

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang diterapkan dalam studi ini adalah metode eksperimen. Menurut Yusuf (2014), penelitian eksperimen adalah jenis penelitian yang memungkinkan peneliti untuk mengontrol variabel bebas baik sebelum ataupun selama pelaksanaan penelitian, sehingga dapat mengurangi dampak faktor-faktor lain yang bisa mempengaruhi hasil penelitian.

3.2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Nazir (2003) Rancangan Acak Lengkap didefinisikan sebagai rancangan dengan beberapa perlakuan yang disusun secara acak untuk seluruh percobaan. Desain ini digunakan karena percobaan dilakukan di laboratorium dan kondisi lingkungan dapat di kontrol.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2023 sampai dengan bulan Juni 2023. Lokasi dilakukannya penelitian ini yaitu di Laboratorium Riset Bioteknologi Universitas Pendidikan Indonesia di Jalan Dr. Setiabudi No. 299 Bandung.

3.4. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri selulolitik yang terdapat pada *leachate* yang diambil dari Tempat Pembuangan sampah di Pasar Gegerkalong Tengah. Lalu sampel penelitian yang digunakan untuk penelitian ini adalah enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme bakteri selulolitik yang diisolasi dari *leachate*.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Persiapan Alat Bahan

Pada Penelitian ini melibatkan alat dan bahan untuk mengisolasi bakteri dari *leachate*, seleksi bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik, mengidentifikasi jenis bakteri selulolitik, membuat serbuk tongkol jagung sebagai substrat, melaksanakan produksi enzim menggunakan teknik

Submerged Fermentation (SmF), serta melakukan optimasi produksi enzim selulase. Semua alat dan bahan yang diperlukan tersedia di Laboratorium Riset, Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.5.1.2 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel *leachate* diambil di Tempat Pembuangan Sampah yang berada pada Jl. Gegerkalong Tengah No. 35 A, Gegerkalong, Kec. Sukasari, Kota Bandung, Jawa barat. Pengambilan sampel *leachate* dilakukan dari kedalaman 0-20 cm (Omoniyi et al, 2016).

Pengenceran sampel *leachate* didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Murtiyaningsih dan Hazmi (2017). Sebanyak 1 ml sampel *leachate* dilarutkan dalam 9 ml larutan akuades dan diaduk menggunakan teknik vortex untuk menghasilkan pengenceran 10^{-1} . Kemudian, sebanyak 1 ml sampel yang telah diencerkan dicampur dengan 9 ml larutan akuades untuk menghasilkan pengenceran 10^{-2} . Proses pengenceran dilanjutkan secara berurutan hingga mencapai pengenceran 10^{-10} . Proses pengenceran bertingkat ini dilakukan untuk mengurangi jumlah mikroorganisme yang terdispersi dalam cairan.

3.5.1.3 Isolasi Bakteri

Pada saat melakukan isolasi bakteri, melihat pada penelitian yang dilakukan oleh Murtiyaningsih dan Hazmi (2017). Pengenceran yang digunakan untuk isolasi bakteri yaitu pengenceran 10^{-4} dan 10^{-6} . Dari pengenceran tersebut, masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml secara aseptik kemudian diinokulasikan dengan menggunakan metode sebaran (*spread plate*) pada media *nutrient agar*. Setelah sampel dimasukkan ke dalam media, sebar sampel menggunakan batang L atau batang bengkok. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Kultur bakteri campuran yang telah tumbuh di media NA, kemudian diisolasi menjadi kultur murni pada permukaan media NA miring.

3.5.1.4 Pembiakan Isolat Bakteri

Untuk melakukan inokulasi bakteri ada 3 media yang digunakan, seperti:

1. NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Media *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB) merupakan jenis media yang memiliki peran sebagai substrat untuk pertumbuhan bakteri. Media ini

menyediakan nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk melakukan reproduksi, termasuk karbohidrat sebagai sumber energi, senyawa nitrogen organik, dan vitamin (Tankeshwar, 2016).

2. CMC (*Carboxymethylcellulose*)

Carboxymethyl Cellulose (CMC) merupakan salah satu sumber karbon yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan bakteri selulolitik. CMC akan dihidrolisis oleh bakteri selulolitik dengan ditandai munculnya zona bening pada sekitar koloni (Hankin & Anagnostakis, 1977).

3. Media Fermentasi

Media fermentasi dimanfaatkan sebagai tempat pertumbuhan mikroba dalam pengujian untuk menentukan waktu, pH, suhu, densitas bakteri, dan volume enzim optimal selama proses fermentasi. Setelah itu, enzim selulase yang diekstrak secara kasar dari hasil fermentasi diuji untuk mengukur aktivitas enzim selulase nya (Shahid *et al.*, 2016).

3.5.1.5 Seleksi Bakteri Selulolitik dengan Media CMC Agar

Isolat bakteri yang telah tumbuh pada lingkungan media NA miring akan dilanjutkan proses seleksi untuk memilih bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik menggunakan media agar CMC. Penanaman bakteri pada media CMC menggunakan metode kertas cakram. Dilakukan pembiakan dengan menginokulasikan 1 ose bakteri murni kedalam 25 ml media NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan putaran 120 rpm, sesuai dengan Mulyadi *et al.*, (2013). Setelah pembiakan, bakteri yang telah tumbuh ditransfer ke medium agar CMC yang berisi kertas cakram dengan diameter sekitar 6 mm, diaplikasikan sejumlah 10 µl, sesuai dengan Niswah (2014). Setelah penanaman bakteri pada medium agar CMC, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah periode 24 jam, kultur pada medium agar CMC diberi pewarnaan menggunakan larutan Congo red 0,1%, dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit sebelum dibilas dengan larutan NaCl 1%, sebagaimana dilakukan oleh Ji *et al.*, (2003). Proses seleksi bakteri selulolitik dilakukan berdasarkan pembentukan zona bening yang muncul pada medium agar CMC. Nilai Indeks Selulolitik (IS) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter Zona Bakteri}}{\text{Diameter Koloni Bakteri}}$$

(Sinaga, 2013).

3.5.1.6 Identifikasi Bakteri Selulolitik

Identifikasi bakteri selulolitik dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu:

A. Pengamatan morfologi koloni

Observasi makroskopis terhadap morfologi bisa dilakukan dengan mengamati ciri-ciri luar koloni bakteri, termasuk bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni (Cappucino dan Sherman, 2014).

B. Pewarnaan bakteri

Untuk mengidentifikasi karakteristik fisiologis bakteri selulolitik, digunakan pendekatan pewarnaan yang meliputi pewarnaan sederhana, pewarnaan gram, pewarnaan kapsul, dan pewarnaan endospora (Indah Sari, 2018)

C. Uji biokimia

Pengamatan secara fisiologi dapat dilakukan dengan uji biokimia, pengamatan fisiologi dapat dilakukan dengan cara pengujian seperti fermentasi karbohidrat, pengujian Metyl red, pengujian Vogest Paskauer, pengujian oksidase, pengujian protease dan lain-lain (Indah Sari, 2018).

a) Uji Hidrolisis

Dalam proses hidrolisis pati, digunakan medium agar yang mengandung pati, dimana bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati akan menghasilkan zona bening di sekitar koloni ketika ditetesi dengan larutan lugol. Hasil positif menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim amilase yang mampu memecah pati menjadi dekstrin. Reaksi hidrolisis pati menghasilkan dekstrin sebagai produk akhir. Eksperimen dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium agar pati, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappucino & Sherman, 2014).

Proses hidrolisis lipid dilakukan dengan menggunakan medium lipid agar. Hasil positif terindikasi oleh adanya zona bening yang muncul di sekitar koloni bakteri serta perubahan warna merah pada bagian bawah koloni, yang

disebabkan oleh produksi asam lemak dan penurunan pH di dalam medium. Bakteri ditanam pada medium agar lipid dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappucino & Sherman, 2014).

Untuk melakukan hidrolisis gelatin, digunakan medium nutrient gelatin, dimana mikroorganisme yang memiliki kemampuan menghidrolisis gelatin akan menghasilkan eksoenzim proteolitik yang disebut gelatinase. Hasil positif dinyatakan dengan cairnya gelatin setelah diinkubasi oleh bakteri, bahkan saat disimpan pada suhu 4°C. Prosedur uji dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium gelatin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu disimpan dalam inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit.

Pada uji hidrolisis kasein, digunakan medium susu skim agar dimana bakteri diinokulasikan pada medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif dari uji hidrolisis kasein ditunjukkan oleh adanya zona bening yang muncul di sekitar koloni.

b) Uji Fermentasi

Uji fermentasi dijalankan untuk mengetahui kapabilitas isolat bakteri dalam melakukan fermentasi karbohidrat. Penelitian ini melibatkan empat jenis gula, yakni glukosa, laktosa, dekstrosa, dan sukrosa. Indikator yang digunakan adalah *brom cresol purple* (BCP). Proses pengujian dilaksanakan dengan menanamkan isolat bakteri ke dalam medium, diinkubasi selama 1-2 kali 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif terindikasi oleh perubahan warna medium menjadi kuning dan hadirnya gas atau gelembung di dalam tabung Durham.

c) Tes Susu Litmus

Media susu litmus mengandung komponen seperti protein kasein, laktosa, vitamin, dan mineral. Fungsi dari uji ini adalah untuk mengidentifikasi adanya keberadaan enzim yang melengkapi aktivitas bakteri. Bakteri yang akan diuji diinokulasikan dengan ose pada medium susu litmus lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna pada media.

d) Uji Reaksi Katalase

Pengujian aktivitas katalase dilaksanakan dengan menanam bakteri di dalam medium nutrient agar dan menginkubasikannya pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah periode inkubasi, larutan H₂O₂ diberikan pada permukaan koloni bakteri pada agar tersebut. Indikasi hasil positif ditandai oleh munculnya gelembung setelah pemberian H₂O₂, menunjukkan bahwa organisme tersebut memproduksi enzim katalase. (Allinya, 2019).

e) IMVIC

IMVIC adalah singkatan dari uji- uji dalam bakteri, yaitu *Indole*, *Methyl red*, *Voges-Proskauer*, dan *Citrate*. Uji *Indole* digunakan untuk menguji apakah bakteri dapat menghasilkan indole dari degradasi asam amino tryptophan. Percobaan ini dilakukan dengan memanfaatkan trypton broth sebagai medium. Bakteri ditanam pada medium tersebut dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil positif dikenali melalui terbentuknya warna merah muda di permukaan cairan setelah ditambahkan reagen Kovac pada kultur. Warna merah muda ini terbentuk karena indole yang dihasilkan oleh bakteri bereaksi dengan paradimetilaminobenzaldehid (*p*-dimetilaminobenzaldehid) yang ada dalam reagen Kovac.

Uji metil merah dilakukan dengan cara menambahkan bakteri ke dalam MR broth, kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Setelah inkubasi, larutan metil merah ditambahkan ke masing-masing tabung reaksi yang berisi biakan. Hasil positif terindikasi oleh munculnya warna merah muda dalam *broth*, sementara hasil negatif menunjukkan warna kuning. Uji *Voges-Proskauer* (VP) dilaksanakan dengan memasukkan bakteri ke dalam medium VP broth dan diinkubasikan selama 24 jam.

Setelah tahap inkubasi selesai, biakan diujikan dengan meneteskan 5 tetes reagen VP (yang mengandung KOH), lalu diaduk hingga homogen. Hasil positif akan ditandai dengan perubahan warna menjadi merah muda atau merah, yang mengindikasikan adanya aseton. Hasil negatif terlihat dari ketidakterlaluannya perubahan warna medium atau perubahan menjadi warna tembaga.

Uji sitrat memiliki tujuan untuk menguji kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan sitrat sebagai sumber energi. Mikroorganisme yang mampu tumbuh pada medium Simmon's Citrate memproduksi enzim sitratpermease yang mengubah sitrat menjadi piruvat. Piruvat dapat

dimetabolisme dalam siklus untuk menghasilkan energi (Aryal, 2018).

Hasil positif dari uji ini terlihat ketika medium berubah warna dari hijau menjadi biru. Perubahan ini disebabkan oleh peningkatan alkalinitas akibat metabolisme bakteri terhadap sitrat, yang mengakibatkan garam ammonium terhidrolisis menjadi ammonia. Pada uji sitrat, prosedur dilakukan dengan menanam 1 ose bakteri pada medium Simmons citrate agar, lalu menginkubasikannya pada suhu 37°C selama 24 jam.

f) Uji Produksi H₂S

Untuk mendeteksi produksi H₂S, bakteri ditanam pada medium SIM agar (sulfide, indole, motility) dan inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 1-2 kali 24 jam. Tanda positif dapat dilihat melalui perubahan warna medium menjadi hitam (Aryal, 2018).

g) Kebutuhan Oksigen

Tidak semua mikroorganisme memerlukan oksigen, namun ada beberapa kelompok. Berikut ini merupakan jenis-jenis kebutuhan oksigen bakteri, yaitu aerob (memerlukan oksigen sebagai aseptor elektron dalam proses respirasi), anaerob merupakan organisme yang tidak memerlukan oksigen, dimana oksigen dapat membentuk H₂O₂ yang bersifat toksik bagi bakteri. Fakultatif aerob merupakan bakteri yang dapat tumbuh dalam lingkungan kelompok anaerob dan mikroorganisme aerofilik merupakan mikroorganisme yang memerlukan oksigen dalam jumlah terbatas sebab jumlah yang berlebihan akan menghambat enzim oksidatif. Uji kebutuhan oksigen dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada medium nutrient agar, kemudian tutup medium dilapisi paraffin agar tidak ada udara yang masuk (Hamdiyati & Kusnadi, 2018).

h) Motilitas

Untuk melakukan pengujian motilitas, bakteri ditanam pada medium *nutrient agar* dengan cara diinokulasi menggunakan ose lalu perkembangannya diamati. Jika bakteri bersifat motil, akan terjadi pertumbuhan di sekitar area inokulasi dan medium akan mengalami perubahan warna menjadi keruh.

3.5.1.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri Selulolitik

Kurva pertumbuhan merupakan representasi grafis yang berisi informasi tentang berbagai fase dalam siklus hidup dan laju perkembangan sel mikroba. Pembuatan kurva pertumbuhan merupakan komponen penting dalam riset mikrobiologi untuk mengumpulkan data mengenai aktivitas pertumbuhan serta karakteristik kolonisasi mikroorganisme yang diisolasi. Penghitungan waktu generasi juga berperan dalam pemahaman tentang proses metabolisme mikroba. Fase pertumbuhan mikroba secara umum meliputi fase lag (adaptasi), fase log (pertumbuhan eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian (Fardiaz, 1992).

Untuk mengetahui fase pertumbuhan bakteri serta mendapatkan waktu inkubasi optimal dalam menghasilkan enzim selulase, digunakan metode pembuatan kurva pertumbuhan. Pada penelitian ini, Untuk menghasilkan kurva pertumbuhan bakteri, langkah pertama adalah membuat stok subkultur bakteri dengan menanam 1 ose pada 25 mL media *Nutrient Broth* (NB). Kemudian, stok ini diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 37°C dan kecepatan putar 120 rpm selama 24 jam. Kepadatan sel atau Optical Density (OD) diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 610 nm. Pengukuran OD dilakukan setiap 60 menit selama periode 24 jam (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018). Pengukuran berlanjut hingga nilai OD menurun atau menunjukkan fase kematian. Data tersebut digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan dengan menghubungkan nilai OD terhadap waktu inkubasi (Purkan *et al.*, 2014).

3.5.1.8 Pre-treatment Tongkol Jagung dan Delignifikasi

Tongkol Jagung yang digunakan dalam penelitian ini adalah tongkol jagung yang didapat dari tanaman Jagung muda karena tongkol jagung muda (usia 35 hari) memiliki kandungan selulosa yang lebih tinggi dibandingkan dengan tongkol jagung tua (usia 95 hari). Kandungan selulosa pada tongkol jagung muda tersebut diperkirakan sebesar 43,5%, sedangkan pada tongkol jagung tua diperkirakan sebesar 36,2% (Mango *et al.*, 2004).

Jagung (*Zea mays*) dengan varietas saccharata diperoleh dari perkebunan jagung di Desa Karangmangu, Kecamatan kramatmulya, Kabupaten Kuningan Jawa Barat. Jagung dipisahkan dengan bulirnya hingga tersisa tongkol jagung.

Dilakukan pencucian, pemotongan, dan pengeringan selama 3 hari menggunakan oven dengan suhu 70°C hingga berat tongkol jagung konstan. Tongkol jagung yang sudah kering diblender dan disaring dengan ukuran 100 mesh.

Langkah selanjutnya adalah melakukan proses delignifikasi dalam dua tahap. Tahap pertama melibatkan pencucian dengan larutan KOH 0,5 M pada suhu kamar selama 4 jam. Setelah itu, tahap kedua melibatkan pencucian menggunakan larutan H₂SO₄ 0,1 N pada suhu kamar selama 1 jam, dengan perbandingan 1:10 antara tongkol jagung dan cairan pencuci (Allinya, 2019). Setelah tahap pencucian selesai, dilakukan pembilasan dengan air hingga mencapai pH netral.

3.5.1.9 Produksi Enzim Secara *Submerged Fermentation* (SmF)

Proses produksi enzim melalui SmF memerlukan 100 mL medium fermentasi yang mengandung bahan-bahan seperti ekstrak ragi 1 gram, sukrosa 2 gram, B₂HPO₄ 1 gram, dan FeSO₄ 0,01 gram per liter. Medium ini juga diperkaya dengan penambahan 0,5 mL larutan basal garam (10 gram NaNO₃, 2,5 gram KCl, 2,5 gram MgSO₄, dan 50 mL air distilasi) (Kumar *et al.*, 2009). Selanjutnya, 2% berat tongkol jagung yang telah mengalami perlakuan ditambahkan ke dalam tabung reaksi berukuran 100 mL. Semua bahan ini kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

Setelah proses sterilisasi selesai, labu Erlenmeyer yang berisi medium fermentasi didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 1% inokulum kultur murni bakteri selulolitik pada kepadatan sel 10⁶ CFU/mL diinokulasikan ke dalam medium fermentasi. Setelah inokulasi, medium fermentasi diinkubasi dalam waterbath shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan pengadukan 120 rpm selama periode waktu 0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam (Sreedevi *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2016; Phong *et al.*, 2017).

Pada setiap titik waktu fermentasi (0, 24, 48, 72, 96, 120 jam), media fermentasi disaring menggunakan kertas saring, dan kemudian dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Proses sentrifugasi akan menghasilkan ekstrak kasar enzim berupa partikel bening (supernatan) (Sholihati *et al.*, 2015).

3.5.1.10 Pembuatan larutan Standar Glukosa

Dalam pembuatan larutan standar glukosa, digunakan beberapa konsentrasi

yang berbeda, yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, dan 350 ppm glukosa. Prosesnya dimulai dengan pembuatan larutan stok glukosa yang memiliki konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok ini disiapkan dengan melarutkan 0,05 gram glukosa dalam 50 mL air suling. Selanjutnya, larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm ini digunakan sebagai basis untuk menghasilkan larutan-larutan dengan konsentrasi yang diinginkan (Allinya, 2019).

3.5.1.11 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dapat digunakan dalam penelitian enzim untuk menentukan konsentrasi glukosa dalam suatu sampel dengan tepat. Kurva standar glukosa dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi glukosa dalam sampel dengan menggunakan metode kalibrasi, yang melibatkan pengukuran konsentrasi glukosa dalam sampel dengan menggunakan standar glukosa yang diketahui (M. G. A. van der Voort *et al.*, 2006).

Dalam penelitian enzim, pembuatan kurva standar glukosa dapat digunakan untuk mengevaluasi performa suatu enzim dalam mengkatalisis reaksi glukosa. Kurva standar glukosa dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi glukosa dalam sampel sebelum dan sesudah reaksi enzim, yang kemudian dapat digunakan untuk menghitung laju reaksi enzim (M. G. A. van der Voort *et al.*, 2006).

Selain itu, pembuatan kurva standar glukosa juga dapat digunakan dalam penelitian enzim untuk mengevaluasi performa suatu metode analisis kimia dalam mengukur konsentrasi glukosa. Misalnya, dapat digunakan untuk mengevaluasi performa metode spektrofotometri dalam mengukur konsentrasi glukosa dalam sampel (M. G. A. van der Voort *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini, larutan standar glukosa dibuat dengan konsentrasi berbeda, yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300, dan 350 ppm. Dari masing-masing konsentrasi ini, diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, sejumlah 1 mL reagen DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan menggunakan alat vorteks. Tabung reaksi yang mengandung glukosa dan reagen DNS ini dididihkan selama 5-15 menit sampai larutan mengalami perubahan warna menjadi merah-coklat. Selanjutnya, sebanyak 1 mL KNa-tartrat ditambahkan dan larutan didinginkan. Setelah dilakukan penambahan

aquades hingga volumenya mencapai 10 mL dan dihomogenkan, absorbansi pada tiap konsentrasi glukosa diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. (Andriani, 2022).

3.5.1.12 Pengukuran Parameter

1) Biomassa bakteri selulolitik

Dalam menghitung jumlah bakteri pada selama proses fermentasi dilakukan metode perhitungan dengan *Optical Density* (OD). Sebanyak 1 mL medium fermentasi dari masing- masing sampel dimasukkan ke dalam kuvet dengan aquades dijadikan sebagai blanko, lalu nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm (Lizayana *et al.*, 2016).

2) Uji aktivitas enzim selulase

Aktivitas enzim selulase diukur dengan mencampurkan 0,5 mL larutan CMC 1% (disiapkan dalam larutan buffer sitrat 0,05 M dengan pH 5) dan 0,5 mL larutan enzim. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah proses inkubasi selesai, ditambahkan 1,5 mL larutan DNS untuk menghentikan reaksi, yang selanjutnya dipanaskan selama 10 menit pada waterbath. Setelah sampel mendingin, absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer. Kuantitas gula yang dihasilkan ditentukan dengan menggunakan standar glukosa. Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit. Berikut merupakan rumus untuk menghitung aktivitas enzim selulase.

$$\text{Aktivitas selulase } \frac{u}{ml} = \frac{\text{konsentrasi gula pereduksi} \times \text{FP} \times 10}{t \times \text{BM}}$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

t = waktu inkubasi (30 menit)

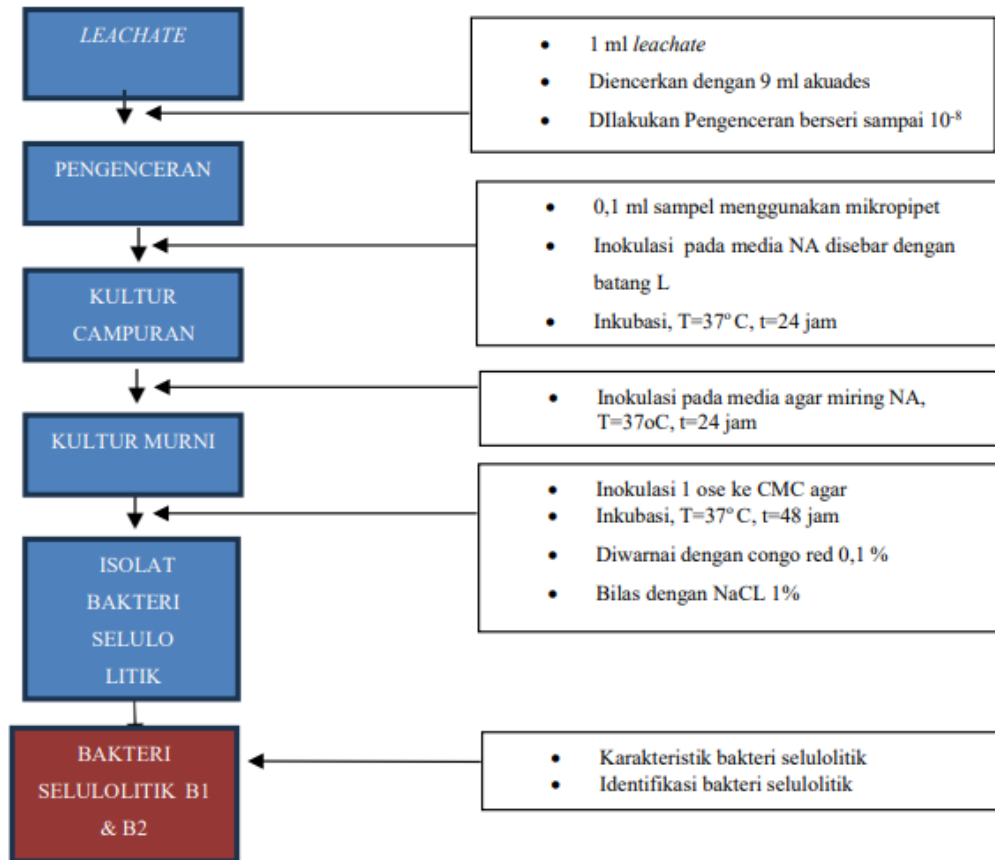
BM = BM glukosa

3.5.2 Tahap Analisis Data

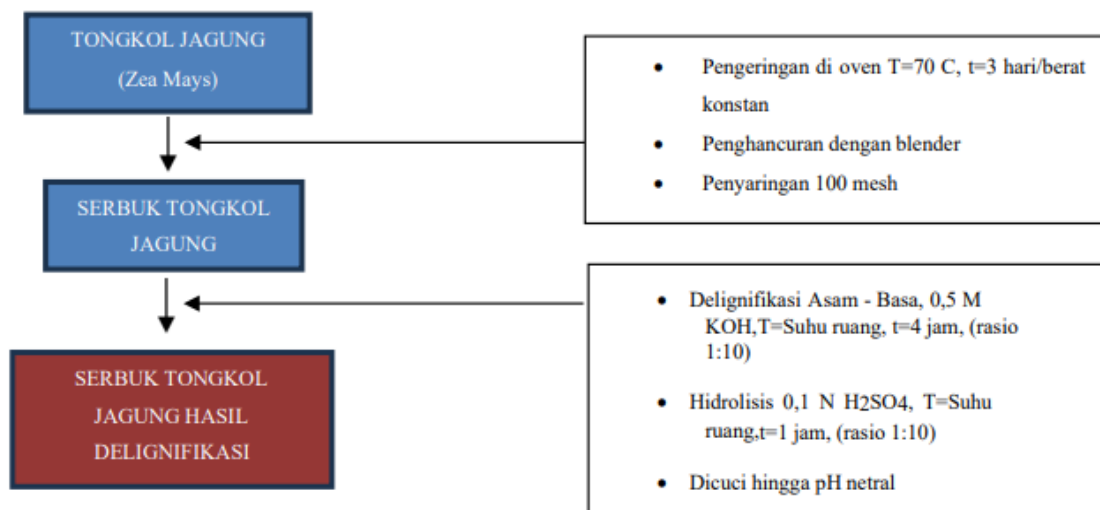
Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25 *for Windows*. Langkah pertama melibatkan uji normalitas pada data, diikuti oleh uji homogenitas. Apabila data menunjukkan distribusi normal dan homogenitas,

dilakukan uji Two Way ANOVA (*Analysis of Variance*). Namun, jika data tidak memenuhi syarat homogenitas, maka dilakukan uji non-parametrik.

3.5.3 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur penelitian isolasi bakteri selulolitik B1 & B2 dari leachate



Gambar 3. 2 Alur penelitian isolasi bakteri selulolitik B1 & B2 dari leachate