yang dipakai untuk penelitian ini diantaranya yaitu *autoclave*, *Beaker glass*, cawan petri, *centrifuge*, inkubator, *laminar air flow*, lemari pendingin, oven, Erlenmeyer, gelas ukur, bunsen, *shaker*, *magnetic stirrer with hot plate*, spektrofotometer, rak tabung, tabung Durham, neraca analitik, blender, mikroskop,

Sinta Yuliandini, 2025

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH JAMUR SELULOLITIK *Aspergillus niger* PADA SUBSTRAT SERBUK TONGKOL JAGUNG (*Zea mays*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

vortex, mikropipet, saringan ukuran 100 mesh, tabung reaksi, kawat ose, dan mortir. Bahan-bahan yang dipakai untuk penelitian ini diantaranya yaitu isolat jamur selulolitik *Aspergillus niger* yang diperoleh dari biakan murni, media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), media agar (pati, gelatin, lipid, fosfat), media fermentasi karbohidrat, reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), larutan NaOH 6%, larutan NaCl, larutan *congo red* 0,1% dan limbah tongkol jagung. Alat dan bahan yang diperlukan pada penelitian ini tertera secara rinci di Lampiran 1.

Dalam mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan pada penelitian harus dilakukan secara aseptik. Pada tahapan ini dilakukan proses sterilisasi di Laboratorium Riset Biologi, FPMIPA, UPI. Sebelum proses sterilisasi, alat yang diperlukan harus dalam keadaan yang kering dan bersih, dibungkus dengan kertas, lalu dimasukkan ke dalam plastik. Bahan ditempatkan pada wadah yang telah dibersihkan, kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas. Pada proses sterilisasi, semua alat dan bahan disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2 Pengambilan Sampel Penelitian

Isolat jamur selulolitik *Aspergillus niger* diisolasi dari biakan murni yang diperoleh dari PT Agritama Sinergi dan Inovasi (AGAVI). Untuk tongkol jagung manis (*Zea mays*) varietas *saccharata* didapatkan dari Perkebunan Jagung di Kecamatan Saguling, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat.

3.5.3 Pembuatan Reagen dan Media

Dalam pelaksanaan penelitian ini, seluruh prosedur terkait pembuatan reagen serta media yang dipakai telah dipaparkan secara rinci dan sistematis pada Lampiran 2.

3.5.4 Delignifikasi dan *Pre-treatment* Tongkol Jagung

Tongkol jagung manis (*Zea mays saccharata*) yang didapatkan dari Perkebunan Jagung di Kecamatan Saguling, Kabupaten Bandung Barat, dibersihkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3 hari, kemudian dipotong kecil-kecil. Selanjutnya tongkol jagung dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100°C selama 3 hari hingga kering dan beratnya stabil. Kemudian tongkol

jagung yang telah kering dihancurkan menggunakan blender dan dilakukan proses penyaringan menggunakan saringan berukuran 100 mesh (Sari dkk., 2018).

Serbuk tongkol jagung dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml untuk proses delignifikasi selanjutnya. Proses delignifikasi diawali dengan memasukkan larutan NaOH 6% pada sampel dengan perbandingan 1:10. Campuran tersebut kemudian diproses menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Campuran kemudian disaring memakai kertas saring dengan tujuan memisahkan residu padat dari larutan. Tahapan selanjutnya adalah proses netralisasi pada tongkol jagung, yaitu dengan pencucian menggunakan H₂SO₄ hingga pH mencapai 7 (netral) (Sari dkk., 2018). Selanjutnya dikeringkan di oven pada suhu 105°C selama 8 jam. Serbuk tongkol jagung hasil delignifikasi selanjutnya digunakan pada proses hidrolisis enzimatis untuk menghasilkan gula hidrolisat.

3.5.5 Isolasi Jamur Selulolitik

Dalam proses isolasi jamur selulolitik, digunakan teknik isolasi mikroba yang dikenal sebagai metode cawan sebar (*spread plate*). Teknik ini dilakukan dengan mengambil sejumlah sampel mikroba, lalu menyebarkannya secara merata di permukaan media agar padat menggunakan alat khusus yang berbentuk menyerupai huruf L atau T. Koloni jamur dibiakkan pada media PDA padat, biakan jamur diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam. Koloni jamur yang telah tumbuh, selanjutnya dibiakkan kembali pada tabung reaksi yang berisi medium PDA miring untuk memperoleh isolat murni jamur, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam (Litaay dkk., 2017).

3.5.6 Uji Aktivitas Selulolitik Jamur Menggunakan Media CMC

Isolat jamur yang sebelumnya telah dimurnikan pada media PDA kemudian diuji aktivitas selulolitiknya secara kualitatif yang dinyatakan dengan indeks selulolitik. Isolat murni diinokulasikan pada media agar CMC. Pengujian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengevaluasi kemampuan jamur dalam memproduksi enzim selulase serta kemampuannya dalam menguraikan selulosa sebagai substrat. Setelah inokulasi, kultur jamur diinkubasi pada suhu 37°C selama periode inkubasi selama 7 hari. Setelah masa inkubasi selesai, media yang telah menunjukkan pertumbuhan jamur direndam dalam larutan pewarna *Congo red* 0,1%

Sinta Yuliandini, 2025

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH JAMUR SELULOLITIK *Aspergillus niger* PADA SUBSTRAT SERBUK TONGKOL JAGUNG (*Zea mays*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

selama 30 menit. Setelah perendaman, media lalu dibilas menggunakan larutan NaCl 1% untuk menghilangkan kelebihan pewarna. Untuk melihat aktivitas selulolitiknya diindikasikan dengan adanya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni (Setiawan, 2023). Menurut Faradilla (2022), kemampuan degradasi selulosa pada jamur digolongkan berdasarkan nilai Indeks Selulolitik (IS) dan terdapat tiga kategori, yaitu:

Tabel 3.1 Kategori nilai Indeks Selulolitik (IS)

Kategori	Nilai Indeks Selulolitik
Rendah	≤ 1
Sedang	1-2
Tinggi	≥ 2

Tabel 3.2 Format hasil uji aktivitas selulolitik pada media CMC

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks Selulolitik

Indeks selulolitik pada jamur dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Talantan dkk., 2018):

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

3.5.7 Identifikasi Jamur Selulolitik

Identifikasi jamur selulolitik bertujuan untuk mengetahui karakteristik jamur baik dari segi morfologi maupun fisiologisnya. Pengamatan untuk identifikasi jamur selulolitik dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis diamati morfologi pada jamur selulolitik, sedangkan secara mikroskopis diamati melalui metode apusan dan dilakukan berbagai pengujian aktivitas biokimia terhadap jamur.

1) Pengamatan Morfologi secara Makroskopis dan Mikroskopis

Isolat jamur selulolitik diidentifikasi melalui pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis meliputi bentuk koloni, tepi koloni, dan warna koloni. Isolat jamur diinokulasikan pada media PDA sejumlah satu ose secara steril, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Jamur yang telah tumbuh pada media dapat diamati struktur makroskopisnya (Talantan dkk., 2018). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan menggunakan

metode apusan. Bagian-bagian yang diamati meliputi hifa, spora aseksual dan struktur konidia. Metode apusan dilakukan dengan membuat preparat basah dari sampel jamur, selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Tahapannya diawali dengan mengambil sampel, membuat preparat basah dengan cara *slide* ke kaca preparat, lalu ditetesi dengan akuades, apusan difiksasi dengan melewati preparat ke atas Bunsen, selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Selanjutnya hasil identifikasi dicatat dengan format pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Format hasil identifikasi jamur selulolitik

Karakteristik	Isolat Jamur <i>Aspergillus niger</i>
Bentuk koloni	
Warna koloni	
Tepi koloni	
Hifa	
Spora aseksual	
Struktur konidia	

2) Uji Biokimia

Uji biokimia pada jamur juga bertujuan untuk membuktikan kemampuan jamur mendapatkan nutrisi melalui proses enzimatik dan untuk mengetahui adanya eksoenzim dan endoenzim. Uji aktivitas biokimia yang dilakukan, yaitu hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis gelatin, uji pelarut fosfat, dan fermentasi karbohidrat. Hasil pengamatan uji biokimia pada jamur dicatat pada tabel pengamatan dengan format seperti yang tertera pada Tabel 3.4.

a. Hidrolisis Pati

Proses uji biokimia hidrolisis pati diawali dengan menuangkan media pati agar ke dalam cawan petri secara steril, kemudian dibekukan. Setelah membeku, koloni jamur diinokulasikan pada media pati agar. Selanjutnya, proses inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Setelah muncul tanda-tanda pertumbuhan koloni jamur pada media, selanjutnya meneteskan larutan indikator berupa iodium atau lugol secara perlahan ke permukaan biakan, lalu didiamkan selama beberapa menit. Munculnya zona bening di sekitar koloni jamur mengindikasikan hasil positif (Hamdiyati & Kusnadi, 2022).

b. Hidrolisis Lipid

Pada tahap awal pengujian biokimia terhadap aktivitas hidrolisis lipid, isolat jamur diinokulasikan ke dalam media lipid agar yang telah dipadatkan sebelumnya dalam cawan petri. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Jika terbentuk daerah terang di sekitar koloni, maka mengindikasikan hasil positif (Hamdiyati & Kusnadi, 2022).

c. Hidrolisis Gelatin

Untuk mengetahui kemampuan jamur dalam menghidrolisis gelatin, diawali dengan menginokulasikan isolat jamur pada media gelatin secara steril. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Kemudian biakan ditempatkan di inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit. Media diamati cair atau tidaknya. Hasil positif diindikasikan dengan media yang tetap cair (Hamdiyati & Kusnadi, 2022).

d. Uji Pelarut Fosfat

Dalam uji pelarut fosfat, diperlukan media agar *Pikovskaya* untuk menumbuhkan jamur (Pikovskaya, 1948). Isolat jamur diinokulasikan ke dalam media agar *Pikovskaya* yang telah mengalami proses pemadatan sebelumnya. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Indikasi bahwa jamur mampu melarutkan senyawa fosfat dalam media ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni, yang menjadi tanda hasil positif dari pengujian ini (Hamdiyati & Kusnadi, 2022).

e. Fermentasi Karbohidrat

Untuk menguji kemampuan jamur dalam fermentasi karbohidrat, dilakukan dengan menginokulasikan koloni jamur pada media xilosa dan glukosa menggunakan *loop* inokulasi steril. Dalam hal ini, dilakukan secara hati-hati agar tidak adanya gelembung udara yang masuk ke dalam tabung Durham. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Hasil positif diindikasikan dengan adanya perubahan warna dan terbentuknya gelembung pada tabung Durham (Hamdiyati & Kusnadi, 2022).

Tabel 3.4 Format hasil uji aktivitas biokimia

No.	Aktivitas Biokimia	Hasil
1	Hidrolisis pati	
2	Hidrolisis lipid	
3	Hidrolisis gelatin	
4	Uji pelarut fosfat	
5	Fermentasi xilosa	
6	Fermentasi glukosa	

3.5.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Jamur

Kurva pertumbuhan jamur dibuat dengan tujuan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan pada jamur seperti fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Selain itu, kurva pertumbuhan jamur dibuat agar dapat mengetahui kapan jamur menghasilkan sel paling banyak, sehingga dapat ditentukan waktu inkubasi optimum untuk produksi enzim selulase (Wuryanti, 2008). Pada penelitian ini, digunakan isolat jamur selulolitik *Aspergillus niger*, sehingga metode yang digunakan adalah perhitungan berat kering (*Cell Dry Weight*). Hal ini disebabkan oleh *Aspergillus niger* merupakan jamur yang mempunyai hifa, perhitungan tidak dapat dilakukan dengan metode *colony counter* (Arifin, 2016).

Penentuan waktu inkubasi yang paling optimal dilakukan dengan memanfaatkan kurva pertumbuhan, yang menggambarkan hubungan antara durasi inkubasi (ditampilkan pada sumbu x) dengan berat kering biomassa jamur (terletak pada sumbu y) sebagai indikator pertumbuhan. Isolat jamur selulolitik yang telah mencapai usia 5 hari terlebih dahulu diinokulasikan pada 20 mL media nutrisi cair *Potato Dextrose Broth* (PDB). Sebanyak 2 ose inokulum diinokulasikan pada media yang steril, selanjutnya diinkubasi menggunakan *shaker* selama 7 hari dengan kecepatan 135 rpm. Setiap 24 jam sekali, sebagian sampel diambil untuk dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan miselium. Miselium yang telah terbentuk pada setiap sampel ditimbang massa nya dengan cara disaring dalam 20 mL kultur menggunakan kertas saring, lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam hingga didapatkan berat yang konstan (Aryani, 2012). Berat kering miselium pada 20 mL didapatkan melalui perhitungan:

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

3.5.9 Produksi Enzim Selulase Menggunakan *Submerged Fermentation* (SmF)

Produksi enzim selulase menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF) diawali dengan mengambil 3 ose koloni jamur selulolitik *Aspergillus niger* dan diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang sebelumnya sudah disterilkan. Selanjutnya, inokulum diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 135 rpm selama waktu optimum dari jamur *Aspergillus niger*.

Untuk memproduksi enzim selulase melalui metode SmF, diperlukan medium fermentasi yang mengandung 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,3 g urea; 0,3 g CaCl_2 ; 0,3 g MgSO_4 ; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0014 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g CoCl_2 ; 0,75 g pepton; 7,5 g substrat tongkol jagung yang dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M pada variasi pH 4,5 dan 5,5 sebanyak 1000 mL dalam labu Erlenmeyer 2000 mL yang sebelumnya telah disterilkan. Selanjutnya, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit (Oktariani, 2017).

Setelah menjalani proses sterilisasi, medium fermentasi yang ditempatkan dalam labu Erlenmeyer dibiarkan terlebih dahulu hingga dingin pada suhu ruang. Tahapan selanjutnya adalah memasukkan inokulum jamur selulolitik *Aspergillus niger* sebanyak 2% total volume media fermentasi ke dalam media fermentasi dengan teknik aseptik. Lalu diinkubasi dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 135 rpm pada variasi suhu $29,5^\circ\text{C}$ dan $30,5^\circ\text{C}$ selama 96 jam (Oktariani, 2017).

Ekstrak kasar enzim selulase didapatkan melalui proses pemisahan antara sel jamur dan media pertumbuhannya dengan menggunakan teknik sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan sel jamur yang mengendap dari supernatan yang mengandung enzim. Setelah pemisahan, supernatan yang terbentuk digunakan sebagai sampel untuk mengukur aktivitas enzim selulase. Selanjutnya, aktivitas enzim selulase ini dianalisis dengan metode yang diusulkan oleh Miller (1959). Satu unit aktivitas selulase diartikan sebagai jumlah enzim yang mampu menghasilkan 1 μmol glukosa dalam waktu satu menit pada kondisi yang telah ditentukan. Hasil produksi enzim selulase pada setiap perlakuan dituliskan dengan format pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Format uji pH dan suhu optimum

Perlakuan	<i>Aspergillus niger</i>		
	Absorbansi	Gula Hidrolisat	Aktivitas Enzim (U/mL)
Suhu 29,5°C dan pH 4,5			
Suhu 29,5°C dan pH 5,5			
Suhu 30,5°C dan pH 4,5			
Suhu 30,5°C dan pH 5,5			

3.5.10 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa 1000 ppm dibuat dengan memakai beberapa konsentrasi, yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm. Larutan stok glukosa dibuat dengan melarutkan 0,05 g glukosa dalam 50 mL akuades. Kemudian larutan stok glukosa dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan dan dibuat sebanyak 5 mL dengan berbagai konsentrasi yang telah ditentukan (Allinya, 2019).

3.5.11 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa memakai beberapa konsentrasi, yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400 ppm. Pembuatan kurva standar glukosa menggunakan metode DNS. Larutan standar glukosa sebanyak 400 µl diambil dan ditambahkan 1200 µl larutan DNS, kemudian dihomogenkan. Sampel kemudian ditutup menggunakan alumunium foil dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 10 menit hingga berubah warna menjadi merah kecoklatan yang menunjukkan reaksi terjadi. Kemudian, sampel didinginkan secara cepat pada penangas es selama 5 menit untuk menghentikan reaksi yang berlangsung. Selanjutnya, absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai larutan blanko dalam pengukuran ini, digunakan campuran yang terdiri dari 400 µl akuades dan 1200 µl larutan DNS. Hasil pengukuran absorbansi ini kemudian digunakan untuk membuat kurva standar yang menghubungkan konsentrasi glukosa dengan nilai absorbansi yang terukur, yang akan digunakan untuk menghitung konsentrasi glukosa dalam sampel (Aisyah, 2012).

Setelah didapatkan nilai absorbansi dari tiap larutan, digunakan persamaan regresi $Y = ax + b$ untuk mengetahui konsentrasi gula pereduksi. Nilai a dan b didapatkan dari perhitungan gula standar, x adalah konsentrasi gula pereduksi yang

dihasilkan, dan Y adalah nilai absorbansi pada panjang gelombang 550 nm (Talantan dkk., 2018).

3.5.12 Pengukuran Parameter

1) Biomassa Jamur

Selama fermentasi, populasi atau biomassa jamur dihitung dengan menggunakan metode pengukuran *Optical Density* (OD). Prosedur yang dilakukan dimulai dengan mengambil 1 mL dari masing-masing sampel medium fermentasi, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet yang digunakan untuk pengukuran. Selanjutnya, dibuat kuvet terpisah yang hanya berisi akuades yang berfungsi sebagai larutan pembanding atau blanko. Setelah itu, absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang cahaya 610 nm (Lizayana & Iswandi., 2016).

2) Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Media Serbuk Tongkol Jagung

Substrat yang digunakan untuk uji aktivitas enzim selulase, yaitu substrat tongkol jagung. Sebanyak 0,01 g serbuk tongkol jagung ditambahkan 1 ml buffer fosfat pada pH (4,5 dan 5,5) serta ditambahkan sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim yang telah didapatkan. Reaksi ini dilakukan dalam tabung reaksi 10 ml, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 29,5 °C dan 30,5 °C. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan menginkubasi campuran tersebut pada suhu 100°C selama 15 menit. Kemudian campuran reaksi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 5000 rpm. Sebanyak 1 ml DNS dimasukkan pada 1 ml supernatan yang telah diambil, selanjutnya diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit. Lalu dilakukan pengukuran pada semua sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Suhu inkubasi dan tingkat keasaman (pH) yang dipakai pada uji aktivitas enzim selulase ditentukan berdasarkan jenis isolat yang digunakan karena kondisi-kondisi ini dapat mempengaruhi kinerja enzim (Meryandini dkk., 2009). Rumus yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim selulase, yaitu (Aryani, 2012):

$$\text{Aktivitas enzim selulase (Unit/mL)} = \frac{[C \times Fp \times 10]}{t \times \text{BM glukosa}}$$

Keterangan:

C : konsentrasi gula pereduksi

t : waktu inkubasi (30 menit)

Fp : faktor pengenceran

BM : BM glukosa (180 dalton)

Aktivitas enzim selulase yang diperoleh kemudian ditabulasikan pada format yang ditunjukkan Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Format aktivitas enzim selulase dalam substrat serbuk tongkol jagung

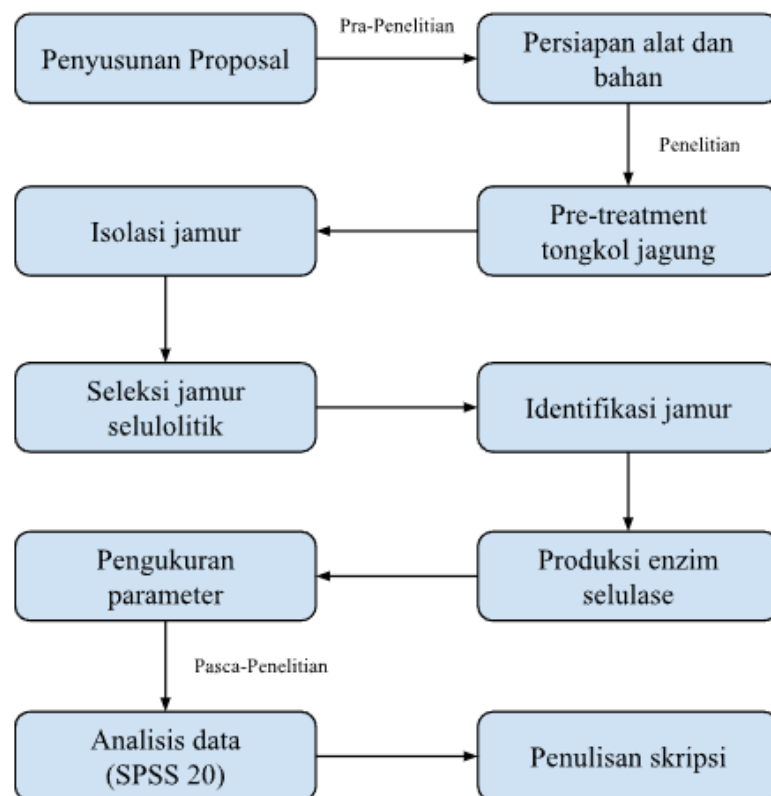
Sampel	Absorbansi	Gula Pereduksi (mg/L)	Aktivitas Enzim (U/mL)

3.6 Analisis Data

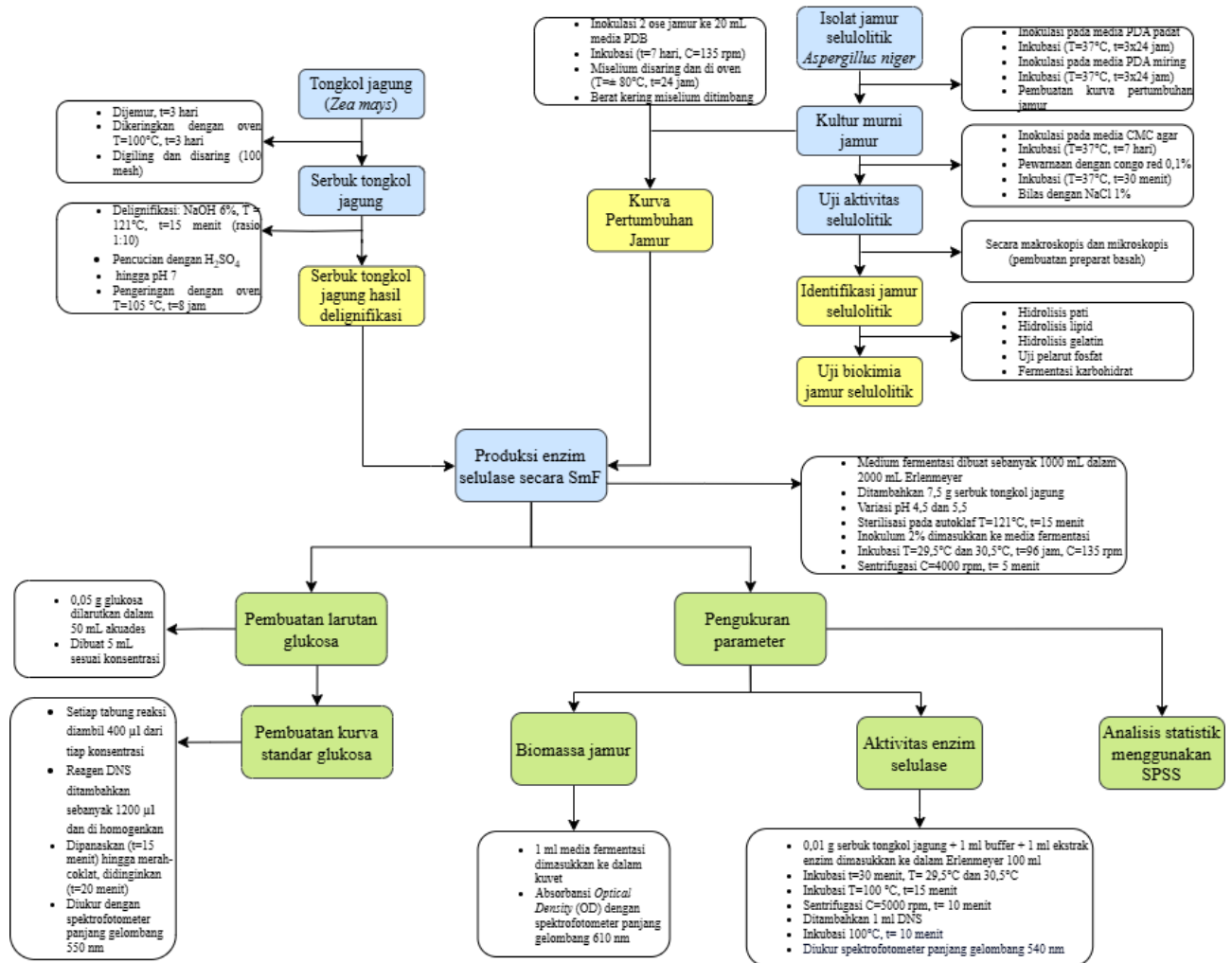
Proses analisis data dilakukan menggunakan aplikasi pemrograman yaitu SPSS 20 *for Windows*. Tujuan dari analisis statistik ini adalah untuk melihat pengaruh variabel pH dan suhu terhadap aktivitas enzim selulase yang telah diperoleh dari hasil eksperimen. Tahapan analisis dimulai dengan melakukan uji normalitas untuk menilai apakah data berdistribusi normal serta dilanjutkan dengan uji homogenitas. Apabila hasil menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan pengujian menggunakan metode statistik parametrik *Two Way ANOVA (Analysis of Variance)*. Sebaliknya, apabila data tidak memenuhi asumsi normalitas, maka uji statistik menggunakan metode non-parametrik, yaitu uji *Friedman*.

3.7 Alur Penelitian

Penelitian yang dilakukan dimulai dari penyusunan proposal, lalu memasuki tahap pra-penelitian, yaitu mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, selanjutnya tahap penelitian dimulai dari proses *pre-treatment* pada tongkol jagung, isolasi jamur, uji aktivitas selulolitik jamur, identifikasi jamur, produksi enzim selulase menggunakan metode SmF hingga pengukuran parameter seperti biomassa jamur dan aktivitas enzim selulase, lalu langkah terakhir adalah analisis data. Alur penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada Gambar 3.1. Prosedur-prosedur yang dilakukan pada penelitian secara rinci ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Kerja Produksi Enzim Selulase oleh Jamur Selulolitik *Aspergillus niger* Pada Substrat Serbuk Tongkol Jagung