

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah variasi suhu yang terdiri dari tiga taraf yaitu 40°C, 50°C, dan 60°C. Faktor kedua adalah variasi pH yang terdiri dari tiga taraf yaitu 4, 5, dan 6. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2014, di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari 2 macam yaitu variable bebas dan variable terikat

3.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan suhu (40°C, 50°C, 60°C) dan perlakuan pH (4, 5, 6).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang diukur berupa nilai aktivitas enzim selulase pada media CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*).

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: oven, ayakan 60 mesh, timbangan analitik, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), spektrofotometer, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge*, *hot plate*, autoklaf, *water bath*, kertas saring, pH meter, vortex, mikropipet, mikro tip, pipet ukur, gelas ukur, gelas beker, labu erlenmeyer, tabung reaksi, *magnetic stirrer*, spatula, jarum ose, dan bunsen.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kapang *Trichoderma sp.* *Gliocladium sp* dan *Botrytis sp.* yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, kulit pisang yang didapatkan dari pabrik kripik pisang “Barokah” di Pasuruan, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , MnSO_4 , *Yeast extract*, PDA (*Potato Dextrose Agar*), CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), aquades, larutan 0,1% *tween* 80, larutan TCA (*Trichloro Acetic Acid*), larutan NaOH 6%, HCl 0,1 M, reagen Nelson, phenol, Na_2SO_3 , arsenomolibdat, aluminium foil, dan alkohol 70 %.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media PDA

Pembuatan media PDA dilakukan dengan cara mencampurkan PDA sebanyak 2,4 gr kedalam 60 ml aquades. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Larutan PDA dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 atm.

3.5.2 Pengembangbiakan Kapang

Pengembangbiakan kapang *Trichoderma* sp. dilakukan pada media PDA miring dengan bantuan kawat ose dan api bunsen di dalam LAF. Biakan kapang *Trichoderma* sp. diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari (Sutarno, 2013). Sedangkan kapang *Gliocladium* sp. dan *Botrytis* sp. diinkubasi selama 7 hari.

3.5.3 Persiapan Bahan Baku

Bahan baku berupa kulit pisang sebanyak 3 kg dikecilkan ukurannya dengan dipotong-potong dan dikeringkan didalam oven dengan suhu 100°C selama 6 jam. Setelah kering kulit pisang dihancurkan dengan alat penggiling hingga menjadi bubuk dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Hasil ayakan digunakan sebagai bahan baku substrat.

3.5.4 Delignifikasi Sampel

Tahap ini dilakukan untuk menghasilkan selulosa kulit pisang dengan kadar lignin yang rendah. Proses delignifikasi dilakukan dengan cara merendam bubuk kulit pisang sebanyak 100 g dalam larutan NaOH 6% pada gelas beker dengan perbandingan 1 : 15 (serbuk kulit pisang : larutan NaOH) selama 12 jam pada suhu kamar (Suparyana, 2010). Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dengan dicuci menggunakan aquades sampai pH netral (7) dan dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C selama 6 jam (Sukardati, 2010).

3.5.5 Pembuatan Media Pertumbuhan (Larutan Nutrisi)

Media pertumbuhan merupakan larutan nutrisi yang berfungsi untuk menyediakan unsur-unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba agar dapat meningkatkan produksi enzim. Komponen media pertumbuhan terdiri dari:

Tabel 1. Komposisi Media Pertumbuhan

Komponen	Komposisi gram/liter aquades
<i>Yeast Ekstrak</i>	2
KH_2PO_4	1.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2

Sumber: (I-Son, 2010).

Semua komponen media pertumbuhan diaduk di dalam gelas beker menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 15 psi.

3.5.6 Pembuatan Media Inokulum

Substrat yang telah digiling halus ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian ditambahkan 100 ml larutan nutrisi. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan.

3.5.7 Produksi Enzim Selulase dari Media Kulit Pisang

Masing-masing spora biakan murni *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., dan *Botrytis* sp. dari media agar miring disuspensikan dalam 10 mL larutan 0,1% *tween* 80, dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi. Kemudian tabung *divortex* untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan

suspensi yang homogen. Suspensi dari kapang *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., dan *Botrytis* sp. masing-masing diambil sebanyak 10 ml dan diinokulasikan ke dalam media inokulum (substrat + larutan nutrisi) yang telah disterilkan secara terpisah, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari untuk *Trichoderma* sp. (Sutarno, 2013), sedangkan *Gliocladium* sp. dan *Botrytis* sp. diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari.

3.5.8 Pemanenan Enzim Selulase

Enzim yang dihasilkan dari fermentasi dipanen dengan cara menambahkan 100 ml larutan 0,1% *tween* 80, di *shaker* pada 150 rpm selama 120 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak enzim kasar yang digunakan dalam uji aktivitas selulase (Szendefy, 2006). Supernatan hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C (Anggrawati, 2012).

3.5.9 Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi

Kurva standar glukosa dibuat dengan membuat larutan stok glukosa standart 100 ppm (10 mg glukosa/100 ml aquades). Kemudian diencerkan hingga didapatkan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dari larutan stok. Masing-masing konsentrasi larutan glukosa diambil 1 ml, lalu ditambahkan 1 ml reagen Nelson, kemudian dididihkan selama 20 menit, dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya campuran tersebut ditambah dengan 7 ml aquades kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Saropah, 2012).

3.5.10 Uji Aktivitas Selulase

Pada metode ini CMC digunakan sebagai substrat. Sebanyak 1 ml CMC 1% ditambah 1 ml campuran enzim kasar dari *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., dan *Botrytis* sp. kemudian dihomogenkan dan diinkubasi sesuai dengan variasi suhu dan pH yang telah ditetapkan selama 30 menit. Variasi suhu yang ditetapkan adalah 40°C, 50°C dan 60°C. Sedangkan variasi pH yang ditetapkan adalah 4, 5 dan 6. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml TCA. Suspensi yang diperoleh dihomogenkan kemudian diambil 1 ml dan ditambah 1 ml reagen Nelson, selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang, setelah dingin ditambah 1 ml arsenomolibdat kemudian dihomogenkan. Selanjutnya campuran tersebut ditambah dengan 7 ml aquades kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Saropah, 2012). Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama pada pengujian sampel. Kontrol merupakan enzim yang telah diinaktivasi terlebih dahulu kemudian direaksikan dengan substrat, sedangkan blanko tidak menggunakan enzim melainkan menggunakan akuades (Anggrawati, 2012).

Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan *International Unit* (IU).

Aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan rumus (Anggrawati, 2012):

$$\text{Aktivitas selulase (U/ml)} = \text{konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{v \times t \times BM}$$

Absorbansi glukosa sampel : $[(As - Ab) - (Ak - Ab)]$

Keterangan : As = Absorbansi sampel

Ab = Absorbansi blanko

A_k = Absorbansi kontrol

t = waktu inkubasi

V = volume enzim

BM = berat molekul glukosa ($C_6H_{12}O_6$) = 180

Dari rumus absorbansi glukosa sampel, kemudian dimasukkan kedalam persamaan yang didapatkan dari kurva standar glukosa untuk mendapatkan konsentrasi glukosa sampel.

3.6 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap besarnya nilai aktivitas selulase, digunakan rancangan penelitian berupa rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial. Data pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas selulase dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Test* (DMRT).