

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif yang bersumber pada buku-buku, artikel-artikel, jurnal, dan literatur-literatur lainnya. Jenis penelitian deskriptif ini digunakan untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran terhadap objek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah terkumpul sebagaimana adanya, tanpa melakukan analisis dan membuat kesimpulan yang berlaku umum (Sugiyono, 2013).

Berkenaan dengan metode pengumpulan data pustaka atau objek penelitiannya dikaji melalui beragam informasi kepastakaan yang bersumber pada buku dan jurnal ilmiah. Penelitian kepastakaan atau kajian literatur (*literature review/literature research*) merupakan penelitian yang mengkaji atau meninjau secara kritis berbagai pengetahuan, gagasan, atau temuan yang terdapat di dalam literatur serta merumuskan kontribusi teoritis dan metodologisnya untuk topik tertentu. Fokus penelitian kepastakaan adalah menemukan berbagai teori, prinsip, atau gagasan yang digunakan untuk menganalisis dan memecahkan pertanyaan penelitian yang dirumuskan. Adapun sifat dari penelitian ini adalah analisis deskriptif, yakni penguraian secara teratur data yang telah diperoleh, kemudian diberikan pemahaman dan penjelasan agar dapat dipahami dengan baik oleh pembaca (Harahap, 2014).

3.2 Desain Penelitian

3.2.1 Penelitian Laboratorik

Pada penelitian laboratorik terdapat dua tahapan utama, yaitu tahap persiapan dan tahap isolasi. Tahapan persiapan meliputi semua kegiatan dalam mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan dan digunakan, sterilisasi alat dan bahan, mengumpulkan limbah jerami padi (*Oryza sativa* L.), dan persiapan pembuatan medium subkultur bakteri. Tahapan kedua yaitu isolasi, seleksi bakteri selulolitik, dan karakterisasi bakteri selulolitik. Bakteri diisolasi dari jerami padi yang nantinya akan dibuat subkultur, selanjutnya melakukan seleksi bakteri selulolitik menggunakan media selektif CMC, setelah didapatkan isolat bakteri

selulolitik yang dilihat dari diameter zona bening yang baik selanjutnya bakteri diidentifikasi dengan mengamati karakteristik morfologi dan melakukan pewarnaan untuk mengamati bentuk sel bakteri.

3.2.2 Penelitian Studi Literatur

Sumber data yang digunakan penelitian ini merupakan data yang diperoleh atau dikumpulkan dari sumber-sumber yang telah dilakukan peneliti sebelumnya. Data yang terkumpul dilakukan berdasarkan pencarian online melalui website *google scholar*. Tahap penelitian studi literatur meliputi pencarian sumber mengenai optimasi produksi enzim selulase oleh bakteri selulolitik dan *pretreatment* menggunakan jerami padi sebagai substrat.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang terdapat pada jerami padi (*Oryza sativa* L.) yang berasal dari limbah pertanian di Desa Cipulus, Kecamatan Ngamprah, Kabupaten Bandung Barat. Selanjutnya sampel penelitian yang digunakan adalah isolat bakteri selulolitik J-1, J-2, J-4, dan J-5 yang diperoleh dari jerami padi (*Oryza sativa* L.) dan telah diuji selulolitiknya.

3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian laboratorik dilakukan pada bulan Desember 2019 sampai dengan Juni 2020 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Biologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia di Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Kota Bandung dan penelitian dilanjutkan studi literatur *Work From Home* disebabkan karena adanya pandemi Covid-19.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tersedia di Laboratorium Riset, Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Kebutuhan alat yang digunakan tersedia pada dan bahan yang digunakan tersedia pada tabel tersebut alat dan bahan terlampir pada Lampiran 1.

3.6 Prosedur Penelitian Laboratorik

3.6.1 Tahap Persiapan

Tahap ini meliputi persiapan dan proses sterilisasi alat dan bahan sebelum digunakan dalam penelitian. Bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke tabung reaksi atau wadah kaca yang bersih dan diberi sumbat serta dibungkus oleh plastik tahan panas sebelum disterilisasi. Alat-alat kaca dan plastik dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Riset Biologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

3.6.2 Tahap Penelitian

3.6.2.1 Pengambilan Sampel

Sebelum mengambil sampel, dilakukan pengukuran suhu dan pH sawah sebagai data pendukung abiotik pada tiga titik dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali yang terlampir pada Lampiran 3. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil jerami padi sebanyak 0,2 gram pada 5 titik dan 3 kg untuk dilakukan *pretreatment* jerami padi menggunakan sarung tangan steril, dan ditempatkan di dalam wadah yang sudah disterilisasi terlebih dahulu.

3.6.2.2 Pembuatan Media

Terdapat 3 medium berbeda yang digunakan untuk proses inokulasi bakteri yaitu sebagai berikut:

1) *Nutrien Agar* (NA) dan *Nutrien Broth* (NB)

Medium *Nutrient Agar* ditimbang 2,8 gram dan ditambahkan 100 mL aquades. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga semua bahan terlarut. Setelah itu media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan cawan petri. Sedangkan medium *Nutrient Broth* ditimbang 6,5 gram dan ditambahkan 100 mL aquades. Semua media kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian disimpan di dalam kulkas.

2) *Carboxymethylcellulose* (CMC) Agar

Carboxymethylcellulose (CMC) agar merupakan media selektif untuk menumbuhkan bakteri yang hanya memiliki kemampuan mendegradasi

selulosa. Media CMC ini dibuat dengan melarutkan 0,05 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,075 gram KNO_3 , 1 gram CMC, 0,05 gram K_2HPO_4 , 0,002 gram $FeSO_4$, 0,004 gram $CaCl_2$, 0,2 gram yeast ekstrak, 1,8 gram agar ke dalam aquades hingga 100 mL (Azizah, 2017). Selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu $121^\circ C$ selama 15 menit, lalu dituangkan ke cawan petri dan tunggu media tersebut hingga memadat.

3.6.2.3 Isolasi Bakteri dari Jerami Padi (*Oryza sativa* L.)

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran Cawan Sebar. Prinsip dari metode cawan sebar adalah menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara menuangkan stok kultur bakteri di atas media agar yang telah memadat, mikroorganisme yang tumbuh ini dapat tersebar merata pada bagian permukaan media agar. Dalam penelitian ini dilakukan pengenceran bertingkat sebanyak sembilan kali, dengan cara sebanyak 1 gram jerami padi lapuk yang sudah diblender dengan metode *bulk* dimasukkan kedalam tabung pengenceran pertama (10^{-1}) yang berisi 9 mL NaCl 0,85% (Yan *et al.*, 2019; Azizah, 2017; Khatiwada *et al.*, 2016). Sampel yang telah dimasukkan kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diambil 1 mL larutan menggunakan pipet steril selanjutnya dipindahkan dari pengenceran tabung pertama ke pengenceran tabung kedua dan dilakukan cara yang sama seperti tabung pertama (10^{-1} sampai 10^{-9}). Dari masing-masing tabung yang dilakukan pengenceran, pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} secara aseptik masing-masing sebanyak 0,1 mL disebarkan menggunakan batang L pada kelima cawan petri steril berisi CMC agar hingga merata. Selanjutnya cawan petri dibungkus dengan kertas dan dibungkus plastik tahan panas untuk mencegah kontaminasi kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu $37^\circ C$ (Khatiwada *et al.*, 2016). Koloni-koloni yang tumbuh dengan karakteristik morfologi yang berbeda dipindahkan sebanyak 1 ose pada tabung agar miring NA untuk didapatkan kultur murninya.

3.6.2.4 Pembuatan Biakan Murni

Terdapat 2 media berbeda untuk inokulasi bakteri, yaitu sebagai berikut:

1) *Nutrient Agar* dan *Nutrient Broth*

Media *Nutrient Agar* digunakan untuk pembiakan isolat atau subkultur bakteri sedangkan *Nutrient Broth* dipakai sebagai kultur biakan dalam media cair yang akan digunakan untuk uji selulolitik pada kertas cakram.

2) CMC (*Carboxymethylcellulose*) Agar

CMC Agar merupakan media selektif untuk pengujian bakteri selulolitik atau medium khusus untuk menumbuhkan bakteri yang hanya memiliki kemampuan mendegradasi selulosa.

3.6.2.5 Seleksi Bakteri Selulolitik

Seleksi bakteri selulolitik pada media CMC agar dilakukan dengan metode kertas cakram. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam pada agar miring, sebanyak 1 ose bakteri diambil dan diinokulasikan pada 25 mL *Nutrient Broth* (NB) dalam botol yang berukuran 100 mL kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Setelah diinkubasi pada *waterbath shaker*, kemudian inokulum diambil 10 µL dan ditanamkan pada kertas cakram yang berukuran 6 mm yang berada diatas permukaan media CMC agar. Koloni bakteri yang tumbuh pada media CMC agar kemudian diwarnai oleh *Congo red* 0,1% dan diinkubasi kembali selama 30 menit, lalu dibilas dengan larutan NaCl 1 M (Azizah, 2017; Ji *et al.*, 2003). Seleksi bakteri selulolitik ini dilakukan berdasarkan terbentuknya diameter zona bening pada koloni bakteri yang ada pada media CMC yang sudah diwarnai *Congo red* 0,1% dan dibilas NaCl 1 M. Indeks selulolitik yang diperoleh dari biakan bakteri tersebut dihitung dengan rumus Indeks Selulolitik (IS) menurut Sinaga (2013) sebagai berikut.

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

Tabel 3.1 Lembar Pengamatan Indeks Selulolitik Isolat Bakteri

Isolat	Diameter Kertas Cakram / Diameter Koloni Bakteri / Diameter Zona Bakteri			Keterangan		
	6 mm / 0,6 cm					
	Diameter Zona Bening (cm)				Rata-Rata Zona Bening (cm)	Indeks Selulolitik (IS) (cm)
	1	2	3			
1						
2						
4						
5						

3.6.2.6 Karakterisasi Bakteri Selulolitik

Karakterisasi bakteri selulolitik dilakukan melalui serangkaian tahapan identifikasi bakteri selulolitik, yaitu:

1) Pengamatan Morfologi Koloni

Setelah diinkubasi selama 24-48 jam dalam suhu 37°C pada inkubator dilakukan pengamatan morfologi koloni menggunakan mikroskop binokuler. Ciri morfologi yang diamati meliputi bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilap atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), kepekatan koloni dan tepian (Cappuccino & Sherman, 2014).

Tabel 3.2 Lembar Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri

Koloni	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Tepian	Permukaan	Elevasi	Diameter (cm)

2) Pewarnaan Bakteri dan Uji Biokimia

Pewarnaan bakteri dilakukan untuk mengamati morfologi sel dan keadaan ciri-ciri fisiologis bakteri. Teknik pewarnaan yang digunakan yaitu pewarnaan gram, endospora, dan kapsul (Herlini, 2017). Sedangkan uji biokimia yang dilakukan meliputi uji motilitas, Simmon's sitrat, dan fermentasi laktosa.

Tabel 3.3 Lembar Pengamatan Pewarnaan dan Uji Biokimia Isolat Bakteri Selulolitik

Pewarnaan dan Uji Biokimia	Isolat Bakteri 1	Isolat Bakteri 2	Isolat Bakteri 4	Isolat Bakteri 5
Bentuk Bakteri				
Pewarnaan Gram				
Pewarnaan Kapsul				
Pewarnaan Endospora				
Motilitas				
Simmon's sitrat				
Fermentasi Laktosa				

3.7 Prosedur Penelitian Studi Literatur

Penelitian kepustakaan dilakukan dengan cara membaca, mengumpulkan, dan mencatat literatur-literatur yang bersumber pada jurnal-jurnal, artikel-artikel, maupun buku-buku. Penelitian kepustakaan menurut Harahap (2014) dapat dilakukan dengan tiga kegiatan, yaitu:

- 1) Mencatat semua temuan mengenai masalah penelitian yang dilakukan pada setiap pembahasan penelitian yang didapatkan dari literatur dan sumber lainnya, atau penemuan terbaru mengenai masalah yang diteliti.
- 2) Menggabungkan segala temuan, baik secara teori maupun temuan yang baru dilakukan.
- 3) Menganalisis temuan kelebihan dan kekurangan yang diperoleh dari berbagai sumber bacaan atau sumber data yang digunakan peneliti.

Sumber data dilakukan dengan pencarian 20 jurnal dan setelah dilakukan skrining menghasilkan 7 jurnal utama yang dijadikan sebagai referensi optimasi pH dan suhu optimum bakteri selulolitik jerami padi dalam menghasilkan

CMCase maksimum dan 15 jurnal dijadikan sebagai data pendukung. Jurnal utama yang digunakan yaitu:

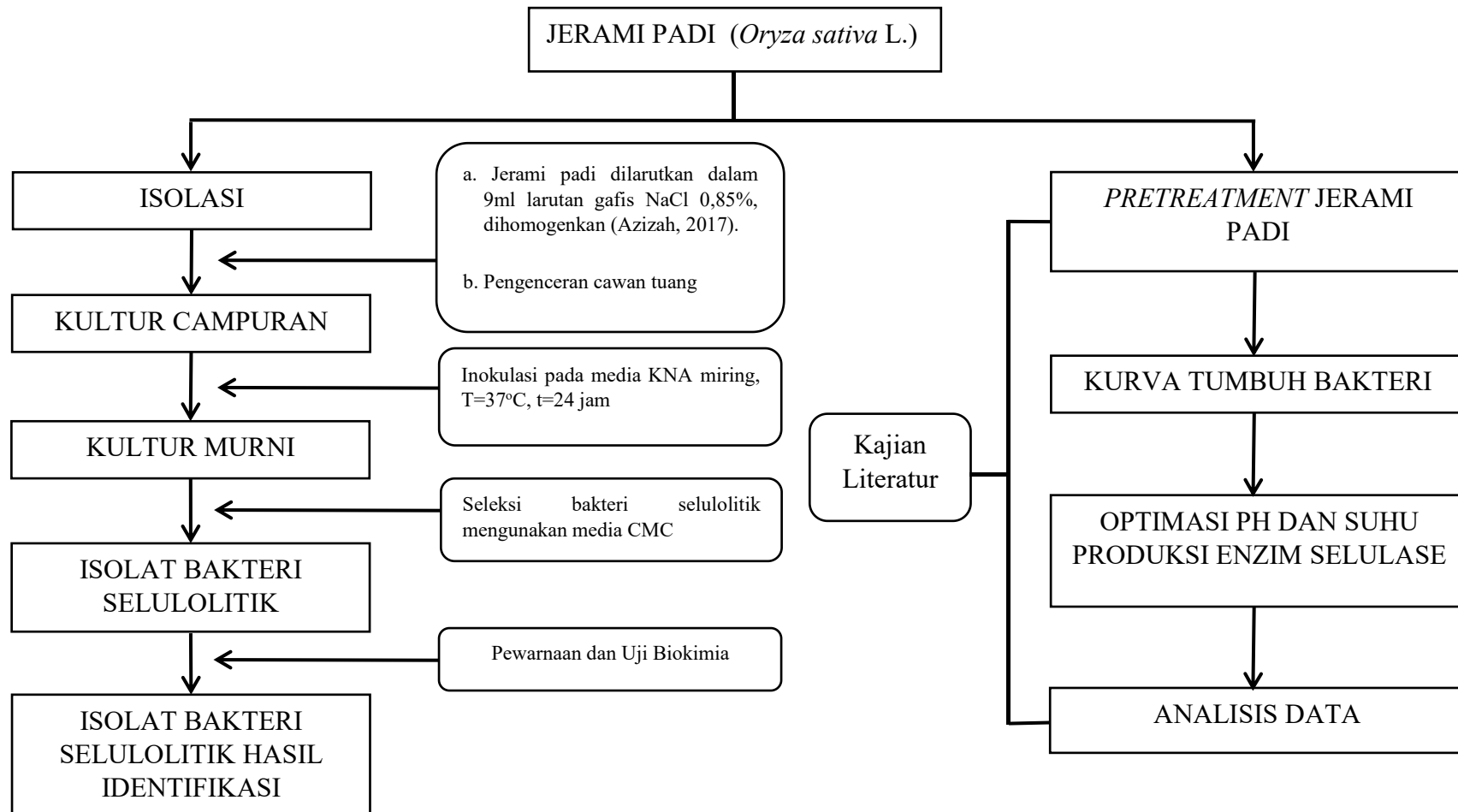
- a. Isolation, Screening, and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* (Khatiwada *et al.*, 2016).
- b. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Selulolitik Asal Jerami Padi di Persawahan Bogor Barat. *Jurnal Ilmiah Farmasi Akademi Farmasi Jember* (Azizah, 2017).
- c. Alkaline Cellulase Produced by a Newly Isolated Thermophilic *Aneurinibacillus* Thermoaerophilus WBS2 from Hot Spring, India. *African Journal of Microbiology Research* (Somen Acharya, 2012).
- d. Production, Purification, and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from Novel Strain *Bacillus megaterium*. *Journal of Environmental Progress and Sustainable Energy* (Shahid *et al.*, 2016).
- e. Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. *ISRN Biotechnology* (Deka *et al.*, 2013).
- f. Utilization of Rice Straw (*Oryza sativa* Linn) Agricultural Waste as Substrate for Poly(3-hydroxybutyrate) Production using *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* (Suardi *et al.*, 2018).
- g. Characterization of a Cellulase Producing *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Agricultural Waste. *Biotechnological* (Beena & Silva, 2018).

3.8 Analisis Data

Data yang dikumpulkan lalu dianalisis secara deskriptif kualitatif dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data yang terkumpul sebagaimana adanya.

3.9 Alur Penelitian

Berdasarkan uraian metode penelitian diatas, berikut ini adalah bagan alur penelitian yang akan dilakukan:



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian