

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya mulai tanggal 21 Januari 2015 sampai 12 Oktober 2015.

3.2 Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan yaitu autoklaf, oven, spektrofotometer, *Laminar Air Flow* (LAF), *water bath*, neraca analitik, desikator, *stirrer*, mikropipet, tic mikropipet, pH-meter, *beaker glass* 250 ml dan 500 ml, gelas ukur, erlenmeyer, *bottle jar* diameter 8 cm, corong, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi aluminium, cawan Petri *disposable* diameter 9 cm dan 5 cm, kain saring, *inoloop*, bunsen, termometer, kompor, panci, saringan besi, baskom, *centrifuge tube* 50 ml, pinset, sarung tangan, masker, dan gunting.

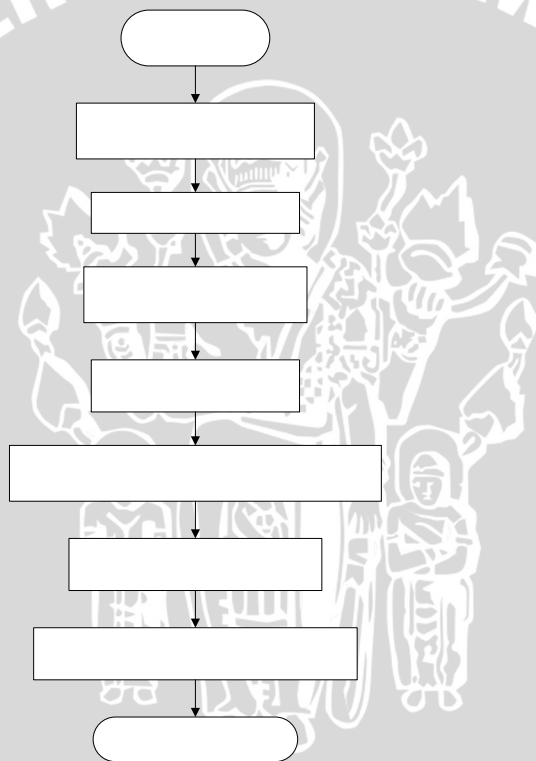
b. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu isolate jamur *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune*, biji barley, ekstrak malt, agar murni, aquades, kulit jagung, tongkol jagung, alcohol 70%, spiritus, kertas saring halus, parafilm, CaSO_4 , CaCO_3 , Na_2CO_3 , *Folin ciocalteu*, asam galat, *Dinitrocalysilic acid* (DNS), pottasium tartat, dan NaOH.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian di mulai dari identifikasi masalah yang akan diteliti. Dilakukan perumusan masalah diikuti dengan studi literatur untuk memperoleh informasi sekaligus data yang dapat menunjang dalam penelitian. Selanjutnya dilakukan penelitian pendahuluan untuk pengamatan awal sehingga dapat ditentukan hipotesis dan rancangan penelitian. Kemudian dilakukan penelitian utama yaitu proses degradasi lignoselulosa

pada kulit dan tongkol jagung menggunakan dua jenis jamur *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune*. Dilakukan pengamatan selama 35 hari, dengan pengumpulan data hasil uji pada hari ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, ke-28, dan ke-35. Kemudian dilakukan pengolahan data yang telah diperoleh untuk dianalisis hasilnya serta kesimpulan dan saran dari penelitian. Berdasarkan tahapan penelitian yang telah dijelaskan, secara umum diagram proses tahapan penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Prosedur Penelitian

3.4 Batasan Masalah

1. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium
2. Pengukuran *weight loss*/susut berat menggunakan metode Pitt and Hocking (2012) tanpa dipengaruhi berat jamur

3.5 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan tiga faktor yaitu lama fermentasi, spesies jamur (*Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune*) serta jenis bahan (kulit dan tongkol jagung). Lama fermentasi terdiri dari hari ke-0 (kontrol), ke-7, ke-14, ke-21, ke-28, dan ke-35. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan sehingga terdapat 72 sampel yang diamati. Rincian perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 3.1**. Pengamatan yang dilakukan pada setiap perlakuan adalah pH, susut bahan (*weight loss*), Total Gula Reduksi (TGR) dan *Total Soluble Phenol* (TSP). Analisis data bertujuan untuk mengetahui perbedaan perlakuan menggunakan MANOVA dan Uji Tukey dengan software SPSS 17.0.

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

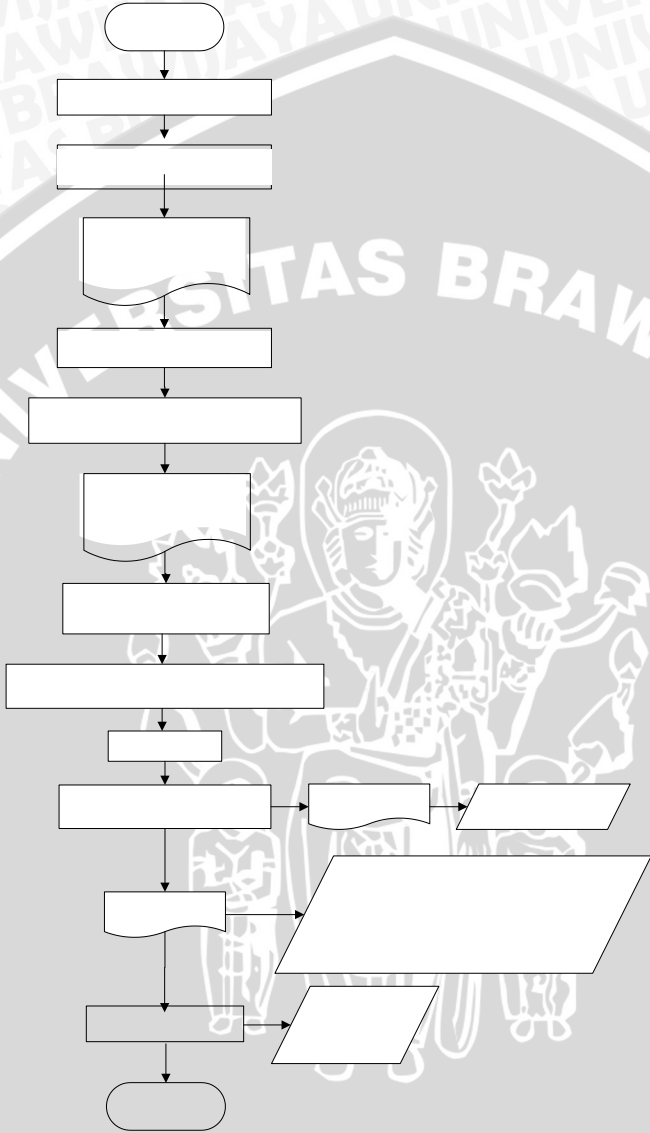
Jenis Jamur	Bahan	Lama Inkubasi (hari)	Simbol
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	0	PK0
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	0	PT0
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	0	SK0
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	0	ST0
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	7	PK7
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	7	PT7
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	7	SK7
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	7	ST7
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	14	PK14
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	14	PT14

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian (lanjutan)

Jenis Jamur	Bahan	Lama Inkubasi (hari)	Simbol
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	14	SK14
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	14	ST14
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	21	PK21
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	21	PT21
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	21	SK21
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	21	ST21
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	28	PK28
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	28	PT28
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	28	SK28
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	28	ST28
<i>P. chrysosporium</i>	Kulit Jagung	35	PK35
<i>P. chrysosporium</i>	Tongkol Jagung	35	PT35
<i>S. commune</i>	Kulit Jagung	35	SK35
<i>S. commune</i>	Tongkol Jagung	35	ST35

3.6 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa langkah. Tahap awal yaitu mulai dari penyiapan penyiapan bahan-bahan yang akan digunakan, diikuti proses inokulasi pada beberapa media. Selanjutnya proses *pretreatment* hingga diperoleh hasil uji *weight loss*, pH, kadar gula reduksi dan *soluble phenol* dan diikuti dengan analisis data statistik. Diagram alir tahapan pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3. 2 Alur Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Persiapan Bahan

Tahap awal yaitu persiapan bahan yang meliputi penyediaan dan pemotongan kulit dan tongkol jagung, pembuatan media MEA (*Malt Extract Agar*) dan *grain spawn*. Dalam menyediakan bahan, dipilih kulit dan tongkol jagung yang dipanen sekitar 2-3 minggu dan dalam kondisi yang baik (tidak berjamur). Setelah itu dilakukan pengeringan dengan dijemur guna mencegah munculnya jamur yang dapat merusak kualitas bahan. Setelah itu dilakukan pengecilan ukuran bahan secara manual. Pengecilan kulit jagung dilakukan dengan gunting dengan ukuran 1-2 cm, sedangkan tongkol jagung dipotong dengan pisau dan bantuan palu dengan ukuran 2-3 cm.

Pembuatan media MEA dan *grain spawn* bertujuan untuk perbanyak isolat *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune*. Perbanyak isolat dilakukan pada media MEA terlebih dahulu, kemudian ketika permukaan media telah dipenuhi koloni jamur, maka dapat dilakukan perbanyak jamur pada media *grain spawn*. Penumbuhan kultur pada *grain spawn* bertujuan untuk memudahkan dalam penimbangan berat inokulum yang akan ditambahkan pada bahan kulit dan tongkol jagung. Tahap inokulasi selalu dilakukan di LAF dengan kondisi steril. Kemudian diinkubasi pada suhu yang optimal untuk pertumbuhan masing-masing jamur. Pengamatan dilakukan hingga seluruh media dipenuhi oleh jamur.

a. Pembuatan Media *Malt Extract Agar* (MEA)

Tahap awal sebelum inokulasi yaitu membuat media. *Malt Extract Agar* merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan jamur. Kandungan ekstrak malt berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen yang dibutuhkan dalam pertumbuhan jamur. Diagram alir pembuatan media MEA dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

b. Inokulasi pada *Malt Extract Agar* (MEA)

Proses inokulasi dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*) karena proses harus dilakukan pada kondisi lingkungan yang

steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Tahapan awal untuk inokulasi yaitu dengan mengkondisikan LAF dalam keadaan steril. Kemudian disiapkan media MEA yang telah padat dan isolat *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune*. Isolat jamur diinokulasi ke media MEA menggunakan *inoloop*. Setelah inokulasi selesai, cawan Petri ditutup dan dirapatkan menggunakan parafilm, selanjutnya diinkubasi pada suhu $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ untuk *Schizophyllum commune* dan suhu $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ untuk *Phanerochaete chrysosporium*.

c. Pembuatan Grain Spawn

Grain spawn merupakan biji-bijian yang dapat dijadikan sebagai media pertumbuhan mikroorganismenya. Dalam penelitian ini, *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune* dapat tumbuh subur pada barley karena adanya nutrisi yang dibutuhkan jamur seperti karbon dan nitrogen. *Grain spawn* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji barley yang dimasak setengah matang. Diagram alir pembuatan *grain spawn* dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

d. Inokulasi pada Grain Spawn

Penanaman jamur pada *grain spawn* bertujuan untuk memperbanyak kultur dan mempermudah dalam penimbangan inokulum. Sehingga diketahui berapa berat kultur yang diinokulasikan ke dalam bahan. Inokulasi dilakukan dengan memindahkan isolat *Phanerochaete chrysosporium* dan *Schizophyllum commune* pada biji barley. Dalam hal ini digunakan *inoloop* untuk memindahkan isolat jamur tersebut. Kemudian ditutup dan dirapatkan kembali dengan parafilm. Kemudian diinkubasi pada suhu $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ untuk *Schizophyllum commune* dan suhu $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ untuk *Phanerochaete chrysosporium*. Selama inkubasi diamati pertumbuhannya, jika terkontaminasi maka dilakukan pengulangan inokulasi.

3.6.2 Inokulasi pada Kulit & Tongkol Jagung

Sebelum kulit dan tongkol jagung diinokulasi, dilakukan *treatment* pengecilan ukuran tongkol jagung dan kulit jagung untuk mempermudah hidrolisis. Inkubasi dilakukan selama 35 hari pada suhu $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ untuk *Schizophyllum commune* dan suhu $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ untuk *Phanerochaete chrysosporium*. Pada hari ke 0 (kontrol), 7, 14, 21, 28 dan 35 diamati dengan pengukuran pH, *weight loss*, TGR (Total Gula Reduksi) dan TSP (*Total Soluble Phenol*). Untuk pengujian TGR dan TSP sebelumnya dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan sampel. Diagram alir degradasi lignoselulosa dan inokulasi pada jerami padi dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

3.6.3 Ekstraksi Hasil Inkubasi

Hasil inkubasi hari ke 0 (kontrol), 7, 14, 21, 28, dan 35 diekstraksi untuk mendapatkan sampel pengujian pH, TGR (Total Gula Reduksi) dan TSP (*Total Soluble Phenol*), sedangkan ampas digunakan untuk pengukuran *weight loss* atau susut berat. Diagram alir proses ekstraksi hasil inkubasi dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

3.6.4 Pengujian Hasil Ekstraksi

a. Uji pH

Pengujian derajat keasaman atau pH dilakukan untuk mengetahui perubahan tingkat keasaman ekstrak pada hari ke-0, 7, 14, 21, 28, dan 35. Pengujian pH dilakukan dengan mengukur nilai pH dari larutan hasil ekstraksi dengan menggunakan pH meter. Tahap awal pengukuran pH yaitu dengan melakukan kalibrasi pH meter, setelah itu dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Selanjutnya pH meter dicelupkan 1/3 bagian ke dalam larutan ekstrak, nilai pH akan muncul secara otomatis. Setelah selesai pH meter dibersihkan dengan aquades dan dikeringkan. Pengujian pH dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing ekstrak.

b. Uji *Weight Loss*(Pitt and Hocking, 2009)

Pengujian *weight loss* atau susut berat dilakukan untuk mengetahui berat bahan yang hilang karena proses degradasi lignoselulosa. Ampas hasil ekstraksi dikeringkan dengan oven pada suhu 80°C selama 16-24 jam. Penimbangan dilakukan pada ampas setelah 16 jam, setiap dua jam sekali hingga berat ampas konstan.

c. Uji Total Gula Reduksi (Miller, 1959)

Pengukuran gula reduksi menggunakan metode *Dinitrocalysilic acid* (DNS). Prinsip metode ini adalah gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) yang absorbansinya diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Metode ini menggunakan glukosa sebagai standar. Sebelumnya dilakukan pengenceran DNS dan glukosa untuk pembuatan larutan standar. Kemudian pembuatan kurva standar diikuti dengan pengukuran gula reduksi pada sampel. Diagram alir proses pengukuran Total Gula Reduksi dapat dilihat pada **Lampiran 5**.

d. Uji Total Soluble Phenol (Singleton and Rossi, 1965)

Pengukuran *soluble phenol* menggunakan metode Folin Ciocalteu dengan asam galat sebagai standar. Pengukuran dilakukan pada absorbansi 765 nm menggunakan spektrofotometer. Tahapan awal yaitu pembuatan larutan Na_2CO_3 , larutan asam galat, dan larutan standar. Tahap selanjutnya yaitu pembuatan kurva standar. Jika kurva standar telah dibuat, dapat dilakukan pengukuran *soluble phenol* pada sampel. Diagram alir proses pengukuran *Total Soluble Phenol* dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

