

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimen. Penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh dari perlakuan tertentu yang diberikan terhadap suatu sampel uji dalam kondisi yang terkendalikan (Sugiono, 2012). Pokok dasar dari jenis penelitian ini yaitu mencoba sesuatu dan mengamati dengan sistematis apa yang terjadi. Pada penelitian eksperimen ini memiliki suatu kondisi yang dapat dibandingkan bertujuan untuk menguji efek-efek dari kondisi tertentu atau “treatment”.

Perlakuan tertentu yang diberikan pada penelitian ini yaitu perbedaan pH dan suhu. Sedangkan parameter yang diukur yaitu aktivitas enzim, biomassa bakteri dan gula pereduksi.

#### **3.2 Desain penelitian**

Perbedaan perlakuan yang diberikan terhadap sampel uji dalam penelitian ini yaitu perbedaan variable pH dan suhu yang digunakan. Variabel yang akan terpengaruh dari perlakuan yang diberikan ini yaitu variabel biomassa sel bakteri, gula pereduksi, dan aktivitas enzim.

Penelitian ini terdiri dari tiga tahapan utama, yang pertama yaitu tahapan persiapan meliputi semua kegiatan dalam mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, pengumpulan sampel rayap kayu (*Cryptotermes* sp.), mengumpulkan jerami padi (*Oryza sativa*, Linn) dan persiapan pembuatan medium subkultur. Tahapan yang kedua adalah tahapan isolasi, identifikasi, dan seleksi bakteri selulolitik. Pada tahapan ini bakteri diisolasi dari saluran pencernaan rayap yang selanjutnya disubkultur, dilakukan identifikasi bakteri meliputi pengamatan morfologi, pewarnaan, dan uji biokimia. Tahapan ini dilanjutkan dengan seleksi bakteri selulolitik menggunakan media selektif CMC, setelah didapatkan bakteri selulolitik dengan zona bening yang baik selanjutnya dibuat kurva tumbuh dari bakteri selulolitik R3-1 untuk mengetahui fase pertumbuhan

dari bakteri tersebut. Tahapan terakhir dari penelitian ini adalah tahap optimasi dan produksi enzim selulase dengan menggunakan perbedaan parameter pH dan suhu menggunakan metode SmF dengan parameter yang diukur yaitu gula pereduksi, biomassa sel bakteri dan aktivitas enzim yang dihasilkan.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan pola factorial  $4 \times 6 = 24$  perlakuan dengan tiga kali pengulangan menjadi 72 percobaan. Faktor pertama yaitu perbedaan pH (6,5 dan 7,5) dan suhu (36,5°C dan 37,5°C) yang digunakan. Sedangkan faktor kedua yaitu, waktu pengambilan sampel pada jam ke 0, jam ke 24, jam ke 48, jam ke 72, jam ke 96 dan jam ke 120. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu biomassa sel bakteri, gula pereduksi, dan aktivitas enzim.

### 3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2019 sampai dengan Juli 2019, bertempat di Laboratorium Riset Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA Universitas Pendidikan Indonesia, jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

### 3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri selulolitik hasil isolasi dari saluran pencernaan rayap kayu (*Cryptotermes* sp.). Sampel yang digunakan adalah bakteri selulolitik R3-1.

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

#### a. Alat

Alat-alat utama yang rutin digunakan dalam penelitian ini merupakan alat-alat standar yang biasa digunakan di Laboratorium seperti, *autoclave*, *laminar air flow*, incubator, *incubator shaker*, spektrofotometer UV, *centrifuge*, timbangan digital, *hot plate*, *vortex*, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, cawan petri, pipet tetes, mikropipet, pH universal, oven dan lain-lain serta alat-alat yang digunakan dalam proses analisis produk hasil.

## **b. Bahan**

Bahan-bahan utama yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu rayap kayu (*Cryptotermes* sp.) dan jerami padi (*Oryza sativa*, Linn). Sedangkan bahan-bahan laboratorium yang digunakan meliputi, alkohol, HCl, NaOH, Yeast ekstrak, bubuk CMC, akuades, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, reagen DNS dan bahan lainnya. Media kultur yang digunakan meliputi kaldu nutrisi agar, kaldu nutrisi *Broth* dan media CMC agar.

## **3.6 Prosedur Penelitian**

Prosedur dalam penelitian ini meliputi tiga tahapan yaitu tahapan persiapan merupakan tahap awal yang mempersiapkan segala alat dan bahan steril yang akan digunakan selama proses penelitian. Tahapan kedua meliputi tahapan isolasi bakteri dari saluran pencernaan rayap, tahapan identifikasi dan tahapan seleksi bakteri selulolitik dari saluran pencernaan rayap *Cryptotermes* sp.. Selanjutnya tahapan terakhir yaitu optimasi produksi enzim secara *Submerged Fermentation* (SmF) dengan memberikan perlakuan suhu dan pH yang berbeda. Optimasi produksi dapat dilihat dari aktivitas enzim selulase yang telah dihasilkan.

### **3.6.1 Tahapan persiapan**

Tahap ini meliputi proses persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Pada tahap ini dilakukan proses sterilisasi terhadap alat dan bahan. Bahan yang akan disterilisasi dimasukkan kedalam wadah kaca yang telah dibersihkan sebelumnya, selanjutnya diberi sumbat kasa serta dibungkus rapat menggunakan kertas dan plastik. Begitupula dengan alat yang akan digunakan, dibungkus menggunakan kertas terlebih dahulu agar tetap dalam keadaan kering dan selanjutnya dibungkus rapat menggunakan plastik. Proses sterilisasi dilakukan dengan memasukkan kedalam *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi. Tahapan ini dilakukan di dalam Laboratorium Riset Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

### 3.6.2 Tahapan Isolasi , Identifikasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik

#### 1. Pengambilan Sampel

Persiapan sampel rayap kayu *Cryptotermes sp.* dilakukan dengan mengambil potongan kayu dari kursi yang sudah lapuk dan dihinggapi rayap dari daerah Geger Arum, Kelurahan Isola, Kecamatan Sukasari, Kota Bandung. Selanjutnya dibawa ke Laboratorium Riset Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA Universitas Pendidikan Indonesia.

Rayap dikeluarkan dari kayu dipilih sebanyak 15 ekor dan dipindahkan ke cawan petri, kemudian rayap disterilkan menggunakan alkohol 70%, setelah itu dipisahkan tubuh dan kepalanya. Dari kedua bagian tersebut hanya bagian tubuhnya yang digunakan, selanjutnya dicampur dengan larutan *saline* 0,9% sebanyak 1 ml yang kemudian dihaluskan (Upadhyaya *et al.*, 2012).

#### 2. Isolasi Bakteri Selulolitik

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran cawan tuang untuk memperoleh biakan murni yang diambil dari biakan campuran. Prinsip dari metode ini adalah pengenceran organisme sehingga individu spesies dapat dipisahkan dari spesies lainnya. Dilakukan pengenceran dilusi bertingkat sebanyak enam kali, dengan cara dimasukkan sebanyak 1 ml suspensi hasil ekstrak saluran pencernaan rayap kedalam tabung berisi 9 ml akuades steril, kemudian dihomogenkan dengan cara divorteks sehingga didapatkan pengenceran pertama, tahapan ini dilakukan hingga tingkatan pengenceran ke-6. Setelah didapatkan enam tabung dengan pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-6}$ , secara aseptik sebanyak 0,1 ml hasil pengenceran pada masing-masing tabung kedalam enam cawan petri steril berisi NBA (*Nutrient Broth Agar*) yang sudah padat dan telah diberi label tingkat pengenceran, kemudian disebar secara merata dengan menggunakan batang kaca penyebar steril. Selanjutnya cawan petri tersebut dibungkus oleh kertas dan dimasukkan kedalam plastik untuk mencegah kontaminasi, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Koloni-koloni yang tumbuh dengan karakteristik morfologi yang berbeda dipindahkan

sebanyak 1 ose pada tabung NBA miring untuk diperoleh biakan murninya. (Hadioetomo, 1990).

### 3. Pemiakan Isolat Bakteri

Digunakan tiga media berbeda untuk inokulasi bakteri, diantaranya :

#### 1) NBA (*Nutrient Broth Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Media ini merupakan media umum banyak digunakan untuk pertumbuhan mikroba karena memiliki banyak kandungan N<sub>2</sub>. Media *Nutrient Agar* digunakan untuk isolasi jangka lama atau proses subkultur bakteri sedangkan *Nutrient Broth* digunakan untuk mengkultur dengan melihat fase pertumbuhan bakteri menggunakan spektrofotometer (Dwidjoseputro, 1994).

#### 2) CMC (*Carboxymethylcellulose*) Agar

Media CMC Agar merupakan media selektif dari bakteri selulolitik dan menjadi sumber karbon untuk pengujian zona bening bakteri selulolitik. (Hankin dan Sandra, 1976). Media CMC terdiri dari : MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05 gr/100 ml, NaCl 0,23 gr/100 ml, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 gr/100 ml, *yeast extract* 0,2 gr/100 ml, CMC 1 gr/100 ml dan agar 2,5 gr/100 ml (Ji *et al.*, 2003).

#### 3) Medium Fermentasi

Medium Fermentasi merupakan media biakan dalam pengujian waktu fermentasi, pH optimal, suhu optimal, biomassa sel dan konsentrasi substrat jerami optimal yang selanjutnya akan diambil ekstrak kasar enzim selulasenya untuk dilakukan pengujian aktivitas enzim (Shahid *et.al.*, 2016). Pembuatan dilakukan dengan mencampur (*yeast extract* 1 gr, sukrosa 2 gr, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 gr dan FeSO<sub>4</sub> 0,01 gr/l) mengandung 0,5 ml *basal salt solution* (NaNO<sub>3</sub> 10 gr, kcl 2,5 gr, mgso<sub>4</sub> 2,5 gr dan air distilasi 50 ml (Kumar, 2009). Ditambahkan 2% (w/v) jerami padi, dimasukkan kedalam 250 ml tabung erlenmeyer dan disterilkan menggunakan *autoclave* 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi (Sreedevi *et al.*, 2013).

### 4. Seleksi Bakteri Selulolitik pada Media CMC

Seleksi bakteri selulolitik ini dilakukan dengan melihat indicator adanya zona bening disekitar koloni yang hasilnya akan disajikan pada Tabel 3.1. Sebanyak 1 ose koloni bakteri ditanam pada 50mL media NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam pada *waterbath*, 120 rpm dengan suhu 37°C. Bakteri yang telah di subkultur pada media NB (*Nutrient Broth*) kemudian ditanam pada media selektif CMC dengan metode cakram. Kertas cakram yang digunakan berdiameter ± 6mm dan bakteri yang ditanam pada cakram sebanyak 10µl (Niswah, 2014). Selanjutnya bakteri diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah itu diwarnai dengan *Congo-Red* 0,1% dan diinkubasikan kembali selama 30 menit dan dibilas dengan larutan NaCl 1% (Ji *et.al.*, 2003). Menurut Sinaga (2013) Indeks selulolitik atau zona bening yang dibentuk oleh bakteri selulolitik dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Tabel 3.1

*Karakteristik Pengamatan Indeks Selulolitik*

<b>Parameter Yang Diamati</b>	<b>Hasil</b>
Diameter Zona Bening	
Diameter Koloni	
Indeks Selulolitik	

## 5. Identifikasi Bakteri

Terdapat beberapa tahapan dalam identifikasi bakteri, yaitu pengamatan morfologi, pewarnaan, dan analisis biokimia.

### 1) Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi secara makroskopis dapat dilakukan dengan cara mengamati bentuk dari koloni bakteri seperti bentuk, ukuran, tepian koloni, elevasi dari koloni dan warna koloni (Cappuccino dan Sherman, 2014). Pengamatan morfologi dari bakteri yang dilakukan 7 x 24 jam. Hasil pengamatan morfologi akan disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2  
*Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Selulolitik R3-1*

<b>Karakter Morfologi yang diamati</b>	<b>Hasil</b>
Bentuk	
Warna	
Kenaikan Permukaan	
Tepian	
Kepekatan	

## 2) Proses Pewarnaan

Proses pewarnaan bakteri merupakan proses identifikasi secara mikroskopis dengan melihat bentuk sel bakteri, ukuran sel bakteri dan sifat bakteri terhadap zat warna. Pewarnaan yang digunakan yaitu pewarnaan Gram, pewarnaan sederhana, pewarnaan kapsul, dan pewarnaan endospora dengan tujuan untuk mengetahui karakteristik dari isolate bakteri (Cappuccino dan Sherman, 2014). Hasil pengamatan pewarnaan akan disajikan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3.  
*Tabel Pengamatan Proses Pewarnaan Isolat Bakteri R3-1*

<b>Jenis Pewarnaan</b>	<b>Hasil</b>
Pewarnaan Gram	
Pewarnaan Endospora	
Pewarnaan Sederhana	
Pewarnaan Kapsul	

## 3) Analisis Biokimia

Analisis biokimia bakteri merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi atau mendeterminasi suatu biakan murni melalui sifat-sifat fisiologisnya. Proses biokimia erat kaitannya dengan proses metabolisme sel selama reaksi kimiawi (Hadiutomo, 1990). Terdapat beberapa macam uji

biokimia yaitu uji fermentasi karbohidrat, uji hidrolisis (lipid, gelatin, pati, dan kasein), uji katalase, uji motilitas, reaksi susu litmus, uji produksi H<sub>2</sub>S, uji urease, uji indol, uji methyl red (mr), Uji aktivitas uji voges-proskauer (vp) dan uji simmon's sitrat (Cappuccino dan Sherman, 2014). Hasil pengamatan uji biokimia akan disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4  
*Pengamatan Analisis Biokimia Isolat Bakteri R3-1*

Jenis	Hasil
Fermentasi Dekstrosa	
Fermentasi Glukosa	
Fermentasi Laktosa	
Fermentasi Sukrosa	
Hidrolisis Pati	
Hidrolisis Lipid	
Hidrolisis Gelatin	
Uji Katalase	
Uji Motilitas	
Produksi Nitrat	
Tes Oksidase	
Uji Produksi H <sub>2</sub> S	
Uji Indol	
Uji Methyl Red	
Uji Voges-proskauer	
Uji simmon's sitrat	

Identifikasi bakteri dari hasil analisis biokimia mengacu pada buku  
*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two.*

### 3.6.3 Tahapan Optimalisasi Produksi Enzim

#### 1. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri *Achromobacter aegrifaciens*

Kurva tumbuh bakteri dilakukan dengan cara membuat stok subkultur bakteri 1 ose pada 25 ml medium NB (*Nutrient Broth*) kemudian diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 37°C dan 120 rpm selama 24 jam. Kepadatan sel atau *Optical Density* (OD) diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600nm. Pengukuran *Optical Density* (OD) dilakukan dengan interval 60 menit selama 24 jam (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

#### 2. Pre-treatment Jerami Padi dan Proses Delignifikasi

Proses *pretreatment* biomassa lignoselulosa merupakan proses pemecahan ikatan lignin, dimana lignin mengikat hemiselulosa dan selulosa. Pretreatment dilakukan untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi monomer gula (Novia, 2014).

Jerami padi (*Oryza sativa*) yang diperoleh dilakukan tahap pencucian, dipotong dan dikeringkan menggunakan oven selama 3 hari dengan suhu 70°C hingga berat jerami konstan. Jerami yang sudah kering kemudian diblender dan disaring dengan ukuran 100 mesh. Selanjutnya proses delignifikasi dilakukan melalui dua tahap, pertama pencucian dengan 0,5 M KOH pada suhu ruang selama 4 jam kemudian pencucian dilanjutkan dengan 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada suhu ruang selama 1 jam, rasio pencucian 1:10 (jerami:pencuci) (Goyal et.al.,2014). Setelah kedua tahap pencucian selesai, dilakukan pembilasan menggunakan air hingga pH netral (Anggarwal et.al., 2017).

#### 3. Produksi Enzim secara SmF

Pembuatan kultur bakteri pada medium NB (*Nutrient Broth*) dibuat sebelum melakukan produksi enzim. Pembuatan kultur dilakukan dengan cara memasukkan 1 ose bakteri R3-1 kedalam 25ml NB pada labu Erlenmeyer 250 ml yang telah disterilisasi, Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam (Shahid et al., 2014).

Produksi enzim secara SmF memerlukan 25 ml medium fermentasi, jerami hasil *pretreatment* sebanyak 2% (w/v) dan telah disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, 15 psi selama 15 menit. Selanjutnya kultur murni bakteri R3-1 dengan densitas bakteri 6 log cells/mL, sebanyak 1% dari jumlah media fermentasi diinokulasikan secara aseptik pada labu erlenmeyer. Setelah proses inokulasi, medium fermentasi diinkubasi pada suhu 36,5°C dan 37,5°C dengan agitasi 150 rpm, proses fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan pengecekan pada tiap interval 24 jam (Sreedevi *et al.*, 2013; Shadid *et al.*, 2016; Phong *et al.*, 2017). Pada setiap interval 24 jam (0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam), aktivitas enzim dihitung dengan cara medium fermentasi disaring menggunakan kertas saring filter Whatman no.1, dilakukan sentrifugasi dengan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatant yang didapatkan dari hasil sentrifugasi merupakan enzim ekstrak kasar yang selanjutnya digunakan untuk pengujian aktivitas enzim selulase (Sholihati *et al.*, 2015).

#### **4. Pengukuran Parameter Optimasi**

##### **a) Biomassa Bakteri Selulolitik R3-1**

Perhitungan biomassa bertujuan untuk mengetahui jumlah bakteri pada proses fermentasi. Masing-masing sampel sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam kuvet. Blanko yang digunakan dalam perhitungan ini adalah aquades. Suspensi tersebut diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali pada sampel masing-masing waktu fermentasi (Lizayana *et al.*, 2016).

##### **b) Uji Aktivitas Enzim Selulase**

Aktivitas dari dilakukan berdasarkan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dengan menambahkan 0,5 ml CMC 1% (disiapkan pada 0,05 M buffer citrate pH 5) dan 0,5 ml enzim selulase yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah inkubasi reaksi dihentikan dengan penambahan 1,5 ml *Dinitro Salicylate Acid* (DNS) dan dididihkan dalam *waterbath* selama 10 menit, kemudian sampel didinginkan dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Ghosh, 1987).

Jumlah gula yang dihasilkan ditentukan dengan standar glukosa. Satu unit aktivitas selulosa didefinisikan sebagai jumlah produksi enzim 1  $\mu\text{mol}$  glukosa per menit. Rumus menghitung aktivitas enzim yang digunakan adalah sebagai berikut (Aryani, 2012). Hasil pengukuran biomassa sel dan aktivitas enzim akan disajikan seperti pada Tabel 3.5.

$$\text{Aktivitas selulase } \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Konsentrasi Gula Pereduksi} \times \text{fp} \times 10}{t \times \text{BM Glukosa}}$$

Keterangan :

FP = Faktor Pengenceran

t = Waktu inkubasi (30 menit)

BM = BM glukosa (180 dalton)

Tabel 3.5  
*Format Pengukuran Biomassa Sel Bakteri Selulolitik dan Aktivitas Enzim*

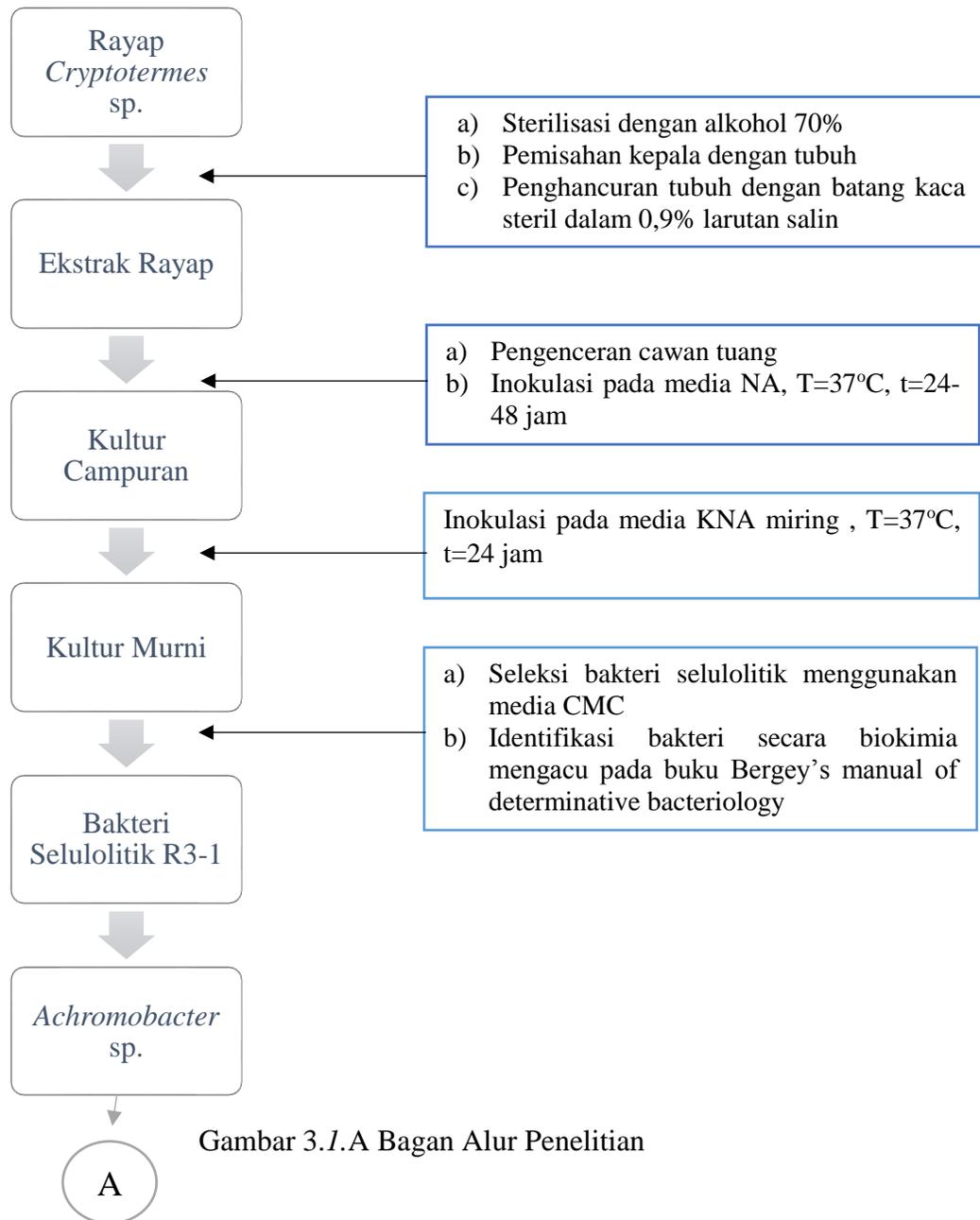
Waktu Pengambilan Sampel	Suhu (36,5°C atau 37,5°C)					
	Biomassa Sel	pH 6,5		Biomassa Sel	pH 7,5	
		Konsentrasi Gula Pereduksi (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)		Konsentrasi Gula Pereduksi (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)
0 Jam						
24 Jam						
48 Jam						
72 Jam						
96 Jam						
120 Jam						

### 3.7 Analisa Statistik

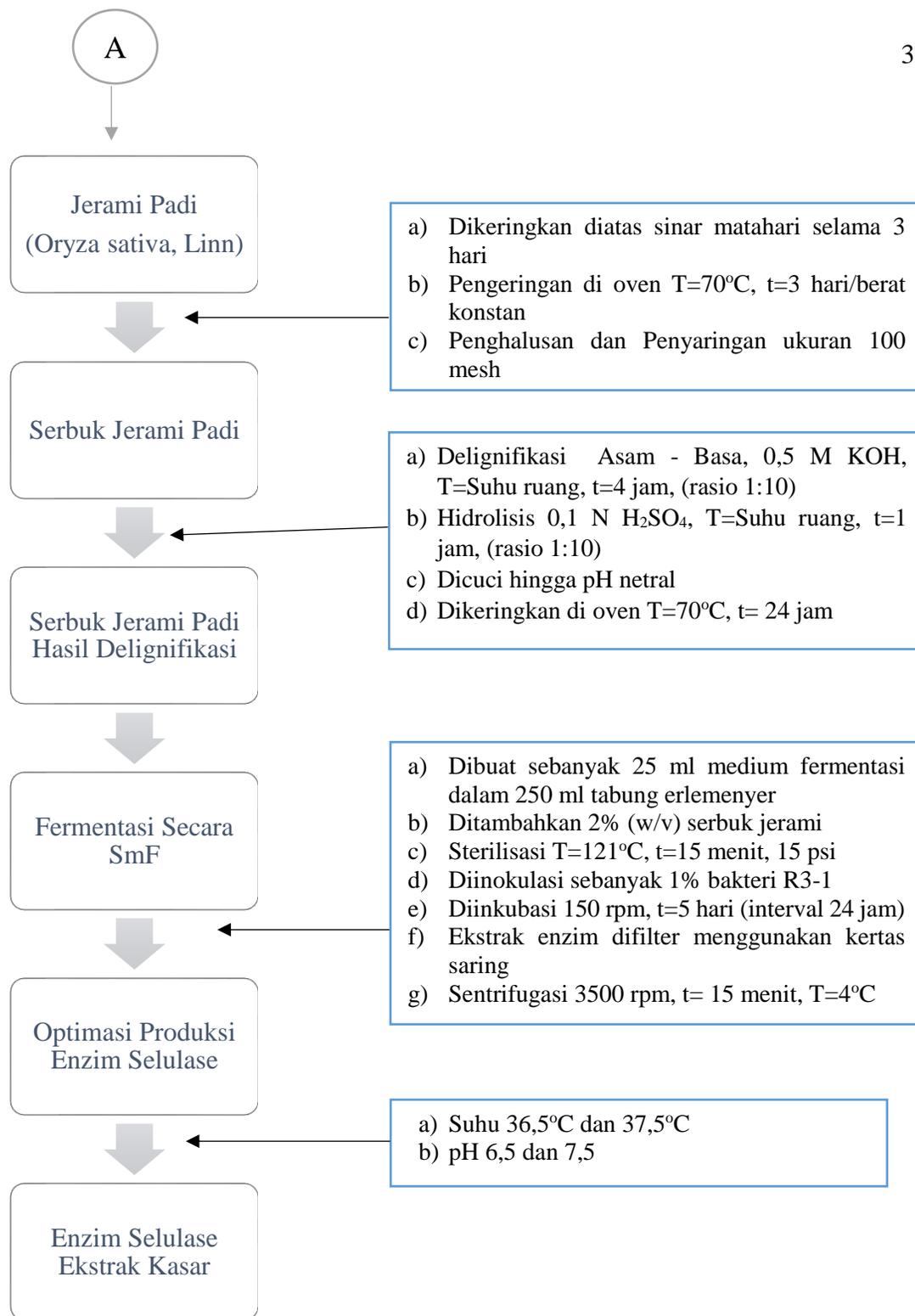
Data yang telah diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis menggunakan SPSS 22 *for Windows* tahap uji normalitas yang dilanjutkan dengan uji homogenitas. Jika data yang diperoleh homogen, maka dilakukan uji Two Way ANOVA (Analysis of Variance), dan jika data tidak homogen dilakukan uji non parametrik yaitu uji Mann-Whitney.

### 3.8 Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan terdiri dari isolasi dan identifikasi bakteri R3-1, pretreatment jerami padi dan optimasi produksi enzim selulase. Adapun keseluruhan tahapan pada penelitian diuraikan oleh Gambar 3.1. A dan Gambar 3.1. B.



Gambar 3.1.A Bagan Alur Penelitian



Gambar 3.1.B Bagan Alur Penelitian