

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Sumatera sejak bulan Februari 2021-Juni 2021. Sampel diambil dan diisolasi dari Taman Nasional Way Kambas, berasal dari gajah jantan bernama Denis berumur 20 tahun. Pada saat pengambilan sampel suhu lingkungan 32°C dan sudah memiliki izin dari Kementerian Lingkungan Hidup untuk melakukan pengambilan sampel dan penelitian yang ditandai dengan SK nomor: **SK.326/KSDAE/SET/KSA.2/7/2019**.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah; spektrofotometer (Thermo scientific), gelas ukur, vortex (Ohaus), mikropipet (Thermo scientific), *waterbath* (MEMMERT), *laminar airflow* (Thermo scientific), autoklaf (tomy), neraca analitik (Metler Toledo), jarum ose, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, batang penyebar, tabung reaksi, bunsen dan cuvet. Adapun Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah; Sampel feses gajah Sumatera, media tumbuh CMC (*Carboxymethyl cellulose*) 1%, garam fisiologis, aquades, indikator *congo red* 1%, pereaksi DNS (3,5 *Dinitrosalisilic acid*), alkohol 70%, spirtus, larutan standar glukosa, larutan BSA (*Bovine serum albumin*), dan pereaksi *Bradford*.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian memiliki beberapa tahapan metode untuk mendapatkan hasil akhir yang dapat menjawab rumusan masalah dan tujuan dari penelitian ini. Metode yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Murtiyaningsih dan Hazmi (2017), dengan beberapa perubahan berdasarkan studi literatur yang sudah dilakukan. Langkah pertama dari penelitian ini ialah isolasi bakteri selulolitik sampel feses gajah diperkaya di medium NB (*Nutrient broth*) pada inkubator bergoyang selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengenceran berseri

hingga  $10^{-8}$  dan disebar pada CMC agar 1%. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dan dilakukan tahapan kedua yaitu uji aktivitas enzim secara kualitatif dengan terlebih dahulu dibuatkan kurva pertumbuhan bakterinya untuk mengetahui fase pertumbuhan dari isolat bakteri dan bakteri dengan zona bening yang besar akan dilanjutkan ke metode selanjutnya untuk uji aktivitas enzim secara kuantitatif kemudian dilakukan pemanenan ekstrak kasar enzim dari isolat tersebut. Pengukuran kadar protein total dilakukan setelah uji aktivitas secara kualitatif. Data yang didapatkan kemudian diolah dengan menggunakan microsoft excel.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Isolasi Bakteri Selulolitik dari Feses Gajah**

Sampel feses gajah berasal dari Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) yang terdapat di Taman Nasional Way Kambas, Kabupaten Lampung Timur Provinsi Lampung. Sebanyak 10g sampel feses gajah dilakukan pengkayaan dengan dimasukan ke dalam labu erlen meyer berisi media *Nutrient broth* steril dan diinkubasi dengan inkubator goyang selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dan kecepatan 120rpm. Setelah itu dilakukan pengenceran bertingkat dari hasil pengkayaan diambil 1mL sampel kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi berisi 9mL garam fisiologis. Kemudian dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil 1mL suspensi feses gajah dan larutan garam fisiologi kemudian dimasukan kedalam tabung berisi 9mL larutan garam fisiologis dan dihomogenkan kembali dengan vortex sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Prosedur ini terus dilakukan sampai pada pengenceran  $10^{-8}$ . Pengenceran  $10^{-4}$  sampai  $10^{-8}$  yang dihasilkan, kemudian diinokulasikan pada media CMC 1% dengan mengambil 0,1mL suspensi kemudian disebar menggunakan batang penyebar diatas CMC media yang sudah padat kemudian diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

#### **3.4.2 Pengamatan Morfologi Koloni dan Pemurnian**

Pengamatan morfologi secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati morfologi koloni yang terbentuk dari bakteri meliputi warna, bentuk koloni, dan tepi

koloni. Pemurnian bakteri dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh terpisah dan memiliki karakter morfologi yang berbeda. Pemurnian ini dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat pada media CMC yang baru dengan metode gores kuadran sehingga diperoleh koloni tunggal. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni tunggal yang kemudian terbentuk pada cawan petri diinokulasikan kembali pada media CMC miring menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C dan digunakan sebagai stok.

### 3.4.3 Uji Aktivitas Enzim Secara Kualitatif

Isolat bakteri yang akan dilakukan uji kualitatif dapat diambil dari stok agar miring CMC, kemudian ditotolkan di atas beberapa cawan petri berisi media CMC padat kemudian diinkubasi selama 5 hari dan diamati setiap 24 jam dengan suhu 30°C. Pengujian aktivitas enzim selulase menggunakan metode *congo red* dengan cara larutan *congo red* 0,1% dituang pada kultur dan dibiarkan selama 15 menit. Larutan kemudian dibuang dan dibilas menggunakan NaCl 0,2M selama 15 menit sebanyak tiga kali. Hal ini bertujuan untuk membersihkan *congo red* yang berikatan dengan polisakarida. Isolat bakteri yang dapat menguraikan CMC media ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri setelah diuji dengan metode *congo red*. Indeks selulolitik kemudian dapat ditentukan dengan cara mengukur rasio diameter koloni. Isolat yang memiliki indeks aktivitas enzim terbesar ditumbuhkan pada media miring CMC untuk digunakan uji lebih lanjut. Berikut adalah rumus untuk menghitung indeks selulolitik

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

(Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

### 3.4.4 Peremajaan Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang memiliki indeks zona bening tertinggi, kemudian diremajakan pada media CMC miring. Peremajaan dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat

dari stok agar miring kemudian diinokulasikan ke dalam media. Setelah diinokulasi kemudian media diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Proses inokulasi dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*.

#### **3.4.6 Produksi Enzim Ekstrak Kasar**

Produksi ekstrak kasar enzim selulase dilakukan pada isolat dengan indeks selulolitik tinggi yang sudah terlebih dahulu diremajakan pada medium CMC agar 1% selama 24 jam. Isolat yang sudah diremajakan kemudian diinokulasikan pada media CMC cair steril kemudian diinkubasi pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 120rpm selama 36 jam. Pemanenan ekstrak kasar enzim dilakukan setiap 3 jam sekali dengan cara diambil sebanyak 10mL isolat yang sudah diinkubasi kemudian ditaruh kedalam tabung valcon dan disentrifuge dengan kecepatan 6000rpm selama 30 menit. Selanjutnya untuk uji kuantitatif digunakan supernatan dari ekstrak enzim yang sudah dipanen sebelumnya.

#### **3.4.7 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Kurva standar glukosa dibuat dengan mencampurkan 1 gram glukosa (1000 mg) kemudian dilarutkan kedalam 100 mL H<sub>2</sub>O steril sebagai larutan stok. Setiap pengambilan 1 mL larutan stok akan mengandung 10 mg glukosa. Pembuatan kurva standar glukosa yang diperlukan adalah konsentrasi 1 mg/ml sehingga 1 mL larutan stok harus dilarutkan kedalam 9 mL H<sub>2</sub>O steril. Kemudian dilakukan seri pengenceran dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm lalu ditambahkan 2 mL DNS dan dihomogenkan dengan vortex setelah itu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 100°C. Suspensi ditunggu sampai dingin kemudian dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3x kemudian dihitung kurva regresinya dengan nilai absorban sebagai sumbu x dan nilai konsentrasi sebagai sumbu y. Komposisi dari larutan glukosa dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 3.4.7.1 Konsentrasi Larutan Kurva Standar Glukosa

| Konsentrasi |       | Jumlah H <sub>2</sub> O Steril<br>(ml) | Jumlah Larutan<br>Stok Standar<br>Glukosa (ml) |
|-------------|-------|--|--|
| ppm (1mg/L) | mg/ml |  |  |
| 0           | 0.00  | 2.00                                   | 0.00   |
| 50          | 0.05  | 1.90                                   | 0.10   |
| 100         | 0.10  | 1.80                                   | 0.20   |
| 150         | 0.15  | 1.70                                   | 0.30   |
| 200         | 0.20  | 1.60                                   | 0.40   |
| 250         | 0.25  | 1.50                                   | 0.50   |
| 300         | 0.30  | 1.40                                   | 0.60   |

### 3.4.8 Uji Aktivitas Enzim Selulase Secara Kuantitatif

Pengukuran aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur konsentrasi gula reduksi yang dilakukan terhadap 2 kelompok tabung reaksi yang terdiri dari sampel dan blanko. Sampel sebanyak 1 mL enzim ekstrak kasar ditambahkan dengan 1 mL larutan CMC 1% kemudian divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL DNS dan diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 100°C selama 10 menit, kemudian ditunggu sampai dingin. Pada kontrol, yang perlu ditambahkan adalah 1 mL enzim ekstrak kasar, CMC media 1% kemudian 2 mL DNS, sedangkan pada blanko 1mL larutan CMC 1% ditambahkan dengan 2 mL DNS dan 1 mL aquades. Blanko dan kontrol divortex kemudian dilakukan inkubasi di *waterbath* pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin dilakukan pengukuran absorbansi pada ketiga tabung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya digunakan untuk analisis aktivitas enzim menggunakan Microsoft excel sehingga diketahui konsentrasi enzimnya.

### 3.4.9 Pengukuran Kadar Protein Total

Pengukuran kadar protein total dilakukan dengan metode *Bradford* diawali dengan membuat larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) berbagai konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm sebagai kurva standar protein. Larutan BSA kemudian ditambahkan dengan aquades steril dan reagen Bradford dengan volume yang dapat dilihat pada tabel 2. Campuran dihomogenkan dengan cara menarik dan menurunkan larutan

menggunakan *micropipette* beberapa kali sampai homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan keadaan gelap selama 10 menit. Pada masing-masing konsentrasi dilihat absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 559 nm.

Tabel 3.4.9.1 Konsentrasi Larutan Kurva Standar BSA

| Konsentrasi |       | Jumlah H <sub>2</sub> O Steril<br>(ml) | Jumlah Larutan<br>Stok BSA (ml) |
|-------------|-------|--|---------------------------------|
| ppm (1mg/L) | mg/ml |  |                                 |
| 0           | 0.00  | 1.00                                   | 0.00                            |
| 10          | 0.01  | 0.90                                   | 0.10                            |
| 20          | 0.02  | 0.80                                   | 0.20                            |
| 30          | 0.03  | 0.70                                   | 0.30                            |
| 40          | 0.04  | 0.60                                   | 0.40                            |
| 50          | 0.05  | 0.50                                   | 0.50                            |
| 60          | 0.06  | 0.40                                   | 0.60                            |

### 3.5 Analisis Data

Data uji kualitatif, uji kuantitatif, dan kurva pertumbuhan bakteri, diolah dan disajikan kedalam bentuk grafik dengan, menggunakan aplikasi Microsoft Excel, untuk mengetahui jumlah sel, konsentrasi enzim dan fase pertumbuhan sel.

### 3.6 Diagram Alir Penelitian

