

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan dalam studi ini adalah penelitian kuantitatif dengan pendekatan eksperimental. Penelitian mengenai mikrobiologi disebut juga sebagai penelitian eksperimental karena penelitiannya dilakukan dengan melalui eksperimen atau percobaan untuk menguji hipotesis atau mencari jawaban atas pertanyaan penelitian.

Penelitian eksperimental melibatkan kontrol atau pengawasan atas setiap perlakuan bebas, baik sebelum maupun selama penelitian dilaksanakan. Hal ini dilakukan untuk mengurangi potensi faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Selain itu, pendekatan ini memungkinkan peneliti untuk memanipulasi variabel independen dan mengontrol situasi penelitian, sehingga dapat menjelaskan hubungan sebab-akibat dari berbagai faktor.

3.2 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai pendekatan penelitian. Rancangan ini dipilih ketika bahan percobaan dan faktor lingkungan memiliki karakteristik yang seragam (homogen). Karena penelitian dilakukan di lingkungan laboratorium yang memastikan keseragaman alat, bahan, dan media, maka Rancangan Acak Lengkap (RAL) dianggap paling tepat. Rancangan ini dianggap "acak" karena setiap unit percobaan memiliki peluang yang setara untuk menerima perlakuan tertentu, dan dianggap "lengkap" karena semua perlakuan yang direncanakan dalam eksperimen digunakan dalam pelaksanaan.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam periode mulai dari bulan Februari hingga Juli tahun 2023. Pelaksanaannya berlangsung di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

(FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia yang terletak di Jalan Dr. Setiabudi No. 299, Bandung.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang menjadi subjek penelitian ini adalah isolat bakteri selulolitik L2 dan L4, yang diperoleh melalui proses isolasi dari sampel *leachate*. Selain itu, enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri selulolitik L2 dan L4 yang diperoleh dari isolasi *leachate* digunakan sebagai sampel penelitian yang didapat dari Instalasi Pengolahan *Leachate* di Tempat Pembuangan Akhir Sarimukti.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini melibatkan serangkaian langkah dengan penggunaan alat dan bahan yang khusus. Langkah-langkah yang dilakukan mencakup isolasi bakteri dari *Leachate*, seleksi bakteri selulolitik, identifikasi spesies bakteri selulolitik, pembuatan serbuk substrat dari tongkol jagung, produksi enzim melalui *Submerged Fermentation* atau SmF, dan optimasi produksi enzim selulase. Semua peralatan dan bahan yang diperlukan sudah tersedia di Laboratorium Riset, Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

Pada tahap persiapan, sangat penting untuk memastikan bahwa semua alat dan bahan dikelola dengan metode aseptik. Alat yang perlu disterilisasi dijaga kering dengan dilindungi oleh kertas, kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Bahan yang akan disterilisasi diletakkan dalam wadah kaca yang bersih, ditutup dengan rapat, dan dibungkus plastik. Setelah proses pembungkusan, alat dan bahan yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam autoclave dan dipanaskan pada suhu 121°C selama 15 menit. Langkah sterilisasi ini dilakukan di Laboratorium Riset Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar lengkap peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat ditemukan di Lampiran 1.

3.5.2 Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel limbah cair dalam penelitian ini menggunakan teknik "*grab sample*," yang merujuk pada pengambilan sampel air pada satu waktu dan lokasi tertentu. Sesuai dengan pedoman SNI 6989.59:2008 tentang Air dan Air Limbah, pemilihan lokasi pengambilan sampel air limbah perlu mempertimbangkan adanya Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL), dan sampel harus diambil dari area yang telah mencapai pencampuran yang sempurna. Pengambilan sampel air limbah dilaksanakan secara instan di satu titik lokasi tertentu, baik di bak inlet maupun outlet. (Lumunon *et al.*, 2021).

Dilakukan rangkaian pengenceran hingga mencapai tingkat pengenceran 10^{-6} . Pendekatan pengenceran bertingkat ini bertujuan untuk mengurangi dan meminimalkan jumlah mikroorganisme yang terlarut dalam cairan. Sampel tanah diambil di Lokasi Pembuangan Akhir (TPA) Sarimukti yang berada di Sarimukti, Kecamatan Cipatat, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat, dengan kode pos 40554. Pengambilan sampel dilakukan di area Instalasi Pengolahan *Leachate* (IPL).

3.5.3 Isolasi Bakteri

Dalam konteks penelitian ini, dilakukan pengenceran bakteri dengan perbandingan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , dan 10^{-6} . Dari setiap tingkat pengenceran tersebut, diambil masing-masing 0,1 ml sampel dengan prosedur aseptik, yang kemudian diinokulasikan pada medium *nutrient agar* menggunakan metode sebaran (*spread plate*). Setelah sampel ditempatkan di atas media, mereka diratakan menggunakan alat seperti batang L atau batang bengkok. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni campuran yang telah tumbuh pada medium *nutrient agar* dipisahkan menjadi kultur murni pada medium NA miring.

Metode cawan sebar (*spread plate*) adalah proses di mana sampel mikroorganisme diletakkan di atas media agar yang padat dan kemudian diratakan secara merata menggunakan alat seperti batang L atau bengkok. Metode cawan tuang (*pour plate*), di sisi lain, melibatkan pencampuran sampel mikroorganisme dengan media agar cair sebelum media tersebut mengeras. Setelah pencampuran, campuran

tersebut dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Kelebihan utama dari metode cawan tuang adalah bahwa proses pencampuran pada fase cair memungkinkan mikroorganisme untuk terdistribusi secara merata di seluruh media agar saat media tersebut mengeras. Ini memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme dengan cara yang lebih merata dan konsisten pada permukaan media. (Krisno, 2011).

3.5.4 Pemiakan Isolat Bakteri

Proses pembiakan bakteri menggunakan tiga media untuk menginokulasi bakteri, antara lain:

1) NA (*Nutrient agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Media *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB) merupakan tipe media yang digunakan sebagai lingkungan pertumbuhan bagi bakteri. Kedua jenis media ini menyediakan nutrisi esensial yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk berkembang, termasuk senyawa nitrogen organik, vitamin, dan sumber karbohidrat (Tankeshwar, 2016).

2) CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) Agar

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) merupakan bentuk turunan atau derivatif dari selulosa yang memiliki gugus *carboxymethyl* ($-\text{CH}_2\text{COOH}$). Turunan ini dihasilkan melalui reaksi selulosa dengan kloroasetat dalam lingkungan alkali, yang mengakibatkan substitusi pada posisi C2, C3, atau C6 dari unit glukosa dalam struktur selulosa. Dampak dari perubahan ini adalah bahwa CMC menjadi larut dalam air dan memiliki aplikasi penting dalam mengukur aktivitas hidrolitik selulase. Media yang menggunakan CMC dikenal sebagai media yang selektif, dan digunakan untuk budidaya bakteri yang memiliki kapasitas untuk mengurai selulosa (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

3) Medium Fermentasi

Media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan untuk menguji kondisi optimal seperti suhu, pH, waktu fermentasi, volume enzim, dan kepadatan bakteri yang menghasilkan enzim selulase. Hasil dari proses ini adalah ekstrak

kasar enzim selulase, yang kemudian diuji untuk mengukur aktivitas enzimnya (Shahid *et al.*, 2016).

3.5.5 Seleksi Bakteri Selulolitik pada Media CMC Agar

Isolat murni dari bakteri yang sebelumnya dibiakkan pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang miring, kemudian melalui proses seleksi bakteri selulolitik menggunakan medium agar *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Proses kultivasi dimulai dengan menginokulasikan sebanyak 1 ose (koloni pembentuk koloni individu) bakteri murni ke dalam 25 mL media *Nutrient Broth* (NB). Setelah itu, kultur bakteri ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan pengadukan pada kecepatan 120 rpm, sesuai dengan penelitian Mulyadi *et al.* (2013). Bakteri yang telah berkembang kemudian ditransfer ke dalam medium agar CMC yang mengandung cakram kertas berdiameter ±6 mm sebanyak 10 µl, seperti yang dijelaskan oleh Niswah (2014).

Setelah bakteri ditanam pada medium agar CMC, kultur bakteri ini dibiarkan tumbuh selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah periode tersebut, biakan bakteri pada medium CMC diwarnai menggunakan larutan *congo red* 0,1% dan dibiarkan menginkubasi selama 30 menit. Setelah itu, biakan tersebut dicuci menggunakan larutan NaCl 1% untuk menghilangkan pewarnaan yang tidak terikat. (Wang *et al.*, 2003). Proses seleksi bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa dilakukan berdasarkan zona bening yang muncul pada medium CMC. Nilai Indeks Selulolitik (IS) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IS = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni bakteri}}{\text{Diameter koloni bakteri}}$$

(Sinaga, 2013).

3.5.6 Identifikasi Bakteri Selulolitik

Identifikasi bakteri selulolitik dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu:

1) Pengamatan morfologi koloni

Pengamatan morfologi pada tingkat makroskopis dilakukan dengan mengobservasi secara menyeluruh bentuk koloni bakteri, termasuk karakteristik

seperti bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni (Cappucino dan Sherman, 2014). Observasi morfologi dilakukan terhadap bakteri dalam periode waktu 7 kali selama 24 jam..

2) Pewarnaan bakteri

Penerapan teknik pewarnaan pada bakteri selulolitik dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi karakteristik fisiologisnya. Metode yang digunakan melibatkan pewarnaan sederhana, pewarnaan gram, pewarnaan kapsul, dan pewarnaan endospora (Indah Sari, 2018).

a) Pewarnaan Gram

Proses pewarnaan gram diawali dengan mengambil satu ose (isolat) bakteri dan menggoreskannya pada permukaan preparat yang telah disterilkan, kemudian di fiksasi. Pada permukaan preparat yang mengandung lapisan bakteri, diteteskan kristal violet dan dibiarkan selama 3 menit. Setelah 3 menit, preparat dibilas dengan air hingga zat pewarna tidak terlihat. Preparat dikeringkan di atas api spiritus. Setelah kering, 1 tetes larutan lugol ditambahkan ke permukaan preparat dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, preparat dibilas dengan air. Kemudian, preparat dibilas dengan alkohol 96% hingga semua zat pewarna hilang, dan dicuci kembali dengan air. Preparat dikeringkan di atas api spiritus. Setelah preparat kering, 1 tetes fuchsin alkali ditambahkan ke permukaan preparat dan dibiarkan selama 45 detik. Preparat kemudian dicuci dengan air, dikeringkan, dan ditambahkan minyak imersi. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Mahmudah *et al.*, 2016).

b) Pewarnaan Kapsul

Pewarnaan kapsul memiliki dua varian, yakni pewarnaan negatif menggunakan nigrosin dan pewarnaan positif dengan menggunakan kristal violet. Pewarnaan negatif berfungsi untuk mewarnai latar belakang objek mikroskopis, sementara pewarnaan positif melibatkan pewarnaan dinding sel bakteri. Proses dimulai dengan membuat apusan bakteri tanpa menggunakan fiksasi panas. Apusan bakteri tersebut kemudian dioleskan kristal violet selama 5-7 menit.

Kelebihan pewarnaan dicuci dengan larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20% dan diakhiri

dengan pengeringan. Apusan bakteri tersebut akhirnya diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000x (Aryal, 2018)

c) Pewarnaan Endospora

Untuk mengidentifikasi spora bakteri, tahap awal melibatkan pembuatan biakan murni dengan metode fiksasi. Setelah itu, biakan tersebut diberi perlakuan menggunakan larutan *malachite green* 5% sebagai pewarna. Setelah pewarnaan dengan *malachite green* 5% selesai, apusan bakteri diapungkan di atas penangas air selama 5 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, apusan bakteri ditetesi dengan safranin selama 30 detik dan kemudian dicuci lagi dengan air mengalir. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop pada perbesaran 1000x, yang memungkinkan untuk mengidentifikasi bahwa spora bakteri akan tampak berwarna hijau (Hamdiyati dan Kusnadi, 2018).

3) Uji biokimia

Uji biokimia pada bakteri merupakan prosedur yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan identitas biakan murni bakteri hasil isolasi berdasarkan karakteristik fisiologisnya. Bagian biokimia berhubungan erat dengan aktivitas metabolik sel, yaitu proses kimia yang terjadi dalam sel untuk menghasilkan energi atau digunakan dalam sintesis komponen sel serta fungsi-fungsi seluler seperti pergerakan (Pelczar dan Chan, 2010)

Pendekatan untuk memahami karakteristik fisiologis ini melibatkan berbagai pengujian biokimia. Beberapa metode pengujian biokimia meliputi fermentasi karbohidrat, pengujian *Methyl Red*, pengujian *Voges-Proskauer*, pengujian oksidase, pengujian protease, dan sebagainya. Melalui pengujian-pengujian ini, informasi mengenai kemampuan bakteri dalam berbagai proses metabolik dan reaksi kimia dapat diperoleh, membantu dalam identifikasi dan penentuan sifat-sifat unik dari masing-masing bakteri (Indah Sari, 2018).

a) Uji Hidrolisis

Dalam uji hidrolisis pati, medium agar pati digunakan sebagai media yang akan mengandung pati sebagai substrat. Bakteri yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis pati akan membentuk zona bening disekitar koloni mereka setelah

Wasni Az Zahra, 2023

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH BAKTERI SELULOLITIK L2 DAN L4 ASAL LEACHATE PADA MEDIA SERBUK TONGKOL JAGUNG (*Zea mays*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

ditetesi dengan larutan lugol. Hasil positif menunjukkan bahwa bakteri tersebut mengandung enzim amilase yang mampu memecah pati menjadi produk yang lebih sederhana seperti dekstrin. Bakteri ditanam pada medium ini dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Cappucino dan Sherman, 2014).

Pada uji hidrolisis lipid, digunakan medium agar lipid yang mengandung lipid sebagai substrat. Hasil positif terlihat dalam bentuk zona bening disekitar koloni bakteri dan perubahan warna medium lipid di bawah koloni bakteri menjadi merah. Perubahan warna ini terjadi karena asam lemak terbentuk saat lipid dihidrolisis, yang menyebabkan penurunan pH medium. Bakteri ditanam pada medium ini dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Cappucino dan Sherman, 2014).

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan menggunakan medium nutrient gelatin yang mengandung gelatin sebagai substrat. Mikroorganisme yang memiliki enzim proteolitik ekstraseluler yang disebut gelatinase akan mampu menghidrolisis gelatin dalam medium, mengakibatkan medium yang tetap cair setelah inkubasi bahkan saat disimpan pada suhu rendah seperti 4°C. Uji ini melibatkan inokulasi bakteri pada medium gelatin dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diikuti oleh penyimpanan dalam inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit.

Dalam uji hidrolisis kasein, medium yang digunakan adalah *skim milk agar* (SSA). Pada uji ini, bakteri ditanam di atas medium SSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama periode 24 jam. Hasil positif pada uji ini ditunjukkan oleh adanya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri. Zona bening ini mengindikasikan bahwa bakteri memiliki kemampuan untuk menghidrolisis kasein, protein dalam susu

b) Uji Fermentasi

Tujuan dari uji fermentasi adalah untuk menguji kemampuan isolat bakteri dalam melakukan fermentasi karbohidrat. Dalam penelitian ini, terdapat empat jenis gula yang digunakan, yaitu laktosa, sukrosa, dekstrosa, dan glukosa. Uji fermentasi ini melibatkan pemberian indikator *Brom Cresol Purple* (BCP). Proses

Wasni Az Zahra, 2023

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH BAKTERI SELULOLITIK L2 DAN L4 ASAL LEACHATE PADA MEDIA SERBUK TONGKOL JAGUNG (*Zea mays*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pengujian dilakukan dengan cara menginokulasi isolat bakteri ke dalam media yang mengandung gula-gula tersebut, dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hasil positif dalam uji fermentasi ditunjukkan oleh perubahan warna medium. Pada awalnya, media mungkin memiliki warna merah muda atau pink keunguan karena indikator BCP. Namun, jika bakteri mampu melakukan fermentasi karbohidrat, maka medium tersebut akan berubah warna menjadi kuning. Selain itu, adanya produksi gas atau gelembung pada tabung durham juga merupakan indikator positif dari fermentasi karbohidrat oleh bakteri.

c) Tes Susu Litmus

Medium susu litmus adalah medium yang mengandung komponen seperti gula laktosa, protein kasein, vitamin, dan mineral. Pengujian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan enzim-enzim yang berperan dalam komplementasi bakteri. Bakteri yang akan diuji akan diinokulasi ke dalam medium susu litmus, dan kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

Hasil positif dalam pengujian ini ditunjukkan oleh perubahan warna medium. Pada awalnya, medium mungkin memiliki warna biru karena indikator litmus. Namun, jika bakteri memiliki kemampuan untuk memecah gula laktosa dan menghasilkan asam, maka medium tersebut akan mengalami perubahan warna menjadi merah muda. Perubahan warna ini terjadi karena adanya peningkatan keasaman akibat produksi asam oleh bakteri.

d) Uji Reaksi Katalase

Pengujian enzim katalase dilaksanakan dengan cara menanamkan bakteri pada medium nutrient agar dan menginkubasikannya selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, biakan bakteri yang telah tumbuh pada medium nutrient agar diberi tetesan larutan H₂O₂ 23% di atas permukaan koloninya. Hasil yang menggembirakan dikenali dari timbulnya gelembung setelah pemberian H₂O₂, sehingga dapat disimpulkan bahwa organisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Allinya, 2019).

e) IMVIC

IMVIC adalah singkatan dari empat uji biokimia, yaitu *Indole*, *Methyl Red*, *Voges Proskauer*, dan *Citrate*. Uji *Indole* bertujuan untuk menguji apakah bakteri mampu menghasilkan *indole* dari pemecahan asam amino tryptophan. Uji ini melibatkan penggunaan medium *trypton broth*, dimana bakteri ditanam dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil positif ditandai oleh perubahan warna medium menjadi merah muda setelah pemberian reagen Kovac pada kultur. Hasil ini disebabkan oleh reaksi indole yang dihasilkan bakteri dengan reagen Kovac.

Uji *Methyl Red* dilakukan dengan menanam bakteri dalam MR broth dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, *methyl red* ditambahkan ke setiap tabung reaksi yang berisi biakan. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi merah muda, sedangkan hasil negatif ditandai dengan warna kuning.

Uji *Voges Proskauer* (VP) melibatkan penggunaan VP broth. Setelah inkubasi bakteri dalam medium VP broth selama 24 jam, 5 tetes reagen VP broth (yang mengandung KOH) ditambahkan ke kultur lalu dihomogenkan. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah atau merah muda, menunjukkan adanya aseton. Hasil negatif ditunjukkan oleh perubahan menjadi warna tembaga atau tidak ada perubahan sama sekali.

Uji sitrat dilakukan untuk menguji apakah mikroorganisme dapat menggunakan sitrat sebagai sumber energi. Bakteri yang memiliki kemampuan ini dapat tumbuh pada medium *Simmon's Citrate* dan memetabolisme sitrat menjadi piruvat, yang memberikan energi. Hasil positif dalam uji sitrat ditandai oleh perubahan warna medium dari hijau ke biru akibat peningkatan alkalinitas yang dihasilkan dari hidrolisis garam amonium menjadi amonia. Uji sitrat melibatkan inokulasi bakteri pada medium *Simmons citrate agar* dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Aryal, 2018).

f) Uji Produksi H₂S

Untuk mendeteksi produksi H₂S, medium SIM agar (Sulfide, Indole, and

Motility) digunakan. Pada uji ini, bakteri diinokulasi ke dalam medium SIM agar

Wasni Az Zahra, 2023

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH BAKTERI SELULOLITIK L2 DAN L4 ASAL LEACHATE PADA MEDIA SERBUK TONGKOL JAGUNG (*Zea mays*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 kali periode 24 jam. Hasil yang menunjukkan produksi H₂S ditandai dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi hitam. Hal ini mengindikasikan adanya produksi gas hidrogen sulfida (H₂S) oleh bakteri yang bereaksi dengan besi yang terkandung dalam medium, membentuk endapan berwarna hitam (Aryal, 2018).

g) Kebutuhan Oksigen

Tidak semua mikroorganisme bergantung pada oksigen, tetapi hanya sebagian kelompok tertentu. Terdapat dua jenis kebutuhan oksigen pada bakteri, yaitu aerob, dimana mikroorganisme ini memanfaatkan oksigen sebagai akseptor elektron dalam proses respirasi, dan anaerob, di mana bakteri ini tidak memerlukan oksigen. Oksigen pada lingkungan anaerob bisa berubah menjadi H₂O₂ yang bersifat racun bagi bakteri. Bakteri fakultatif aerob adalah mikroorganisme yang mampu bertumbuh baik dalam lingkungan anaerob maupun aerob. Sedangkan mikroorganisme aerofilik membutuhkan oksigen dalam jumlah terbatas karena jumlah oksigen yang berlebihan dapat menghambat aktivitas enzim oksidatif.

Pengujian kebutuhan oksigen dilakukan dengan menanamkan bakteri pada medium nutrient agar. Medium tersebut kemudian ditutup dan diberi lapisan parafin agar udara tidak dapat masuk ke dalam medium. Hal ini dilakukan untuk menghasilkan kondisi lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan oksigen bakteri yang diuji (Hamdiyati dan Kusnadi, 2018).

h) Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara menanamkan bakteri pada medium nutrient agar melalui teknik tusukan dan kemudian mengamati pertumbuhan yang terjadi. Jika bakteri memiliki sifat motil, maka akan terlihat pertumbuhan yang menyebar di sekitar area di mana bakteri diinokulasi. Selain itu, medium nutrient agar juga akan mengalami perubahan warna menjadi keruh.

Perubahan warna menjadi keruh dan pertumbuhan yang menyebar merupakan indikasi bahwa bakteri memiliki kemampuan untuk bergerak secara aktif dalam medium, yang disebut sebagai motilitas. Dengan kata lain, bakteri

mampu bergerak dan menghasilkan pertumbuhan yang tampak seperti garis-garis atau lingkaran yang meluas dari titik inokulasi.

3.5.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri Selulolitik

Pembuatan kurva pertumbuhan digunakan untuk mengidentifikasi fase-fase pertumbuhan bakteri, dengan tujuan untuk menentukan waktu inkubasi yang optimal bagi produksi enzim selulase. Dalam eksperimen ini, dua isolat bakteri selulolitik diinokulasi pada media CMC *broth* 1% sebanyak 15 mL, kemudian ditempatkan dalam shaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C. Setelah itu, 12 mL dari masing-masing kultur ditransfer ke erlenmeyer yang mengandung 120 mL media CMC *broth* dan ditempatkan kembali dalam *shaker*.

Selama percobaan, dilakukan pengambilan inokulum sebanyak 1,5 mL setiap 2 jam untuk mengukur kepadatan sel atau *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm, sesuai dengan metode yang digunakan oleh Baharuddin *et al.* (2014). Pengukuran ini dilakukan hingga nilai OD menurun atau menunjukkan fase kematian bakteri. Dengan data yang diperoleh, kurva pertumbuhan dibuat dengan menghubungkan nilai OD dengan waktu inkubasi, sehingga memvisualisasikan profil pertumbuhan bakteri selama percobaan (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

3.5.8 Pre-treatment Tongkol Jagung dan Delignifikasi

Jagung yang dipakai dalam eksperimen ini ialah jagung yang berusia sekitar 35 hari. Ini karena tongkol muda jagung memiliki kadar selulosa yang lebih tinggi daripada tongkol jagung yang sudah tua (berusia 95 hari). Kadar selulosa diperkirakan sekitar 43,5% pada tongkol jagung muda, berbeda dengan tongkol jagung tua yang diperkirakan hanya memiliki kadar sekitar 36,2%. (Mango *et al.*, 2004).

Jagung manis (*Zea mays saccharata*) adalah tumbuhan berasal dari benua Amerika dan telah lama diakui serta dikembangkan di Indonesia. Sebagai produk pertanian, jagung manis sangat diminati oleh masyarakat karena cita rasanya yang manis dan lezat, serta kandungannya yang melibatkan karbohidrat, lemak, dan jumlah

protein yang terbatas. Inilah yang menyebabkan meningkatnya kebutuhan akan jagung manis (Dewi dan Kusumiyati, 2016).

Jagung (*Zea mays*) dengan varietas *saccharata* diperoleh dari perkebunan jagung di Desa Karangmangu, Kecamatan Kramatmulya, Kabupaten Kuningan, Jawa Barat. Buah jagung dipipil hingga hanya tersisa tongkolnya. Kemudian dilakukan proses pemotongan, pencucian, dan pengeringan selama 3 hari menggunakan oven pada suhu 70°C hingga berat tongkol jagung stabil. Setelah dikeringkan, tongkol jagung dihancurkan menjadi serbuk menggunakan blender dan disaring dengan saringan berukuran 100 mesh.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Argo *et al.* (2016), mereka melakukan penyaringan serbuk jerami padi dengan ukuran 20, 50, dan 100 mesh, lalu serbuk jerami ini dijalani proses delignifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada penyaringan dengan ukuran 100 mesh, kandungan selulosa dan hemiselulosa lebih tinggi, sementara kadar lignin menurun jika dibandingkan dengan ukuran penyaringan 50 dan 20 mesh. Dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa semakin halus ukuran penyaringan, maka konsentrasi selulosa dan lignoselulosa lebih tinggi. Hal ini terjadi karena semakin kecil ukuran serbuk jerami, permukaannya menjadi lebih luas, yang pada gilirannya memperbesar pengaruh *pre-treatment* untuk memutuskan ikatan lignin.

Langkah berikutnya dalam proses adalah delignifikasi yang dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama melibatkan pencucian menggunakan larutan 2 N NaOH pada suhu ruang. Setelah tahap ini selesai, dilanjutkan dengan tahap kedua, yaitu pencucian menggunakan larutan 0,1 N H₂SO₄ pada suhu ruang hingga pH 7. Dalam proses ini, rasio pencucian yang digunakan adalah 1:10 (berdasarkan berat tongkol jagung terhadap volume cairan pencuci) sesuai dengan metode yang diterapkan oleh Allinya pada tahun 2019. Setelah kedua tahap pencucian selesai, langkah selanjutnya adalah pencucian dengan air hingga pH mencapai netral.

3.5.9 Produksi Enzim Secara Submerged Fermentation (SmF)

Sebelum menjalankan produksi enzim melalui Fermentasi *Submerged* (SmF), jumlah 1 ose (unit koloni pembentuk koloni) dari bakteri selulolitik diinokulasi ke dalam 25 mL *Nutrient Broth* (NB) dalam labu Erlenmeyer berukuran 250 mL yang sebelumnya telah disterilkan. Kemudian, inokulum ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan putaran 120 rpm, sesuai dengan studi oleh Shahid *et al.* pada tahun 2016.

Tahap produksi enzim melalui Fermentasi *Submerged* membutuhkan 25 mL medium fermentasi yang mengandung 1 gram *yeast extract*, 2 gram sukrosa, 1 gram K₂HPO₄, dan 0,01 gram FeSO₄ per liter. Medium ini juga mengandung 0,5 mL larutan garam basal (10 gram NaNO₃, 2,5 gram KCl, 2,5 gram MgSO₄, dan 50 mL air distilasi) sesuai dengan metode yang diterapkan oleh Kumar *et al.* pada tahun 2009. Selanjutnya, 2% (berat per volume) serbuk tongkol jagung yang sudah melalui tahap perlakuan ditambahkan ke dalam medium, dan semua bahan dimasukkan ke dalam tabung berukuran 100 mL. Kemudian, tabung tersebut disterilkan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

Setelah proses sterilisasi selesai, labu Erlenmeyer yang berisi medium fermentasi dibiarkan pada suhu ruang hingga mendingin. Selanjutnya, 1% dari inokulum kultur bakteri selulolitik yang memiliki densitas 10⁶ CFU/mL diinokulasi ke dalam medium fermentasi. Setelah inokulasi dilakukan, medium fermentasi diinkubasi selama 0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi sebesar 150 rpm, sesuai dengan metode yang digunakan oleh Shahid *et al.* pada tahun 2016, Sreedevi *et al.* pada tahun 2013, dan Phong *et al.* pada tahun 2017.

Pada setiap interval waktu fermentasi (0, 24, 48, 72, 96, 120 jam), sampel dari media fermentasi diambil dan disaring menggunakan kertas saring tipe Whatman no.1. Kemudian, sampel tersebut menjalani proses sentrifugasi selama 15 menit pada suhu 40°C dengan kecepatan 3500 rpm. Setelah sentrifugasi selesai, diperoleh ekstrak kasar enzim dalam bentuk partikel bening (supernatan) (Sholihati *et al.*, 2015)

3.5.10 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Dalam pembuatan larutan standar glukosa, digunakan berbagai konsentrasi seperti 100, 200, 250, 300, 350, 400, dan 450 ppm glukosa. Langkah pertama adalah membuat larutan stok glukosa dengan konsentrasi 1000 ppm. Ini dilakukan dengan melarutkan 0,05 gram glukosa ke dalam 50 mL aquades (air murni). Setelah itu, larutan stok glukosa dengan konsentrasi 1000 ppm ini diencerkan dan dibagi menjadi berbagai konsentrasi yang diinginkan sesuai dengan kebutuhan (Allinya, 2019).

3.5.11 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dalam konteks penelitian enzim bertujuan untuk mengukur konsentrasi glukosa dalam sampel secara akurat. Kurva standar glukosa berfungsi sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi glukosa dalam sampel menggunakan metode kalibrasi. Dalam metode kalibrasi, konsentrasi glukosa dalam sampel diukur dengan membandingkannya terhadap konsentrasi glukosa dalam standar yang sudah diketahui. Dengan memanfaatkan informasi dari kurva standar, peneliti dapat menghitung konsentrasi glukosa yang tepat dalam sampel berdasarkan respons yang diberikan oleh sampel terhadap metode analisis yang digunakan (Van der Voort *et al.*, (2006).

Dalam penelitian mengenai enzim, pembuatan kurva standar glukosa berguna untuk mengukur efektivitas suatu enzim dalam memfasilitasi reaksi glukosa. Kurva standar glukosa membantu dalam menilai jumlah glukosa dalam sampel sebelum dan sesudah reaksi enzimatik, yang nantinya digunakan untuk mengestimasi kecepatan reaksi enzim (Van der Voort *et al.*, (2006).

Pembuatan kurva standar glukosa juga memiliki manfaat dalam menilai kinerja suatu metode analisis kimia untuk mengukur konsentrasi glukosa. Sebagai contoh, dapat digunakan untuk mengevaluasi kinerja metode spektrofotometri dalam mengukur konsentrasi glukosa dalam sampel (Van der Voort *et al.*, (2006).

Rangkaian larutan standar glukosa dibuat dengan konsentrasi berturut-turut 100, 200, 250, 300, 350, 400, dan 450 ppm. Dari setiap konsentrasi tersebut, diambil 1 mL larutan yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, 1 mL reagen

DNS (*Dinitrosalicylic acid*) ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan menggunakan perangkat vorteks. Campuran dalam tabung reaksi, yang mengandung glukosa dan reagen DNS, dipanaskan selama 5-15 menit sampai larutan mengalami perubahan warna menjadi merah-coklat.

Selanjutnya, 1 mL larutan KNa-tartrat ditambahkan dan sampel didinginkan. Lalu, ditambahkan aquades hingga volume total mencapai 10 mL, dan campuran dihomogenkan kembali menggunakan perangkat vorteks. Kemudian, absorbansi dari setiap larutan dengan konsentrasi glukosa yang berbeda diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Andriani, 2022).

3.5.12 Pengukuran Parameter

1) Biomassa bakteri selulolitik

Metode pengukuran *Optical Density* (OD) digunakan untuk menilai populasi bakteri selama proses fermentasi. Dalam langkah ini, diambil 1 mL medium fermentasi dari setiap sampel dan ditempatkan dalam kuvet. Sebagai perbandingan, kuvet lain diisi dengan aquades sebagai referensi kosong, kemudian nilai penyerapan cahaya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang cahaya 610 nm (Lizayana *et al.*, 2016).

2) Uji aktivitas enzim selulase

Aktivitas enzim selulase dinilai melalui interaksi antara 0,5 mL larutan CMC 1% (tercampur dalam 0,05 M buffer sitrat pH 5) dan 0,5 mL larutan enzim, yang kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, sejumlah 1,5 mL larutan DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan dijelaskan dalam penangas air selama 10 menit. Setelah sampel mendingin, dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang cahaya 540 nm. Jumlah gula yang dihasilkan diidentifikasi berdasarkan standar glukosa yang ada. Aktivitas selulase diukur dalam satu unit, yang didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit. Berikut adalah rumus untuk menghitung aktivitas enzim selulase.

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{\text{konsentrasi gula pereduksi} \times F_p \times 10}{t \times \text{BM Glukosa}}$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

t = waktu inkubasi (30 menit)

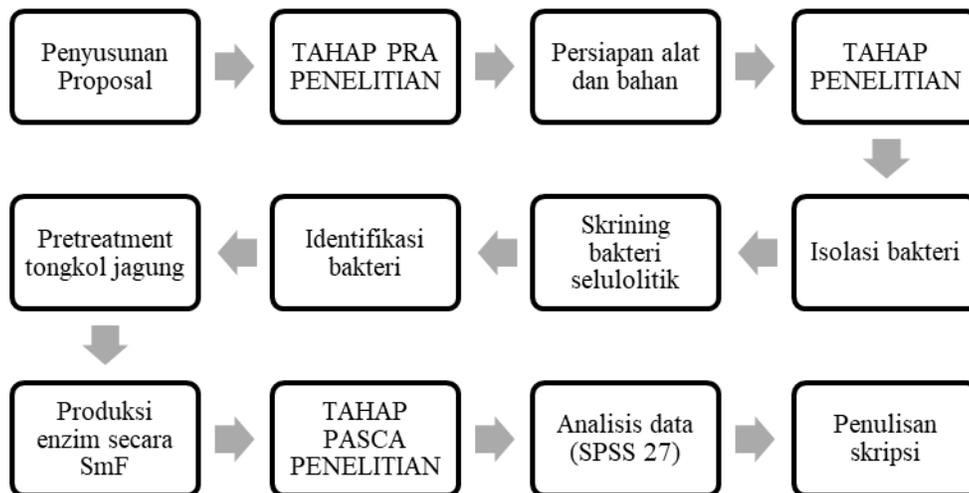
BM = BM glukosa (180 dalton)

3.6 Analisis Data

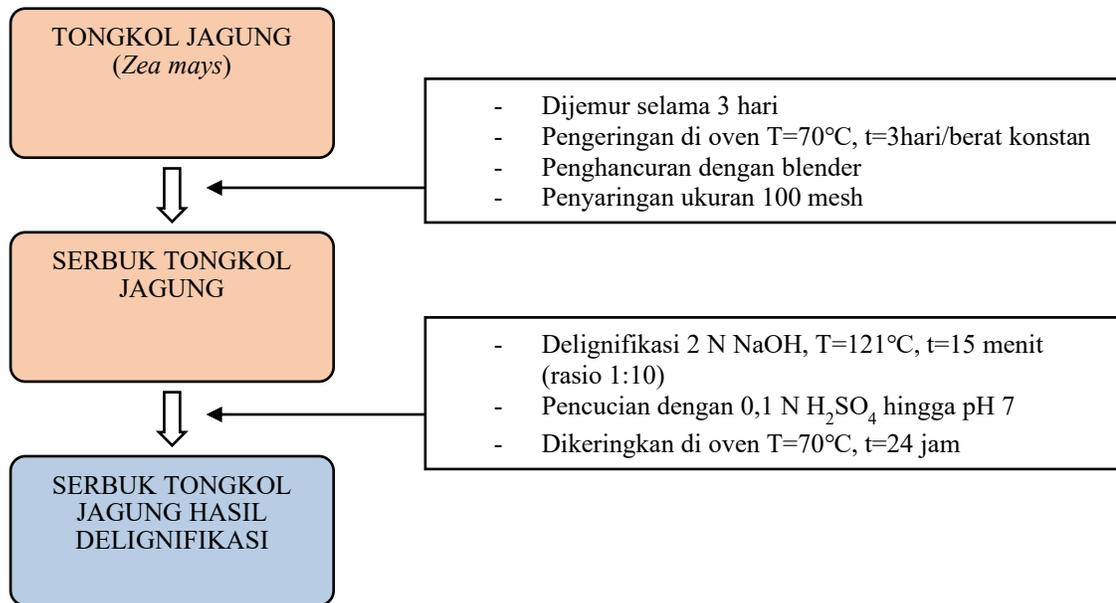
Program SPSS 27 *for Windows* digunakan untuk menganalisis data dalam penelitian ini. Langkah pertama melibatkan uji normalitas dan uji homogenitas data. Jika data yang diperoleh memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, maka dilakukan uji *Two Way ANOVA (Analysis of Variance)*. Namun, jika data tidak memenuhi syarat homogenitas, maka digunakan uji non-parametrik yaitu uji Mann-Whitney.

3.7 Alur Penelitian

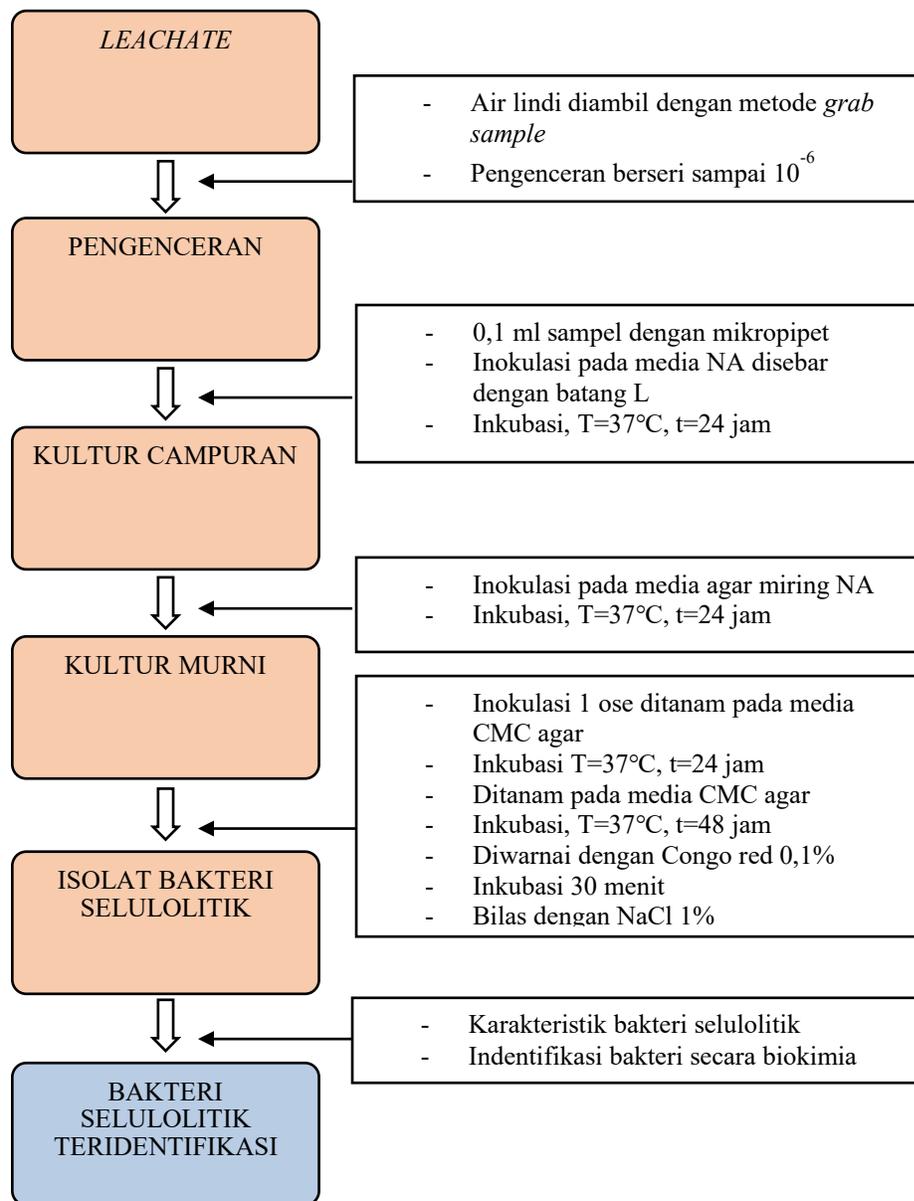
Alur penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut.



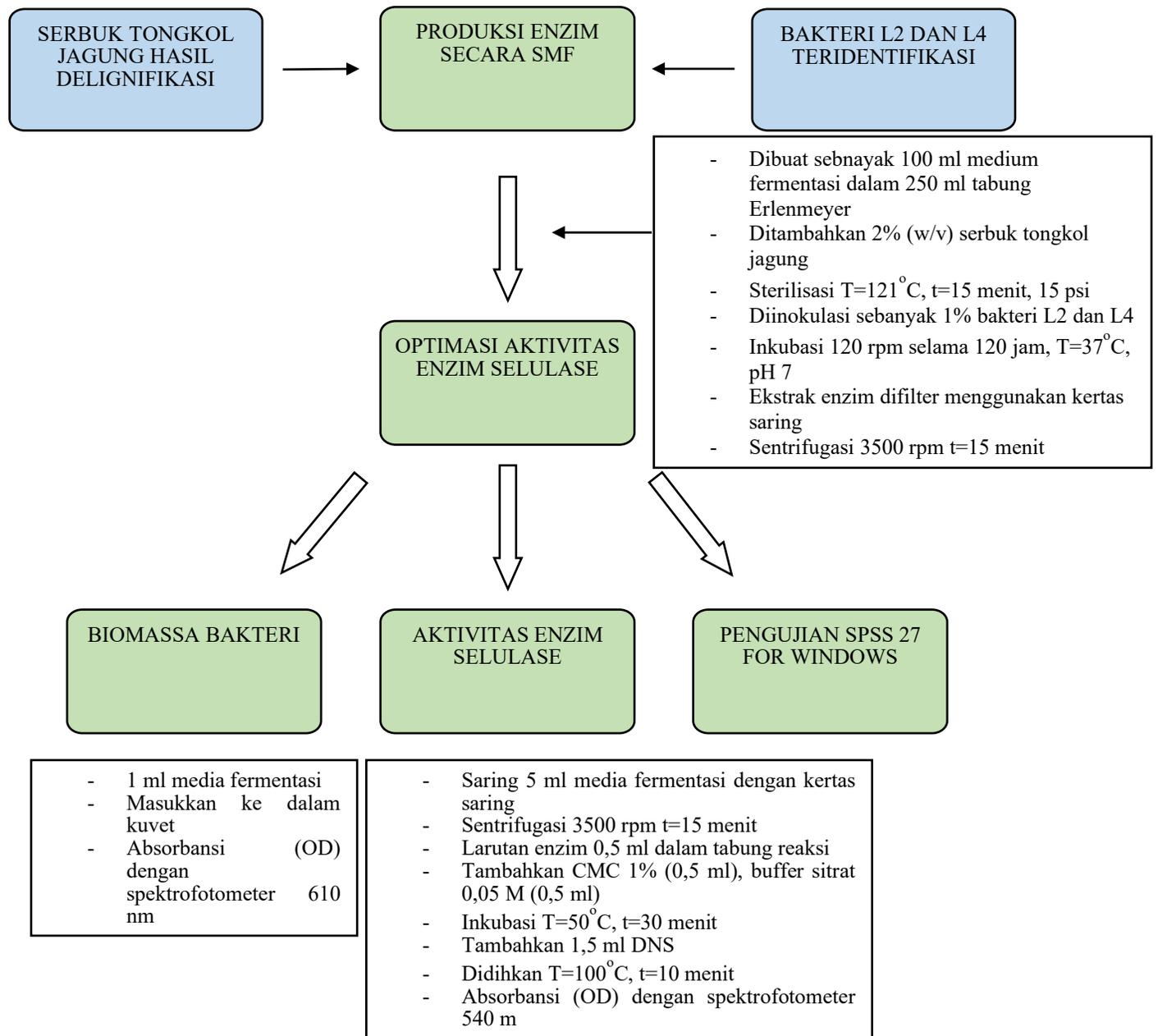
Gambar 3. 1 Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Alur Kerja *Pre-treatment* pada Tongkol Jagung (*Zea mays*)



Gambar 3.3 Alur Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri selulolitik L2 dan L4 asal *leachate*



Gambar 3.4 Alur Kerja Produksi Enzim Selulase Ekstrak Kasar dengan Metode Fermentasi SmF menggunakan Media Serbuk pada Tongkol Jagung (*Zea mays*)