

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian Pustaka**

Penelitian ini menggunakan teknik studi literatur dalam penulisan skripsi dengan cara mengkaji dan meneliti hasil penelitian yang ada dalam artikel, dokumen, buku serta sumber lain yang dapat mendukung hasil penelitian dan relevan. Pada penelitian studi literatur ini berisi kajian beberapa jurnal yang berkaitan dengan aktivitas enzim selulase oleh konsorsium bakteri dan jamur selulolitik, serta metode yang optimal dalam aktivitas enzim selulase oleh konsorsium bakteri dan jamur selulolitik berdasarkan kajian literatur. Penelitian ini menggunakan data sekunder sebagai sumber data. Menurut Martono (2014) menjelaskan bahwa data sekunder merupakan pengambilan data yang memanfaatkan sumber data yang sudah ada atau sumber data yang diambil secara tidak langsung. Sumber data sekunder yang digunakan peneliti, yaitu:

- a. *Syntrophic microbial system for ex-situ degradation of paddy straw at low temperature under controlled and natural environment* (Shukla dkk., 2016).
- b. *Insights into rapid composting of paddy straw augmented with efficient microorganism consortium* (Sharma dkk., 2014).

### **3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian Pustaka**

Penelitian dilakukan di Kota Cimahi pada bulan April hingga Juni tahun 2020.

### **3.3 Subjek Penelitian Pustaka**

Subjek penelitian pada studi pustaka yang digunakan yaitu konsorsium bakteri dan jamur yang telah di uji aktivitas lignoselulolitik.

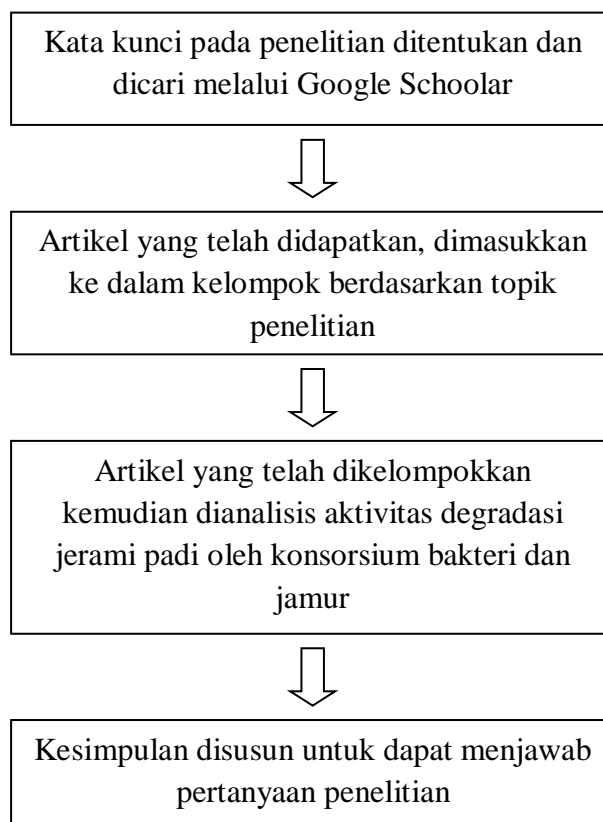
### **3.4 Prosedur Penelitian Pustaka**

Beberapa tahapan prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1. Tahap pencarian sumber data dilakukan dengan mencari kata kunci yang sesuai dengan penelitian, kemudian melakukan pencarian beberapa data menggunakan aplikasi yang telah ditentukan. Berdasarkan dengan judul, abstrak dan simpulan diambil

dari setiap artikel yang telah didapatkan, setelah itu dilakukan pengelompokan data berdasarkan konsorsium bakteri dan jamur, jerami padi, dan enzim selulase.

Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah tahap analisis yang bertujuan untuk mengetahui bagaimana aktivitas konsorsium bakteri dan jamur dalam mendegradasi jerami padi. Analisis data sekunder dilakukan dengan mengkaji hasil penelitian pada artikel yaitu hasil aktivitas konsorsium bakteri dan jamur, aktivitas uji enzim pada jerami padi yang telah diberi perlakuan menggunakan konsorsium bakteri dan jamur. Cara ini dilakukan untuk dapat mengelompokkan hasil penelitian serta untuk mengetahui bagaimana aktivitas enzim selulase oleh konsorsium bakteri dan jamur. Keseluruhan hasil analisis data sekunder digunakan untuk memprediksi konsorsium bakteri dan jamur merupakan kombinasi isolat yang dapat mendegradasi jerami padi lebih baik.

Tahap terakhir yang dilakukan yaitu menyusun kesimpulan dari penelitian yang menjawab pertanyaan penelitian tentang hasil penelitian aktivitas enzim tertinggi yang diberi perlakuan bakteri dan jamur.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### 3.4.1 Pelaksanaan Penelitian Berdasarkan Studi Pustaka

Terdapat dua sumber literatur utama sebagai perbandingan metode pada aktivitas enzim selulase yang dikaji sebagai data sekunder, yaitu sebagai berikut:

3.4.1.1 *Metode literatur Syntrophic microbial system for ex-situ degradation of paddy straw at low temperature under controlled and natural environment (Shukla dkk., 2016).*

#### 3.4.1.1.1 Isolasi Mikroorganisme Bakteri dan Jamur (Shukla dkk., 2016).

Mikroorganisme psikotrofik yang digunakan dalam penelitian ini bertujuan untuk dapat membantu proses aktivitas enzim pada suhu yang rendah, karena penggunaan mikroba mesofilik saja akan sulit. Mikroorganisme psikotrofik merupakan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada suhu rendah yaitu 0°C hingga 20°C (Hamdiyati, 2011) yang terdiri dari spesies bakteri *Bacillus atropheus* dan *Bacillus* sp. sedangkan spesies jamur yaitu *Eupenicillium crustaceum* dan *Paceliomyces* sp. Isolasi mikroba dilakukan dengan metode pengenceran Cawan Sebar. Mikroorganisme psikotrofik didapat dengan cara satu gram sedimen/tanah atau 1 mL sampel air ditambahkan ke dalam 9 mL air suling steril, kemudian sampel diencerkan dan pengenceran disebar pada media agar. Media *Kaldu Nutrient Agar* (KNA) digunakan untuk isolasi bakteri, sedangkan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk isolasi jamur, kemudian sampel diinkubasi pada suhu 4°C hingga 10°C selama 7 hingga 15 hari. Koloni yang tumbuh dibuat biakkan murni, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C. Isolat lain dari jamur yang digunakan yaitu *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Phanerochaete chrysosporium* dan *Trichoderma viridae*.

#### 3.4.1.1.2 Uji Aktivitas Lignoselulolitik (Shukla dkk., 2016).

Aktivitas hidrolitik pada mikroorganisme di uji menggunakan pelat agar difusi media basal (1 gram ekstrak ragi, 1 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 gram  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 5 gram  $\text{NaCl}$ , 1 gram  $\text{NaCO}_3$ , dan 18 gram agar) yang ditambahkan substrat berbeda seperti *Xylan* (0,1%) dan *Carboxymethyl cellulose* (0,5%). Mikroba murni dimasukkan ke dalam labu berukuran 150 mL yang berisi 50 mL *Kaldu Nutrient Agar* (KNA) atau *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan 5 $\mu\text{L}$

kultur yang diisolasi pada pelat agar difusi, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C dan 10°C selama 3 hingga 5 hari. Zona bening yang timbul pada koloni ditetesi larutan *Congo Red* 0,1% selama 15 menit pada suhu ruang, setelah itu dibilas menggunakan 1M NaCl yang bertujuan untuk aktivitas selulase dan xilanase. Aktivitas selulase dan xilanase (CMCase, FPase, dan  $\beta$ -glukosidase) ditentukan menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) dalam 50 mM sitrat fosfat buffer (pH 5) yang mengandung 1% (w/v) masing-masing substrat. Penggunaan media dilakukan dengan menambahkan jerami padi.

#### **3.4.1.1.3 Pengomposan (Shukla dkk., 2016).**

Isolat bakteri dan jamur yang telah diuji aktivitas lignoselulolitik kemudian diinokulasi pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hingga 3 hari. Dilakukan eksperimen set up yang dilakukan diinkubator pada suhu 10°C dengan kelembapan 55% untuk optimalisasi dosis inokulum yang digunakan. Jerami padi sebanyak 200 gram digunakan sebagai substrat dan dilunakkan dengan 100 mL air suling yang steril, kemudian diinokulasikan mikroba. Proses steril urea dilakukan menggunakan filter membran nilon 0,2  $\mu$ m melalui filtrasi vakum sebagai amandemen nitrogen. Proses pengomposan dilakukan di dalam lubang berukuran 6 x 4 x 2 meter yang telah ditambahkan air, proses ini dilakukan selama musim dingin dari bulan Desember hingga Februari. Semua bahan dicampur secara manual ke dalam lubang pada interval yang sama yaitu 30 hari untuk mengisi konsentrasi oksigen yang berkurang dan pengambilan sampel untuk parameter dilakukan dalam 30, 60, dan 90 hari.

#### **3.4.1.1.4 Uji Aktivitas Enzim (Shukla dkk., 2016).**

Uji CMCase, FPase, dan xilanase diekstraksi dari kompos menggunakan buffer sitrat pH 7. Sebanyak 0,5 mL filtrat diinkubasi dengan substrat masing-masing (CMCase, FPase, dan xilanase) dan ditambahkan hingga volume mencapai 1 mL menggunakan 0,05M buffer sitrat pH 4,8. Keseluruhan tabung diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam untuk uji selulase dan selama 30 menit untuk uji selobiase dan xilanase. Konsentrasi enzim direpresentasikan sebagai satuan international atau IU per gram substrat, nilai 1 IU sebagai 1 mol produk yang dapat dihasilkan dalam waktu 1 menit dari 1 gram substrat.

#### **3.4.1.1.5 Analisis Kimia Kompos (Shukla dkk., 2016).**

Berbagai parameter kompos diamati selama penelitian. Pengamatan suhu, pH dan konduktivitas listrik (EC) termasuk ke dalam parameter fisika yang juga penting dilakukan. Pada 10 gram sampel dicampur menggunakan air suling dengan perbandingan 1 : 2,5, kemudian dihomogenkan selama 20 menit. Kandungan karbon organik kompos dilakukan menggunakan metode titrasi Walkley dan Black. Kandungan nitrogen total (%) menggunakan prosedur metode Kjeldahl oleh N-Analyzer UDK-149. Kandungan kadar humus pada kompos diekstraksi dengan mencampurkan sampel dan alkali natrium pirofosfat (0,1M NaOH dan 0,1M natrium pirofosfat) dengan perbandingan 1 : 5 selama 1 hingga 2 jam pada *shaker*, kemudian disentrifuge pada 10.000 g selama 10 menit. Perubahan warna dilihat dibawah air mengalir selama 24 jam.

**3.4.1.2 Metode literature** Insights into rapid composting of paddy straw augmented with efficient microorganism consortium (Sharma dkk., 2014).

#### **3.4.1.2.1 Substrat (Sharma dkk., 2014).**

Penelitian ini menggunakan jerami padi yang dikumpulkan dari *Indian Agriculture Research Institute* (IARI), kemudian penggunaan kotoran unggas diperoleh dari peternakan unggas yang terletak di daerah Kota New Delhi. Proses pengomposan jerami padi dan kotoran unggas dilakukan didalam lubang berukuran 1 m<sup>2</sup> yang terdapat di Divisi Mikrobiologi, IARI, New Delhi.

#### **3.4.1.2.2 Isolasi inokulum untuk augmentasi kompos (Sharma dkk., 2014).**

Ada 2 jenis inokulan yang digunakan dalam penelitian yaitu, inokulan kompos (CI) dan mikroorganisme efisien (EM). Inokulan kompos (CI) terdiri dari 4 jamur lignoselulolitik yaitu *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma viridae*, *Phanerochaete chrysosporium*, dan *Aspergillus awamori*. Keempat jamur tersebut dipilih berdasarkan produksi enzim lignoselulolitik. Jamur spesies *Aspergillus nidulans* dan *Trichoderma viridae* diperoleh dari *Indian Type Culture Collection* (ITCC), IARI, New Delhi. Jamur spesies *Phanerochaete chrysosporium* diperoleh dari National Chemical Laboratory (NCL), Pune, India. Jamur spesies *Aspergillus awamori* diperoleh dari Divisi Mikrobiologi, IARI, New Delhi. Keseluruhan spesies jamur tersebut dibiakkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Pembiakkan konsorsium mikroorganisme efisien (EM) diperoleh dari ragi, aktinomisetes, dan jamur yang telah diuji aktivitas lignoselulolitik yang diambil berdasarkan tingkat aktivitas lignoselulolitik tertinggi. Mikroorganismes efisien (EM) terdiri dari beberapa spesies yaitu *Candida tropicalis* yang diperoleh dari buah busuk, spesies *Phanerochaete chrysosporium* diperoleh dari tanah kilang minyak Vadodara yang terkontaminasi, spesies *Streptomyces globisporous* diperoleh dari mustard strover yang telah terdegradasi, dan spesies *Lactobacillus* sp. yang diperoleh dari asinan kubis. Penggunaan bakteri fotosintesis diperoleh dari sampel air kolam. Keseluruhan isolat EM dibiakkan didalam medium. Spesies *Phanerochaete chrysosporium* dibiakkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan pH 6,5, spesies *Streptomyces globisporous* dibiakkan pada media yang terdiri dari 4 (g/L) glukosa, 4 (g/L) ekstrak ragi, 10 (g/L) ekstrak malt, dan 20 (g/L) agar dengan pH medium 6,5. Pada spesies *Candida tropicalis* dibiakkan didalam media agar miring MGYB berisi 3 (g/L) ekstrak malt, 10 (g/L) glukosa, 3 (g/L) ekstrak yeast, 5 (g/L) pepton, dan 20 (g/L) agar dengan pH medium 7. Pada spesies *Lactobacillus* sp. dibiakkan pada media agar laktik dengan pH 6. Pada bakteri fotosintesis dibiakkan menggunakan media yang berisi 0,33 (g/L)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,33 (g/L)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,33 (g/L)  $\text{NaCl}$ , 0,50 (g/L)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,05 (g/L)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 (g/L) sodium sukinat, 0,02 (g/L) ekstrak yeast, dan 0,01 (g/L)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02%) dengan pH medium 6,8. Seluruh isolat diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 hari dan untuk penyimpanan di suhu 4°C.

#### **3.4.1.2.3 Pengomposan (Sharma dkk., 2014).**

Jerami padi sebanyak 40 kg yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jerami padi pasca panen, kemudian jerami padi disimpan didalam lubang yang berukuran 1 m<sup>2</sup>. Penggunaan nitrogen dalam penelitian ini memanfaatkan kotoran unggas sebanyak 5 kg dengan rasio 8 : 1 (jerami padi : kotoran unggas) yang bertujuan untuk menurunkan kadar rasio C pada C:N (60 : 1) sebanyak 1% w/w yang diperoleh dari Rajasthan, India kemudian dimasukkan kedalam kompos yang bertujuan sebagai sumber fosfor yang tidak larut. Proses pengomposan dilakukan selama musim panas dari bulan Juni hingga Agustus 2012 yang dilaksanakan di Divisi Mikrobiologi, IARI, New Delhi. Setelah dilakukan pencampuran, kemudian

inokulum dimasukkan sebanyak 1% v/w. Kompos yang telah diberi perlakuan mikroba disiram secara berkala yang bertujuan untuk mempertahankan kelembaban pada kompos yaitu 60%. Selama proses pengomposan setiap 2 minggu kompos dibalik supaya menjaga aerasi.

#### **3.4.1.2.4 Proses Degradasi (Sharma dkk., 2014).**

Sampel kompos dilakukan uji enzim dan analisis berbagai parameter fisika maupun kimia menggunakan interval waktu bulanan. Sampel kompos disimpan untuk dapat dianalisis pada suhu 4°C.

#### **3.4.1.2.5 Uji Enzim (Sharma dkk., 2014).**

Pengujian enzim dianalisis pada interval waktu bulanan. Ekstrak kompos diambil dan campur menggunakan buffer sitrat 0,05M dengan pH 4,8 yang bertujuan untuk uji enzim ekstraseluler. Pengujian enzim dilakukan dengan menambahkan sebanyak 2% *Carboxymethyl cellulose* dan kertas saring (FPase) sebagai substrat dan dihitung dengan satuan IU/g. Hitungan 1 IU pada uji enzim sama dengan 1 µM glukosa yang dihasilkan dalam per menit reaksi uji enzim. Pada uji aktivitas enzim xilanase menggunakan xilan kayu *birch* 1%, uji aktivitas enzim xilanase menggunakan satuan IU dengan nilai 1 IU sama dengan 1 µM yang dihasilkan dalam per menit reaksi. Uji dehidrogenase, asam atau alkali fosfat, dan *Fluorescein Diacetate Hidrolase* (FDA) dilakukan untuk dapat melihat aktivitas mikroba dalam mendegradasi kompos jerami padi. Uji dehidrogenase dilakukan menggunakan triphenil tetrazolium klorid sebagai substrat uji. Proses uji dehidrogenase menggunakan µg TPF per gram kompos per hari sebagai hitungan aktivitas dehidrogenase. Pada uji asam fosfat dan alkali fosfat menggunakan *p*-nitrophenyl sebagai substrat uji dan dihitung dengan satuan µg *p*NP per gram kompos per jam proses uji. Uji *Fluorescein Diacetate Hidrolase* (FDA) menggunakan FDA sebagai substrat dan dihitung menggunakan satuan µg fluorescein per gram kompos per jam reaksi. Dalam melihat konsentrasi total fenol dianalisis menggunakan ekstrak air dari kompos yang dihitung dengan satuan mg/g kompos kering.

#### **3.4.1.2.6 Parameter Fisiokimia (Sharma dkk., 2014).**

Uji parameter fisiokimia dilakukan untuk dapat mengetahui kualitas kompos berdasarkan kandungannya. Pada uji parameter fisiokimia menggunakan sampel kompos yang kering, kemudian ditumbuk. Uji fisiokimia terdiri dari kandungan karbon organik (OC), pH, konduktivitas listrik (EC), dan humus. Bahan organik kompos jerami padi dilakukan dengan membakar kompos pada suhu 550°C selama 5 jam. Kompos dilakukan pengujian kandungan karbon (OC). Pengujian kandungan total N pada kompos diuji menggunakan campuran natrium sulfat dan  $\text{CuSO}_4$  yang kemudian kedua larutan tersebut ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Uji parameter untuk mengetahui kandungan karbon larut dalam air (WSC) dan karbon larut dalam alkali (ASC) dilakukan dengan menggunakan ekstrak air kompos dan alkali 1N NaOH dari kompos jerami padi dan dilakukan titrasi dengan 0,5N ferro ammonium sulfat. Pengukuran UV-vis kompos jerami padi dilakukan dengan mengambil ekstrak kompos dalam air suling dan larutan alkali (10% w/v) yang bertujuan untuk menghitung rasio E4/E6 atau absorbansi pada 465 nm diatas absorbansi pada 665 nm dan rasio E2/E3 atau absorbansi pada 250 nm diatas absorbansi pada 365 nm. Pengujian lainnya yaitu mengukur konduktivitas listrik (EC) dan pH kompos dengan cara mencampur kompos dan suspensi air dengan perbandingan (1 : 5 w/v), konduktivitas listrik ditentukan menggunakan EC digital dan pH meter. Kandungan humus pada kompos jerami padi dilakukan menggunakan reagen pirofosfat sebagai ekstraktan. Pengujian kandungan patogen dan nitrat pada jerami pun dilakukan pengujian. Uji patogen tersebut yaitu Coliform dan *Salmonella* sp. menggunakan media agar XLD/SS.

### **3.5 Rekomendasi Metode dalam Proses Aktivitas Enzim Selulase oleh Konsorsium Bakteri dan Jamur Selulolitik**

Berdasarkan metode kedua sumber literatur utama yang telah dikaji yaitu Shukla dkk. (2016) dan Sharma dkk. (2014) terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dalam aktivitas enzim selulase tertinggi oleh konsorsium bakteri dan jamur selulolitik yaitu isolasi bakteri menggunakan medium NA (*Nutrient Agar*) (Hadioetomo, 1990) dan jamur menggunakan medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan dilakukan metode pengenceran dengan mengambil 1 mL sampel



bakteri dan jamur kemudian ditambahkan ke dalam 9 mL air steril, setelah itu sampel diencerkan dan pengenceran disebar pada media agar (Yan dkk., 2019; Yadav dkk., 2015) yang bertujuan untuk dapat memisahkan individu spesies dari spesies lain. Pada aktivitas enzim selulase menggunakan substrat jerami padi, kriteria jerami padi yang dapat digunakan yaitu jerami padi pasca panen yang sudah lapuk berwarna kecoklatan yang (Kasmiran, 2011; Razie dkk., 2011). Aktivitas enzim selulase dapat terhambat oleh senyawa lignin yang terkandung dalam jerami padi, maka perlu dilakukan proses *pretreatment* jerami padi. Menurut beberapa penelitian metode *pretreatment* secara kimia menggunakan basa lebih efektif dalam mendegradasi senyawa lignin yang dapat menghambat aktivitas enzim tanpa adanya inhibitor (Zhao, 2008; Zhao dkk., 2009). *Pretreatment* secara kimia menggunakan basa dapat menggunakan reagen urea. Urea merupakan bahan yang mudah ditemukan, relatif murah, dan tidak menyebabkan adanya inhibitor (Silvi, 2016). *Pretreatment* menggunakan urea dapat meningkatkan senyawa nitrogen (McDonald dkk., 2002) serta dapat meningkatkan konsumsi, palatabilitas, dan pencernaan pakan (Ahmed dkk., 2002). Proses *pretreatment* jerami padi menggunakan menghilangkan senyawa lignin pada jerami sebanyak 35-60% dengan kadar glukosa 71,1% (Ko dkk., 2009). *Pretreatment* secara kimia menggunakan basa dapat dilakukan dengan metode *pretreatment* SAA (*Soaking in Aqueous Ammonia*) menggunakan reagen urea (Silvi, 2016) penggunaan metode *pretreatment* ini memiliki beberapa keuntungan yaitu menghilangkan kadar lignin yang tinggi, mempertahankan senyawa karbohidrat pada bentuk aslinya, bersifat volatile sehingga dapat dijumpat kembali (Kim dkk., 2003; Zhu dkk., 2006; Kim dkk., 2008; Ko dkk., 2009). Setelah melalui tahap *pretreatment*, Jerami padi sebanyak 200 gram digunakan sebagai substrat yang ditambah dengan 100 mL air steril (Shukla dkk., 2016). Sebanyak 1% sumber nitrogen (urea) dimasukan ke dalam 200 gram substrat jerami padi, kemudian diberi perlakuan menggunakan konsorsium bakteri dan jamur selulolitik sebanyak 1% (v/w) (Sreedevi dkk., 2013; Shahid dkk., 2016; Phong dkk., 2017). Setelah semua bahan tercampur, kemudian dilakukan tahap uji aktivitas enzim selulase pada substrat jerami padi yang telah ditambahkan sumber nitrogen (urea) dan diberi pelakuan menggunakan konsorsium

bakteri dan jamur selulolitik. Tahap uji aktivitas enzim selulase diukur menggunakan metode CMCase yaitu dengan mereaksikan 0,5 mL CMC 1% (disiapkan dalam 0,05 M buffer sitrat pH 5) dan 0,5 mL sampel substrat yang telah diberi perlakuan. Kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan 1,5 mL larutan DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) untuk menghentikan reaksi dan di didihkan selama 10 menit pada *waterbath*. Setelah sampel dingin dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer. Jumlah gula yang dihasilkan ditentukan dengan standar glukosa. Satu unit aktivitas selulosa didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diproduksi 1 IU per gram substrat, nilai 1 IU sebagai 1 mol produk yang dihasilkan dalam waktu 1 menit dari 1 gram substrat (Ghost, 1987; Suman dkk., 2015; Miller, 1959). Tahapan uji aktivitas enzim selulase berdasarkan parameter pH dan suhu optimum.

### **3.6 Analisis Data Pustaka**

Data yang telah didapat melalui studi literatur kemudian dengan cara mendeskripsikan data yang telah terkumpul sebagaimana