

BAB 3

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan pendekatan kuantitatif. Metode deskriptif merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan peristiwa yang sedang berlangsung sebagaimana mestinya pada saat penelitian berlangsung. Sedangkan pendekatan kuantitatif adalah pendekatan dalam penelitian yang menggunakan metode bilangan untuk mendeskripsikan observasi suatu objek atau variabel dimana bilangan menjadi bagian dari pengukuran (Sudjana, 2004).

Metode penelitian deskriptif dengan menggunakan pendekatan secara kuantitatif digunakan apabila memiliki tujuan untuk mendeskripsikan atau menjelaskan peristiwa atau suatu kejadian yang terjadi pada saat sekarang dalam bentuk angka-angka yang bermakna (Sudjana, 2004). Penggunaan metode ini dimaksudkan untuk mendapat informasi mengenai jamur selulolitik yang diisolasi dari usus rayap (*Cryptotermes sp.*) dan aktivitas seluloliticnya pada media serbuk jerami padi (*Oryza sativa*, Linn).

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2016 sampai Juli 2017 di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Pengambilan sampel rayap dan jerami (*Oryza sativa*) dilakukan di Desa Ciwaruga Kabupaten Bandung Barat.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, autoklaf, oven, *shaker*, spektrofotometer, *centrifuge*, tabung Durham, timbangan analitik, hot plate, blender, *vortex*, mikroskop, pipet mikro, lemari pendingin, saringan 100 mesh, dan

peralatan laboratorium mikrobiologi seperti *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung, *micro tube*, tip, bunsen, kawat ose, mortir, dan tabung vial. Alat yang digunakan dalam penelitian secara rinci tercantum dalam Lampiran 1.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap (*Cryptotermes sp.*), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) agar 1%, media agar pati, media agar kasein, media agar gelatin, media agar lipid, media agar fosfat, media fermentasi karbohidrat, media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) cair 1%, substrat CMC pH 5-8, pewarna *congo red* 0,1%, larutan NaCl 1 M, reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), buffer sitrat fosfat 0,1 M pH 5-8, reagen biuret, larutan NaOH 0,2%, aluminium foil, kapas, plastik tahan panas, kertas label, dan plastik wrap. Bahan yang digunakan dalam penelitian secara rinci tercantum dalam Lampiran 1.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah aktivitas enzim selulase yang dihasilkan jamur selulolitik dari usus rayap (*Cryptotermes sp.*). Sedangkan Sampel penelitian yang digunakan adalah jamur selulolitik yang diisolasi dari usus rayap (*Cryptotermes sp.*) yang diambil dari Desa Ciwaruga, Kabupaten Bandung Barat.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Penentuan lokasi pengambilan rayap dan jerami

Penentuan lokasi dilihat dari keadaan lingkungan yang merupakan area persawahan yang dapat dimanfaatkan jeraminya yaitu di Desa Ciwaruga, Kabupaten Bandung Barat. Begitu pula untuk rayap *Cryptotermes sp.*, rayap diambil dari kayu-kayu yang kering yang sudah tidak terpakai yang ada di Desa Ciwaruga.

b. Persiapan alat dan bahan

Seluruh alat dan bahan yang dibutuhkan selama penelitian berlangsung dipersiapkan, diperiksa ketersediaannya dan keberfungsian. Alat dan bahan kemudian dibungkus menggunakan plastik tahan panas, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit

c. Pembuatan reagen dan media

Pembuatan reagen dan media yang digunakan dalam penelitian ini secara rinci tercantum pada Lampiran 2.

2. Tahap Penelitian

a. Ekstraksi Rayap dan Isolasi Jamur pada Media

Beberapa rayap species *Cryptotermes* sp. diambil dan diletakkan pada cawan petri kemudian disterilkan menggunakan alkohol 70% selama ± 10 menit. Penggunaan alkohol 70% bertujuan untuk membunuh mikroorganisme di luar tubuh rayap dengan cara mendenaturasi protein dan melarutkan membran lemak yang merupakan penyusun sel mikroorganisme. Setiap rayap dipisahkan menjadi bagian kepala dan tubuh. Bagian tubuh rayap dihancurkan/digerus menggunakan mortir, kemudian ditambahkan larutan NaCl sebanyak 1 mL. Sebelum diinokulasikan pada media, dilakukan pengenceran terlebih dahulu sebanyak 10^{-6} . Pengenceran dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga mempermudah proses isolasi.

Sampel kemudian ditanam pada media pembiakan jamur yaitu *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah dicampur dengan *Chloramphenicol*. *Chloramphenicol* merupakan salah satu zat anti bakteri yang mampu menekan bahkan mencegah pertumbuhan bakteri. Pemberian anti bakteri pada media PDA bertujuan agar tidak ada bakteri yang hidup dan terisolasi pada media. Metode yang digunakan dalam isolasi adalah metode cawan sebar. Biakan selanjutnya diinkubasi selama

3x24 jam pada suhu 37⁰C. Jamur yang telah tumbuh kemudian dipindahkan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) miring untuk mendapatkan isolat murni jamur dan diinkubasi selama 3x24 jam dengan suhu 37⁰C (Kakkar *et al.*, 2015).

b. Delignifikasi Serbuk Jerami Padi

Jerami terlebih dahulu dikeringkan di bawah sinar matahari selama ±3 hari, kemudian dipotong-potong hingga didapatkan ukuran sekitar 3 cm. Setelah itu jerami dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 90⁰C selama 24 jam. Selanjutnya dihaluskan menggunakan *blender* dan disaring menggunakan saringan berukuran 100 mesh (Gunam, 2010). Tujuannya adalah untuk mempermudah proses hidrolisis oleh enzim serta dapat memperluas permukaan kontak antara enzim dengan jerami padi, dengan demikian enzim dapat dengan mudah mendegradasi selulosa dalam jerami menjadi glukosa.

Delignifikasi serbuk jerami padi dilakukan dengan cara menambahkan substrat dengan larutan NaOH 6% (perbandingan 1:10). Penggunaan NaOH dalam proses delignifikasi jerami padi bertujuan untuk menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf. Campuran substrat dan larutan NaOH kemudian dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu 121⁰C selama 15 menit. Disaring menggunakan kertas saring dan dicuci menggunakan akuades hingga pH netral (pH 7). Selanjutnya dikeringkan ke dalam oven pada suhu 105⁰C selama 10 jam (Gunam, 2010). Hasil dari delignifikasi serbuk jerami padi digunakan untuk proses selanjutnya yaitu hidrolisis enzimatik serbuk jerami padi untuk mengetahui kadar gula hidrolisat yang dihasilkan.

c. Uji Aktivitas Selulolitik Menggunakan Media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*)

Uji aktivitas selulolitik dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni jamur pada media agar CMC, kemudian diinkubasikan selama 120 jam pada suhu 35⁰C, diwarnai dengan *Congo Red* 0,1% dan diinkubasikan selama 60 menit kemudian dibilas dengan larutan NaCl

1% (Ji *et al.*, 2003). Indikasi positif dilihat dari adanya daerah bening di sekitar koloni. Hasil dari uji aktivitas selulolitik kemudian disajikan dalam tabel seperti terlihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1. Format hasil uji aktivitas selulolitik menggunakan media CMC

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)	Luas Zona Bening Total (mm)	Diameter Koloni (mm)	Luas Koloni Total (mm)	Indeks Aktivitas Selulolitik

Indeks aktivitas selulolitik dihitung berdasarkan persamaan yang digunakan oleh Roesnawati (1996) yaitu:

- Luas koloni total (A) = $\pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot d \text{ koloni}\right)^2$
- Luas zona bening total (B) = $\pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot D \text{ zona bening}\right)^2$

Sehingga indeks Selulolitik = $\frac{B}{A}$

Keterangan: $\pi = 3,14$

d = diameter koloni

D = diameter zona bening

A = luas koloni total

B = luas zona bening total

d. Identifikasi Isolat Jamur Selulolitik

Identifikasi isolat jamur dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Untuk pengamatan secara makroskopis yaitu pengamatan terhadap bentuk dan koloni jamur. Sedangkan untuk pengamatan secara mikroskopis meliputi pengamatan terhadap bentuk hifa, spora aseksual, dan sebagainya yang dilakukan dengan membuat *slide culture* (Balai Karantina Ikan, 2011). Buku yang digunakan untuk membantu dalam identifikasi jamur selulolitik adalah karangan dari Barnett & Barry, Webster & Roland, dan Tsuneo Watanabe. Selain itu dilakukan beberapa uji aktivitas biokimia pada jamur selulolitik.

Slide culture dibuat dengan cara memasukkan penahan yang terbuat dari sumpit berbentuk segi tiga ke dalam cawan petri sebagai tempat untuk meletakkan objek gelas, kemudian disterilkan. Sebanyak \pm

1 cm² PDA diletakkan di atas objek gelas kemudian diletakkan spora kapang di atas media. Selanjutnya diinkubasi selama 5 hari pada temperatur 35⁰C. Setelah hari ke-5 *slide cultur* diamati dengan menggunakan mikroskop (Balai Karantina Ikan, 2011). Hasil identifikasi kemudian dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang telah disajikan pada Tabel 3.2

Tabel 3.2. Format identifikasi isolat jamur selulolitik

Kode Isolat	Koloni		Hifa	Spora Seksual	Struktur Konidia/ Spora	Genus
	Bentuk	Warna				

e. Uji Biokimia Isolat Jamur Selulolitik

Uji biokimia yang dilakukan meliputi hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis gelatin, pelarut fosfat, dan fermentasi glukosa serta xilosa.

1) Hidrolisis Pati

Koloni jamur ditumbuhkan pada media pati agar (pH diatur sampai 7) yang telah membeku pada cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 22-37⁰C selama 3-5 hari. Setelah terlihat pertumbuhan, ditetesi iodine atau lugol pada biakan. Tanda positif diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Kusnadi, *et al.*, 2016).

2) Hidrolisis Lipid

Koloni jamur ditumbuhkan pada media lipid agar yang telah membeku pada cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 22-37⁰C selama 3-5 hari. Tanda positif diindikasikan dengan terbentuknya daerah terang di sekitar koloni (Kusnadi, *et al.*, 2016)

3) Hidrolisis Gelatin

Koloni jamur ditumbuhkan pada media gelatin, kemudian diinkubasi pada suhu 22-37⁰C selama 3-5 hari. Biakan disimpan pada

inkubator suhu 4⁰C selama 30 menit. Tanda positif diindikasikan dengan media yang tetap mencair (Kusnadi *et al.*, 2016).

4) Uji Pelarut Fosfat

Koloni jamur ditumbuhkan pada media agar *Pikovskaya* (Pikovskaya, 1948) yang telah membeku pada cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 3-5 hari. Tanda positif diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

5) Fermentasi Karbohidrat

Koloni jamur ditumbuhkan pada media glukosa dan xilosa, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 3-5 hari. Tanda positif ditandai dengan perubahan warna dan adanya gelembung pada tabung Durham (Kusnadi *et al.*, 2016).

Hasil uji biokimia jamur kemudian dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang telah disajikan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Format uji aktivitas biokimia

No.	Aktivitas biokimia	Genus		
		1	3	6
1	Hidrolisis pati			
2	Hidrolisis lipid			
3	Hidrolisis gelatin			
4	Pelarut fosfat			
5	Fermentasi glukosa			
6	Fermentasi xilosa			

f. Pembuatan Kurva Tumbuh Jamur

Kurva tumbuh dibuat bertujuan untuk menentukan umur terbaik isolat jamur dalam medium aktivasi sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi. Penentuan umur optimum dibuat berdasarkan kurva pertumbuhan berupa hubungan antara waktu (sumbu x) dengan berat kering biomassa jamur (sumbu y).

Isolat kapang selulolitik berumur 5 hari ditumbuhkan ke dalam 20 mL media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Inokulum diambil sebanyak 1 *loop* dan dimasukkan ke dalam media yang telah disterilkan. Kemudian

diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam sekali dengan cara mengambil sampel untuk menimbang masa miselium yang telah terbentuk. Pengukuran berat miselium pada masing-masing sampel yaitu dengan menyaring massa miselium dalam 20 mL kultur menggunakan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 3-4 jam (Aryani, 2012). Berat kering diperoleh dengan perhitungan:

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

g. Produksi Enzim Selulase

Enzim selulase ekstrak kasar didapat dengan melakukan pemisahan sel jamur dengan media pertumbuhannya dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan ditentukan untuk menentukan aktivitas enzim. Aktivitas selulase diukur menggunakan metode Miller (1959). Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa dalam satu menit.

h. Pengukuran Parameter

1) Kadar Gula Pereduksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Metode Miller

Aktivitas enzim selulase diuji dengan cara mencampurkan 200 μl enzim dengan 200 μl substrat (1% CMC pada pH optimum) dalam *microtube*, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Gula yang terbentuk kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) yaitu dengan cara menambahkan 1200 μl DNS ke dalam tabung, selanjutnya dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit kemudian didinginkan menggunakan air es selama 20 menit. Apabila sampel terlalu pekat maka dilakukan pengenceran. Pengenceran 10^{-1} dilakukan dengan cara mengambil 1 mL larutan ditambahkan dengan 9 mL akuades. Selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer

UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm untuk mengetahui kadar gula pereduksi (Aryani, 2012).

Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan konsentrasi gula pereduksi dengan rumus persamaan regresi linier $Y=a+bx$. a dan b diperoleh dari perhitungan gula standar, Y merupakan nilai absorbansi pada panjang gelombang 550 nm, sedangkan x adalah konsentrasi glukosa pereduksi yang dihasilkan.

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 15 menit, kemudian didinginkan dalam air es selama 20 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.

$$\text{Aktivitas enzim selulase U/ml} = \frac{[Cx10xFp]}{(TxBM \text{ glukosa})}$$

Keterangan:

C = konsentrasi gula pereduksi

T = waktu inkubasi

Fp = faktor pengenceran (Aryani, 2012)

Hasil penentuan kadar gula pereduksi dan aktivitas enzim selulase dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4. Format kadar gula pereduksi dan uji aktivitas enzim selulase

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

2) Pentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan pada kisaran pH 4 - pH 8 menggunakan buffer universal dengan rentang pH yaitu 1. Ekstrak enzim diinkubasi pada substrat CMC 1% yang dilarutkan pada pH 4-8 selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitasnya (Aryani, 2012). Hasil penentuan pH optimum dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang disajikan pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5. Format penentuan pH optimum

pH	Species	Absorbansi	Gula Hidrolisat	Aktivitas Enzim (U/mL)
4				
5				
6				
7				
8				

3. Kadar Protein

Pengukuran kadar protein enzim menggunakan Bovin Serum Albumin (BSA), dilakukan dengan menggunakan metode Biuret. Sebanyak 0,2 mL sampel enzim ekstrak kasar ditambahkan dengan 1,8 mL reagen biuret. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 20 menit. Absorbansi larutan sampel protein dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Dengan persamaan matematik dari kurva standar protein, akan didapatkan kadar protein terlarut yang terkandung dalam larutan ekstrak enzim kasar (Purwanto, 2014). Hasil pengukuran kadar protein dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang disajikan pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6. Format penentuan kadar protein

Species	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)

i. Uji Aktivitas Enzim Selulase dalam Media Serbuk Jerami Padi

Sebanyak 0,05 g serbuk jerami padi ditambahkan 5 ml buffer (mungkinan pH optimum jamur) dan 5 ml enzim ekstrak kasar, di dalam Erlenmeyer 100 ml selama 60 menit pada suhu optimum. Setelah itu reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μ l NaOH 0,2 M atau dengan menginkubasinya pada suhu 100°C selama 15 menit. Lalu suspensi tersebut disentrifus pada kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Sebanyak 2 ml supernatannya diambil dan ditambahkan 2 ml DNS lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi serbuk jerami padi tiap Erlenmeyer adalah 1% (b /v). Suhu inkubasi serbuk jerami padi-enzim serta pH larutan bufer disesuaikan dengan jenis isolat yang digunakan (Meryandini *et al.*, 2009). Hasil Aktivitas enzim selulase dimasukkan ke dalam tabel dengan format yang disajikan pada Tabel 3.7.

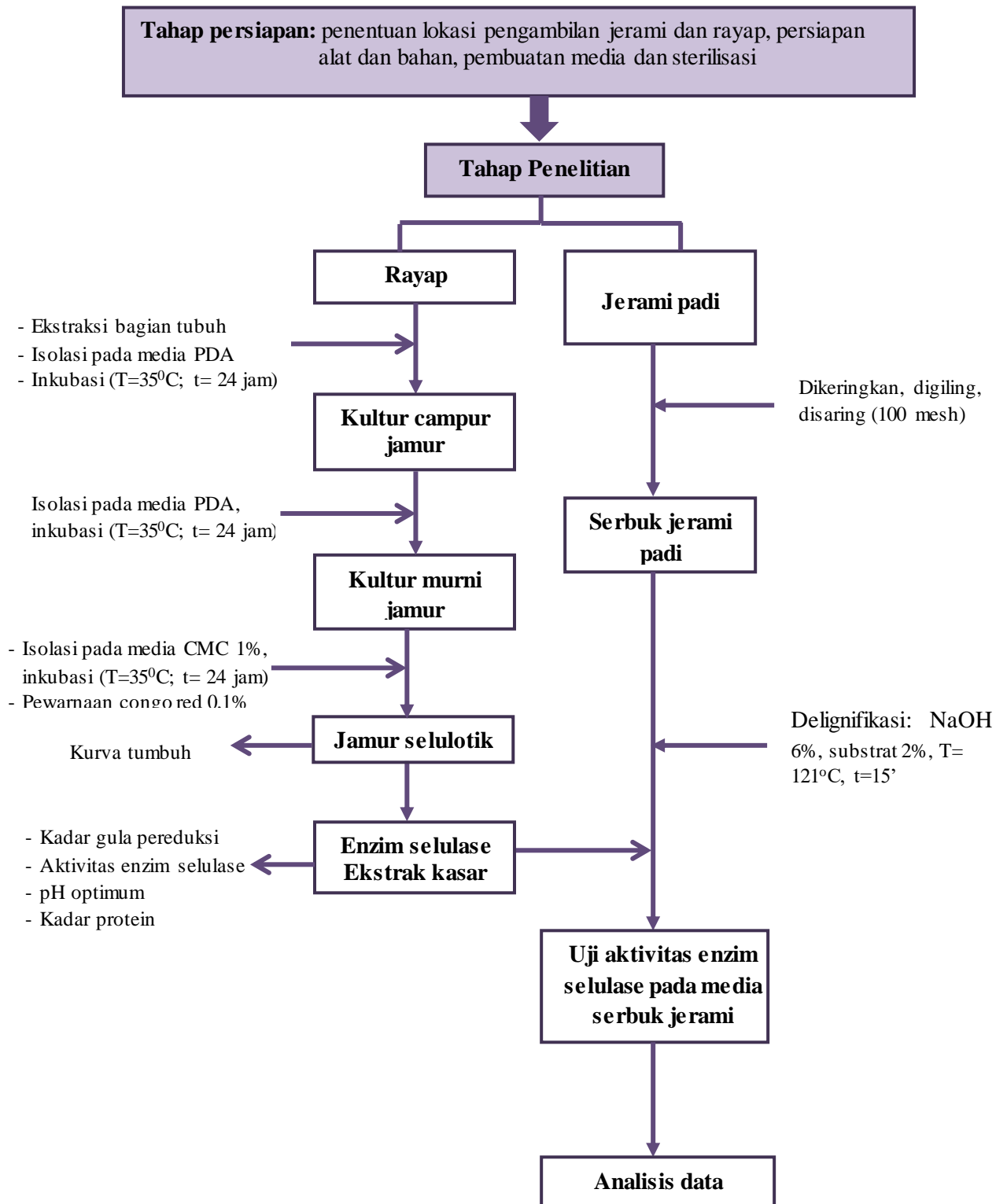
Tabel 3.7. Format aktivitas enzim selulase dalam media serbuk jerami padi

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

F. Analisis Statistika

Untuk menganalisis data digunakan aplikasi *SPSS 20 for Windows*. Uji analisis statistik dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh pH substrat/media terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh jamur selulolitik menggunakan *One Way ANOVA*.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Bagan Alur Penelitian