

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Metode eksperimental kuantitatif dilakukan dalam penelitian ini dengan tujuan untuk menyelidiki korelasi sebab-akibat faktor yang independen, yaitu konsentrasi substrat terhadap variabel dependen, yakni jumlah gula hidrolisat yang dihasilkan dan jumlah sel. Dalam pendekatan eksperimental ini, faktor-faktor independen tersebut akan diatur dan dimanipulasi untuk menentukan dampak pada variabel terikat (Apuke, 2017).

3.2. Desain Penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) dipilih karena homogenitas lingkungan penelitian dan kondisi bahan percobaan. Desain penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap) memastikan bahwa semua perlakuan yang direncanakan akan diterapkan secara keseluruhan, dan setiap percobaan memiliki kesempatan yang sama untuk menerima perlakuan secara acak.

3.3. Populasi dan Sampel

Isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari air lindi Tempat Pembuangan Sampah Sementara (TPS) Pasar Gegerkalong digunakan sebagai populasi dalam penelitian ini. Sementara itu, isolat bakteri selulolitik dengan Indeks Selulolitik (IS) tertinggi dipilih sebagai sampel penelitian.

3.4. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Januari hingga Juli 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi dan Laboratorium Pembelajaran Mikrobiologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia yang berlokasi di Jalan Dr. Setiabudi No. 299, Bandung, Jawa Barat.

3.5. Prosedur Kerja

Penelitian dimulai dengan persiapan alat dan bahan, dilanjutkan dengan pengambilan sampel, pembiakan dan seleksi bakteri, identifikasi bakteri, pembuatan kurva tumbuh dan standar jumlah sel bakteri, pembuatan gula standar, praperlakuan limbah jerami yang mencakup proses delignifikasi, dan fermentasi secara SmF

3.5.1. Persiapan Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini sudah melewati proses sterilisasi secara aseptik. Alat dan bahan sebelum disterilkan dengan autoklaf 121 °C (All American model No.75) dipastikan dibungkus dengan kertas, plastik, serta tertutup rapat. Alat kaca dan bahan disterilisasi dengan autoklaf 121 °C selama 15 menit. Inkubator yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada medium serta dalam proses fermentasi SmF dalam penelitian ini adalah inkubator Gallenkamp pada suhu 37°C. Alat dan bahan dalam penelitian ini tersedia di Laboratorium Riset dan Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Secara lengkap, daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini beserta merek dapat dilihat pada Lampiran 1.

Limbah jerami (*Oryza sativa* L.) kering didapatkan dari lahan persawahan Cipageran, Cimahi Utara, Kota Cimahi pada Februari 2024. Sebanyak 500 gram jerami digunakan dalam penelitian ini, dicuci terlebih dahulu sebelum masuk ke tahap praperlakuan.

3.5.2. Sampling dan Isolasi

Pengambilan sampel air lindi dilakukan dengan metode “*grab sampling*” secara instan di lokasi yang telah ditentukan. Sampel air lindi di ambil menggunakan 10 mL vial steril dari permukaan air hingga dasar tanah (Garcete *et al.*, 2022). Sampling dilakukan di lokasi TPS Gegerkalong, Jl. Gegerkalong Tengah No.35 A, Gegerkalong, Kecamatan Sukasari, Kota Bandung, Jawa Barat, dengan kode pos 40153 pada Februari 2024.

Isolasi bakteri dari air lindi dilakukan pada hari yang sama dengan pengambilan sampel. Metode ini mengikuti langkah kerja Cappuccino dan Natalie (2014). Sebanyak 1 mL air lindi dalam 9 mL larutan NaCl 0,85% sebagai garam fisiologis divorteks sehingga diperoleh pengenceran pertama, yaitu 10^{-1} . Pengenceran dilakukan bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-10} (Masngut, Manap, Man, dan Shaarani, 2017). Pengenceran bakteri yang digunakan untuk isolasi bakteri dalam pengenceran ini adalah 3 seri pengenceran terakhir, yaitu 10^{-8} , 10^{-9} , dan 10^{-10} . Sebanyak 0,1 mL secara aseptik, hasil ketiga pengenceran

tersebut diinokulasikan dengan menggunakan metode sebaran (*spread plate*) ke medium CMC Agar pada cawan petri yang dapat dilihat pada Lampiran 5. Medium inokulasi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dalam inkubator (Gallenkamp). Koloni bakteri yang memiliki morfologi berbeda kemudian dipisahkan menjadi kultur murni pada medium KNA miring.

3.5.3. Pemiakan isolat bakteri

Pemiakan bakteri dilakukan pada 3 medium berbeda

1. Kaldu Nutrisi Agar (KNA) dan *Nutrient broth* (NB) dibuat dari campuran ekstrak daging, pepton, agar, dan bahan lain seperti gula, vitamin, dan mineral. Perbedaan utama antara kedua medium adalah konsistensi fisik, KNA berbentuk padat sementara NB cair
2. CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) Agar dibuat dengan komposisi: Agar 1,8 gr; Glukosa 0,1 gr; ekstra yeast 0,2 gr; CMC 1 gr. Serta KNO₃, 0,075 gr; MgSO₄. K₂HPO₄, 0,05 gr; FeSO₄.7H₂O, 0,002 gr; CaCl₂.2H₂O, 0,004 gr; 7H₂O, 0,02 g. dalam 100 mL aquades. Medium ditaruh pada autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 15 menit (Siruwahni dan Rasyidah, 2023)
3. Medium fermentasi digunakan dalam metode SmF untuk menghasilkan enzim dari bakteri uji. Enzim dikorelasikan dengan konsentrasi gula hidrolisat yang terbentuk. Medium ini digunakan untuk melihat waktu fermentasi optimal, jumlah sel maksimal, serta konsentrasi gula hidrolisat yang terbentuk selama uji fermentasi. Serbuk jerami padi 5 dan 10% (b/v) digunakan sebagai substrat dalam medium fermentasi.

3.5.4. Seleksi Bakteri Selulolitik

Seleksi bakteri selulolitik memodifikasi metode penelitian Arifin, Gunam, Antara, dan Setiyo (2019) menggunakan medium CMC (*Carboxymethyl Cellulose*). Isolat bakteri selulolitik murni yang telah didapatkan kemudian dilanjutkan untuk diseleksi pada medium CMC Agar. Strain bakteri digoreskan pada plat Agar berisi 1% CMC dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dalam inkubator (Gallenkamp). Setelah itu, dilakukan pewarnaan medium dengan penuangan reagen *Congo red* 0,1% dan dibiarkan 20 menit. Setelah itu, medium dibilas dengan NaCl 1M. Aktivitas enzim dihitung sebagai diameter koloni ditambah zona jernih di sekitar, dibagi

dengan diameter koloni. Hanya isolat yang menghasilkan zona bening di sekitar koloni yang dipilih untuk pengukuran indeks selulolitik dengan rumus:

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

(Nababan, Gunam, dan Wijaya, 2019)

3.5.5. Identifikasi bakteri Selulolitik

Identifikasi bakteri selulolitik dilakukan berdasarkan morfologi, pewarnaan dan sifat biokimia mengikuti buku *Microbiology: A Laboratory Manual* oleh Cappuccino dan Natalie (2014).

3.5.5.1. Karakterisasi morfologi bakteri

Karakterisasi morfologi untuk bakteri selulolitik mengikuti langkah dari Cappuccino dan Natalie (2014). Bentuk, warna, elevasi, dan margin bakteri diamati secara makroskopis

3.5.5.2. Pewarnaan bakteri

Pewarnaan dilakukan untuk mengidentifikasi karakter fisiologis bakteri selulolitik..

1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram mengikuti instruksi dari Cappuccino dan Natalie (2014), isolat bakteri berumur 24 jam diletakan di atas kaca objek sebagai apusan. Larutan kristal violet ditambahkan pada apusan selama 3 menit. Kemudian, apusan dibilas dengan air dan dilanjut dengan ditambahkan larutan lugol selama 1 menit. Apusan dibilas kembali dengan air dan ditambahkan etanol 96% untuk peluntur selama beberapa detik. Untuk penghilangan kandungan etanol, apusan dibilas kembali dengan air dan ditambahkan larutan safranin selama 3 menit. Apusan diamati dibawah mikroskop 1000x.

2. Pewarnaan kapsul

Terdapat dua cara pewarnaan kapsul bakteri yang umum digunakan, yaitu cara pewarnaan negatif dengan larutan

nigrosin dan cara pewarnaan positif dengan kristal violet. Larutan CuSO₄ 20% digunakan untuk fiksasi selama 5-7 menit. Kaca objek dibilas dengan larutan pewarna lain, seperti larutan safranin, guna memberi warna kontras pada latar belakang. Apusan diamati dibawah mikroskop 1000x (Cappuccino dan Natalie, 2014)

3. Pewarnaan endospora

Metode pewarnaan dilakukan dengan metode Schaeffer-Fulton sesuai langkah Cappuccino dan Natalie (2014). Apusan ditetaskan larutan *malachite green* 5% dan diletakkan di atas air mendidih selama 5-10 menit. Kelebihan warna dibuang dan ditambahkan larutan safranin selama 30 menit sebelum dibilas dan dibiarkan mengering. Apusan diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran 1000x.

3.5.5.3. Uji biokimia

Uji Biokimia untuk mengkarakterisasi bakteri selulolitik mengikuti pedoman metode Cappuccino dan Natalie, (2014). Dalam penelitian ini, uji biokimia terdiri dari uji hidrolisis yang terdiri dari uji hidrolisis pati, lipid, kasein, dan gelatin, uji fermentasi yang terdiri dari fermentasi sukrosa, laktosa, glukosa, dan dekstrosa, uji reaksi katalase, IMVIC yang terdiri dari uji indol, *Methyl red*, *Voges-Proskauer*, dan Sitrat, tes susu litmus, uji produksi H₂S, dan uji motilitas bakteri.

1. Uji hidrolisis

Uji hidrolisis bakteri selulolitik melibatkan pengujian untuk melihat kemampuan bakteri untuk menguraikan senyawa-senyawa tertentu, yaitu pati, lipid, kasein, dan gelatin. Bakteri ditumbuhkan pada 4 medium pengujian (medium agar pati, agar lipid, *nutrient* gelatin, dan susu skim agar) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

dalam inkubator (Gallenkamp) (Cappuccino dan Natalie, 2014).

2. Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan dengan empat jenis gula: sukrosa, laktosa, glukosa, dan dekstrosa, yang melibatkan indikator *Brom Cresol Purple* (BCP). Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam masing-masing medium yang berisi gula tersebut, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator (Cappuccino dan Natalie, 2014).

3. Tes Susu Litmus

Tes diawali dengan menginokulasikan isolat bakteri pada medium susu litmus. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator (Gallenkamp) (Cappuccino dan Natalie, 2014)

4. Uji Reaksi Katalase

Biakan bakteri berusia 24 jam ditumbuhkan pada medium KNA pada suhu 37 °C dalam inkubator selama 24 jam, lalu diteteskan larutan H₂O₂ 23% (Cappuccino and Natalie, 2014). Hasil positif akan ditandai kemunculan gelembung pada koloni, sedangkan hasil negatif tidak menunjukkan terdapat gelembung pada koloni

5. Uji IMVIC

Uji IMVIC (*Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, dan Citrat*) adalah metode yang terdiri dari 4 pengujian. Metode ini mengikuti instruksi Cappuccino dan Natalie (2014). Satu ose bakteri diinokulasi ke dalam medium uji dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator sebelum diberi reagen *Kovac*. Apabila medium biakan berwarna merah, maka bakteri mampu menghasilkan *indole* dan reaksi bernilai positif

Pengujian *Methyl Red* menggunakan medium MR broth yang diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator. Setelah itu, medium biakan ditetesi *methyl red*. Hasil positif ditunjukkan oleh warna merah muda pada medium tersebut.

Pengujian *Voges-Proskauer* juga dilakukan bersamaan dengan pengujian *Methyl Red*. Bakteri diinokulasi pada medium *VP broth* selama 24 jam dalam inkubator (Gallenkamp) sebelum ditetesi 5 tetes reagen VP (KOH). Perubahan warna menjadi merah menunjukkan reaksi positif yang mengindikasikan pembentukan aseton.

Medium *Simmons citrate Agar* digunakan untuk uji sitrat. Sebanyak 1 ose bakteri diinokulasikan ke dalam medium, diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam inkubator (Gallenkamp). Perubahan warna hijau menjadi biru menunjukkan reaksi positif pada uji sitrat.

6. Uji Produksi H₂S

Pengujian H₂S digabung dengan pengujian *indole* dan motilitas. Dalam pengujian tersebut digunakan medium SIM Agar (*Sulfide, indole, and Motility*). Sebanyak 1 ose bakteri diinokulasikan ke dalam medium dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1-2x 24 jam (Cappuccino dan Natalie, 2014). Hasil positif menunjukkan bahwa bakteri mampu menghasilkan H₂S yang ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi hitam.

7. Motilitas

Biakan bakteri diinokulasikan secara vertikal pada permukaan hingga ke bagian tengah medium SIM Agar. Selanjutnya, tabung yang berisi medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappuccino dan Natalie, 2014).

3.5.6. Pembuatan Kurva Tumbuh

Metode pembuatan kurva tumbuh memodifikasi penelitian Wahyuningsih dan Zulaika (2019). Sebanyak 2 ose bakteri diinokulasikan ke

dalam 100 mL medium NB cair, setelah itu ditempatkan dalam *rotary shaker* dengan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setiap satu jam sekali diambil 1 mL sampel untuk pengukuran *optical density* (OD) mikroba. Pengukuran OD dilakukan pada panjang gelombang 600 nm dengan *spektrofotometer UV-vis* (Yang *et al.*, 2014).

3.5.7. Pembuatan Kurva Standar Jumlah Sel

Kurva standar jumlah sel diperlukan untuk menentukan jumlah sel awal bakteri (Maryanty, Saputra, dan Prasetyo, 2020). Dalam pembuatan kurva standar, diperlukan metode pengenceran untuk menyesuaikan jumlah sel tertentu dengan OD yang ingin ditentukan. Kultur bakteri disiapkan untuk dilakukan pengenceran hingga mencapai tingkat OD tertentu pada panjang gelombang 610nm. Rentang tingkat OD yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,2 hingga 1,2 dengan interval 0,2. Setelah tingkat OD didapat, pengenceran bertingkat dilakukan pada setiap kultur hingga 10^{-10} sebelum dilakukan perhitungan jumlah total bakteri hidup atau *Total Plate Count* (TPC) menggunakan *colony counter*. Tiga urutan terakhir dalam pengenceran digunakan untuk perhitungan TPC.

3.5.8. Praperlakuan Jerami

Praperlakuan jerami dilakukan dengan memodifikasi penelitian dari Omar *et al.* (2017). Setelah dibersihkan dan dipotong hingga 2 mm, jerami kemudian dihancurkan dengan *blender* kering dan dikeringkan dalam oven 70°C selama 3 hari hingga berat konstan. Bubuk jerami disaring hingga mencapai ukuran partikel sekitar 100 *mesh* untuk meningkatkan luas permukaan kontak enzim dengan substrat. Selanjutnya jerami padi direndam dalam NaOH 1% dengan rasio 1:20 (m/v) selama 1 jam dalam *sonicator water bath* (VEVOR) (Soontornchaiboon *et al.*, 2016). Setelah ampas substrat hasil praperlakuan didapatkan, kemudian disaring dan dibilas hingga mencapai pH 7. Kandungan air dihilangkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman no.1*. Ampas jerami tanpa lignin digunakan sebagai komposisi pembuatan medium fermentasi sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan, yaitu 5% dan 10% (b/v).

3.5.9. Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Metode pembuatan larutan standar glukosa memodifikasi penelitian Baharuddin, Patong, Ahmad, dan La nafie (2014) terkait hidrolisis CMC oleh enzim selulase. Konsentrasi glukosa yang digunakan dalam penelitian ini, terdiri dari 50 hingga 400 ppm dengan interval 50 ppm. Larutan induk glukosa 1000 ppm dibuat terlebih dahulu dengan cara menimbang 0,1 gram glukosa dan kemudian dilarutkan dalam aquades hingga mencapai volume 100 mL. Untuk mendapatkan konsentrasi glukosa yang telah ditentukan, larutan induk tersebut dapat diencerkan.

3.5.10. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Metode pengukuran gula hidrolisat memodifikasi penelitian Santi dan Widyaningrum (2022). Setiap konsentrasi gula ditambahkan 1:1 mL asam dinitrosalisilat (DNS), Campuran tersebut kemudian dididihkan selama 5 menit, lalu ditambahkan 0,5 mL Garam Rochelle dan divorteks. Tingkat absorbansi didapat dari pengukuran sampel dengan tambahan DNS pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometri UV-vis (Yang *et al.*, 2014). Hasil kemudian dapat dibuat dalam bentuk grafik untuk menentukan persamaan linear dan regresi.

3.5.11. Produksi Gula Hidrolisat dari Penguraian Enzim yang Dihasilkan secara *Submerged Fermentation* (SmF)

Fermentasi membutuhkan kultur bakteri murni yang telah diinokulasi pada 25 mL NB pada tabung yang telah di sterilisasi. Dalam 25 mL, medium fermentasi (sukrosa 2 gr, K_2HPO_4 1 gr, *yeast extract* 1 gr, dan $FeSO_4$ 0,01 gr/l) mengandung 0,5 mL basal *salt solution* (KCl 2,5 gr, $NaNO_3$ 2,5 gr, $MgSO_4$ 2,5 gr, dan air distilasi 50 mL) pada labu erlenmeyer. Serbuk jerami padi dengan konsentrasi 5% dan 10% (b/v) ditambahkan setelah medium dituang pada botol sesuai perlakuan. Kadar pH disesuaikan dengan medium saat seleksi CMC, yaitu 7. Botol berisi medium fermentasi disterilisasi kembali dalam autoklaf pada suhu 121 °C, 15 psi selama 15 menit (All American Model No.75). Sebanyak 1% bakteri diinokulasikan pada setiap medium fermentasi setelah didinginkan. Medium fermentasi kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Shahid, Mohammad, Chen, Tang, dan Xing, 2016)

3.5.12. Pengukuran Parameter

Pengukuran untuk setiap parameter dilakukan selama proses hidrolisis dengan interval 3 jam selama 24 jam

1. Jumlah sel selulotik

Pengukuran Jumlah sel selulotik memodifikasi metode penelitian Yang *et al.* (2014). Jumlah sel diketahui pada panjang gelombang 610 nm dengan spektrofotometer *UV-vis*. Satu mL medium fermentasi dari setiap sampel dimasukkan ke dalam kuvet. Medium fermentasi, yaitu NB digunakan sebagai kontrol kosong (*blank*).

2. Konsentrasi gula hidrolisat

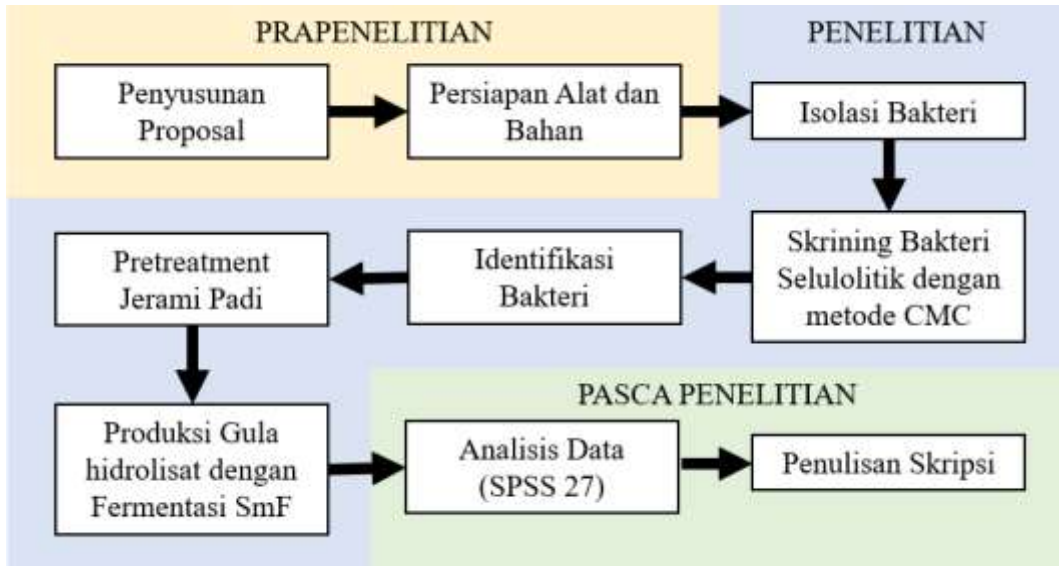
Metode pengukuran gula hidrolisat mengikuti penelitian Santi dan Widyaningrum (2022). Pengukuran konsentrasi gula hidrolisat diukur dengan spektrofotometer. Nilai penyerapan cahaya tampak diukur pada panjang gelombang 540 nm (Kusumaningati, Nurhatika, dan Muhibuddin, 2013). Nilai absorbansi sampel dapat diubah menjadi konsentrasi gula hidrolisat (%) berdasarkan persamaan regresi dari larutan gula hidrolisat standar.

3.6. Analisis Data

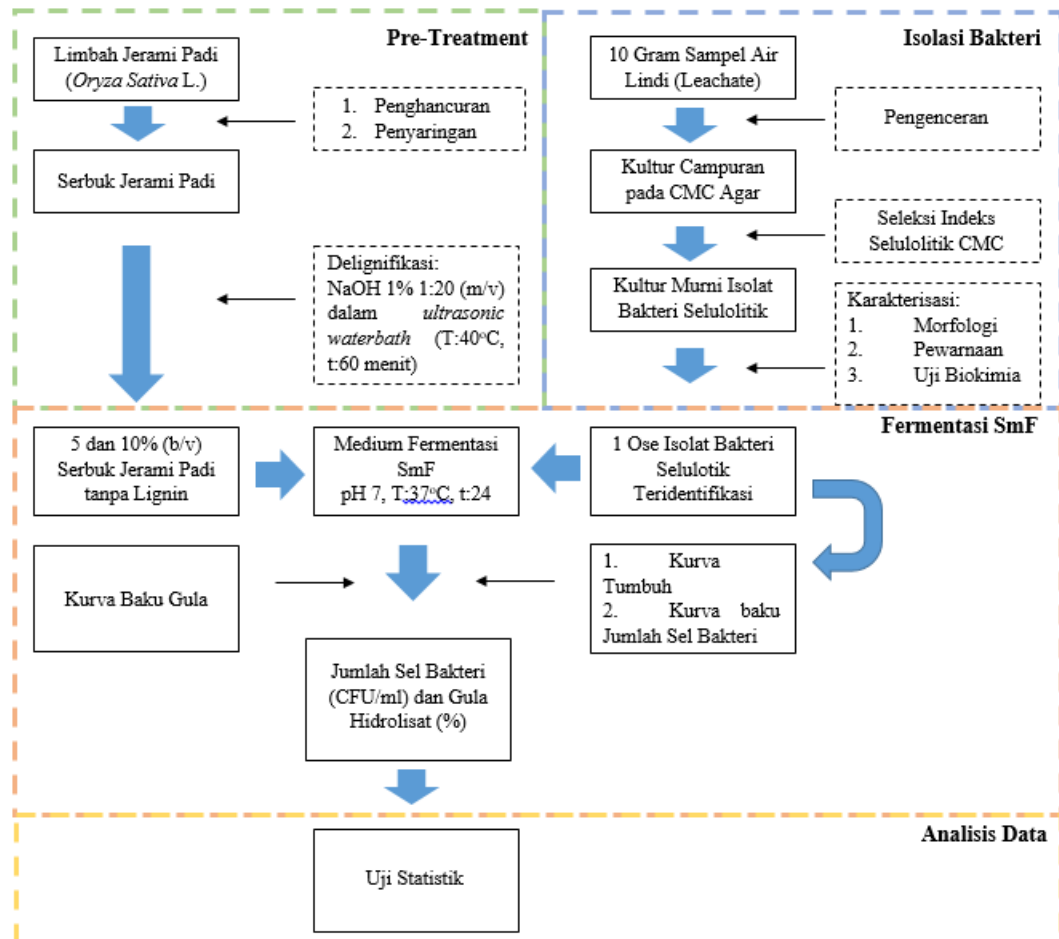
Uji statistik data dilakukan menggunakan program SPSS 22 (IBM) pada *Windows*. Metode *ANOVA two-way* digunakan untuk data yang normal dan homogen, tetapi jika data tidak normal maka digunakan uji non-parametrik, yaitu uji *Friedman*. Apabila ditemukan signifikansi, maka uji lanjutan *Post hoc* dapat dilakukan. Uji *Tukey* dapat dilakukan pasca uji *ANOVA two-way* dan Uji *Dunnett T3* untuk data yang tidak memenuhi syarat uji tersebut.

3.7. Alur Penelitian

Alur penelitian dan langkah kerja dalam penelitian ini secara berurutan dapat dilihat pada Gambar 3.1 dan Gambar 3.2.



Gambar 3.1 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Langkah Kerja Produksi Gula Hidrolisat dari Serbuk jerami padi (*Oryza sativa L.*) oleh Bakteri Selulolitik asal Air Lindi