

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian deskriptif eksploratif. Metode penelitian deskriptif yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistematis, sehingga dapat lebih mudah dipahami dan disimpulkan. Sedangkan penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk menggambarkan atau menemukan hal baru. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroorganisme jamur yang bersimbion dengan rayap *Macrotermes sp*, sedangkan sampel yang diambil ialah jamur selulolitik yang mampu mendegradasi selulosa yang berasal dari usus rayap tersebut.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di dua tempat berbeda, yaitu yang pertama, lokasi pengambilan sampel rayap di daerah Ciwaruga, yang kedua melakukan perlakuan penelitian di Laboratorium Riset jurusan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Desember 2016 sampai bulan September 2017.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan secara lengkap tercantum dalam Lampiran 1.

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (Macrotermes sp.) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (Oryza sativa)

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

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dipersiapkan dan diperiksa, untuk alat dan bahan tertentu dicuci hingga di sterilisasi. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara sterilisasi fisik menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Pengumpulan Jerami Padi

Jerami padi yang digunakan adalah jerami padi yang sudah kering yang diperoleh dari Persawahan di Kecamatan Ciwaruga, Bandung.

c. *Pretreatment* Jerami Padi dan Delignifikasi

Jerami padi yang telah diperoleh dijemur selanjutnya dipotong hingga ukuran ± 2 cm kemudian di oven hingga kering. Jerami padi kemudian digiling dengan blender. Hasil blender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan 100 Mesh (Novianto, 2017). Serbuk jerami padi yang telah didapatkan dari proses penggilingan dimasukkan ke dalam larutan 2% NaOH. Seratus gram serbuk jerami padi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan NaOH 2%, lalu ditutup dengan sumbat dan *aluminium foil*, kemudian di autoklaf dengan suhu 121⁰C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Selesai diautoklaf, substrat serbuk jerami padi dicuci dengan air mengalir hingga substrat memiliki pH normal 7. Setelah mencapai pH normal, substrat dikeringkan dalam oven dengan suhu 70⁰C sampai kering. Setelah kering, substrat tersebut kembali diblender (Remly *et al.*, 2013).

d. Pengambilan Sampel Rayap

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

Tempat lokasi pengambilan sampel rayap dilakukan di daerah Ciwaruga, Kabupaten Bandung. Rayap diambil dari sarangnya dan ditempatkan ke dalam wadah berisi tanah dan potongan kayu.

e. Pembuatan Medium Pertumbuhan Jamur

Media yang berbeda digunakan untuk inokulasi jamur, yaitu media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) untuk media pertumbuhan jamur, media CMC Agar (*Carboxymethyl Cellulose*) untuk media dalam pengujian aktivitas enzim selulase secara kualitatif, media CMC Broth (*Carboxymethyl Cellulose*) untuk media dalam pengujian aktivitas enzim selulase secara kuantitatif.

f. Ekstraksi Rayap

Setelah dilakukan pengamatan terhadap spesies rayap tertentu, rayap ditempatkan di cawan petri lalu disterilkan permukaannya dengan menggunakan alkohol 70%. Setelah hal tersebut dilakukan, rayap dipisahkan antara tubuh dan kepalanya. Bagian tubuhnya lalu ditambahkan larutan NaCl 0,85% lalu digerus perlahan. Bahan ekstraksi ini digunakan untuk mengisolasi jamur (Siswandono, 1995).

2. Tahap Penelitian

a. Isolasi Isolat Jamur Kapang dari Usus Rayap

Bahan ekstraksi rayap sebelumnya digunakan dalam pengisolasian jamur kapang dari usus rayap. Bahan ekstraksi rayap diencerkan sampai 6 kali (10^{-6}) (Juwita *et al*, 2013), setiap pengenceran dibiakkan ke dalam medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan diamati pertumbuhan koloninya setiap 1 x 24 jam. Isolat jamur yang diperoleh dimurnikan dengan cara memisahkan koloni yang berlainan dan ditumbuhkan kembali ke dalam medium PDA.

b. Uji Aktivitas Enzim Selulase Secara Kualitatif

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (Macrotermes sp.) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (Oryza sativa)

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

Penentuan aktivitas enzim selulase secara kualitatif dilakukan dengan mengamati zona bening pada media CMC Agar. Sebanyak 1 lup dengan diameter 8 mm diambil dan diletakkan di atas media CMC Agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, cawan tersebut direndam dengan larutan *congo red* selama 30 menit lalu dibilas dengan NaCl 1 M. Zona bening yang terbentuk disekitar koloni jamur diamati dan diukur diameter zona beningnya dengan menggunakan penggaris. Zona bening yang terbentuk menandakan bahwa isolat jamur tersebut mampu menghasilkan enzim selulase ekstraseluler (Rosyada, 2015).

Secara kualitatif, besarnya aktivitas selulase dapat dinyatakan sebagai indeks selulolitik atau Indeks Aktivitas Selulase (IAS) yang diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Kader & Omar, 1998) :

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{A - B}{B}$$

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni isolat (mm)

Tabel 3.1 Tabel pengujian aktivitas enzim selulase secara kualitatif dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

No	Isolat	Luas Koloni Total	Luas Zona Bening	Indeks Selulolitik

c. Identifikasi Isolat Jamur Selulolitik

Jamur yang telah diketahui memiliki karakteristik selulolitik diidentifikasi dengan secara makroskopis, mikroskopis, dan aktivitas

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

biokimia. Identifikasi secara makroskopis yaitu meliputi pengamatan terhadap warna dan bentuk koloni jamur tersebut (Haniah, 2008). Sedangkan secara mikroskopis, yaitu meliputi pengamatan terhadap bentuk hifa dan ukuran konidia yang dilakukan dengan cara membuat *slide culture*. *Slide culture* dibuat dengan cara menyiapkan 1 buah cawan petri steril yang didalamnya telah diberi penahan batang kaca atau sumpit yang dibentuk seperti huruf U. Satu buah objek gelas steril diisi blok media PDA (*Potato Dextrose Agar*) steril berukuran 1 cm² dan spora jamur diletakkan di atas penahan batang kaca atau sumpit yang berbentuk huruf U dan diinkubasi pada suhu optimal jamur. Uji biokimia yang dilakukan ialah uji fermentasi xilosa dan glukosa, uji pati, uji gelatin, uji lipid, dan uji skim. Pembuatan media uji biokimia terlampir pada Lampiran 2.

Tabel 3.2. Format tabel identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

Isolat	Koloni		Spora Seksual	Konidia/Spora
	Bentuk	Warna		

Tabel 3.3. Format tabel identifikasi secara biokimia dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

Isolat	Uji Biokimia					
	Uji Pati	Uji Lipid	Uji Gelatin	Uji Kasein	Uji Fermentasi Glukosa	Uji Fermentasi Xilosa

d. Pembuatan Kurva Tumbuh Jamur Selulolitik

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

Isolat jamur selulolitik ditumbuhkan dalam 25 mL medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Sebelum ditumbuhkan, terlebih dahulu dibuat inokulum dengan cara melarutkan spora jamur dengan menggunakan air fisiologis kemudian digoyangkan hingga semua spora tersuspensi. Inokulum tersebut diencerkan hingga mendapatkan absorbansi 0,5 pada λ 540 nm.

Pada masing-masing media ditambahkan inokulum dan diinkubasi pada suhu ruang sambil digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara mengambil sampel untuk menimbang massa misellium yang terbentuk. Pengukuran berat misellium yang terbentuk pada masing-masing sampel dengan cara menyaring massa misellium dalam 25 mL kultur, lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 100°C selama 1 jam atau hingga diperoleh berat yang konstan. Berat kering misellium dalam 25 mL diperoleh dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Berat kering misellium} = \frac{(\text{berat misellium} + \text{kertas saring}) - \text{berat kertas saring}}{\text{dalam 25 mL}}$$

Data tersebut diplotkan terhadap waktu inkubasi untuk membuat kurva pertumbuhan (Aryani, 2012).

e. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Jamur yang telah diremajakan diinokulasikan ke dalam medium CMC cair dan diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruangan selama 7 hari untuk mengetahui waktu optimum jamur dalam memproduksi ekstrak enzim selulase. Ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan sentrifugasi pada suhu dingin dengan kecepatan 8.400 rpm selama 10 menit. Filtrat dipisahkan dari suspensi jamur dan supernatannya. Supernatan diambil sebagai hasil ekstrak kasar enzim selulase (Jennifer & Thiruneelakandan, 2015).

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

Ekstrak kasar enzim selulase selanjutnya diuji aktivitas enzimnya dengan menggunakan metode DNS.

f. Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Pengujian aktivitas selulase secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan reagen *3,5-dinitrosalisilic acid* (DNS). Metode DNS ini bertujuan untuk menentukan aktivitas enzim Endo-1,4- β -D-glukanase melalui penentuan jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Gula pereduksi yang terbentuk erat kaitannya dengan aktivitas enzim. Semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin banyak pula gula pereduksi yang dihasilkan, itu berarti semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terukur pada spektrofotometer (Miller, 1959). Substrat spesifik yang digunakan adalah *Carboxymethyl cellulose* (CMC).

Kurva standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi glukosa, yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm dengan menggunakan metode DNS, sebanyak 1 mL larutan standar glukosa, masing-masing konsentrasi ditambahkan 3 mL larutan DNS, selanjutnya dikocok hingga homogen dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit, setelah itu didinginkan dalam air es selama 20 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 540 nm. Larutan blanko dibuat dari 200 μ L akuades dan 600 μ L larutan DNS. Setelah data tersebut diperoleh kemudian dibuat kurva standar antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.

3. Pengukuran Parameter

a. Pengukuran Gula Pereduksi dengan Metode DNS

Aktivitas endoglukanase ini diuji dengan mencampurkan 100 μ L enzim dan 100 μ L substrat (CMC 1%), kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Sejumlah gula yang terbentuk diukur aktivitasnya dengan menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

(DNS) yaitu dengan cara menambahkan 600 μL DNS ke dalam tabung, selanjutnya dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit kemudian didinginkan dalam air es selama 20 menit. Proses pemanasan dalam penangas air yang mendidih bertujuan untuk menyempurnakan reaksi dengan DNS sedangkan penggunaan air es yakni bertujuan untuk menghentikan reaksi. Volume total uji aktivitas dengan metode DNS pada penelitian ini sebanyak 800 μL . Banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1 μmol produk per satuan waktu untuk setiap mL enzim (Miller, 1959).

Aktivitas endo-1,4- β -D-glukanase (U/mL) dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{Konsentrasi produk} \times \text{FP} \times 10}{\text{waktu inkubasi} \times \text{BM glukosa}}$$

Keterangan :

Konsentrasi produk = Konsentrasi glukosa = X

FP = Faktor Pengenceran (1)

Waktu Inkubasi = 30 menit

BM (Berat Molekul Glukosa) = 180 Dalton

Tabel 3.4 Format tabel pengujian aktivitas enzim selulase secara kuantitatif dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

No	Isolat	Absorbansi	Aktivitas Enzim	Konsentrasi Produk

b. Penentuan pH optimum

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

Penentuan pH optimum enzim dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim dengan substrat CMC 1% pada suhu ruang (Sari, 2010). Variasi pH diuji pada setiap medium isolat, yaitu pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Aktivitas enzim selulase diukur dengan metode DNS sesuai dengan prosedur sebelumnya (Aryani, 2012).

Analisis data statistik menggunakan program SPSS 22 for Windows. Analisis data yang dilakukan yaitu hasil aktivitas enzim selulase dengan perlakuan perbedaan pH yang dihasilkan oleh jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap *Macrotermes sp.* Analisis statistika yang dilakukan ialah uji normalitas dan uji anova. Uji normalitas merupakan sebuah uji yang dilakukan dengan tujuan untuk menilai sebaran data pada sebuah kelompok data atau variabel, apakah sebaran data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Sedangkan uji anova atau *Analysis of Varian* adalah salah satu [uji komparatif](#) yang digunakan untuk menguji perbedaan mean (rata-rata) data lebih dari dua kelompok.

Tabel 3.5 Format tabel pengujian aktivitas enzim selulase dalam penentuan pH optimum dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

Isolat	pH	Absorbansi	Aktivitas Enzim	Konsentrasi Produk

c. Kadar Protein

Pengukuran kadar protein enzim menggunakan Bovin Serum Albumin (BSA), dilakukan dengan cara menambahkan 0,2 mL ekstrak enzim kasar dengan 1,8 mL reagen biuret, lalu divortex, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Absorbansi larutan sampel protein

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

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. Kurva standar BSA digunakan untuk menentukan kadar protein. Untuk mendapatkan gambar kurva standar BSA digunakan persamaan regresi linier $Y = a + bx$. Variasi konsentrasi BSA yaitu 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, dan 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Waltam, 2009).

4. Uji Aktivitas Enzim Selulase Pada Media Serbuk Jerami Padi

Jerami padi dipilih sebagai substrat alam yang digunakan dalam penelitian ini. Sebanyak 0,05 g serbuk jerami padi ditambahkan 5 ml buffer (dengan menggunakan pH optimum setiap isolat jamur) dan 5 ml enzim ekstrak kasar yang diperoleh dari jamur yang bersumber dari usus rayap dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Setelah itu reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μl NaOH 0,2 M. Lalu suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Sebanyak 2 ml supernatannya diambil dan ditambahkan 2 ml DNS lalu dimasukkan ke dalam penangas air selama 15 menit. Seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi serbuk jerami padi tiap Erlenmeyer adalah 1% (b/v) (Aryani, 2012).

Tabel 3.6 Format tabel pengujian aktivitas enzim selulase pada media serbuk jerami padi dari isolat jamur selulolitik yang berasal dari usus rayap tanah (*Macrotermes sp.*)

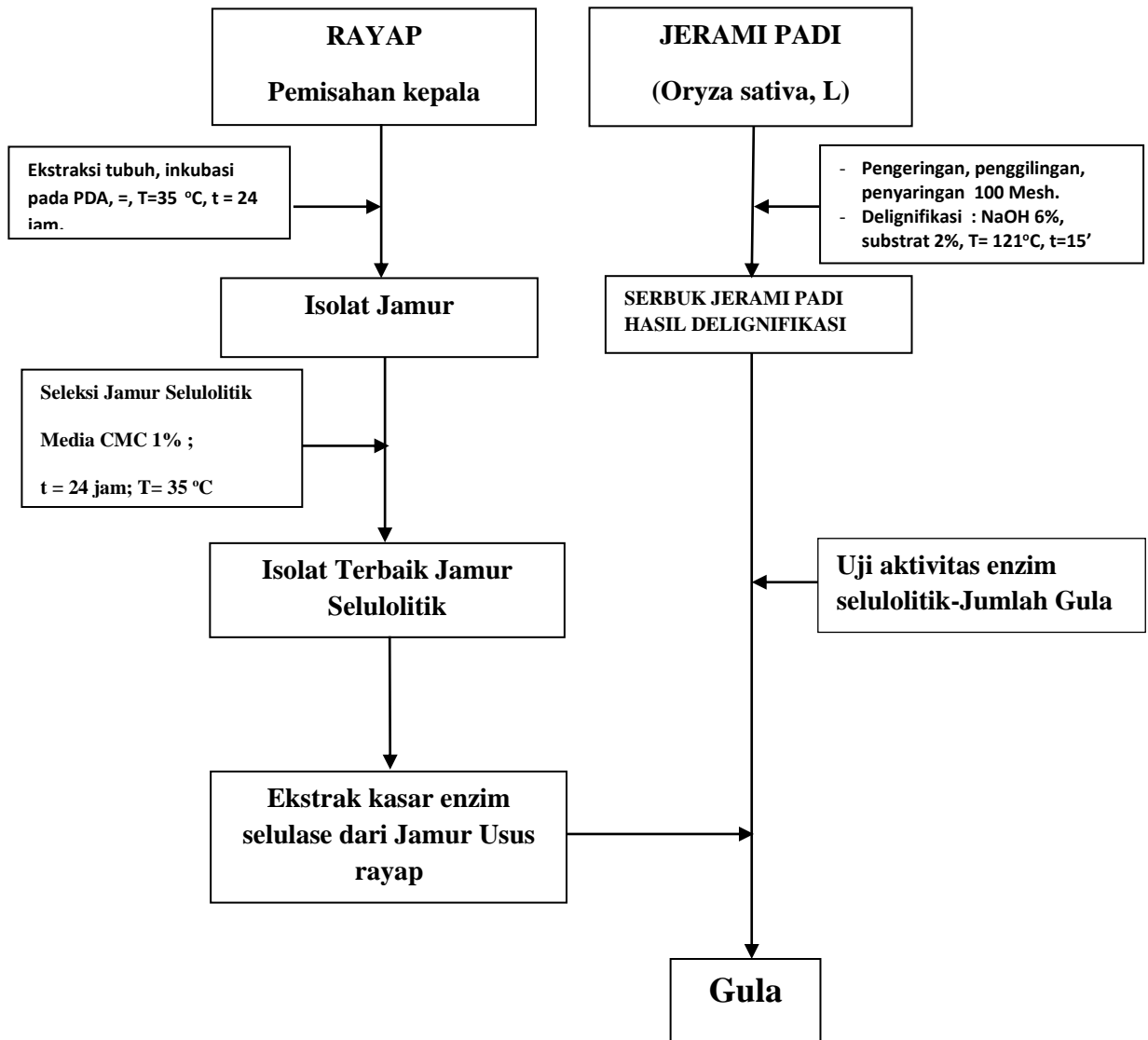
No	Isolat	Absorbansi	Aktivitas Enzim	Konsentrasi Produk

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes sp.*) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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

BAGAN ALIR PENELITIAN



Gambar 3.1. Diagram Alur Penelitian

Desi Sari Fitri, 2017

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR SELULOLITIK PADA USUS RAYAP (*Macrotermes* sp.) DALAM MEDIA SERBUK JERAMI PADI (*Oryza sativa*)

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