

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Desember 2014 – Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Spektrofotometer yang digunakan untuk mengukur kadar gula hasil aktivitas enzim xilanase; inkubator untuk menginkubasi bakteri pada suhu yang terkontrol; dan *laminar airflow* untuk perlakuan yang memerlukan kondisi aseptik, termasuk inokulasi bakteri.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: isolat *Bacillus* sp. yang diperoleh dari koleksi biakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila; media untuk kultur *Bacillus* sp. yaitu media Mendels yang dimodifikasi (Lampiran 1). Sebagai sumber karbon digunakan limbah bagas tebu, sekam padi dan tongkol jagung. Bagas tebu diperoleh dari penjual minuman es tebu di sekitar Bandar Lampung. Sekam padi diperoleh dari sisa penggilingan padi. Tongkol jagung diperoleh dari sisa hasil pembuatan perkedel jagung. Amonium klorida, amonium sulfat, dan

natrium nitrat digunakan sebagai sumber nitrogen, sedangkan untuk gula sederhana digunakan glukosa, laktosa, sukrosa dan xilosa. Dalam penelitian ini delignifikasi limbah dilakukan dengan menggunakan NaOCl 0,5%, sedangkan ekstraksi xilan dilakukan menggunakan NaOH 10%, HCl 6N dan etanol 95%.

Penelitian ini dilaksanakan secara bertahap. Tahap pertama mengkaji perbedaan sumber karbon yang berasal dari bagas tebu, sekam padi, dan tongkol jagung terhadap aktivitas relatif enzim xilanase. Tahap kedua mengkaji konsentrasi sumber karbon yang berbeda terhadap aktivitas relatif enzim xilanase. Tahap ketiga menguji beberapa sumber nitrogen: amonium klorida, amonium sulfat, dan natrium nitrat terhadap aktivitas relatif enzim xilanase. Tahap keempat menguji konsentrasi sumber nitrogen yang berbeda terhadap aktivitas relatif enzim xilanase. Tahap kelima menguji jenis gula sederhana: glukosa, laktosa, sukrosa dan xilosa terhadap aktivitas enzim xilanase.

### **3.3. Pelaksanaan**

#### **3.3.1. Peremajaan Isolat**

Isolat yang akan diuji diremajakan terlebih dahulu dengan cara menginokulasikan 10% isolat *Bacillus* sp. ke dalam erlenmeyer berisi 20 ml media Mendels yang dimodifikasi (Lampiran 1). Kultur diinkubasi selama 24 jam pada *shaker waterbath* dengan suhu 40°C dan kecepatan 120 rpm (Pangesti dkk., 2012).

### **3.3.2. Delignifikasi Limbah Bagas Tebu, Sekam Padi, dan Tongkol Jagung**

Limbah bagas tebu, sekam padi, dan tongkol jagung, dicacah dengan ukuran  $\pm 1$  cm. Hasil cacahan diblender dan diayak dengan ayakan 180  $\mu\text{m}$ . Tepung limbah yang dihasilkan didelignifikasi dengan cara merendam tepung limbah dalam larutan NaOCl 0,5% selama 5 jam pada suhu 28°C. Setelah 5 jam sampel dibilas dengan air dan disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6500 rpm. Padatan yang dihasilkan kemudian dikeringkan pada suhu 35°C selama 24 jam. Selanjutnya padatan yang telah kering direndam menggunakan larutan NaOH 10% selama 24 jam pada suhu 28°C. Setelah 24 jam sampel disentrifugasi dan diambil supernatannya. Filtrat yang diperoleh kemudian dinetralkan menggunakan HCl 6N. Selanjutnya sampel disentrifugasi, supernatan yang dihasilkan mengandung xilan. Xilan yang larut dapat dipisahkan dengan menambahkan etanol 95% dengan perbandingan etanol:sampel 3:1 (Richana dkk., 2007). Produk akhir berupa tepung xilan. Masing-masing 0,5 % tepung xilan digunakan sebagai sumber karbon.

### **3.3.3. Optimasi Waktu Produksi Enzim Xilanase**

Pengujian waktu produksi *Bacillus* sp. dalam memproduksi enzim xilanase dilakukan dengan melakukan pengukuran aktivitas enzim xilanase pada kultur isolat *Bacillus* sp. setiap 6 jam sekali selama 30 jam.

### 3.3.4. Optimasi Media

Pengujian optimasi media pertumbuhan terhadap kemampuan *Bacillus* sp. memproduksi enzim xilanase dilakukan dalam 5 tahap. Tahap pertama adalah optimasi sumber karbon. Sumber karbon dalam media Mendels yang digunakan yaitu tepung xilan dari bagas tebu, sekam padi, dan tongkol jagung. Sumber karbon terbaik yang memberikan hasil pengukuran aktivitas enzim paling tinggi dijadikan acuan untuk pelaksanaan tahap kedua.

Tahap kedua adalah optimasi perbedaan konsentrasi sumber karbon yang terdiri dari 4 konsentrasi yaitu: 0,25%; 0,5%; 0,75%; dan 1% yang ditambahkan ke dalam media Mendels yang dimodifikasi untuk kultur *Bacillus* sp. Sebagai kontrol digunakan media Mendels tanpa pemberian sumber karbon. Kultur kemudian diinkubasikan dalam *incubator shaker* pada suhu 40°C dengan kecepatan 120 rpm.

Konsentrasi jenis sumber karbon yang memberikan hasil pengukuran aktivitas enzim paling tinggi dijadikan acuan untuk pelaksanaan tahap ketiga.

Tahap ketiga adalah optimasi sumber nitrogen. Sumber nitrogen yang diuji untuk mengoptimalkan produksi xilanase adalah amonium klorida, amonium sulfat, dan natrium nitrat. Sumber nitrogen yang memberikan hasil pengukuran aktivitas enzim paling tinggi dijadikan acuan untuk pelaksanaan tahap keempat.

Tahap keempat adalah optimasi perbedaan konsentrasi sumber nitrogen yang terdiri dari 4 konsentrasi yaitu: 0,0875%; 0,175%; 0,263%; dan 0,35% yang ditambahkan ke dalam media Mendels yang dimodifikasi untuk kultur *Bacillus* sp. Sebagai kontrol digunakan media Mendels tanpa pemberian sumber nitrogen. Kultur kemudian diinkubasikan dalam *incubator shaker* pada suhu 40°C dengan kecepatan 120 rpm. Konsentrasi jenis sumber nitrogen yang memberikan hasil pengukuran aktivitas enzim paling tinggi dijadikan acuan untuk pelaksanaan tahap kelima.

Tahap kelima adalah optimasi media dengan penambahan gula sederhana ke dalam media Mendels yang dimodifikasi. Gula sederhana yang digunakan adalah: glukosa, laktosa, sukrosa dan xilosa sebanyak 0,0625 gram (Sadhu, 2010).

### **3.3.5. Penentuan Aktivitas Enzim Xilanase**

Pengujian aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan metode DNS (Miller, 1959). Sebanyak 0,5 ml enzim ditambahkan ke dalam 0,5 ml *buffer* sitrat *xylan beechwood* dengan pH 6 dalam tabung reaksi. Tabung reaksi diinkubasi pada inkubator selama 30 menit pada suhu 40°C, kemudian sebanyak 1 ml pereaksi DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi untuk mengikat gula pereduksi. Selanjutnya tabung reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan selama 20 menit untuk membuat enzim tidak aktif dan stabil pada saat dilakukan pengukuran aktivitas enzim menggunakan

spektrofotometer. Aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel pada  $\lambda=575$  nm. Sebagai blangko, penambahan enzim ke dalam tabung reaksi dilakukan setelah proses inkubasi. Hasil pengukuran absorbansi digunakan untuk menentukan kadar xilosa menggunakan persamaan regresi linier sebagai berikut.

$$Y = a + bx$$

Keterangan: Y = nilai absorbansi pada panjang gelombang  $\lambda=575$  nm  
 a dan b = perhitungan gula standar xilosa  
 x = kadar xilosa.

Satu unit aktivitas xilanase (U/ml) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepaskan  $\mu\text{mol}$  xilosa per menit (Dybkær, 2002).

Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{kadar xilosa } (\mu\text{g/mL}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat molekul xilosa} \times \text{waktu inkubasi (menit)}}$$

### 3.3.6. Pembuatan Kurva Standar Xilosa

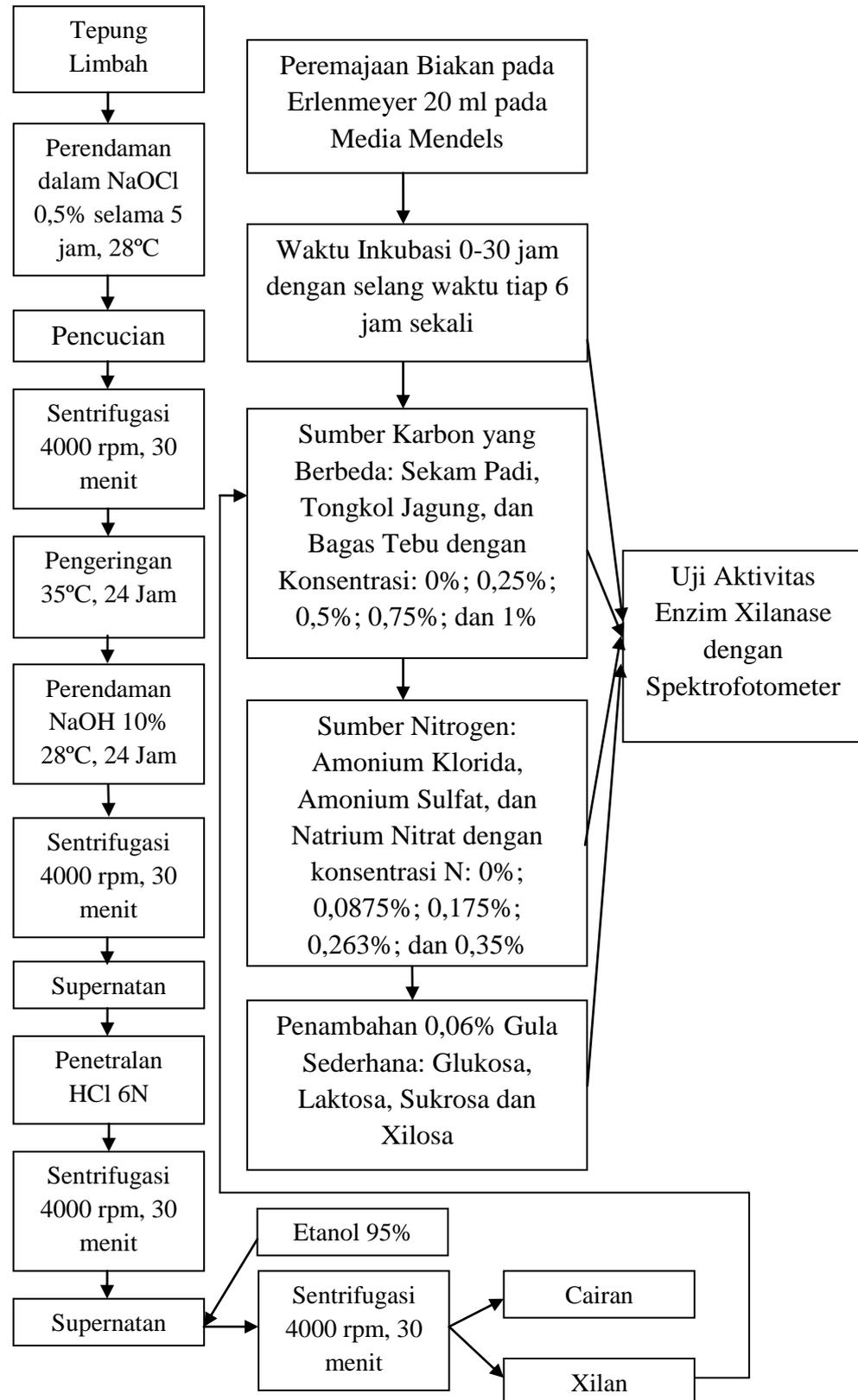
Satu set larutan standar xilosa yang terdiri dari 0  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , dan 500  $\mu\text{g/ml}$  masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi. Kedalam masing-masing tabung reaksi dimasukkan 0,5 ml *buffer* sitrat xilan pH 6. Larutan diinkubasi dalam *shaker waterbath* selama 30 menit pada suhu 40°C. Setelah diinkubasi, ke dalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 ml pereaksi DNS, lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Sebelum dilakukan pengukuran, tabung reaksi didinginkan dalam air

dingin selama 20 menit. Sebagai blangko, akuades ditambahkan pereaksi DNS. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan  $\lambda=575$  nm (Miller, 1959).

#### **3.4. Analisis Data**

Data aktivitas enzim xilanase yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berdasarkan data aktivitas enzim xilanase.

### 3.5. Bagan Alir Penelitian



Gambar 5. Bagan Alir Penelitian