

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. TEMPAT DAN WAKTU

Tempat : Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.

Waktu : Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Mei 1997

B. BAHAN DAN ALAT

Alat : Blender, erlenmeyer 100 ml, pipet, tabung reaksi, beker glass, gelas ukur, timbangan, spectrofotometer (Spectronic 20), sentrifus 5000 rpm, corong kaca, kertas Whatman 42, kapas, "water bath shaker", es batu, inkubator, mikroskop.

Bahan : Biakan *Aspergillus sp.* DUCC M-001, Jerami, Bekatul, Medium Tauge Agar, Medium Czapek Agar, Akuades, Glukosa, NaOH, Na K Tartrat, Na Sitrat, Asam Sitrat, Carboxy Methyl Cellulosa (CMC), Merthiolat, Asam Dinitrosalisilat (DNS), HCl.

C. CARA KERJA

1. Persiapan Inokulum

Dipersiapkan medium Tauge Agar miring (Lampiran 06.5), lalu diinokulasi dengan biakan *Aspergillus sp.* DUCC M-001 dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Ke dalam biakan ditambah akuades steril dan digojog hati-hati untuk mendapatkan suspensi spora dengan OD 0,5 pada panjang gelombang 620 nm yang menghasilkan kerapatan konidia $6,23 \times 10^6$ /ml. Suspensi spora ini digunakan sebagai inokulum (Soekadkk., 1991).

2. Penyediaan Substrat dan Inokulasi

Jerami kering dipotong-potong 1 cm, lalu dihaluskan dengan blender. Sebagai media digunakan campuran jerami dan bekatul dengan perbandingan :

- S1 = 100 % jerami : 0 % bekatul
- S2 = 80 % jerami : 20 % bekatul
- S3 = 60 % jerami : 40 % bekatul
- S4 = 40 % jerami : 60 % bekatul
- S5 = 20 % jerami : 80 % bekatul
- S6 = 0 % jerami : 100 % bekatul

Sebanyak 10 gram media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml dan ditambah aquades sebanyak 74 % v/w. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , selama 15 menit. Setelah dingin, pH media dibuat 5 dengan menambahkan HCl 0,1N. Ke

dalam tiap media diberi inokulum suspensi spora sebanyak 2,3 % v/w (Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991), lalu diinkubasi selama 7 dan 9 hari pada suhu kamar. Tiap perlakuan dibuat 3 ulangan.

3. Pengamatan Pertumbuhan

Pertumbuhan kapang ditentukan secara visual (kualitatif) dengan pemberian skor terhadap pertumbuhan miselium pada media.

Skor 4 : tumbuh sangat baik, jika miselium tumbuh menutupi seluruh permukaan media, dan spora sangat banyak.

skor 3 : tumbuh baik, jika miselium tumbuh menutupi \pm $\frac{3}{4}$ permukaan media, spora banyak.

Skor 2 : tumbuh cukup baik, jika miselium tumbuh menutupi \pm $\frac{1}{2}$ permukaan media, spora cukup banyak.

Skor 1 : tumbuh kurang baik, jika miselium tumbuh \pm $\frac{1}{4}$ permukaan media, spora tidak banyak.

(Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991).

4. Ekstraksi Enzim Selulase

Kultur yang telah ditumbuhi miselium ditambah aquades steril sebanyak 50 ml, lalu dikocok dalam water bath yang didinginkan dengan es (suhu \pm 10°C) dalam kecepatan 120

hentakan per menit selama 2 jam. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, lalu disaring dengan kertas Whatman no 42 dan filtrat yang didapat diambil untuk dianalisis aktivitas enzimnya (Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991).

5. Penentuan Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase ditentukan berdasarkan aktivitasnya. Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur jumlah gula pereduksi menurut Mandels (1974) dengan menggunakan larutan Carboxy Methyl Cellulosa (CMC) 1 % (Lampiran 06.3) sebagai substrat dalam buffer sitrat PH 4,8 (Lampiran 06.2). Gula pereduksi yang dihasilkan dihitung sebagai glukosa dengan metode DNS (Macris, 1984). Ke dalam 0,5 ml larutan enzim ditambahkan 0,5 ml larutan CMC, diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml pereaksi DNS (Lampiran 06.4) dan dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih dan segera didinginkan. Selanjutnya ditambah 8 ml akuades dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mg/ml (Lampiran 06.1). Satu unit aktivitas enzim selulase setara dengan jumlah enzim selulase yang dapat menghasilkan 1 mikro mol glukosa dari larutan CMC selama 1 menit (Rahman, 1992).

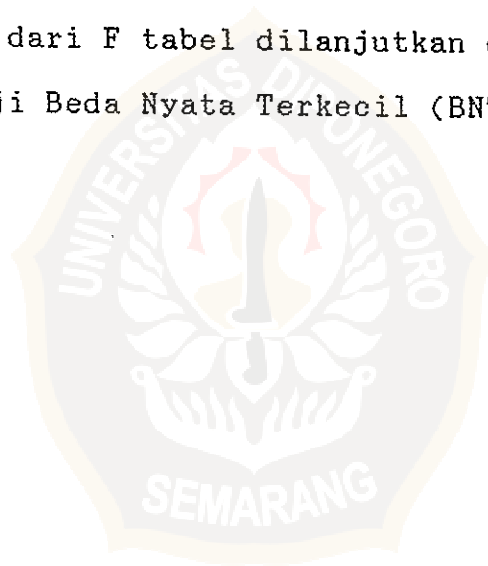
D. PARAMETER

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Pertumbuhan kapang
2. Aktivitas enzim selulase

E. ANALISIS DATA

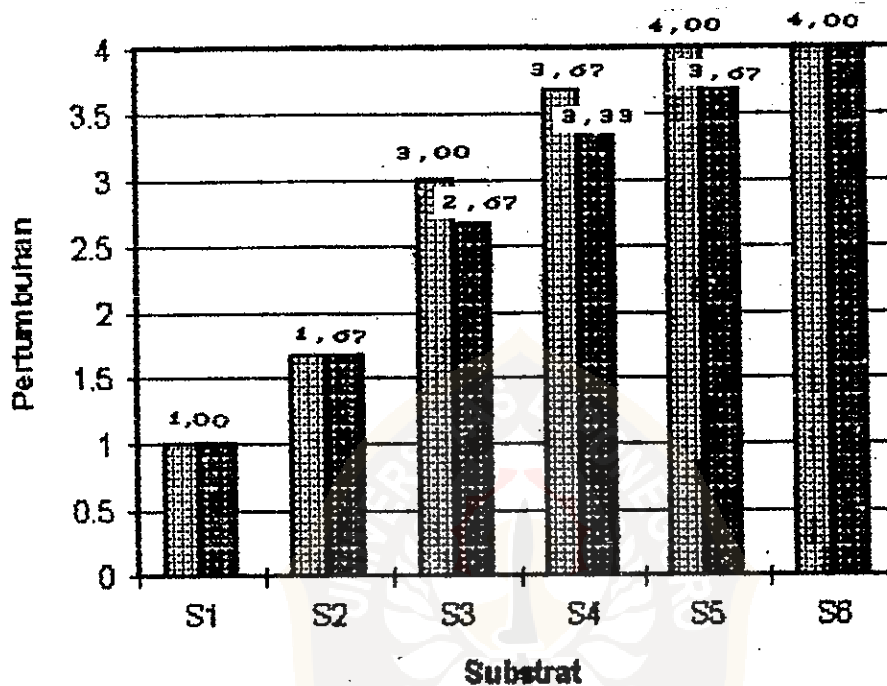
Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 2 faktor yaitu substrat (6 variasi) dan waktu inkubasi (2 variasi). Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam atau ANOVA dengan tingkat kesalahan 5 % . Jika F hitung lebih besar dari F tabel dilanjutkan dengan uji beda rata-rata dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada $\alpha = 5 \%$.



V. HASIL

A. Pertumbuhan *Aspergillus sp.* DUCC M-001

Hasil rata-rata pertumbuhan kapang *Aspergillus sp.* DUCC M-001 dalam histogram terlihat pada Gambar 04 di bawah ini.



Keterangan: S1 : Jerami 100 %
S2 : Jerami 80 % : bekatul 20 %
S3 : Jerami 60 % : bekatul 40 %
S4 : Jerami 40 % : bekatul 60 %
S5 : Jerami 20 % : bekatul 80 %
S6 : Bekatul 100 %

□ : Waktu inkubasi 7 hari
■ : Waktu inkubasi 9 hari

Gambar 04. Histogram pengaruh komposisi substrat dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *Aspergillus sp.* DUCC M-001

Hasil perhitungan analisis sidik ragam dari pengaruh komposisi campuran jerami dan bekatul dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan kapang *Aspergillus sp.* DUCC M-001 terlihat pada Tabel 03.

Tabel 03. Hasil analisis sidik ragam pengaruh komposisi campuran jerami dan bekatul dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan *Aspergillus*

SK	DB	JK	KT	FH	F Tab. 5 %
Perlakuan	11	45,64	4,15	25,93*	2,25
Substrat	5	45,14	9,028	56,42*	2,62
Waktu	1	0,25	0,25	1,51	4,26
S X W	5	0,25	0,05	0,31	2,62
Galat	24	4,00	0,16		
Total	35	49,64			

Keterangan : * F hitung lebih besar dari F tabel 5 %

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan adanya perbedaan nyata pertumbuhan kapang karena perlakuan komposisi substrat, sedangkan lama waktu inkubasi tidak menyebabkan perbedaan yang nyata. Antara perlakuan substrat dan waktu inkubasi tidak ada interaksi, yang berarti pengaruh substrat dan waktu inkubasi saling bebas.

Hasil uji beda rata-rata pertumbuhan *Aspergillus* dengan uji Beda Nyata Terkecil terlihat pada Tabel 04.

Tabel 04. Hasil uji BNT terhadap rata-rata pertumbuhan *Aspergillus sp.* DUCC M-001.

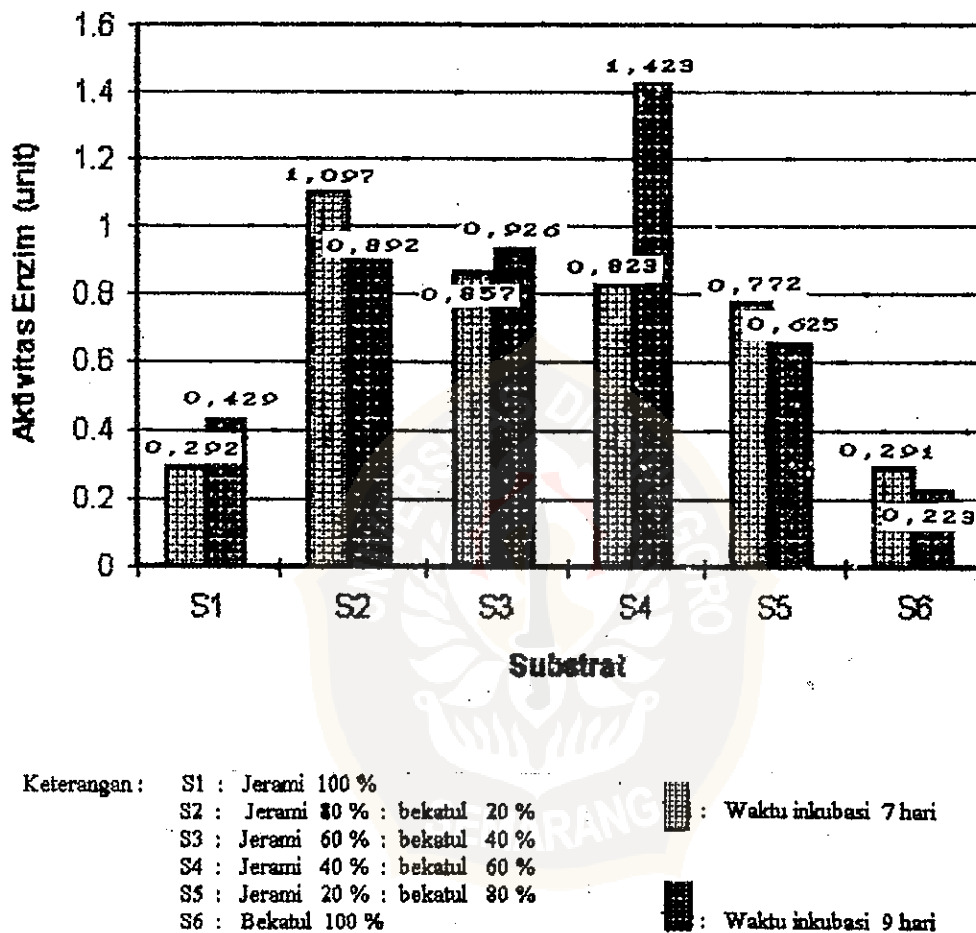
Jenis substrat	rerata pertumbuhan pada waktu inkubasi		rerata pengaruh substrat
	W1	W2	
S1	1,00	1,00	1,00 a
S2	1,67	1,67	1,67 a
S3	3,00	2,67	2,83 b
S4	3,67	3,33	3,50 bc
S5	4,00	3,67	3,83 c
S6	4,00	4,00	4,00 c
rerata pengaruh waktu	2,89 a	2,72 a	

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % dengan uji BNT.

Dari Tabel 04 di atas dapat diketahui bahwa pertumbuhan tertinggi terdapat pada perlakuan substrat S6, yang tidak berbeda nyata dengan S5 dan S4, dan berbeda nyata dengan S1, S2 dan S3. Pertumbuhan terendah terlihat pada S1 yang tidak berbeda nyata dengan S2.

B. Aktivitas Enzim selulase

Hasil rata-rata aktivitas enzim selulase dalam histogram terlihat pada Gambar 05.



Gambar 05. Histogram pengaruh substrat dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase.

Hasil perhitungan analisis sidik ragam pengaruh komposisi substrat dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase terlihat pada Tabel 05.

Tabel 05. Hasil analisis sidik ragam pengaruh komposisi substrat dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase

SK	DB	JK	KT	FH	F tab. 5 %
Perlakuan	11	4,333	0,3939	3,88*	2,25
Subsrat	5	3,666	7,33	7,23*	2,62
Waktu	1	0,0426	0,0426	0,42	4,26
S X W	5	0,624	0,1248	1,23	2,62
Galat	24	2,434	0,1014		
Total	35	6,767			

Keterangan : * F hitung lebih besar dari F tabel 5 %

Hasil di atas menunjukkan bahwa perbedaan nyata aktivitas enzim selulase, karena pengaruh perlakuan substrat, sedangkan lama inkubasi tidak menyebabkan perbedaan yang nyata. Antara perlakuan substrat dan waktu inkubasi tidak ada interaksi.

Hasil uji lanjut terhadap rata-rata aktivitas enzim dengan uji BNT terlihat pada Tabel 06. berikut ini.

Tabel 06. Hasil uji BNT terhadap rata-rata aktivitas enzim selulase (unit/ml/menit)

Jenis substrat	Aktivitas Enzim pada pada waktu inkubasi		rerata pengaruh substrat
	W1	W2	
S1	0,292	0,429	0,3605 ab
S2	1,097	0,892	0,9945 c
S3	0,857	0,926	0,8915 c
S4	0,823	1,423	1,1230 c
S5	0,772	0,652	0,7120 abc
S6	0,291	0,223	0,2570 a
rerata pengaruh waktu	0,6687 a	0,7575 a	

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % dengan BNT.

Dari Tabel 06. di atas terlihat bahwa aktivitas enzim selulase tertinggi dihasilkan pada perlakuan S4 yang tidak berbeda nyata dengan S2, S3, dan S5, tetapi berbeda nyata dengan S1 dan S6. Aktivitas terendah dihasilkan pada S6 dan tidak berbea nyata dengan S1 dan S5.