

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian Pustaka

Penelitian ini menggunakan metode studi pustaka dalam penulisan skripsi dengan cara mengkaji dan menganalisis hasil penelitian yang terdapat pada artikel jurnal, buku, maupun sumber referensi lain yang mendukung hasil dan pembahasan penelitian. Studi pustaka merupakan istilah lain dari kajian pustaka, tinjauan pustaka kajian teoritis, landasan teori, telaah pustaka (*pustaka review*), dan tinjauan teoritis. Studi pustaka atau studi literatur merupakan suatu proses studi penelitian yang digunakan untuk mengumpulkan informasi maupun data yang berkaitan dengan penelitian seseorang dengan memanfaatkan fasilitas berupa dokumen, buku, artikel, kisah – kisah sejarah, majalah, dan sebagainya. Studi pustaka juga mempelajari dari bermacam – macam referensi hasil penelitian seseorang yang sebelumnya, dengan kriteria yang sejenis serta mendukung untuk mendapatkan landasan teori mengenai permasalahan yang sedang atau akan diteliti. Lebih dari itu, studi pustaka juga mengacu kepada teknik pengumpulan data dengan melibatkan proses penelaahan terhadap buku, artikel, literature, catatan serta laporan lain yang sejenis namun berkaitan dengan penelitian yang akan dilakukan (Mirzaqon & Purwoko, 2017).

Studi pustaka termasuk proses yang sangat penting dalam penelitian. Walaupun sebagian orang membedakan antara riset kepustakaan dan riset lapangan, akan tetapi keduanya memerlukan penelusuran pustaka atau studi literatur. Terdapat perbedaan yang signifikan antara penelitian kepustakaan dengan penelitian lapangan. Setiap penelitian memiliki perbedaan utamanya dalam hal tujuan, fungsi serta kedudukan studi pustaka. Dalam penelitian lapangan, studi pustaka dilakukan sebagai langkah awal untuk mempersiapkan kerangka penelitian sehingga diperoleh informasi penelitian yang berkaitan dengan penelitiannya dan memperdalam kajian teoritis. Berbeda dengan

penelitian pustaka, pelaksanaan studi pustaka lebih konsisten dilakukan tidak hanya diawal saja, hal tersebut dikarenakan agar memperoleh data penelitiannya. Lebih jelasnya, penelitian pustaka terbatas hanya dengan meneelaah sumber-sumber referensi yang berkaitan dengan penelitian tanpa melakukan penelitian di lapangan (Khatibah, 2011). Sumber data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data sekunder. Adapun data sekunder merupakan data yang mengacu pada informasi yang dikumpulkan dari beberapa sumber yang telah ada dan penulis bukan merupakan tangan pertama (Wijoyo, 2011). Sumber data sekunder yang digunakan peneliti antara lain :

1. *Evaluation of different fungi and bacteria strains for production of cellulases by submerged fermentation using sugarcane bagasse as carbon source: Effect of substrate concentration and cultivation temperature* (Laura et al., 2020).
2. *Lignocellulose hydrolytic enzymes production by Aspergillus flavus KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste* (Namnuch et.al., 2019).
3. *Cellulase production by Penicillium funiculosum and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation* (Maeda et.al., 2013).
4. *Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification* (De Cassia Pereira et al., 2015).
5. *Cellulolytic activity of isolated fungi from sugarcane bagasse and decayed wood* (Basso et al., 2010).
6. *Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass degrading enzyme production* (Dos Santos et al., 2015).
7. *Pemindaian Jamur Kontaminan Ampas Tebu untuk Produksi Enzim Selulase* (Zahriadan & Nawfa, 2015).

3.2 Waktu Penelitian Pustaka

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Juli 2021.

3.3 Subjek Penelitian Pustaka

Subjek penelitian pada studi pustaka yang digunakan adalah isolat jamur selulolitik yang diisolasi dari ampas tebu pada media ampas tebu (*Saccharum officinarum*).

3.4 Prosedur Penelitian Pustaka

Penelitian pustaka ini dimulai dengan pencarian sumber data menggunakan aplikasi pencari, diantaranya adalah Google Scholar, Online Willey Library, Springer dan ResearchGate. Penelusuran tersebut menghasilkan sumber data berupa jurnal, artikel dan *e-book*. Hasil penelusuran didapatkan 7 artikel yang berkaitan dengan topik penelitian. Kata kunci yang digunakan untuk pencarian ke empat artikel tersebut yang pertama adalah “*isolation fungi cellulolytic from sugarcane bagasse*” lalu untuk kata kunci lainnya yaitu “*optimization production enzyme cellulase*” atau dengan kata kunci “*production enzyme using sugarcane bagasse*”. Tahap selanjutnya adalah dilakukan kajian pustaka mengenai isolasi dan identifikasi jamur selulolitik yang berasal dari ampas tebu. Setelah itu, dilakukan juga kajian pustaka mengenai optimasi produksi enzim dengan menggunakan substrat ampas tebu dan *pre-treatment* ampas tebu tersebut.

Dari ke tujuh artikel yang telah disebutkan di atas, dilakukan pembagian berdasarkan artikel yang terkait dengan isolasi jamur selulolitik dan penentuan pH dan suhu optimum produksi enzim selulase. Untuk isolasi jamur selulolitik ampas tebu sumber data yang digunakan terdapat 4 artikel sedangkan untuk penentuan pH dan suhu optimum terdapat 3 artikel utama yang digunakan. Sumber data tersebut akan dikelompokkan berdasarkan kriteria berikut ini :

Tabel 3.1 Format Hasil Studi Pustaka Isolat Jamur Selulolitik Ampas Tebu

Sampel	Metode Isolasi	Metode Seleksi	Metode Identifikasi	Isolat	Referensi

Tabel 3.2 Format Hasil Studi Pustaka pH dan Suhu Optimum

Jamur Selulolitik	pH Optimum	Suhu Optimum	Nilai Aktivitas Enzim (IU/mL)	Referensi

3.4.1 Pelaksanaan Studi Pustaka

Terdapat 7 sumber literatur yang digunakan sebagai dasar pengambilan setiap metode penelitian mengenai optimasi produksi enzim selulase menggunakan jamur selulolitik ampas tebu media ampas tebu. Adapun sebagian sumber literatur dari ketujuh sumber literatur tersebut juga dijadikan sebagai data sekunder untuk hasil penelitian.

3.4.1.1 Isolasi Jamur (Zahriadan *et al.*, 2015)

Ampas tebu dibiarkan agar membusuk, lalu jamur kontaminan yang tumbuh di permukaan ampas tebu diambil sampelnya menggunakan penjepit. Sampel yang diambil dimasukkan ke dalam air steril. Kemudian, suspensi sebanyak 2 mL diambil dan dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak 3 kali. Setelah itu, masing – masing suspensi hasil pengenceran bertingkat diinokulasikan ke dalam medium *Potato*

Dextrose Agar (PDA) yang mengandung *chloramphenicol* 2% untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan diinkubasi selama 3-7 hari dalam suhu ruang. Media PDA (*Potato Dextrosa Agar*) dibuat dari 39 gram serbuk PDA dipanaskan dalam 1 liter akuades. Media disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Adapun setelah banyak koloni tumbuh, dilakukan pengamatan dan diinokulasikan kembali ke dalam medium yang berbeda dan diinkubasi selama 3-7 hari dalam suhu ruang sampai tumbuh satu koloni saja (kultur murni). Hasil dari kultur murni diinokulasikan ke dalam medium cair *Potato Dextrose Broth* (PDB).

3.4.1.2 Seleksi Isolat Jamur Selulolitik (Zahriadan *et al.*, 2015)

Untuk menentukan isolat jamur yang berpotensi menghasilkan enzim selulase dilakukan inokulasi dari hasil isolat murni terpilih ke medium *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Media CMC dibuat dengan mencampurkan 0.4 g CMC, 0.5 g MgSO₄.7H₂O, 0.03 g KNO₃, 1.0 g K₂HPO₄, 0.0008 g FeSO₄.7H₂O, 0.08 yeast, 2 gr NaNO₃, 18 g agar dan dilarutkan dalam 1 liter akuades. Setelah diinkubasikan 24 jam pada suhu ruang, isolat kemudian ditetesi larutan merah kongo 0.1% (b/v) dan ditambahkan larutan NaCl 1%. Pengukuran yang dilakukan meliputi diameter koloni dan diameter zona bening. Rasio aktivitas selulolitik ditentukan dari perbandingan diameter zona bening dan diameter koloni.

3.4.1.3 Karakterisasi Isolat Jamur Selulolitik (Dos Santos *et al.*, 2015)

Identifikasi isolat jamur selulolitik dilakukan berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan pengamatan terhadap bentuk dan koloni jamur. Jika sebelumnya isolasi mikroorganisme dalam hal ini jamur dilakukan melalui ekstraksi DNA lalu dilanjutkan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian PCR dan analisis sekuens, maka dapat diidentifikasi dengan cara molekuler. Strain dengan kemiripan kurang dari 97% dari urutan database GenBank dapat diidentifikasi dari struktur morfologi menggunakan mikroskop stereo. Secara makroskopis, aspek yang dapat diamati antara lain : miselium, bentuk koloni, diameter koloni, warna dan permukaan koloni, warna spora, warna miselium dan karakteristik lainnya (Pitt & Hocking, 1997). Untuk pengamatan secara mikroskopis, dilakukan dengan cara biakan murni jamur diambil dan

diletakkan pada *object glass* dan dilakukan pewarnaan menggunakan *lactophenol cotton blue* lalu diamati menggunakan mikroskop. Prosedur ini kemungkinan dapat mengidentifikasi hingga tingkat genus.

3.4.1.4 Pretreatment Ampas Tebu (Oktavia *et al.*, 2014)

Pertama – tama ampas tebu dibersihkan dengan air mengalir agar kotoran yang menempel pada ampas tebu hilang. Lalu, ampas tebu yang telah dibersihkan dijemur hingga kering. Jika telah kering, ampas tebu dipotong-potong ± 2 cm. Langkah selanjutnya adalah menggunakan blender agar ukurannya menjadi serbuk. Selanjutnya, serbuk direndam dalam NaOH 3 M, kemudian dipanaskan dengan menggunakan microwave dalam waktu 40 menit. Serbuk ampas tebu hasil pretreatment tersebut yang akan digunakan dalam proses hidrolisis enzimatik.

3.4.1.5 Pembuatan Kurva Tumbuh Jamur (Rulianah *et al.*, 2017)

Kurva pertumbuhan dibuat untuk menentukan umur optimal isolat jamur pada media aktivasi sebelum ditempatkan pada media fermentasi. Umur optimal ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan berupa hubungan antara waktu (sumbu x) dan berat kering biomassa jamur (sumbu y).

Kurva pertumbuhan dibuat dengan menyiapkan suspensi spora *Phanerochaete chrysosporium*, kemudian menginokulasikan suspensi spora tersebut ke dalam masing-masing erlenmeyer yang diisi dengan 20 erlemeyer Nitrogen Limited Media (NLM). Suspensi yang ditambahkan adalah 10% dari media. Setelah inokulasi, semua labu Erlenmeyer dikultur selama 1 sampai 20 hari. Kemudian dilakukan analisa kualitas sel punca dari masing-masing labu Erlenmeyer, kemudian analisa data untuk membuat kurva pertumbuhan.

3.4.1.6 Produksi Enzim Selulase (Laura *et al.*, 2020)

Untuk produksi enzim, ampas tebu yang digunakan berukuran antara 0,85 dan 2,36 mm (Fernandes, 2007). Selanjutnya ampas tebu dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL larutan garam mineral Mandels dan Weber

(1969) pada pH 5,3. Lalu, labu diautoklaf pada 121°C selama 20 menit dan diinokulasi dengan konsentrasi 10^6 spora/mL. Setelah itu, labu diinkubasi (28, 33 dan 38°C) pada shaker (100 rpm) selama 72 jam. Ketika akhir fermentasi, media disaring serta filtratnya digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

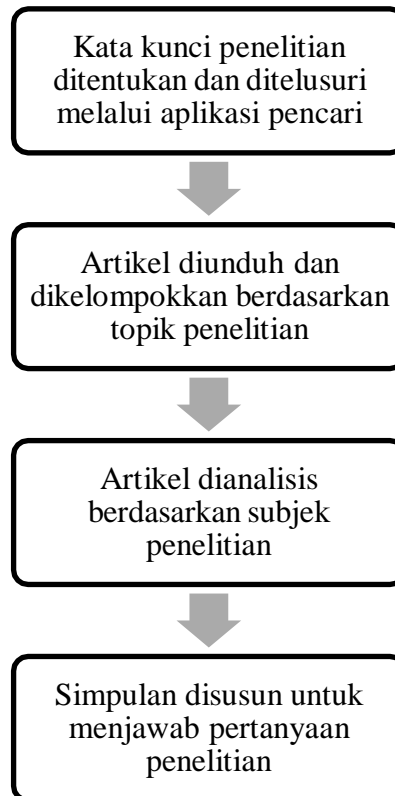
3.4.1.7 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase Kasar (Rosyida *et al.*, 2018)

Metode 3,5 asam dinitrosalisilat (DNS) digunakan untuk menghitung aktivitas selulase untuk mengukur glukosa yang dihasilkan oleh selulase mentah yang menghidrolisis selulosa (Miller 1976, Irfan *et al.* 2010). Substrat selulosa yang digunakan untuk menentukan aktivitas selulase kasar ini adalah CMC. Cara menentukan aktivitas selulase kasar adalah sebagai berikut: ambil 1,5 mL masing-masing enzim yang dihasilkan dan masukkan ke dalam tabung mikro, kemudian sentrifus sampel dengan sentrifus P selecta BL II pada suhu 4°C dan 10.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya diambil 0,5 mL supernatan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup, ditambahkan 0,5 mL substrat CMC 1%, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Selanjutnya, tambahkan 3ml DNS dan panaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setiap larutan pada tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis Dynamica Holo RB-10 pada panjang gelombang 550 nm. Perhitungan untuk mendapatkan aktivitas volum enzim CMC-ase didasarkan pada 1 μ -mol glukosa = 0.18 mg dan 1 unit aktivivtas CMC-ase setara dengan 1 μ -mol glukosa yang dihasilkan permenit. Jika inkubasi dilakukan selama 30 menit maka 1 mg glukosa yang dihasilkan per mL adalah $1(30 \times 0.18)$ unit = 0.185 unit, sehingga:

$$\text{Satu Unit Aktivitas Volum Enzim CMC-ase (U/ mL)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0.185}{\text{ml}}$$

3.5 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil kajian pustaka tersebut lalu dilakukan analisis dan dideskripsikan mengenai optimasi produksi enzim selulase khususnya dengan menggunakan jamur selulolitik untuk menghasilkan enzim dengan jumlah yang tinggi.



Gambar 2.13 Alur Studi Pustaka Optimasi Produksi Enzim Selulase oleh Jamur Selulolitik Ampas Tebu (*Saccharum officinarum*)