

III. METODE KERJA

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dari bulan Januari 2015 sampai bulan Mei 2015.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas beaker, jarum ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, oven, pembakar bunsen, timbangan, inkubator, *hot plate stirrer*, *water bath shaker*, *micropipet*, *tip*, *autoclave*, *laminar air flow*, *pH meter* dan *spektrofotometer*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tepung bonggol

jagung, *Agar bacteriological*, alkohol 70%, aquades, *Xylan beechwood* 0,5%, *buffer (sitrat, fosfat, Tris-HCl)*, *spritus*, reagen DNS, *congo red*, gula xilosa (koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila), isolat bakteri uji *Bacillus* sp. (koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila), dan media modifikasi Mandels dan Reese (Tabel 2) (Mandels dan Reese, 1956).

Tabel 2. Media Mandels yang dimodifikasi dan Media Mandels dan Reese

No	Bahan	Mandels dan Reese (%)	Modifikasi Mandels dan Reese (%)
1	Protease peptone	0,1	-
2	CaCl ₂	0,03	-
3	Urea	0,03	-
4	NaCl	0,14	0,2
5	KH ₂ PO ₄	0,2	0,245
6	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,00003	0,035
7	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14	0,175
8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0005	-
9	ZnCl	0,00017	-
10	MnSO ₄ .H ₂ O	0,00016	-
11	Xilan	-	0,5
12	Cellulose	0,001	-
13	<i>Yeast Extract</i>	-	0,35
14	<i>Tryptone Water</i>	-	0,35

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif dengan tiga faktor yang diamati yaitu suhu pada 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, dan 90°C pH *buffer* 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 serta lama penyimpanan terhadap kestabilan enzim yaitu pada 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 jam dengan tiga kali pengulangan. Besarnya aktivitas enzim ditentukan berdasarkan gula reduksi yang terbentuk. Kandungan gula reduksi diketahui dengan metode DNS dan dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.

1. Pembuatan Media Peremajaan

Media peremajaan di buat berdasarkan modifikasi Mandels dan Reese (Tabel 2) yang ditambahkan dengan agar 1,5% dari volume aquades kemudian dimasukkan aquades dengan volume 100 mL ke dalam gelas beaker 500 mL. Bahan-bahan tersebut dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan *hot plate stirer* lalu dipindahkan ke dalam erlenmeyer di beri sumbat dan dilapisi alumunium foil. Media disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Dalam keadaan cair media dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian di miringkan diamkan sampai media padat.

2. Peremajaan *Bacillus sp* (Media Miring)

Peremajaan bakteri *Bacillus sp.* dilakukan dengan mengambil satu ose

stok isolat secara aseptis dan diinokulasikan pada media miring yang terdiri dari media modifikasi Mandels dan Reese ditambah *agar bacteriological* 1,5% dan 0,5% *xylan beechwood* di dalam tabung reaksi yang steril. Isolat kemudian diinkubasi pada suhu 39°C selama 12 jam.

3. Pembuatan Media Produksi Enzim (modifikasi Mandels dan Reese)

Media produksi enzim di buat berdasarkan modifikasi Mandels dan Reese (Tabel 2) dengan volume 100 mL aquades dimasukkan ke dalam gelas beaker 500 mL. Selanjutnya dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan *hot plate stirer*, lalu pindahkan ke dalam erlenmeyer beri sumbat pada erlenmeyer dan dilapisi dengan alumunium foil. Kemudian di sterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Uji Kualitatif Xilanolitik *Bacillus* sp

Satu ose bakteri *Bacillus* sp diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi media modifikasi Mandels dan Reese yang ditambahkan agar. Setelah diinokulasi, cawan petri yang sudah di bungkus dengan kertas diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan penyiraman pada media yang telah ditumbuhi bakteri menggunakan

larutan *congo red* 1 % rendam selama 15 menit, kemudian cuci menggunakan NaCl 0,1%. Zona jernih yang terbentuk menandakan *Bacillus* sp mempunyai aktivitas xilanolitik.

5. Penentuan Lama Waktu Inkubasi Untuk Mendapatkan Aktivitas tertinggi Enzim Xilanase

Untuk mendapatkan aktivitas tertinggi dari enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri perlu dilakukan pengujian lama waktu inkubasi. Lama waktu inkubasi terbaik akan digunakan dalam proses pembuatan stater dan produksi enzim. Erlenmeyer volume 250 mL diisi dengan 45 mL media stater bakteri, kemudian dimasukkan *Bacillus* sp sebanyak 1 ose, lalu diinkubasi dengan menggunakan waterbath shaker selama 24 jam, pada suhu 39° C. Setelah 24 jam stater bakteri yang sudah dibuat diambil 5 ml (10% dari jumlah media produksi yang digunakan) kemudian inkubasi pada suhu 39° C. Untuk mengetahui tingkat pertumbuhan ditetapkan dengan cara pengambilan sample setiap 6 jam sekali pada jam ke-6, ke-12, ke-16, ke-24, dan ke-30 jam. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur gula reduksi yang diikat oleh DNS (Tabel.3). Gula reduksi yang telah terbentuk dideteksi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm. Setelah dilakukan pengukuran dapat diketahui waktu optimum aktivitas enzim.

6. Pengujian Gula Standar Xilosa Dengan Metode Bernfeld (1955)

Larutan standar xilosa dibuat pada konsentrasi 0 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, dan 500 µg/mL. Pengujian gula standar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Pengujian gula standar xilosa

Bahan (mL)	Xil-0 (µg/ml)	Xil-100 µg/ml	Xil-200 µg/ml	Xil-300 µg/ml	Xil-400 µg/ml	Xil-500 µg/ml
Gula Standar	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Larutan Buffer*	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Larutan DNS	1	1	1	1	1	1
Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit						
Larutan didinginkan di air dingin selama 20 menit, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm						
*0,5% <i>xylan beechwood</i> dalam buffer sitrat pH 6 0,05 M						

Sumber : Sumardi dan Ekowati (2013)

Nilai absorbansi yang telah didapatkan digunakan untuk menentukan kadar xilosa dengan rumus persamaan regresi linier $Y = bx+a$ nilai a dan b diperoleh setelah dilakukan pengukuran gula standar sedangkan Y merupakan nilai absorbansi yang dihasilkan dari pengukuran pada panjang gelombang 575 nm dan x adalah kadar

xilosa yang dihasilkan. Setelah mendapatkan nilai absorbansi gula standar, untuk mendapatkan nilai a dan b dapat dilakukan perhitungan menggunakan rumus berikut:

$$b = [n\sum xy - \sum x \sum y] : [n\sum x^2 - (\sum x)^2]$$

$$a = [\sum y - b\sum x] : n$$

Keterangan :

n = Jumlah sampel

x = Kadar gula

y = Nilai absorbansi

7. Pembuatan Starter Bakteri

Bacillus sp. dalam media miring umur 12 jam diinokulasikan menggunakan jarum ose ke dalam erlenmeyer berukuran 100 mL yang berisi 20 mL media produksi. Kemudian diinkubasi dengan menggunakan waterbath shaker dengan kecepatan 100 rpm dengan suhu 39°C selama 12 jam.

8. Produksi Enzim

Proses produksi enzim dilakukan dengan cara mengambil 2 ml (10% dari media produksi) starter bakteri *Bacillus* sp dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi 18 mL media modifikasi Mandels dan Reese steril. Lalu kultur diinkubasi selama 12 jam pada

waterbath shaker dengan suhu 39° C. Setelah masa inkubasi, dilakukan sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase yang digunakan untuk pengujian karakteristik enzim xilanase.

9. Pengujian Aktivitas Enzim Xilanase

Penentuan aktivitas enzim dilakukan berdasarkan kadar xilosa yang dihasilkan. Pengukuran kadar xilosa dilakukan dengan menggunakan metode DNS dengan langkah – langkah yang terdapat pada tabel 4.

Tabel 4. Pengujian aktivitas enzim xilanase

Bahan	Kontrol	Uji
Enzim	-	0,5 mL
0,5% <i>xylan beechwood</i> dalam <i>buffer</i> 0,05 M	0,5 mL	0,5 mL
Larutan diinkubasi (suhu optimum dan suhu 40 °C) selama 30 menit		
Dimasukkan dalam air dingin		
Larutan DNS	1 mL	1 mL
Enzim	0,5 mL	-
Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit		
Larutan didinginkan di air dingin selama 20 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm		

Sumber : Sumardi dan Ekowati (2013)

Penentuan aktivitas enzim xilanase per unit dapat ditentukan dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{\text{kadar xilosa } (\mu\text{g}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{BM Xilosa} \times \text{waktu inkubasi}}$$

$$\text{Aktivitas Enzim Relatif (\%)} = \frac{\text{Aktifitas enzim yang diperoleh (U/ml)}}{\text{Aktivitas enzim optimum (U/ml)}} \times 100\%$$

Keterangan = BM xilosa : 150,13 g/mol
 Waktu inkubasi : 30 menit
 Kadar xilosa : x $\mu\text{g/mol}$

10. Karakterisasi Enzim Xilanase

a. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase

Penentuan suhu inkubasi optimum enzim xilanase dilakukan dengan menginkubasi 0,5 mL ekstrak kasar enzim dan 0,5mL 0,5% *xylan beechwood* dalam *buffer* sitrat 0,05 M pada suhu 30 °C, 40 °C, 50 °C , 60 °C , 70 °C , 80 °C, dan 90 °C selama 30 menit. Setelah 30 menit, ditambahkan 1 mL larutan DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam wadah berisi air dingin selama 20 menit. Dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada λ 575 nm.

b. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase

Penentuan suhu inkubasi optimum enzim xilanase dilakukan dengan menginkubasi 0,5 mL ekstrak kasar enzim dan 0,5mL 0,5% *xylan beechwood* dalam *buffer* 0,05 M pada suhu optimum dan suhu 40 °C selama 30 menit. Untuk pengujian pH optimum pelarutan 0,5% *xylan beechwood* dilakukan dalam *buffer* yang memiliki pH yang berbeda. *Buffer* yang digunakan, yaitu *buffer* sitrat pH 4, 5, dan 6, bufer fosfat pH 7, dan bufer Tris-HCl pH 8 dan 9. Setelah 30 menit, ditambahkan 1mL larutan DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam wadah berisi air dingin selama 20 menit. Dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada λ 575 nm.

c. Pengaruh Lama Waktu Penyimpanan Terhadap Kestabilan Enzim

Ekstrak kasar enzim yang telah dihasilkan selanjutnya disimpan pada suhu optimum dan 40 °C. Pengujian terhadap lama penyimpanan dilakukan pada 5 variasi waktu yang terdiri dari 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 jam. Setelah dilakukan penyimpanan dilakukan pengujian aktivitas enzim (tabel. 4) dengan menggunakan suhu optimum dan suhu 40 °C sebagai suhu inkubasi dan pH *buffer* optimum dalam melarutkan 0,5% *xylan beechwood*.

D. Diagram Alir

