IV. METODOLOGI PENELITIAN

1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Nopember 1999.

2. Alat dan Bahan

2.1. Alat : kertas pH, autoklaf, *shaker*, sentrifuge, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, *slide micrometer*, hemositometer, *water bath*, mikroskop, pipet ukur, labu ukur, kertas Whatman no. 42, corong.

2.2. Bahan : jerami, bekatul, isolat kapang *A. niger* berasal dari gambut di Pontianak, Kalimantan Barat yang merupakan koleksi dari laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

3. Cara Kerja

3.1. Identifikasi Kapang

Pada gelas benda diteteskan 1-2 tetes larutan laktophenol. Sedikit miselium biakan kapang diambil dengan menggunakan jarum ose diletakkan pada gelas benda yang telah ditetesi larutan laktophenol. Miselium diratakan dengan menggunakan jarum ose supaya kelihatan terpisah satu sama lain, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

3.2. Medium PDA (*Potato Dextrosa Agar*)

Tiga puluh sembilan gram PDA dilarutkan dengan 1 lt akuades, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3. Persiapan Inokulum

Ke dalam medium PDA miring diinokulasikan biakan *A. niger* dan diinkubasikan selama 3 hari pada suhu kamar. Ke dalam biakan yang telah ditumbuhi miselium berkonidia ditambahkan akuades steril dan digojog dengan hati-hati untuk mendapatkan suspensi konidia dengan *optical density* (OD) 0,5 pada panjang gelombang 620 nm, kemudian dihitung dengan hemositometer, sehingga didapatkan kerapatan konidia 6,25 x 10^6/ml. Suspensi konidia ini digunakan sebagai inokulum (Wirahadikusumah dan Rahwono, 1990).

3.4. Medium Fermentasi

Jerami kering dipotong-potong 1 cm dan dihaluskan dengan blender. Sebagai media digunakan campuran jerami dan bekatul dengan perbandingan 6 gram jerami dan 4 gram bekatul untuk tiap media uji. Campuran bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, lalu ditambahkan larutan buffer sitrat dengan pH 3, 4, 5, 6 dan 7 sebanyak 74 % v/w untuk masing-masing perlakuan, yaitu 5 perlakuan pH dengan 3 kali ulangan. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah dingin, ke dalam media diinokulasikan suspensi konidia sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasikan selama 7 hari pada suhu kamar (Soeka, Djajasukma dan Sastraatmadja, 1991).

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

3.5. Pengamatan Pertumbuhan

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

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

Skor 3 : tumbuh baik, jika miselium tumbuh menutupi ± ¾ permukaan media dan konidia banyak.

Skor 2 : tumbuh cukup baik, jika miselium tumbuh menutupi ± ½ permukaan media dan konidia cukup banyak.

Skor 1 : tumbuh kurang baik, jika miselium tumbuh menutupi ± ¼ permukaan media dan konidia tidak banyak (Saskiawan dan Sastratmadja, 1991).

3.6. Ekstraksi Enzim

Kultur yang telah ditumbuhi miselium berkonidia ditambah buffer sitrat sebanyak 50 ml, dikocok dalam *water bath* yang didinginkan dengan es (suhu 10°C) dengan kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, lalu disaring dengan kertas Whatman 42, filtrat yang didapat dianalisis aktivitas enzimnya (Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991).

3.7. Penentuan Aktivitas Selulase

Filtrat yang didapat ditentukan kandungan gula tereduksinya yang disimpulkan sebagai glukosa dengan metode DNS. Ke dalam 0,5 ml larutan enzim ditambahkan 0,5 ml larutan CMC, diinkubasikan pada suhu 50°C selama 30 menit. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml pereaksi DNS dan dipanaskan selama 15

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

menit dalam air mendidih dan segera didinginkan. Selanjutnya ditambahkan 8 ml akuades dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kandungan gula tereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml. Satu unit aktivitas selulase sama dengan jumlah selulase yang dapat menghasilkan 1 mikromol glukosa dari larutan CMC selama 1 menit, dinyatakan dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Enzim (unit/ml filtrat/menit)} = \frac{(\text{mg glukosa} \times 1000 \times 2)}{(\text{BM glukosa} \times 30)}$$

(Rahman, 1992)

3.8. Penentuan Kadar Protein

Larutan enzim hasil ekstraksi enzim ditentukan kadar proteinnya dengan menggunakan metode Lowry-Folin. Ke dalam 1 ml larutan enzim ditambahkan 1 ml Reagen D, segera digojog dan diinkubasikan pada suhu kamar selama15 menit. Setelah masa inkubasi selesai, kemudian ditambahkan 3 ml Reagen E ke dalam larutan tersebut, segera digojog dan diinkubasikan dalam suhu kamar selama 45 menit, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kandungan protein ditentukan berdasarkan kurva standar protein dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 mg protein/ml (Sudarmadji dan Suhardi, 1992).

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

4. Penentuan Aktivitas Spesifik Selulase

Aktivitas spesifik selulase menurut Wirahadikusumah dan Rahwono (1990), dinyatakan dengan rumus :

$$\text{Aktivitas spesifik (unit/mg protein)} = \frac{\text{Aktivitas selulase (unit/ml/menit)}}{\text{Kadar Protein (mg/ml)}}$$

5. Parameter

a. Pertumbuhan kapang *A. niger*

b. Produksi selulase

6. Model Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan model Rancangan Acak Lengkap dengan menggunakan perlakuan tingkatan pH (pH 3, 4, 5, 6 dan pH 7) dan masing-masing dengan tiga kali ulangan.

7. Analisis Data

Data diuji homogenitas dan normalitasnya, bila data homogen dan normal, dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dilanjutkan denga uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Bila uji homogenitas menunjukkan data tidak homogen maka sebelum dilanjutkan uji berikutnya, dilakukan koreksi dengan menggunakan faktor koreksi K menurut Barlett, sedangkan untuk uji normalitas yang menunjukkan data tidak normal, maka keseluruhan data ditransformasi, bisa menggunakan transformasi ke akarnya, ke arcus sinus atau transformasi logaritma (Gomez and Gomez, 1985). Apabila data tetap tidak normal dan homogen, data dianalisis dengan Analisis Non Parametrik uji Wilcoxon pada α 1 % (Daniel, 1991).

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)