

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni 2011 sampai Januari 2012 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi FMIPA Unila.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : botol selai, erlenmeyer, gelas beker, batang pengduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet, pipet tips, mikrotub, lampu spiritus, jarum ose, neraca analitik, inkubator kapang, autoklaf, *laminar air flow*, *orbital shaker*, *water bath shaker*, *sentrifuge*, *spektrofotometer*, *vortex mixer*, oven, kertas saring, corong, dan kompor listrik.

##### **2. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu bagas dari PT. GMP, Gunung Sugih, Lampung Tengah, jerami padi, rumput gajah, isolat *Aspergillus* spp.1, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , aquades, CMC (*Carboxymethyl Cellulose*), larutan buffer sitrat pH 4, DNS (3,5-*dinitrosalicylic acid*), alkohol 70%, dan spiritus.

### **C. Metode Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dalam skala laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga kali ulangan. Perlakuan yang diberikan pada media fermentasi yaitu kadar urea sebesar 0% (w/v), 0,03% (w/v), 0,06% (w/v), 0,09% (w/v), dan 0,12% (w/v).

Parameter utama yang diukur yaitu persentase pengurangan berat kering bagas dan parameter pendukung yaitu aktivitas *filter paperase* (FP-ase) dan degradasi berbagai substrat terhadap gula pereduksi yang dihasilkan.

Persentase pengurangan berat kering bagas ditentukan menggunakan metode pengeringan dalam oven. Untuk aktivitas FP-ase dan degradasi berbagai substrat terhadap gula pereduksi yang dihasilkan ditentukan berdasarkan kadar glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik substrat dengan ekstrak kasar enzim.

### **D. Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis ragam dan jika di antara perlakuan berbeda nyata pada taraf 5%, maka analisis dilanjutkan dengan polinomial orthogonal.

### **E. Pelaksanaan penelitian**

#### **1. Pembuatan Media Fermentasi**

Bagas ditimbang sebanyak 1,35 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam botol selai dan ditambahkan larutan media sebanyak 45 ml per botol dengan komposisi sebagai berikut :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L dan  $\text{FeSO}_4$  0,005 g/L

(Ahamed dan Vermette, 2008). Setelah itu, urea ditambahkan ke dalam media masing-masing dengan kadar 0,03% (w/v), 0,06% (w/v), 0,09% (w/v), dan 0,12% (w/v). Sebagai kontrol digunakan media dengan kadar urea yang sama tapi tidak diberi isolat. Selanjutnya, media disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C dan tekanan 2 atm.

## 2. Inokulasi

Masing-masing isolat *Aspergillus* spp.1 diremajakan pada media PDA miring dalam tabung reaksi selama 3 hari. Kemudian larutan garam fisiologis 0,9% (w/v) dituangkan ke dalam tabung reaksi dan dilakukan pemisahan spora dari media agar menggunakan vortex mixer hingga spora terlepas. Sebanyak 1,8 ml suspensi spora diinokulasikan pada media fermentasi dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang dengan *orbital shaker* (Purwadaria, 2003).

## 3. Persentase Pengurangan Berat Kering

Kertas saring ditimbang (A gram). Bagas yang telah difermentasi ditempatkan pada kertas saring. Kemudian dikeringkan dalam oven 55°C sampai beratnya konstan. Kertas saring dan bagas yang telah dikeringkan ditimbang (B gram). Berat kering merupakan selisih berat B-A. Persentase pengurangan berat kering ditentukan dengan rumus :

$$\% P = \frac{R - r_1}{R} \times 100\%$$

Keterangan :  $W_k$  = Rata-rata berat kering bagas kontrol

$W_{bf}$  = Berat kering bagas yang difermentasi

#### 4. Pengukuran Aktivitas FP-ase

Sebanyak 50 mg substrat kertas saring dipotong-potong dengan ukuran  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ . Lalu, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,8 ml buffer sitrat pH 4 dan 0,2 ml ekstrak kasar enzim. Kemudian larutan tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada *water bath* dengan suhu  $40^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan 2 ml pereaksi DNS. Setelah itu, dihomogenkan, dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, dan direndam dalam air es selama 20 menit.

Masing-masing larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Miller, 1959). Kadar glukosa ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Satu unit aktivitas FP-ase didefinisikan sebagai jumlah  $\mu\text{mol}$  glukosa yang dihasilkan per menit untuk setiap ml enzim pada kondisi pengujian.

#### 5. Pengukuran Degradasi Berbagai Substrat Berdasarkan Kadar Gula Pereduksi yang Dihasilkan

Substrat produksi yang digunakan pada uji ini terdiri dari 2 macam yaitu CMC 1% (w/v) dan bagas 3% (w/v). Larutan media per botol selai dibuat sebanyak 45 ml dengan dengan komposisi sebagai berikut :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0,005 g/L dan urea 0,03% (w/v). Uji degradasi berbagai substrat dilakukan dengan cara yaitu sebanyak 50 mg substrat

jerami padi, bagas, rumput gajah, dan larutan CMC 0,5% (w/v) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,8 ml buffer sitrat pH 4 dan 0,2 ml ekstrak kasar enzim. Kemudian larutan tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 60 menit pada *water bath* dengan suhu 40°C lalu ditambahkan 2 ml pereaksi DNS. Setelah itu, dihomogenkan, dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, dan direndam dalam air es selama 20 menit.

Masing-masing larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Miller, 1959). Kadar gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

#### **6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Uji Aktivitas FPase**

Larutan gula reduksi glukosa merupakan larutan gula standar yang digunakan pada interval 0-160 µg/ml yaitu 0 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg, 120 µg, 140 µg, dan 160 µg masing-masing larutan diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml larutan buffer sitrat dan 50 mg kertas saring sebagai substrat dan 2 ml pereaksi DNS. Dihomogenkan dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan dengan merendamnya kedalam air es selama 20 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).

**7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Uji Degradasi Berbagai Subtrat Berdasarkan Gula pereduksi yang dihasilkan.**

Larutan gula standar yang digunakan pada interval 0-1000  $\mu\text{g/ml}$  yaitu 0  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$ , 400  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{g}$ , 600  $\mu\text{g}$ , 700  $\mu\text{g}$ , 800  $\mu\text{g}$ , 800  $\mu\text{g}$ , 900  $\mu\text{g}$ , dan 1000  $\mu\text{g}$ . Masing-masing larutan diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml larutan buffer sitrat pH 4 dan 2 ml pereaksi DNS. Dihomogenkan dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan dengan merendamnya kedalam air es selama 20 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).