

**SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI MANANOLITIK DARI  
CAMPURAN TANAH DAN UMBI PORANG BESERTA  
KARAKTERISASI ENZIMNYA**

**SKRIPSI PENELITIAN**

Oleh:

**SANDY SANTOSO**

**NIM 155100501111008**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Bioteknologi



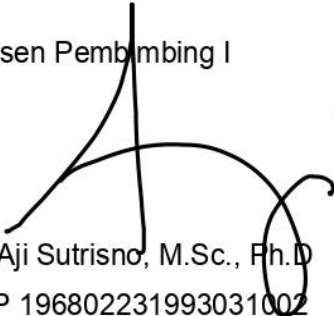
**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2020**

## LEMBAR PERSETUJUAN

Judul TA : Skrining dan Isolasi Bakteri Mananolitik dari Campuran  
Tanah dan Umbi Porang beserta Karakterisasi Enzimnya  
Nama Mahasiswa : Sandy Santoso  
NIM : 155100501111008  
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I



Ir. Aji Sutrisno, M.Sc., Ph.D  
NIP 196802231993031002

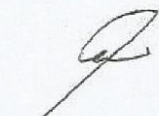
Tanggal Persetujuan :

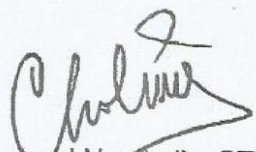
## LEMBAR PENGESAHAN

Judul TA : Skringing dan Isolasi Bakteri Mananolitik dari Campuran Tanah dan Umbi Porang beserta Karakterisasi Enzimnya:  
Nama Mahasiswa : Sandy Santoso  
NIM : 155100501111008  
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas : Teknologi Pertanian

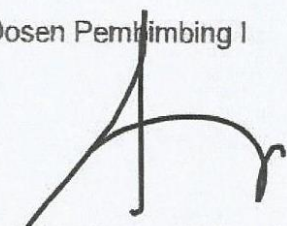
Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

  
Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA  
NIP 195906131986011001

  
Mochamad Nurcholis, STP., MP, Ph.D  
NIK 2009118507201001

Dosen Pembimbing I

  
Ir. Aji Sutrisno, M.Sc., Ph.D  
NIP 196802231993031002

Ketua Jurusan  
  
Dr. Widya Pw. Rukmi Putri, STP., MP  
NIP 197005041999032002

Tanggal Persetujuan :

## RIWAYAT HIDUP

Sandy Santoso, lahir di Probolinggo pada tanggal 3 Agustus 1997 dari pasangan Eko Santoso dan Lidiya. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara, dengan adik bernama Michael Santoso.

Sebelumnya penulis telah menyelesaikan jenjang pendidikan di TKK Mater Dei Probolinggo pada tahun 2003, sekolah dasar di SDK Mater Dei Probolinggo pada tahun 2009, sekolah menengah pertama di SMPK Mater Dei Probolinggo pada tahun 2012 dan sekolah menengah atas di SMAK Kolese Santo Yusup Malang pada tahun 2015. Selanjutnya penulis melanjutkan studi perguruan tinggi pada tahun 2015 di Universitas Brawijaya melalui jalur SNMPTN sebagai mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian jurusan Teknologi Hasil Pertanian program studi Bioteknologi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa  
Karya ini saya persembahkan kepada  
kedua Orang Tuaku dan Adikku tercinta

## PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Sandy Santoso  
NIM : 155100501111008  
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas : Teknologi Pertanian  
Judul TA : Skrining dan Isolasi Bakteri Mananolitik dari Campuran Tanah dan Umbi Porang beserta Karakterisasi Enzimnya

Menyatakan bahwa,

TA dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar saya bersedia dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Malang, 18 Mei 2020

Pembuat Pernyataan,



Sandy Santoso  
NIM 155100501111008

Sandy Santoso. 15500501111008. Skrining dan Isolasi Bakteri Mananolitik dari Campuran Tanah dan Umbi Porang beserta Karakterisasi Enzimnya.

SKRIPSI. Pembimbing I: Dr. Ir. Aji Sutrisno, M. Sc.

## RINGKASAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki biodiversitas mikroorganisme yang sangat beragam namun masih kurang dieksplorasi. Bakteri mananolitik merupakan salah satunya. Bakteri mananolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim mananase yang mampu mendegradasi senyawa manan dan turunannya. Enzim mananase tersebut memiliki aplikasi yang luas pada sektor industri pangan, pakan ternak, farmasi, industri kertas dan masih banyak lagi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri mananolitik dan mengetahui karakter dari enzimnya

Bakteri dari umbi porang (*Amorphophallus muelleri*) yang dibusukkan dalam tanah diisolasi dan dilakukan konfirmasi aktivitas mananolitiknya dengan menggunakan media selektif diikuti *staining* menggunakan Congo red 1%. Isolat bakteri mananolitik dengan aktivitas mananase tertinggi diidentifikasi secara morfologi dengan 16S rRNA. Ekstrak enzim kasar yang diperoleh dilakukan purifikasi menggunakan metode presipitasi amonium sulfat dan dialisis. Aktivitas ekstrak kasar maupun hasil purifikasi diuji menggunakan dengan metode DNS pada 540 nm. Kemudian dilakukan karakterisasi terhadap sifat enzim tersebut.

Hasil penelitian diketahui diperoleh beberapa isolat mananolitik. Isolat dengan aktivitas mananolitik terbaik diketahui memiliki kekerabatan dengan *Streptococcus macedonicus*. Konsentrasi presipitasi amonium sulfat optimum adalah 80%. Aktivitas optimum enzim tersebut pada suhu 45°C sebesar 3,2 U/mg dan pH 7 sebesar 9,4 U/mg. Kestabilan suhu enzim mananase tersebut berkisar pada suhu 35–55°C dan pH 5–7. Substrat yang meningkatkan aktivitas enzim mananase tersebut adalah *guar gum*. Ion logam yang meningkatkan aktivitas enzim mananase tersebut adalah  $Mn^{2+}$ .

**Kata Kunci:** Skrining, bakteri mananolitik, enzim mananase, karakterisasi

Sandy Santoso. 15500501111008. Screening and Isolation Mannanolytic Bacteria from Mixture of Soil and Porang Tuber along with the Characterization of the Enzyme. TA. Supervisor: Dr. Ir. Aji Sutrisno, M. Sc.

### SUMMARY

Indonesia is a country that has a diversity of microorganisms that are diverse but still less explored. Mannanolytic bacteria are one of them. Mannanolytic bacteria are bacteria that are able to produce mannanase enzyme that is able to degrade mannan compound and its derivatives. The mannanase enzyme has broad applications in the food industry, animal feed, pharmaceutical, paper industries and many more. This study aims to obtain mannanolytic bacteria isolates and determine the character of the enzyme

Bacteria from porang tubers (*Amorphophallus muelleri*) is decomposed in soil and isolated and confirmed its mannanolytic activity with selective media followed by staining using Congo red 1%. Mannanolytic bacterial isolates with the highest mannanase activity were morphologically identified by 16S rRNA. The crude enzyme extract obtained was purified using ammonium sulfate precipitation and dialysis methods. Coarse extract activity and purification results were tested using the DNS method at 540 nm. Then the enzyme was characterized.

The results are known to have been obtained by several manolytic isolates. The isolate with the best mannanolytic activity is known to have a kinship with *Streptococcus macedonicus*. The optimum concentration of ammonium sulfate precipitation is 80%. The optimum activity of the enzyme at 45°C was 3,2 U / mg and pH 7 was 9,4 U / mg. The stability of the temperature of the mannanase enzyme is around 35-55°C and pH 5-7. The substrate that increases the activity of the mannanase enzyme is guar gum. The metal ion which increases the activity of the mannanase enzyme is Mn<sup>2+</sup>.

**Keywords:** Screening, mannanolytic bacteria, mannanase enzyme, characterization



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Tuhan yang Maha Esa atas rahmat dan kasih karunia-Nya kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Skrining dan Isolasi Bakteri Mananolitik dari Campuran Tanah dan Umbi Porang beserta Karakterisasi Enzimnya". Penyusunan tugas akhir ini sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi strata 1 (S1) pada Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Aji Sutrisno, M.Sc, Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah sabar dalam membantu memberikan ilmu dan masukan.
2. Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA dan Mochamad Nurcholis, STP., MP, Ph.D selaku dosen penguji yang memberikan masukan
3. Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP., MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
4. Kedua orang tuaku dan saudaraku yang telah memberikan dukungan dan bantuan untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Dedy Muzaki selaku partner saya telah menemani penelitian ini hingga akhir.
6. Teman-teman seperjuangan angkatan 2015 Cindy, Belinda, Pauline, Venisa, Kiki dan Yulian atas dukungan dan saran yang diberikan.
7. Kakak kelas pasca sarjana kak Miko, kak Ajeng dan kak Lulus yang memberikan saran dan dukungan terhadap penelitian ini.
8. *Supplier* dan pamanku yang membantu penyediaan alat dan bahan untuk penelitian
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan keilmuan dalam meningkatkan kualitas kehidupan masyarakat.

Malang, Mei 2020

Penulis

**DAFTAR ISI**

<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERUNTUKAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN</b> .....	v
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah Penelitian.....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	2
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Bakteri Mananolitik.....	3
2.2 Senyawa Manan.....	3
2.3 Enzim Mananase.....	4
2.3.1 $\beta$ -mananase .....	6
2.3.2 $\beta$ -manosidase.....	7
2.3.3 $\beta$ -glukosidase .....	7
2.3.4 $\alpha$ -galaktosidase.....	7
2.4 Umbi Porang .....	7
2.5 Tanah.....	9
2.6 Isolasi Bakteri.....	10
2.6.1 Metode <i>Streak Plate</i> .....	10
2.6.2 Metode <i>Pour Plate</i> .....	11
2.6.3 Metode <i>Spread Plate</i> .....	11
2.7 Identifikasi Bakteri dengan Metode 16S rRNA.....	12
2.8 Purifikasi Enzim.....	12



2.8.1	Presipitasi Protein dengan Amonium Sulfat.....	13
2.8.2	Dialisis.....	14
2.9	Pengaruh Beberapa Faktor terhadap Aktivitas Enzim.....	14
2.9.1	Suhu.....	15
2.9.2	pH.....	15
2.9.3	Substrat.....	15
2.9.4	Kofaktor Inhibitor.....	15
<b>III. METODE PENELITIAN</b>		
3.1	Tempat dan Waktu.....	16
3.2	Alat dan Bahan.....	16
3.2.1	Alat.....	16
3.2.2	Bahan.....	16
3.3	Metode Penelitian.....	17
3.4	Pelaksanaan Penelitian.....	17
3.4.1	Pembuatan Media Racik Tepung Porang.....	17
3.4.2	Pengumpulan Sampel Umbi Porang.....	17
3.4.3	Metode Isolasi Bakteri dari Umbi Porang.....	18
3.4.4	Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi.....	18
3.4.5	Konfirmasi Aktivitas Mananolitik Bakteri Isolat.....	19
3.4.6	Penentuan Waktu Produksi Enzim.....	19
3.4.7	Purifikasi Enzim.....	19
3.4.7.1	Presipitasi Amonium Sulfat.....	19
3.4.7.2	Dialisis.....	20
3.4.8	Karakterisasi Enzim.....	20
3.5	Pengujian dan Analisa Data.....	20
3.5.1	Skrining Bakteri Mananolitik.....	20
3.5.2	Identifikasi Molekular.....	21
3.5.3	Penentuan Waktu Produksi Enzim.....	22
3.5.4	Purifikasi Enzim.....	23
3.5.5	Karakterisasi Enzim.....	24
3.5.5.1	Penentuan Suhu Optimal.....	24
3.5.5.2	Penentuan pH Optimal.....	24
3.5.5.3	Penentuan Kestabilan Suhu.....	25
3.5.5.4	Penentuan Kestabilan pH.....	25
3.5.5.5	Spesifitas Substrat.....	25

3.5.5.6 Pengaruh Ion Logam.....	25
3.6 Diagram Alir.....	26
3.6.1 Diagram Alir Pengambilan Sampel Umbi Porang.....	26
3.6.2 Diagram Alir Isolasi Bakteri dari Sampel Umbi Porang.....	27
3.6.3 Diagram Alir Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi.....	28
3.6.4 Diagram Alir Konfirmasi Isolat Hasil <i>Streak Plate</i> .....	29
3.6.5 Diagram Alir Ekstraksi Enzim.....	30
3.6.6 Diagram Alir Uji DNS pada Sampel Enzim.....	31
3.6.7 Diagram Alir Uji Biuret.....	32
3.6.8 Diagram Alir Penentuan Suhu Optimal.....	33
3.6.9 Diagram Alir Penentuan pH Optimal.....	34
3.6.10 Diagram Alir Penentuan Kestabilan Suhu.....	35
3.6.11 Diagram Alir Penentuan Kestabilan pH.....	36
3.6.12 Diagram Alir Spesifitas Substrat.....	37
3.6.13 Diagram Alir Pengaruh Ion Logam.....	38
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Mananolitik.....	39
4.1.1 Isolasi Bakteri Mananolitik.....	39
4.1.2 Identifikasi Bakteri Mananolitik.....	41
4.2 Produksi dan Isolasi Enzim.....	47
4.3 Purifikasi Enzim.....	49
4.3.1 Presipitasi Amonium Sulfat.....	50
4.3.2 Dialisis.....	50
4.4 Karakterisasi Enzim.....	51
4.4.1 Suhu Optimum.....	51
4.4.2 pH Optimum.....	52
4.4.3 Kestabilan Suhu.....	53
4.4.4 Kestabilan pH.....	54
4.4.5 Pengaruh Ion Logam.....	54
4.4.6 Spesifitas Substrat.....	55
<b>V. KESIMPULAN</b> .....	57
5.1 Kesimpulan.....	57
5.2 Saran.....	57
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	58
<b>LAMPIRAN</b> .....	62

DAFTAR TABEL

2.1 Komposisi Kimia Umbi Porang Segar dan Tepung Porang..... 9

3.1 Primer yang Digunakan dalam PCR 16S rDNA..... 21

4.1 Isolat Positif Hasil Streak ..... 40

4.2 Tingkat Kemurnian DNA Ekstraksi..... 41

4.3 Hasil 5 Teratas Penelusuran BLAST..... 45

4.4 Purifikasi Enzim Mananase..... 49

4.5 Aktivitas Enzim pada Beberapa Fraksi Pengendapan..... 50



DAFTAR GAMBAR

2.1 Struktur dari Beberapa Tipe Manan ..... 4

2.2 Jalur Degradasi Manan secara Enzimatis ..... 5

2.3 Mekanisme Hidrolisis  $\beta$ -mananase dari *Thermospora fusca* ..... 6

2.4 Tumbuhan Porang ..... 8

2.5 Proses *Streak Plate* ..... 10

2.6 Proses *Pour Plate* ..... 11

2.7 Proses *Spread Plate* ..... 12

2.8 Proses *Salting In* dan *Salting Out* ..... 13

2.9 Proses Dialisis ..... 14

3.1 Diagram Alir Pengambilan Sampel Umbi Porang ..... 26

3.2 Diagram Alir Isolasi Bakteri dari Sampel Umbi Porang ..... 27

3.3 Diagram Alir Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi ..... 28

3.4 Diagram Alir Konfirmasi Isolat Hasil *Streak Plate* ..... 29

3.5 Diagram Alir Ekstraksi Enzim ..... 30

3.6 Diagram Alir Uji DNS pada Sampel Enzim ..... 31

3.7 Diagram Alir Uji Biuret ..... 32

3.8 Diagram Alir Penentuan Suhu Optimal ..... 33

3.9 Diagram Alir Penentuan pH Optimal ..... 34

3.10 Diagram Alir Penentuan Kestabilan Suhu ..... 35

3.11 Diagram Alir Penentuan Kestabilan pH ..... 36

3.12 Diagram Alir Spesifitas Substrat ..... 37

3.13 Diagram Alir Pengaruh Ion Logam ..... 38

4.1 Konfirmasi Aktivitas Mananolitik ..... 40

4.2 Foto Hasil Elektroforesis DNA Hasil PCR 16S rDNA ..... 42

4.3 Marker yang Digunakan ..... 43

4.4 Hasil PCR Colony ..... 44

4.5 Sekuens DNA Sampel ..... 45

4.6 Pohon Filogenik Sampel ..... 46

4.7 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim ..... 48

4.8 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Mananase ..... 51

4.9 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Mananase ..... 52

4.10 Kestabilan Aktivitas Enzim Mananase terhadap Variasi Suhu..... 53

4.11 Kestabilan Aktivitas Enzim Mananase terhadap Variasi pH ..... 54

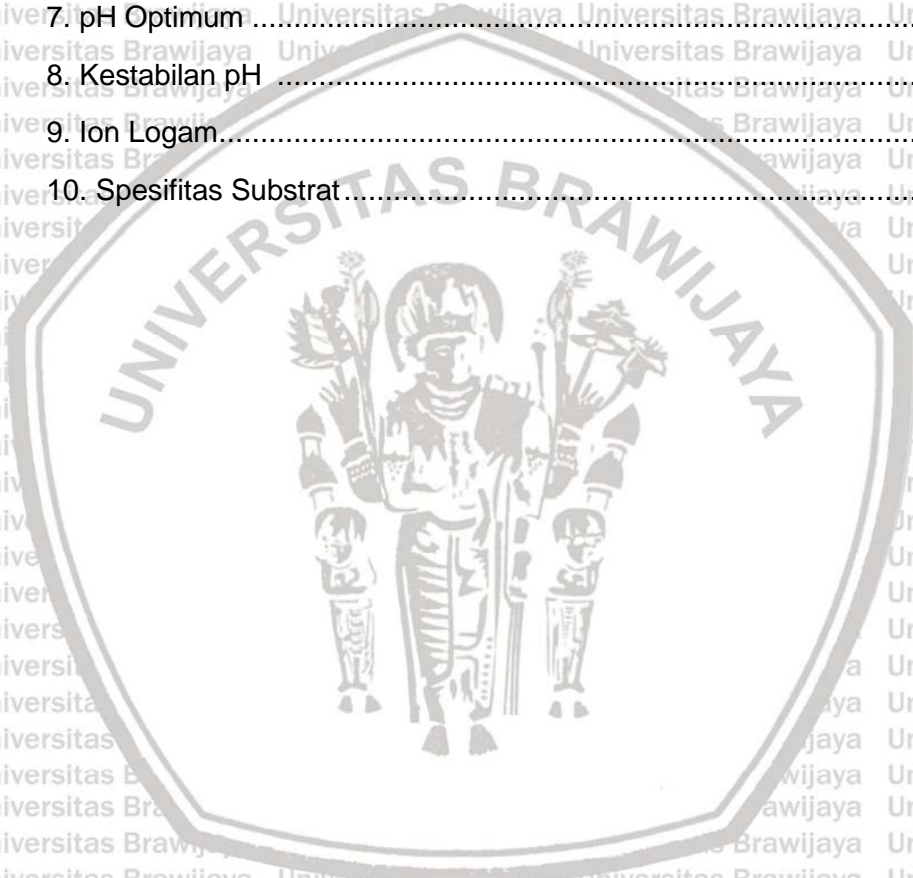
4.12 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Mananase ..... 55

4.13 Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Enzim Mananase ..... 56



LAMPIRAN

1. Hasil Sequencing Sampel.....	62
2. Vector pTA2.....	63
3. Kurva Standar Manosa.....	64
4. Kurva Standar Biuret.....	65
5. Suhu Optimum.....	66
6. Kestabilan Suhu.....	66
7. pH Optimum.....	67
8. Kestabilan pH.....	67
9. Ion Logam.....	68
10. Spesifitas Substrat.....	68





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim berperan penting dalam industri di masa sekarang. Produksi menggunakan enzim memiliki banyak manfaat ketimbang menggunakan reaksi kimia, seperti lebih ramah lingkungan dan dapat mengurangi biaya produksi. Sebanyak 80% dari keperluan enzim industrial secara keseluruhan merupakan enzim hidrolitik Oetomo (2012) dalam Seftiono (2017). Salah satu dari enzim hidrolitik yang digunakan dalam industri adalah mananase.

Enzim mananase merupakan enzim yang mendegradasi manan dan senyawa turunannya. Enzim mananase dapat diaplikasikan pada industri kertas sebagai *biobleaching* menggantikan *pre-treatment* yang menggunakan kondisi basa, agen hidrolitik dalam industri deterjen, meningkatkan kualitas pakan ternak juga dalam industri pangan dan farmasi (Chauhan *et al.*, 2012). Enzim mananase biasanya diproduksi oleh bakteri mananolitik.

Bakteri mananolitik merupakan jenis bakteri yang mampu memproduksi enzim mananase. Bakteri merupakan makhluk hidup mikroskopis bersel tunggal yang memiliki daur hidup yang singkat. Hal ini menyebabkan bakteri mampu menghasilkan produk dalam jumlah yang cukup besar, dalam hal ini enzim  $\beta$ -mananase. Beberapa bakteri yang dihasilkan dari penelitian yang telah dilakukan adalah *Paenibacillus cookii* (Yin *et al.*, 2012), *Klebsiella edwardsii* (Olaniyi dan Arotupin, 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (Zurmiati *et al.*, 2017) dan *Bacillus subtilis* BE-91 (Cheng *et al.*, 2016).

Namun dengan potensinya yang cukup tinggi, pemanfaatan mananase masih dapat terbilang cukup rendah. Sehingga banyak dilakukan penelitian untuk menemukan bakteri mananolitik. Tanah merupakan sumber bakteri yang cukup bagus untuk mencari bakteri mananolitik, terutama bila dilakukan penambahan substrat yang dapat menginduksi keberadaan bakteri mananolitik seperti porang, *palm kernel cake* (PKC) dan *copra meal*. Yin dalam penelitiannya Yin *et al.* (2012) melakukan isolasi bakteri *Paenibacillus cookii* dari tanah Taiwan utara. Tidak hanya menemukan isolat namun penelitian tersebut juga melakukan purifikasi dan karakterisasi enzimnya.

Penelitian dilakukan dengan isolasi dan skrining menggunakan sampel umbi porang yang dibusukkan beserta tanah yang digunakan. Kemudian dilakukan pemurnian dan identifikasi secara molekular (16S rRNA). Selanjutnya

ditentukan kondisi produksi optimum agar diperoleh enzim mananase dengan aktivitas optimum yang akan dilakukan purifikasi parsial dan karakterisasi.

Karakterisasi dilakukan agar mengetahui aplikasi industri yang memungkinkan untuk enzim mananase tersebut.

## 1.2 Perumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut:

1.2.1 Apakah ada bakteri mananolitik pada sampel campuran tanah dan porang yang diuji?

1.2.2 Bagaimana metode isolasi dan purifikasi penghasil enzim mananase dari bakteri?

1.2.3 Bagaimana karakteristik enzim mananase yang dihasilkan bakteri?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah diuraikan, tujuan penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

1.3.1 Mengetahui adanya bakteri mananolitik pada porang yang dibusukkan.

1.3.2 Mendapatkan enzim mananase dari bakteri

1.3.3 Mengetahui karakteristik enzim mananase yang dihasilkan dari bakteri.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian yang berupa isolat bakteri mananolitik yang mampu mendegradasi glukomanan. Enzim mananase yang diperoleh dilakukan identifikasi dan karakterisasi agar diketahui potensinya dalam industri.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri Mananolitik

Bakteri merupakan makhluk hidup uniselular berukuran mikroskopik yang tumbuh di mana saja. Mereka dapat tumbuh di tanah, air, udara maupun manusia. Bakteri memiliki interaksi manusia baik positif maupun negatif. Ada bakteri yang berperan dalam proses fermentasi makanan maupun yang menyebabkan sakit pada manusia. Bakteri memiliki daur hidup yang cepat sehingga sangat ideal untuk melakukan produksi senyawa organik (Amyes, S. G. B., 2013).

Bakteri mananolitik merupakan jenis bakteri yang mampu memproduksi enzim  $\beta$ -mananase yang mampu memecah senyawa manan. Enzim  $\beta$ -mananase sendiri adalah enzim yang mampu menghidrolisis manan menjadi manosa dan mano-oligosakarida (Wahyuni *et al.*, 2014).

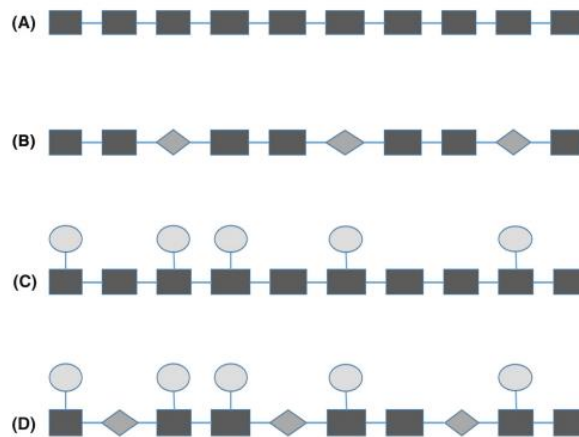
Mananase dapat diperoleh dari mikroorganisme mananolitik yang dapat diperoleh dari berbagai sumber lingkungan seperti tanah dan laut. Penelitian sebelumnya menemukan *Paenibacillus cookii* yang mampu menghasilkan mananase yang diisolasi dari tanah Taiwan utara (Yin *et al.*, 2012), *Bacillus amyloliquefaciens* (Zurmiati *et al.*, 2017) dan *Bacillus subtilis* BE-91 (Cheng *et al.*, 2016). Selain itu juga diperoleh *Klebsiella edwardsii* yang mampu menghasilkan mananase yang diisolasi dari limbah agrikultural seperti kulit nanas, biji kapas, kulit singkong, cangkang kelapa, kulit pisang dan kulit kentang (Olaniyi dan Arotupin, 2013).

### 2.2 Senyawa Manan

Manan adalah salah satu penyusun utama dari hemiselulosa. Hemiselulosa sendiri merupakan polisakarida struktural dari dinding sel tumbuhan. Hemiselulosa terdiri dari berbagai jenis polimer gula yang dinamakan berdasarkan komponen utama gula penyusunnya (80-90%), salah satunya adalah manan hemiselulosa yang sebagian besar mengandung manosa. Manan terdiri dari monomer manosa yang berikatan secara ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Selain D-manosa, gula-gula lainnya seperti glukosa, galaktosa dan gugus asetil bisa terdapat dalam manan (Shukla, P. *et al.*, 2013).

Manan dapat diklasifikasikan berdasarkan keberadaan gula-gula selain D-manosa dalam struktur manan. Klasifikasi manan tersebut meliputi manan yang

linear, glukomanan, galaktomanan dan galaktoglukomanan. Manan linier merupakan struktur homo-polisakarida yang memiliki rantai utama terdiri dari residu ikatan 1,4  $\beta$ -D-manopiranosil atau ikatan manosa dengan manosa. Glukomanan memiliki rantai utama yang terdiri atas residu ikatan  $\beta$ -1,4-D-manosa dan D-glukosa. Sedangkan pada galaktomanan, galaktosa terdapat dan menggantikan ikatan samping dari ikatan utama gula manosa membentuk cabang. Pada galaktoglukomanan, terdapat galaktosa sebagai rantai samping pada ikatan  $\alpha$ -1,6 dengan rantai utama yang memiliki manosa dan glukosa (Shukla, P. *et. al.*, 2013).



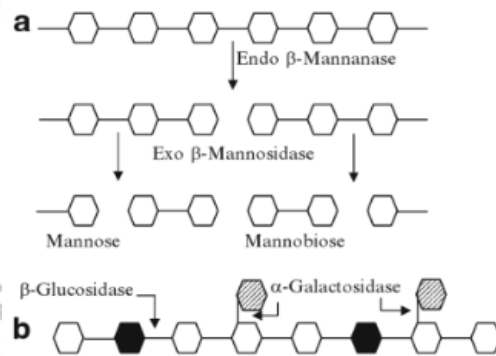
**Gambar 2.1** Gambar struktur dari beberapa tipe manan: a. Manan linear b. Glukomanan c. Galaktomanan d. Galaktoglukomanan. Simbol persegi panjang adalah manosa, simbol lingkaran adalah galaktosa dan simbol belah ketupat adalah glukosa (Malgas *et al.*, 2015).

### 2.3 Enzim Mananase

Secara umum enzim-enzim yang berperan dalam hidrolisis manan disebut sebagai mananase. Namun dalam biodegradasi secara keseluruhan terhadap manan membutuhkan berbagai enzim. Enzim-enzim yang berperan dalam degradasi manan adalah  $\beta$ -mananase (1,4- $\beta$ -D-manan manohidrolase, EC 3.2.1.78),  $\beta$ -manosidase (1,4- $\beta$ -D-manopiranosida hidrolase, EC 3.2.1.25),  $\beta$ -glukosidase (1,4- $\beta$ -D-glukosid glukohidrolase, EC 3.2.1.21),  $\alpha$ -galactosidase (1,4- $\alpha$ -D-galaktosida galaktohidrolase, EC 3.2.1.22) dan asetil esterase (EC

3.1.1.6). Enzim-enzim tersebut masuk dalam golongan enzim *glycoside hydrolase* (GH) (Malgas *et al.*, 2015).

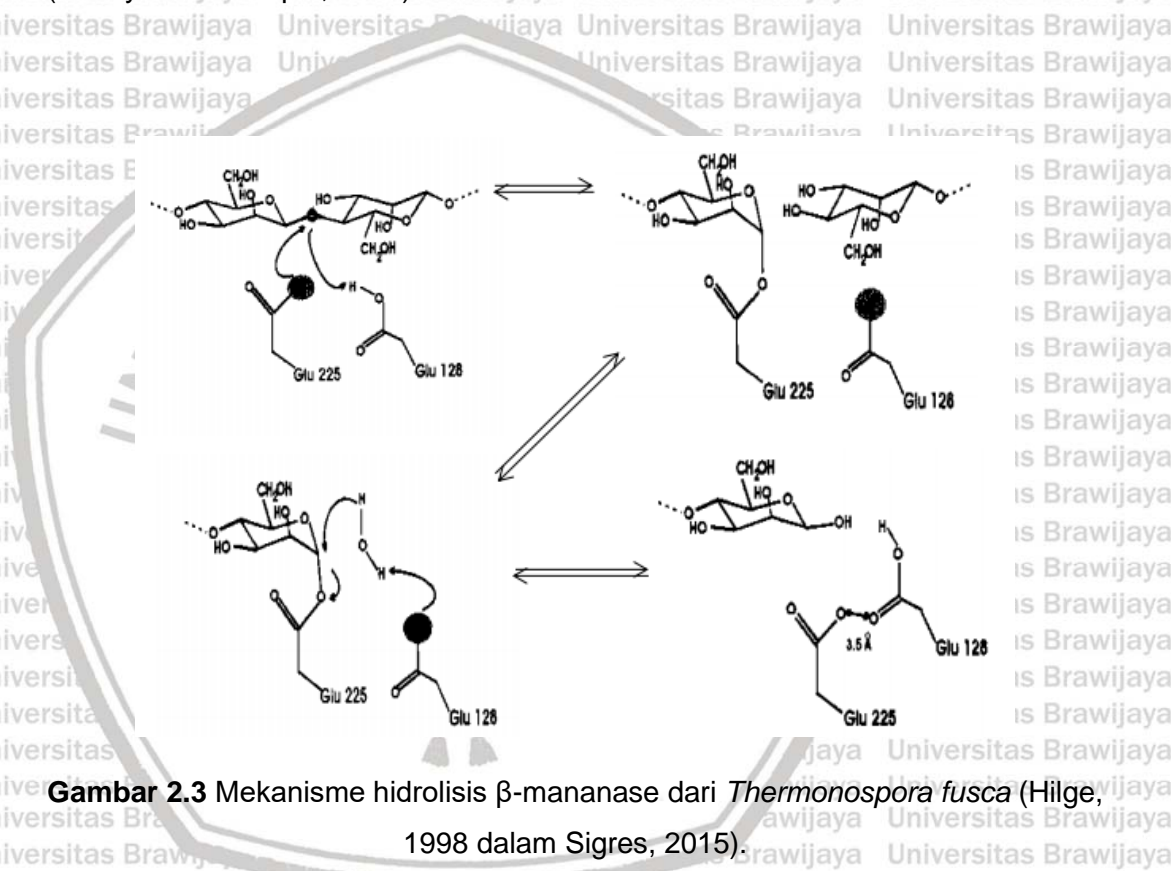
Mekanisme dari hidrolisis manan dimulai dengan  $\beta$ -mananase di mana akan memotong rantai tengah pada ikatan residu  $\beta$ -1,4-manosa ataupun glukosa pada rantai utama manan. Kemudian dilanjutkan oleh  $\beta$ -manosidase yang membantu melepaskan manosa dari ujung non-pereduksi dari manan dan memotong ikatan residu  $\beta$ -1,4 manosa.  $\beta$ -glukosidase berperan dalam melepaskan residu glukosa dari ujung rantai non-pereduksi pada oligoglukomanan dan memotong ikatan 1,4- $\beta$ -D-glukopiranosida. Selain enzim yang memotong pada rantai utama, enzim-enzim yang berperan dalam memotong rantai samping penting untuk biodegradasi sempurna pada manan, seperti  $\alpha$ -galaktosidase yang memotong ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik antara galaktosa dan rantai utama dan mengacu pada hidrolisis rantai samping D-galaktopiranosil dari glukomanan dan galaktoglukomanan. Komposisi manan sendiri juga mempengaruhi mekanisme degradasi oleh enzim, misalnya pada degradasi heteromanan dari *locust bean gum* diperlukan 3 enzim untuk agar mampu didegradasi ( $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase dan  $\alpha$ -galaktosidase) (Shukia *et al.*, 2013).



**Gambar 2.2** Jalur degradasi manan secara enzimatik. a. Mekanisme degradasi rantai linear oleh  $\beta$ -mananase dan  $\beta$ -manosidase b. Mekanisme pemutusan rantai samping oleh  $\beta$ -glukosidase dan  $\alpha$ -galaktosidase pada galaktoglukomanan (  $\circ$  manosa,  $\bullet$  glukosa dan  $\bullet$  galaktosa) (Shukia *et al*, 2013)

### 2.3.1 $\beta$ -mananase

$\beta$ -mananase (EC 3.2.1.78) merupakan enzim bertipe *endo* yang berperan dalam memulai degradasi manan dengan cara memotong ikatan  $\beta$ -1,4 di bagian dalam rantai manan secara acak. Enzim ini secara umum menghasilkan oligomanan atau oligoglukomanan dan sangat efektif dalam memecah struktur manan linier dan glukomanan. Hasil pemecahan yang dilakukan enzim ini adalah oligomanan dan oligoglukomanan (Shukla *et. al*, 2013). Mananase memiliki berbagai manfaat pada industri makanan, pakan ternak, farmasi dan kertas (Olaniyi dan Arotupin, 2013).



**Gambar 2.3** Mekanisme hidrolisis  $\beta$ -mananase dari *Thermomonospora fusca* (Hilge, 1998 dalam Sigres, 2015).

Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh  $\beta$ -mananase dari *Thermomonospora fusca*. Enzim  $\beta$ -mananase memiliki situs aktif asam glutamat nomor 128 (glu 128) dan 225 (glu 225). Pada enzim  $\beta$ -mananase, asam amino glutamat nomor 128 bertindak sebagai donor proton  $H^+$  pada oksigen glikosidik. Pada asam amino glutamat nomor 225, gugus COO bekerja sama dengan  $-COOH$  pada glu 128 menyerang atom karbon anomerik dengan membelah ikatan manosil sehingga glu 128 kehilangan  $H^+$  sehingga bermuatan negatif. Kemudian atom

C-1 diserang oleh glu 225 sehingga terjadi ikatan antara substrat dengan enzim. Ikatan tersebut kemudian diserang oleh molekul air. Setelah terpotong senyawa manooligosakarida lepas (Hilge, 1998 dalam Sigres, 2015).

### 2.3.2 $\beta$ -manosidase

$\beta$ -manosidase (EC 3.2.1.25) merupakan ekso enzim yang mengkatalis hidrolisis dari  $\beta$ -1,4-ikatan manoside dan melepaskan manosa dari ujung non pereduksi dari manan dan oligosakarida manan.  $\beta$ -manosidase masuk dalam keluarga GH 1, 2 dan 5. Keluarga GH 2 dan 5 memiliki memiliki dua *subsite* pengikat gula aglikon (+1 dan +2) dan *subsite* yang mengikat gula glikon (-1) (Malgas et al., 2015).

### 2.3.3 $\beta$ -glukosidase

$\beta$ -glukosidase (EC 3.2.1.21) merupakan ekso enzim yang menghidrolisis 1,4- $\beta$ -D-glukopiranosida pada ujung non pereduksi dari oligosakarida yang dilepaskan dari glukomanan dan galaktomanan oleh  $\beta$ -mananase.  $\beta$ -glukosidase termasuk golongan keluarga GH 1 dan 3. Juga dihambat aktivitasnya oleh glukosa dan tidak mampu menghidrolisis rantai panjang  $\beta$ -1,4 (Malgas et al., 2015).

### 2.3.4 $\alpha$ -galaktosidase

$\alpha$ -galaktosidase (EC 3.2.1.22) merupakan enzim yang menghidrolisis substituen  $\alpha$ -galaktosidase dari oligosakarida sederhana seperti rafinosa dan substrat polimer.  $\alpha$ -galaktosidase masuk dalam keluarga GH 4, 27 dan 36. Di mana  $\alpha$ -galaktosidase dari eukariot sebagian besar masuk dalam keluarga 27 sedangkan yang dari prokariot dari keluarga 36 (Malgas et al., 2015).

## 2.4 Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*)

Tumbuhan porang (*Amorphophallus muelleri*) atau yang dikenal dengan nama lokal acung atau acoan oray (Sunda), kajrong (Nganjuk) merupakan tumbuhan umbi-umbian herba yang tumbuh di wilayah tropis dan sub-tropis (Dewanto dan Purnomo, 2009). Tumbuhan porang tergolong dalam familia Araceae (talas-talasan) dan tergolong dalam genus *Amorphophallus*. Terdapat beberapa spesies golongan ini di Indonesia yaitu *A. campanulatus*, *A.*

*oncophyllus*, *A. variabilis*, *A. spectabilis*, *A. decussilvae*, *A. muelleri* dan masih banyak lainnya (Koswara, 2013).



**Gambar 2.4** Tumbuhan porang (Pusat Penelitian dan Pengembangan Porang Indonesia, 2013).

Tumbuhan porang memiliki bentuk batang tegak halus, lunak yang berwarna hijau atau kehitaman dengan bercak putih. Helaian daun memanjang dengan ukuran antara 60–200 cm dengan tulang daun yang kecil namun terlihat jelas (Ganjari, 2014). Tumbuhan ini mampu mencapai tinggi kurang lebih 1,5 meter. Tumbuhan porang memiliki daur tumbuh antara 4-6 tahun dan menghasilkan bunga yang besar di bagian terminal yang mengeluarkan bau tidak sedap (Purwanto, 2014). Tumbuhan porang mampu tumbuh pada ketinggian 0–700 m di atas permukaan laut, tapi kondisi optimumnya pada ketinggian 100-600 m di atas permukaan laut. Pertumbuhan porang membutuhkan intensitas cahaya hingga 40% dan rentang pH tanah yang optimal adalah pH 6–7 (Dewanto dan Purnomo, 2009). Waktu panen agar diperoleh kadar glukomanan pada umbi porang terbaik adalah ketika setelah tanamannya rebah dan daunnya telah kering. Kandungan glukomanan pada awal pertumbuhan lebih rendah karena digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan daun (Chairiyah, et al., 2014).



Umbi porang memiliki kandungan karbohidrat dalam bentuk polisakarida yaitu glukomanan yang memiliki sifat larut dalam air dan dapat difermentasi (Thomas, 1997 dalam Purwanto, 2014). Namun selain glukomanan, umbi porang juga mengandung kalsium oksalat yang mampu menyebabkan rasa gatal dan zat konisin yang memberikan rasa pahit. Oksalat yang tak larut dalam rupa kalsium oksalat bila dikonsumsi dapat menyebabkan batu ginjal (Indriyani, *et al.*, 2010).

**Tabel 2.1** Komposisi Kimia Umbi Porang Segar dan Tepung Porang (Dewanto dan Purnomo, 2009)

Unsur Kimia	Kandungan per 100 gram contoh (bobot basah)	
	Umbi segar (%)	Tepung (%)
Air	83,30	6,80
Glukomanan	3,58	64,98
Pati	7,65	10,24
Protein	0,92	3,42
Lemak	0,02	-
Serat berat	2,50	5,90
Kalsium oksalat	0,19	-
Abu	1,22	7,88
Timbal	0,09	0,13

## 2.5 Tanah

Tanah dihuni berbagai jenis mikroorganismenya, hal ini dikarenakan tanah merupakan suatu substrat. Di antara partikel tanah terdapat banyak molekul air dan unsur-unsur anorganik dalam bentuk ion dan berbagai macam senyawa organik. Selain itu tanah juga mengandung banyak oksigen di permukaannya. Tanah merupakan sumber mikroorganismenya yang sangat beragam. Keanekaragaman mikroorganismenya pada tanah dapat dipengaruhi adanya perbedaan kandungan senyawa organik pada tanah, pH tanah, air tanah dan oksigen dalam tanah (Syauqi, 2017).

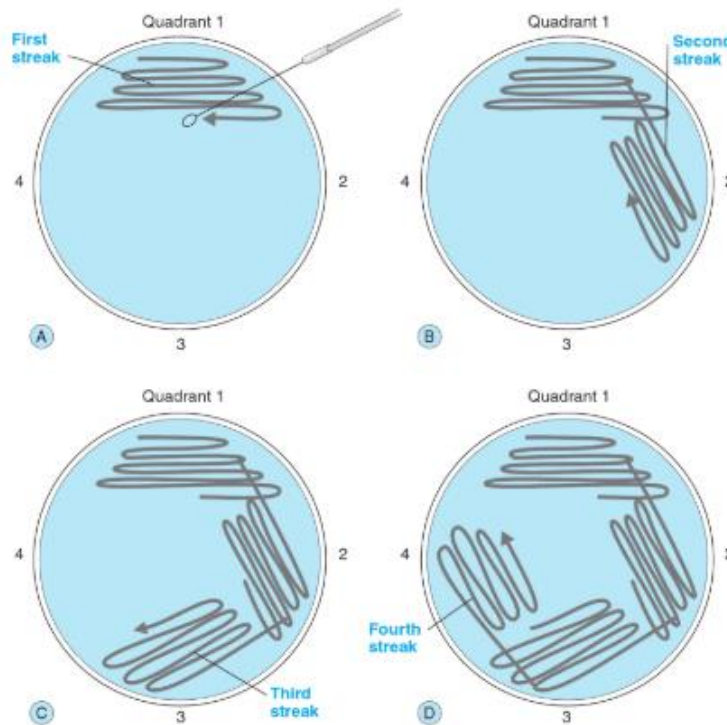
Keanekaragaman mikroorganismenya dalam tanah memungkinkan adanya mikroorganismenya yang bersifat mananolitik. Sebagai contoh mikroorganismenya mananolitik yang diisolasi dari tanah adalah bakteri *Paenibacillus cookii* dari tanah Taiwan utara (Yin *et al.*, 2012), *Klebsiella edwardsii* (Olaniyi dan Arotupin, 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (Zurmiati *et al.*, 2017) dan *Bacillus subtilis* BE-91 (Cheng *et al.*, 2016).

## 2.6 Isolasi Bakteri

Secara umum bakteri ada secara alami di tanah, air dan berbagai organ pada tubuh manusia. Bakteri tersebut umumnya merupakan koloni campuran (*mixed population*). Identifikasi terhadap koloni campuran bukan merupakan hal yang baik sehingga diperlukan adanya pemurnian kultur untuk analisis atau identifikasi lebih lanjut (Pommerville, 2011). Terdapat 3 jenis metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri dari koloni campuran:

### 2.6.1 Metode *Streak Plate*

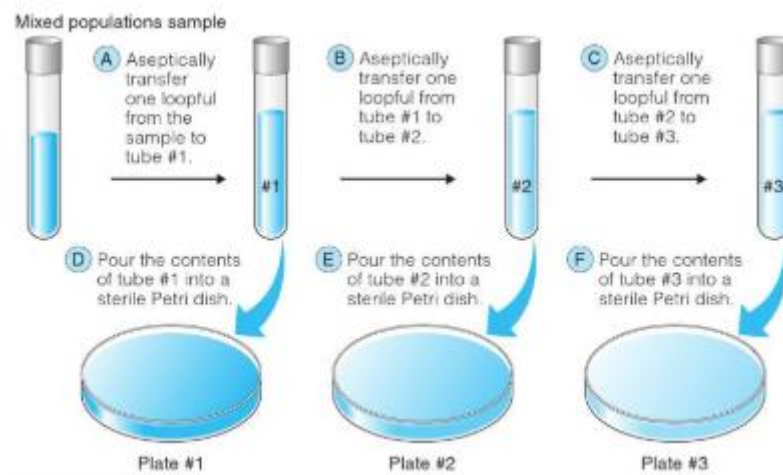
Metode kuadran *streak plate* merupakan metode isolasi bakteri dimana dilakukan penggoresan terhadap media agar dengan menggunakan jarum ose yang terdapat kultur campur. Setelah inkubasi bekas goresan tersebut akan tumbuh koloni yang terpisah pada permukaan media agar yang merupakan biakan murni. Metode ini secara relatif murah dan cepat untuk melakukan isolasi sehingga metode ini sering dipakai dalam riset, industri dan laboratorium medis (Pommerville, 2011).



Gambar 2.5 Proses *streak plate* (Pommerville, 2011).

### 2.6.2 Metode *Pour Plate*

Metode *pour plate* merupakan metode isolasi yang dilakukan dengan menginokulasikan kultur campuran dalam *broth* yang sudah diencerkan pada cawan petri kemudian dicampurkan dengan media agar yang masih cair. Biasanya dilakukan pada 3 pengenceran. Setelah proses dimulai, metode ini harus dilakukan dengan cepat karena agar yang masih cair dapat dengan cepat memadat. Namun perlu diperhatikan agar agar yang masih cair tidak terlalu panas sehingga membunuh kultur. Dengan pengenceran yang tepat koloni murni dapat tumbuh dan terpisahkan dari koloni lainnya pada permukaan atau di dalam agar (Pommerville, 2011).

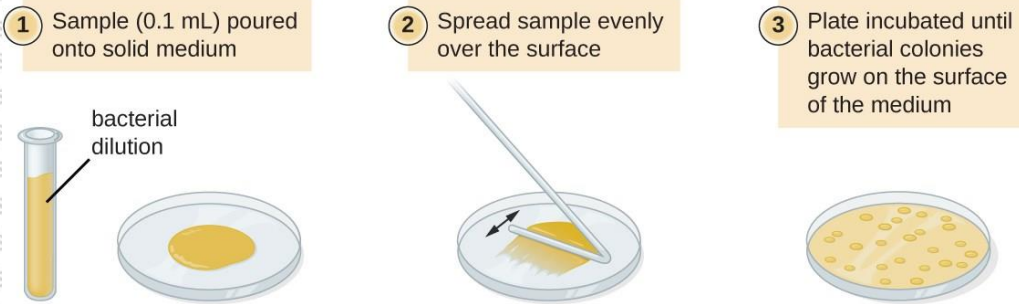


Gambar 2.6 Proses *pour plate* (Pommerville, 2011).

### 2.6.3 Metode *Spread Plate*

*Spread plate* merupakan metode isolasi yang dilakukan dengan menyebarkan kultur campur sampel yang telah diencerkan secara merata pada permukaan media agar yang sudah memadat. Agar penyebaran sampel merata digunakan *spreader* atau *hockey stick*. Kemudian dilakukan inkubasi, di mana akan tumbuh koloni-koloni yang terpisah pada permukaan media agar (Rijal, 2017).

Spread Plate Method



Gambar 2.7 Proses *spread plate* (Rijal, 2017).

### 2.7 Identifikasi Bakteri dengan Metode 16S rRNA

Identifikasi secara molekular dengan metode 16S rRNA dilakukan untuk mengetahui kekerabatan dari isolat yang diperoleh. Metode ini menggunakan gen penyandi 16S rRNA yang mampu bekerja dengan kompleks 19 jenis protein lainnya untuk membentuk sub unit 30S dari ribosom bakteri. Gen 16S rRNA esensial untuk setiap bakteri namun memiliki perbedaan pada masing-masing jenis bakteri. Sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Kelebihan dari metode identifikasi molekular 16S rRNA adalah analisa yang cepat dan lebih akurat, juga mampu mengidentifikasi strain yang sulit ditumbuhkan dalam kondisi laboratorium. Selain itu juga mampu mengidentifikasi bakteri yang memiliki penampilan yang mirip (JoVE, 2020).

### 2.8 Purifikasi Enzim

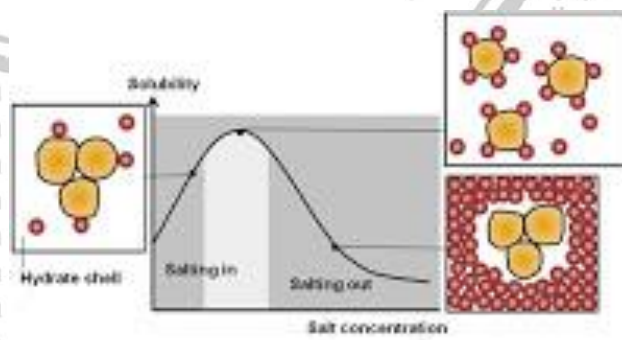
Purifikasi enzim merupakan proses ekstraksi yang dilanjutkan dengan isolasi atau memisahkan enzim yang diinginkan dari komponen-komponen pengotor lainnya seperti sel, karbohidrat, protein lain, asam nukleat dan molekul kecil lainnya. Proses pemisahan dapat dilakukan dengan memanfaatkan sifat-sifat enzim seperti muatan, ukuran, kelarutan dan afinitas enzim (Sutrisno, 2017).

### 2.8.1 Presipitasi Protein dengan Amonium Sulfat

Presipitasi protein merupakan proses purifikasi protein yang sangat kasar dan sangat jarang dapat menghasilkan nilai dengan faktor 2 – 3. Namun, presipitasi protein memiliki proses yang cepat dan murah, selain itu bila digunakan pada ekstrak kasar dapat memisahkan material yang dapat mengganggu proses purifikasi selanjutnya. Proses presipitasi protein dapat dilakukan dengan menggunakan garam, pelarut ataupun panas (Buxbaum, 2015).

Proses presipitasi dengan garam prinsipnya adalah protein memiliki interaksi kuat dengan air dan memiliki wujud yang mudah larut bila terhidrasi oleh air. Bila ketersediaan konsentrasi air berkurang dengan penambahan gram atau pelarut organik protein dapat terpresipitasi sehingga terpisah dari larutan. Pada presipitasi garam, amonium sulfat merupakan garam yang sering dipakai karena murah, nontoksik, mudah larut dalam air dan memiliki ionisasi yang kuat (Buxbaum, 2015).

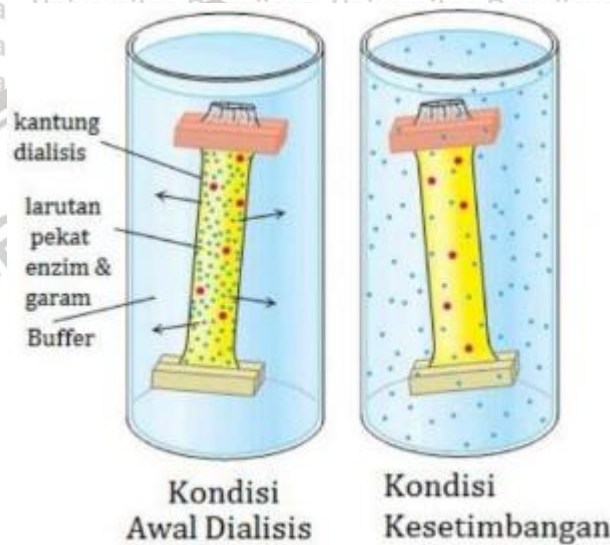
Prinsip presipitasi merupakan proses *salting in* dan diikuti dengan *salting out* di mana protein terpresipitasi. Penambahan garam dalam konsentrasi rendah akan meningkatkan kelarutan protein (*salting in*), hal ini dikarenakan molekul garam menstabilkan molekul protein dengan mengurangi energi elektrostatik. Semakin tinggi konsentrasi garam akan mengendapkan protein, hal ini dikarenakan molekul garam berkompetisi dengan molekul protein untuk mengikat air. Berkurangnya jumlah molekul air yang dapat diikat oleh protein mengurangi kelarutan protein hingga protein terpresipitasi (Baynes *et al.*, 2014).



Gambar 2.8 Proses *Salting in* dan *Salting out* (Katie, 2017).

### 2.8.2 Dialisis

Dialisis dilakukan untuk mengurangi keberadaan garam yang dapat mengganggu aktivitas enzim. Sehingga umumnya setelah proses presipitasi dilakukan dialisis. Pada dialisis molekul garam yang kecil akan keluar melalui pori-pori yang ada pada kantung dialisis, sedangkan enzim atau protein tetap di dalam kantung dialisis karena memiliki ukuran yang jauh lebih besar (Sutrisno, 2017).



Gambar 2.9 Proses Dialisis (Sutrisno, 2017).

### 2.9 Pengaruh Beberapa Faktor terhadap Aktivitas Enzim

Reaksi enzimatik merupakan reaksi kimia juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Karakteristik dari reaksi tersebut penting untuk menentukan aplikasi yang tepat terhadap enzim tersebut. Faktor dominan yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah pH, aktivitas air dan temperatur.

### 2.9.1 Suhu

Suhu secara umum mempengaruhi reaksi kimia, termasuk reaksi enzimatis. Peningkatan suhu akan meningkatkan reaksi enzimatis yang ditunjukkan dalam peningkatan aktivitas enzim. Namun enzim dapat terdenaturasi ketika melewati suhu optimalnya. Sehingga kenaikan suhu akan meningkatkan aktivitas enzim hingga suhu optimalnya, setelah itu aktivitas akan menurun karena enzim mulai inaktif atau terdenaturasi. Pengaruh kenaikan suhu terhadap enzim seringkali bersifat *irreversible* (Nagodawithana dan Reed, 1993).

### 2.9.2 pH

Efek pH terhadap reaksi enzimatis disebabkan karena ionisasi terhadap substrat secara reversibel atau residu asam amino dari enzim, sehingga mempengaruhi pengikatan substrat. Efek pH terhadap enzim dapat meliputi aktivitas enzim, stabilitas enzim atau interaksi dengan *ligand*. Tiap enzim memiliki pH optimum yang berbeda beda, namun kebanyakan enzim memiliki pH optimum mendekati pH netral. Beberapa enzim dengan pH optimalnya adalah *pepsin* pada pH 2 dan *alkaline phosphatase* pada pH 10. Enzim dari fungi memiliki pH optimal yang sedikit asam sedangkan enzim dari *yeast* mendekati pH netral (Nagodawithana dan Reed, 1993).

### 2.9.3 Substrat

Substrat yang digunakan mempengaruhi aktivitas enzim. Substrat yang sesuai dengan enzim dapat meningkatkan aktivitas enzim. Contohnya seperti  $\beta$ -mananase (EC 3.2.1.78) menghasilkan oligomanan atau oligoglukomanan dan sangat efektif dalam memecah struktur manan linier dan glukomanan. (Shukla *et. al*, 2013).

### 2.9.4 Pengaruh Ion Logam

Kofaktor merupakan bagian nonprotein dari enzim yang berupa senyawa anorganik seperti  $Zn^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  atau senyawa organik seperti vitamin B. Kofaktor dibutuhkan dalam proses katalitik enzim, sehingga dengan adanya kofaktor aktivitas enzim semakin meningkat. Inhibitor merupakan senyawa yang menghambat proses katalitik enzim. Keberadaan inhibitor dapat mengurangi aktivitas enzim (Bettelheim *et al.*, 2010).

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Kota Malang, Jawa Timur. Penelitian ini akan dilaksanakan selama 16 bulan, yaitu pada November 2018 hingga Februari 2020.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf (All American), timbangan analitik (Ohaus), *Laminar Air Flow*, spektrofotometer (Jenway), *magnetic stirrer* (IntLab), *vortex*, kompor gas (Maspion), oven (Binder), *Shaker waterbath* (Memmert), *Cold Centrifuge* (Thermo-scientific), lemari asam, mikropipet (Socorex), dan mikrotip.

Perangkat gelas dan non-gelas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gelas beaker (IWAKI), tabung reaksi (IWAKI), cawan petri (UMBRA), Erlenmeyer (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), gelas kaca 40 mL, pipet ukur, pipet tetes, jarum ose, gelas arloji, pengaduk kaca, kuvet, *tube centrifuge* berukuran 15 dan 45 mL, *plastic wrap*, *aluminium foil*, kapas steril, dan kantong selofan.

#### 3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan yaitu umbi porang yang didapatkan pada pasar di Pasuruan. Bahan media yang digunakan magnesium sulfat heptahidrat atau  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), kalium dihidrogen fosfat atau  $KH_2PO_4$  (Merck), agar teknis (lokal), pepton (Himedia), tepung porang (lokal) dan ekstrak yeast (Himedia). Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini yaitu aquadest (lokal dan Onelab), alkohol 70%, bunsen, glukomanan *konjac root*, kit pengecatan gram (Himedia), *Congo red* 0,1% (Himedia), NaCl 1% (Merck), NaOH 1% (Merck), DNS 1% (Merck),  $Na_3PO_4$ , amonium sulfat atau  $(NH_4)_2SO_4$  (Merck), *Bovine Serum Albumin* (Merck), Manosa (Sigma-Aldrich), buffer dengan pH 4, 7, dan 10 untuk kalibrasi pH meter (Merck), EDTA (Merck), Glisin (Merck), NaOH (Merck), Gliserol (Merck),



### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 1 isolat hasil isolasi dengan aktivitas mananolitik terbaik. Penentuan aktivitas mananolitik terbaik dilakukan dengan memilih isolat dengan indeks mananolitik terbaik. Pengujian meliputi penentuan waktu produksi, identifikasi isolat dengan metode 16S rRNA oleh PT. Genetika Science, uji aktivitas enzim manase, purifikasi dan karakterisasi enzim dilakukan menggunakan metode Yin, L. J., et al. (2012) dan ditunjukkan dalam bentuk tabel data numeral dan grafik.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Media Racik Tepung Porang

Media yang digunakan merupakan media racik bakteri yang mengandung 9 gram pepton, 1 gram ekstrak yeast, 1 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 15 gram agar teknis dalam 1 liter aquades sebagai pelarut (Modifikasi dari Kusakabe dan Takahsi, 1986). Modifikasi yang dilakukan adalah *azo-carob-glucomannan* yang seharusnya ditambahkan sebagai substrat diganti dengan sebanyak 1% glukomanan porang dalam bentuk tepung porang. Untuk media racik *broth* digunakan komposisi media yang sama namun tanpa adanya agar teknis. Perlu diperhatikan dalam pembuatan media tersebut jangan mengisi media terlalu banyak pada *Erlenmeyer* karena dapat meletup.

#### 3.4.2 Pengumpulan Sampel Umbi Porang

Sampel yang digunakan merupakan porang yang dibeli di pasar Pasuruan. Porang tersebut dibusukkan dengan cara dipendam setengahnya dalam tanah basah selama 2 minggu. Pencacahan dilakukan dengan bentuk kubus dengan ukuran  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ . Kemudian sampel (umbi porang dan tanah yang digunakan dalam pemendaman tanpa dilakukan pembilasan dengan air) digerus dengan *mortar* dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisikan *broth* media steril sebanyak 0,5 gram untuk proses pengkayaan. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga  $10^8$  dengan media pengenceran pepton.

### 3.4.3 Metode Isolasi Bakteri dari Umbi Porang

Isolasi dilakukan untuk memperoleh kandidat koloni bakteri yang bersifat mananolitik. Sampel umbi porang yang telah digerus dengan *mortar* diperkaya di dalam tabung reaksi berisikan media racik *broth* dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengenceran hingga  $10^{-8}$  dengan media pengenceran pepton. Selanjutnya pada masing-masing pengenceran dilakukan *plating* dengan metode *spread plate* pada cawan petri berisi media racik agar dan dilakukan inkubasi pada 37°C selama 24 jam.

### 3.4.4 Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi

Penentuan skrining positif atau negatifnya koloni dalam kemampuannya mendegradasi glukomanan pada media agar dapat diamati dengan adanya zona bening yang muncul setelah diberikan *Congo red* 1% dan dibilas dengan NaCl. Metode skrining ini sama dengan yang akan dilakukan dengan konfirmasi bedanya konfirmasi akhir dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang sudah dimurnikan merupakan bakteri mananolitik. Koloni yang mampu menghasilkan zona bening tersebut sebelum dilakukan *staining* dengan *Congo red* 1% harus dilakukan duplikasi ke cawan petri lainnya karena *Congo red* bersifat toksik pada koloni bakteri yang akan di-*staining*.

Koloni positif mendegradasi glukomanan dimurnikan dengan metode *streak plate* pada cawan petri dengan media racik agar. Setelah hasil *streak* diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dilakukan duplikasi pada setiap kuadran dan di-*stain* dengan *Congo red* pada cawan *master* (bukan yang diduplikasi). Hal ini dilakukan untuk melihat pada kuadran yang isolatnya memiliki kemampuan mendegradasi glukomanan pada media. Isolat yang dipilih adalah isolat positif pada kuadran terakhir pada masing-masing cawan. Isolat-isolat tersebut diinokulasikan pada cawan petri dengan media racik agar untuk dilakukan konfirmasi.

### 3.4.5 Konfirmasi Aktivitas Mananolitik Bakteri Isolat

Konfirmasi dan pengujian aktivitas mananolitik dari bakteri secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media racik agar yang di suplementasi dengan tepung porang dan kemudian ditambahkan reagen Congo red 1% hingga merata. Apabila isolat bakteri memiliki aktivitas mananolitik, maka akan membentuk zona bening pada media. Metode konfirmasi sama dengan skrining yang dilakukan untuk memilih koloni yang bersifat mananolitik.

### 3.4.6 Penentuan Waktu Produksi Enzim

Penentuan waktu produksi enzim dilakukan untuk mengetahui waktu produksi di mana aktivitas enzim paling tinggi. Penentuan waktu produksi enzim dilakukan dengan cara membuat kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim per periode sehingga dapat diketahui puncak dari aktivitas enzim selama daur hidup bakteri tersebut. Penentuan waktu produksi dilakukan tiap periode waktu tertentu hingga diperoleh fase kematian bakteri. Namun waktu produksi digunakan waktu di mana aktivitas enzim tertinggi.

### 3.4.7 Purifikasi Parsial Enzim

Purifikasi parsial enzim yang telah diproduksi dilakukan dengan metode Yin *et al.*, (2012) yang dilakukan oleh yang telah dimodifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah tanpa dilakukan kromatografi.

#### 3.4.7.1 Presipitasi Amonium Sulfat

Presipitasi amonium sulfat dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat pada ekstrak enzim kasar pada konsentrasi akhir amonium sulfat tertentu dan distirer dalam kondisi dingin selama 24 jam. Berbeda dengan penelitian Yin *et al.* (2012) yang menggunakan presipitasi dalam range yaitu 40-60%, presipitasi yang dilakukan adalah dengan satu kali presipitasi dengan konsentrasi amonium sulfat optimal. Sehingga perlu ditentukan konsentrasi amonium sulfat yang optimal antara 50-80%.

#### 3.4.7.2 Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan amonium sulfat telah mempersipitasi enzim. Enzim yang dipresipitasi dengan amonium sulfat disentrifugasi dingin agar muncul endapan enzim tersebut. Endapan enzim dalam bentuk *pellet* disuspensi dengan buffer sitrat 0,05 M pH 6. Kemudian larutan enzim tersebut dimasukkan ke dalam kantung selofan dan didialisis hingga amonium sulfat keluar dari dalam kantung. Untuk mengetahui selesai tidaknya dialisis ditambahkan BaCl<sub>2</sub> 1% dan HCl 1% pada buffer yang telah digunakan, bila ada endapan berarti masih ada amonium sulfat yang tersisa. Buffer perlu diganti secara berkala agar tidak jenuh sekitar tiap 12 jam bila menggunakan *beaker glass* ukuran 500 mL.

#### 3.4.8 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim mananase dilakukan adalah karakterisasi enzim yang dilakukan pada penelitian Yin *et al.* (2012) yang sudah dimodifikasi untuk menyesuaikan dengan penelitian yang dilakukan. Untuk pengaruh ion logam menggunakan metode yang dilakukan oleh Rahmani, *et al.* (2017) yang telah dimodifikasi.

### 3.5 Pengujian dan Analisa Data

#### 3.5.1 Skrining Bakteri Mananolitik

Skrining untuk menentukan bakteri mananolitik dilakukan dengan pengecatan *Congo red* 1%. Kultur terlebih dahulu dilakukan duplikasi karena pengecatan dengan *Congo red* dapat membunuh kultur-kultur tersebut. *Congo red* 1% diberikan secara merata pada permukaan agar dan kemudian dibilas. Selanjutnya diamati zona bening yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk diukur dan ditentukan indeks mananolitiknya. Koloni dengan indeks mananolitik terbesar akan dipilih untuk tahapan penelitian selanjutnya. Metode yang digunakan merupakan modifikasi dari penelitian Ratnakomala *et al.* (2015).

### 3.5.2 Identifikasi Molekular

Identifikasi molekular dilakukan dengan menggunakan 16S rRNA. Pengujiannya dilakukan menggunakan jasa PT. Genetika Science yang bertempat di Jakarta. Identifikasi ini dapat menentukan kekerabatan dari sampel isolat yang diuji. Sampel isolat pertama-tama dikulturkan dan dilakukan ekstraksi untuk mengambil DNA-nya. Kemudian DNA tersebut diuji konsentrasi dan kemurniannya, bila sudah sesuai dilanjutkan dengan proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mereplikasi DNA tersebut. Selanjutnya dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan basa dari DNA tersebut. Setelah dipastikan kemurniannya, dilakukan amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan Kit My Taq HS Red Mix oleh Bioline. Primer yang digunakan disajikan pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Primer yang Digunakan dalam PCR 16S rDNA

No	Oligo name	Sequence	Panjang basa
1.	Sequence 27F Primer	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
2.	Sequence 1492R Primer	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22

Bila hasil *sequencing* terdapat banyak *noise* atau puncak yang bertubrukan sehingga data tidak *valid*, perlu dilakukan *sub-cloning*. Proses *sub-cloning* dilakukan dengan memasukkan DNA ke dalam vektor pTA2. Vektor tersebut ditransformasi pada *E. coli* DH5 $\alpha$  dan dikulturkan. Selanjutnya dilakukan ekstraksi terhadap koloni-koloni tersebut sehingga diperoleh banyak vektor pTA2. DNA yang terdapat pada vektor tersebut diambil dengan menggunakan enzim dan di-*sequence* sehingga diketahui urutan basanya. Data urutan basa tersebut kemudian dibandingkan dengan *database* di NCBI untuk mengetahui kekerabatan isolat sampel.

### 3.5.3 Penentuan Waktu Produksi Enzim

Penentuan waktu produksi enzim dilakukan dengan melakukan pengamatan pertumbuhan bakteri isolat dan aktivitas enzim manasannya.

Interval waktu yang digunakan adalah tiap 30 menit hingga 2 jam pertama, selanjutnya tiap satu jam hingga fase stasioner mulai terlihat dan pengamatan setelahnya dilakukan tiap 2 jam.

Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. Sebelumnya panjang gelombang maksimum ditentukan lebih dahulu secara manual menggunakan spektrofotometer, yaitu 470 nm. Media steril digunakan sebagai blanko sedangkan sampel merupakan media dan bakteri pada waktu tertentu yang diuji.

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode DNS. Metode DNS dapat menentukan konsentrasi gula pereduksi dengan bantuan alat spektrofotometer. Komposisi reagen DNS yang digunakan adalah Reagen DNS yang digunakan sesuai dengan reagen DNS yang digunakan oleh Miller (1959).

Ekstraksi ekstrak kasar enzim dilakukan terhadap kultur yang telah diinkubasi pada suhu 37°C dan 105 rpm selama waktu produksi optimal yang ditentukan. Kultur bakteri tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam *tube centrifuge*. Sentrifugasi dilakukan dengan menggunakan *cold centrifuge* dengan kecepatan 7.000 rpm, 4°C selama 15 menit. Penyimpanan supernatan bisa dilakukan pada suhu -20°C. Metode ekstraksi ekstrak enzim kasar yang dilakukan merupakan metode yang dilakukan oleh Phothichitto, K. *et al.* (2006).

Metode uji aktivitas enzim yang dilakukan merupakan modifikasi dari uji aktivitas enzim yang dilakukan dalam penelitian Yin, *et al.* (2012). Kultur yang telah diinkubasi sesuai dengan waktu produksi optimal ditambahkan sebanyak 0,2 mL ke dalam buffer sitrat pH 6,0 sebanyak 1,8 mL. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan menggunakan *shaker waterbath* selama 30 menit. Untuk control, ekstrak kasar enzim sebanyak 0,2 mL ditambahkan pada 1,8 mL buffer fosfat pH 7,0 dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Sampel dan kontrol ditambahkan sebanyak 3 mL reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS) dan divortek. Kemudian dilakukan pemanasan terhadap keduanya selama 5 menit dengan suhu 100°C. Ketika dingin diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Blanko yang digunakan adalah DNS dengan akuades dan kontrol yang dibandingkan adalah enzim yang sudah dinaktivasi dan diinkubasi bersama dengan substrat.

Rumus perhitungan aktivitas total mananase yang digunakan adalah Seftiono (2017):

$$\text{Aktivitas total mananase (U/mL)} = \frac{(X_s - X_k) \times f_p \times 1000}{t \times \text{BM manosa}}$$

Keterangan:

Aktivitas total mananase : Jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu  $\mu\text{mol}$  manosa per menit

$X_s$  : kadar manosa sampel

$X_k$  : kadar manosa control

$t$  : waktu inkubasi (menit)

$f_p$  : faktor pengenceran

$\text{BM}$  : berat molekuler manosa (180 g/mol)

#### 3.5.4 Purifikasi Enzim

Ekstrak kasar enzim, hasil presipitasi dan hasil dialisis diuji aktivitas enzimnya dengan metode DNS seperti sebelumnya dan uji total protein dilakukan dengan metode biuret. Hasil uji aktivitas enzim dan total protein dilakukan perhitungan pada tabel purifikasi sehingga diketahui tingkat kemurnian dan hasil purifikasi.

Metode uji biuret yang dilakukan menggunakan metode dari penelitian Janairo *et al.* (2011). Reagen biuret yang digunakan terbuat dari 0,375 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 1,51 g  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  yang dicampurkan ke dalam 100 mL air distilasi. Kemudian pada campuran tersebut ditambahkan 100 mL larutan 7,5% NaOH dan dilarutkan hingga 250 mL. Pengujian biuret dilakukan dengan modifikasi yaitu 0,5 mL sampel ditambahkan pada 3,5 mL reagen biuret. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan *vortex* dan didiamkan selama 30 menit. Hasil dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 545 nm. Konsentrasi protein dapat dihitung dengan bantuan kurva standar biuret.

Rumus perhitungan aktivitas spesifik mananase digunakan berdasarkan penelitian yang dilakukan Seftiono (2017):

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Total aktivitas (U/mg)}}{\text{Total Protein (mg/mL)}}$$

Keterangan:

Aktivitas Total (U) = volume enzim (mL) x aktivitas (U/mL)

Total Protein (mg) = volume enzim (mL) x kadar protein (mg/mL)

### 3.5.5 Karakterisasi Enzim

#### 3.5.5.1 Penentuan Suhu Optimal

Penentuan suhu optimal dari enzim mananase yang telah diproduksi dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim mananase dengan suhu inkubasi yang beragam. Variasi yang digunakan adalah 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C.

Pengujian DNS dilakukan dengan cara sebanyak 0,2 mL sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit bersama 1,8 mL substrat yang telah dilarutkan dengan buffer asam sitrat 0,05 M dengan pH 6. Kemudian ditambahkan DNS sebanyak 3 mL dan dipanaskan dengan air mendidih selama 5 menit. Kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Yin *et al.*, 2012). Perlakuan tersebut dilakukan duplo.

#### 3.5.5.2 Penentuan pH Optimal

Penentuan pH optimal dari enzim mananase yang diproduksi dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim mananase dengan pH yang beragam sesuai dengan metode penelitian yang dilakukan sesuai dengan metode penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012). Sistem buffer yang digunakan adalah 0,1 M buffer asam sitrat (pH 3, 4, 5, 6), 50 mM buffer natrium fosfat (pH 7, 8) dan 0,2 M buffer glisin (pH 9, 10). Pengujian DNS dilakukan dengan cara sebanyak 0,2 mL sampel diinkubasi pada suhu optimal selama 30 menit bersama 1,8 mL substrat yang telah diatur pH nya dengan buffer yang telah disebutkan. Kemudian ditambahkan DNS sebanyak 3 mL dan dipanaskan dengan air mendidih selama 5 menit. Kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perlakuan tersebut dilakukan duplo. Modifikasi penelitian yang dilakukan adalah pada buffer dan rentang pH yang digunakan.



### 3.5.5.3 Penentuan Kestabilan Suhu

Penentuan kestabilan suhu dari enzim mananase yang diproduksi dilakukan dengan menggunakan metode penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012). Enzim mananase yang diperoleh diinkubasi dalam beberapa gradien suhu inkubasi, yaitu 30-60°C dalam buffer sitrat 0,05 M pH 6 selama 30 menit. Aktivitas residual dari enzim tersebut diukur setelah inkubasi pada suhu dan pH optimal yang telah diperoleh selama 30 menit dengan metode DNS seperti yang dilakukan sebelumnya. Perlakuan tersebut dilakukan duplo. Modifikasi dilakukan pada suhu dan buffer yang digunakan.

### 3.5.5.4 Penentuan Kestabilan pH

Penentuan kestabilan pH dari enzim mananase yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan metode penelitian yang dilakukan oleh Yin *et al.* (2012). Enzim mananase yang diperoleh diinkubasi dalam beberapa gradien larutan pH (0,1 M buffer asam sitrat (pH 3, 4, 5, 6), 50 mM buffer natrium fosfat (pH 7, 8) dan 0,2 M buffer glisin (pH 9, 10)) selama 30 menit pada suhu optimal yang telah diperoleh. Setelah dilakukan inkubasi, enzim tersebut dihitung aktivitas residualnya pada suhu dan pH optimal yang diperoleh selama 30 menit dengan metode DNS. Perlakuan tersebut dilakukan duplo. Modifikasi dilakukan dengan perubahan pada buffer yang digunakan dan suhu inkubasi pada metode DNS yang dipakai untuk menyesuaikan uji DNS yang dilakukan sebelumnya.

### 3.5.5.5 Spesifitas Substrat

Penentuan spesifitas substrat dilakukan dengan menguji aktivitas enzim mananase yang diperoleh dengan substrat konyaku, tepung porang dan *guar gum* masing-masing 0.5% yang dibandingkan dengan kontrol yaitu glukomanan murni. Perlakuan tersebut dilakukan duplo. Masing-masing variabel diinkubasi pada suhu dan pH optimum selama 30 menit.

### 3.5.5.6 Pengaruh Ion Logam

Penentuan pengaruh efek ion metal, agen pereduksi atau inhibitor dilakukan dengan metode dari Rahmani, N *et al.* (2017) yang telah dimodifikasi. Enzim yang telah diperoleh diinkubasi pada buffer sitrat 0,05 M pH 6 yang terdapat masing-masing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, KCl dan MnCl<sub>2</sub> juga 5 mM EDTA. Masing-

masing variabel diinkubasi pada suhu dan pH optimum selama 30 menit. Perlakuan tersebut dilakukan duplo. Modifikasi yang dilakukan adalah variabel ion yang digunakan untuk menyesuaikan ketersediaan bahan. Modifikasi juga dilakukan pada buffer dan kondisi inkubasi yang digunakan untuk menyesuaikan perlakuan pada penelitian yang sebelumnya.

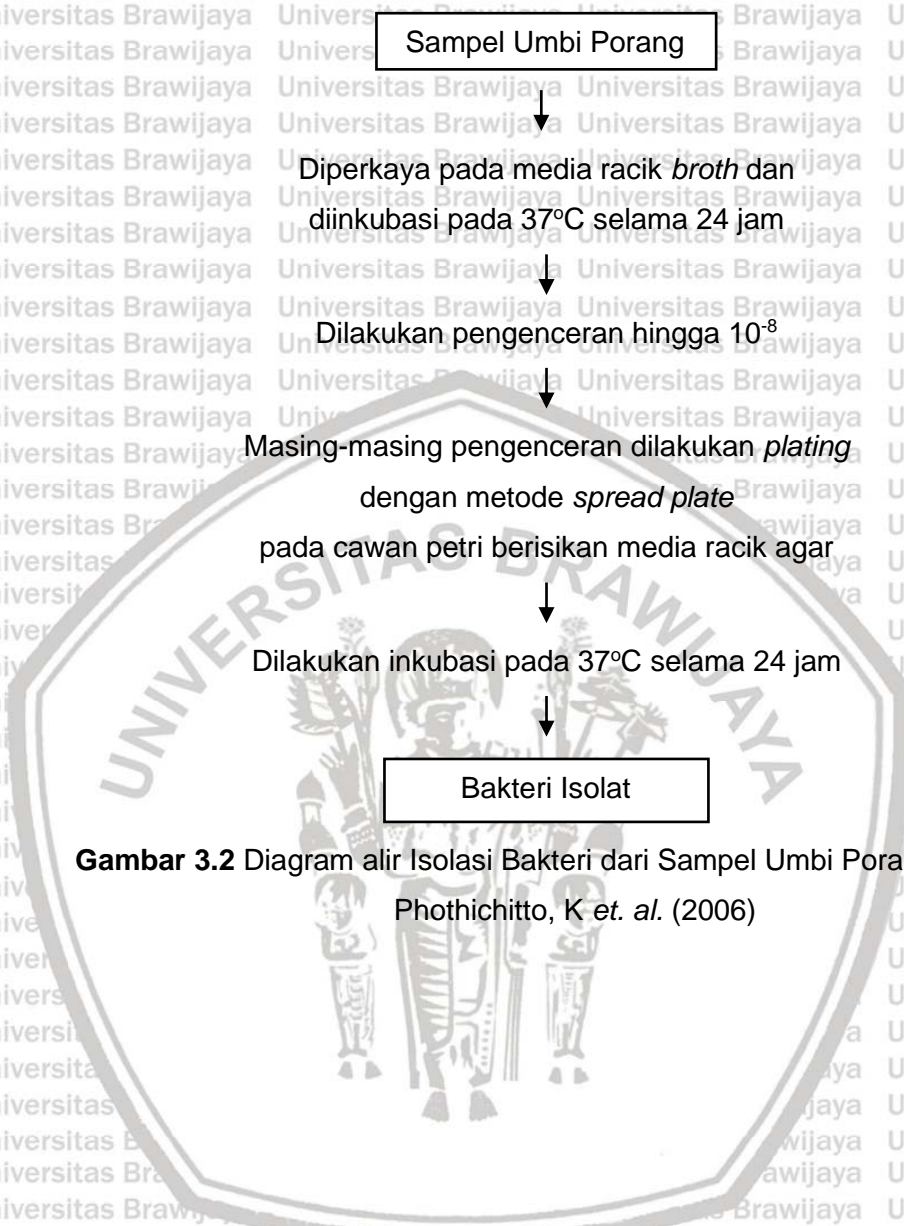
### 3.6 Diagram Alir

#### 3.6.1 Diagram Alir Pengambilan Sampel Umbi Porang



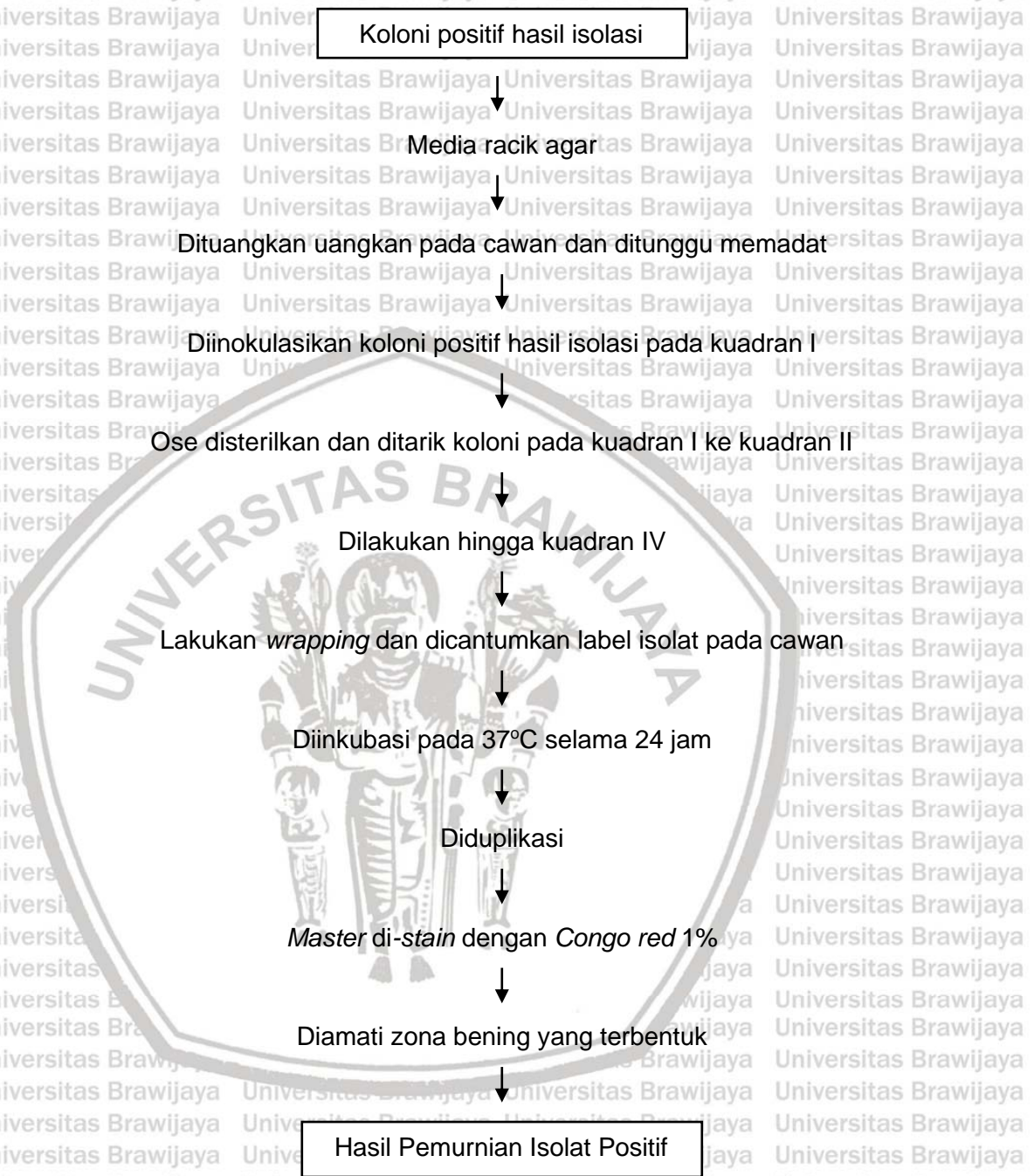
Gambar 3.1 Diagram alir Pengambilan Sampel Umbi Porang

### 3.6.2 Diagram alir Isolasi Bakteri dari Sampel Umbi Porang



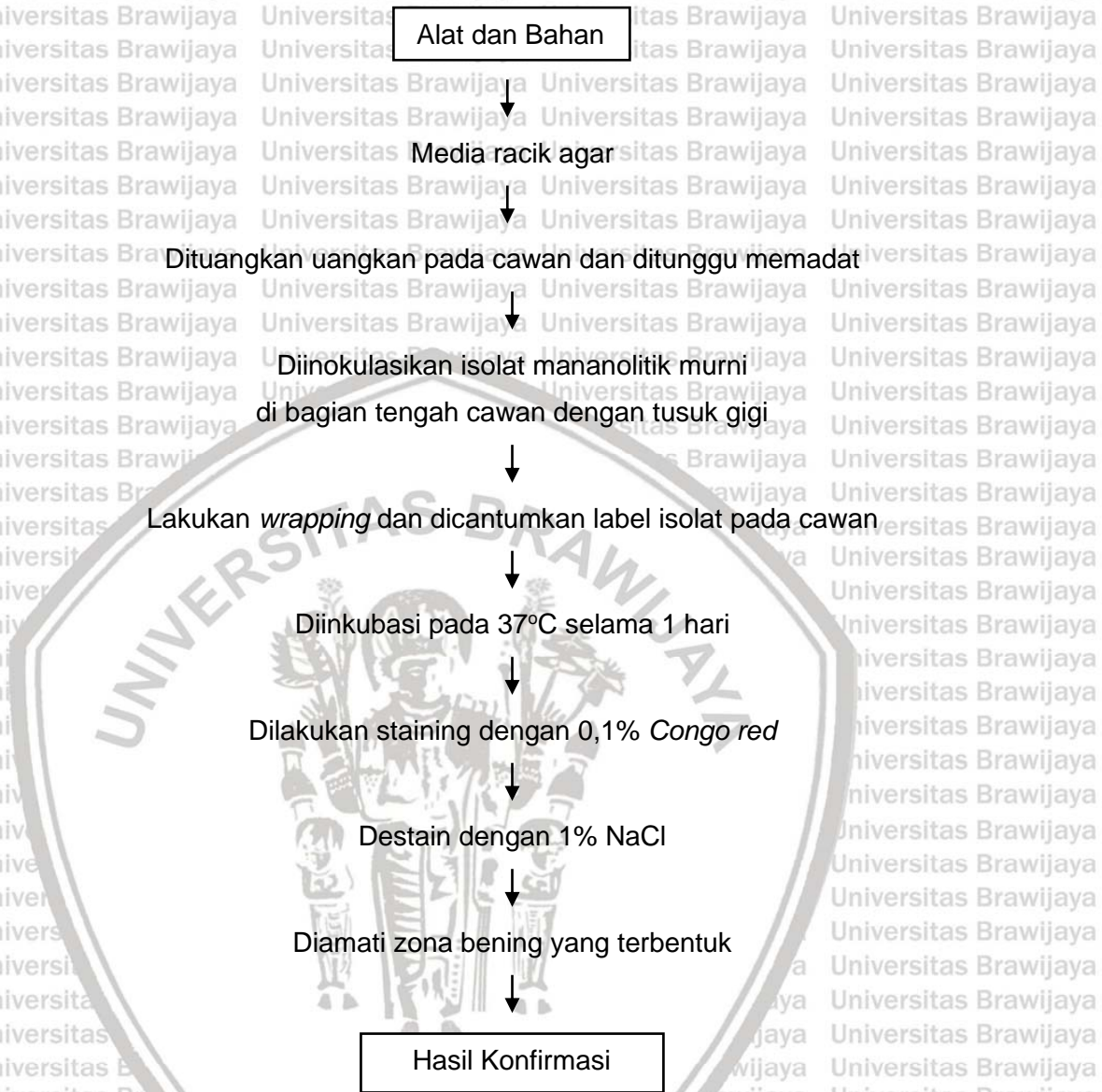
**Gambar 3.2** Diagram alir Isolasi Bakteri dari Sampel Umbi Porang modifikasi Phothichitto, K *et. al.* (2006)

### 3.6.3 Diagram alir Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi



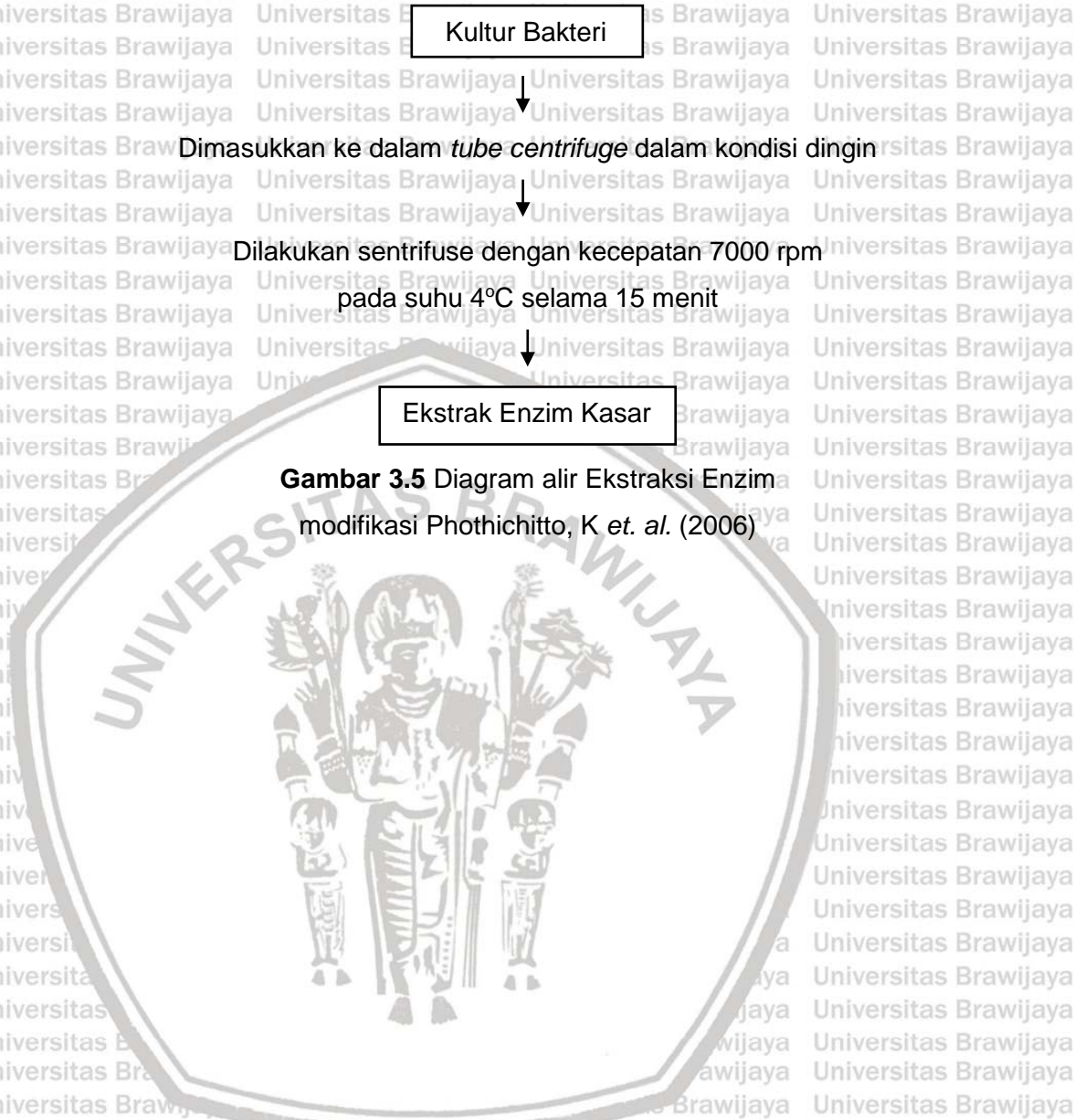
**Gambar 3.3** Diagram alir Pemurnian Koloni Positif Hasil Isolasi modifikasi Ratnakomala et al. (2015)

### 3.6.4 Diagram alir Konfirmasi Isolat Hasil *Streak Plate*



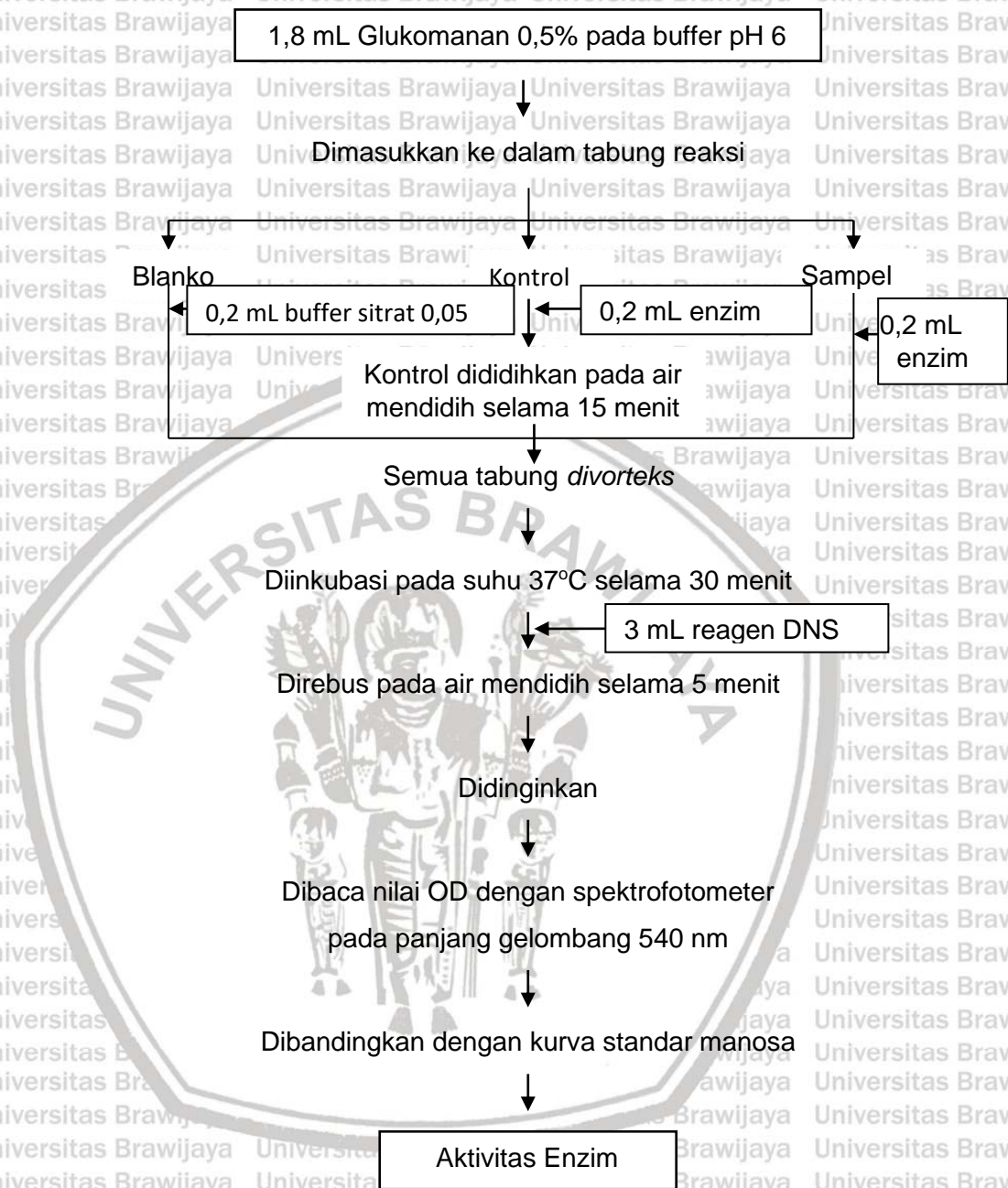
**Gambar 3.4** Diagram alir Konfirmasi Isolat Hasil *Streak Plate* modifikasi Pommerville (2011)

### 3.6.5 Diagram Alir Ekstraksi Enzim



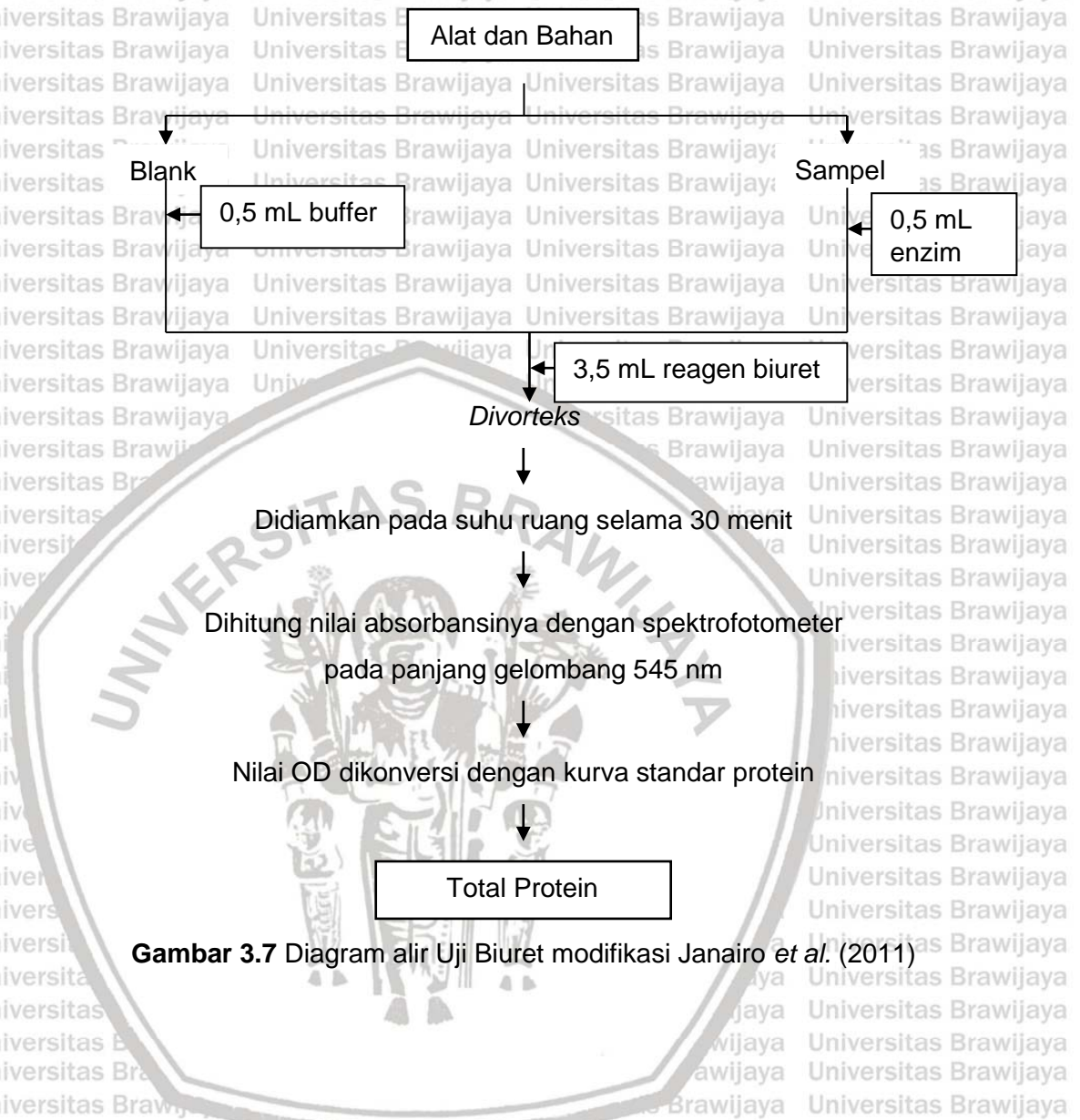
**Gambar 3.5** Diagram alir Ekstraksi Enzim modifikasi Phothichitto, K *et. al.* (2006)

### 3.6.6 Diagram Alir Uji DNS pada Sampel Enzim



Gambar 3.6 Diagram alir Uji DNS pada Sampel Enzim modifikasi dari Yin *et al.* (2012)

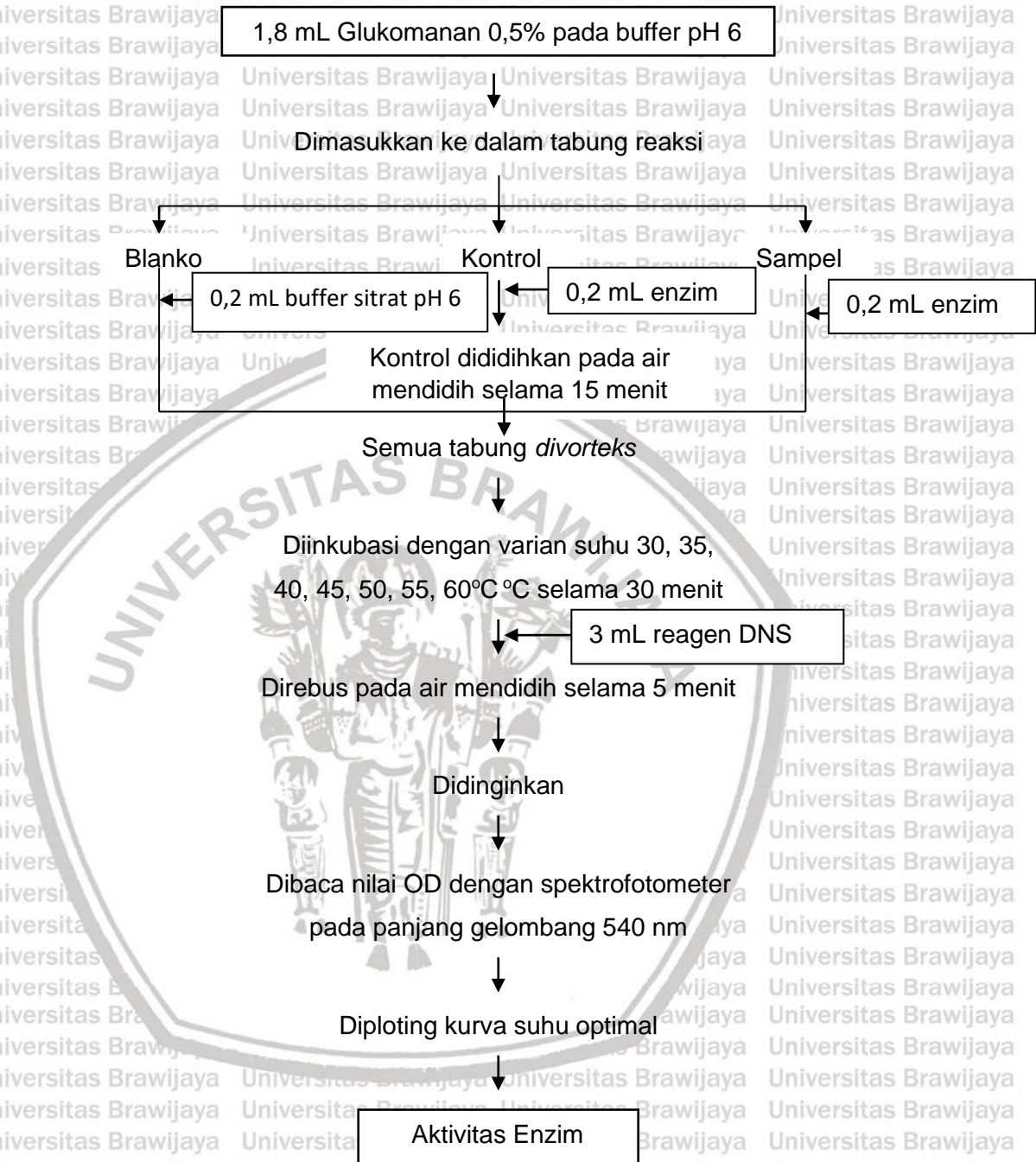
### 3.6.7 Diagram Uji Biuret



Gambar 3.7 Diagram alir Uji Biuret modifikasi Janairo *et al.* (2011)



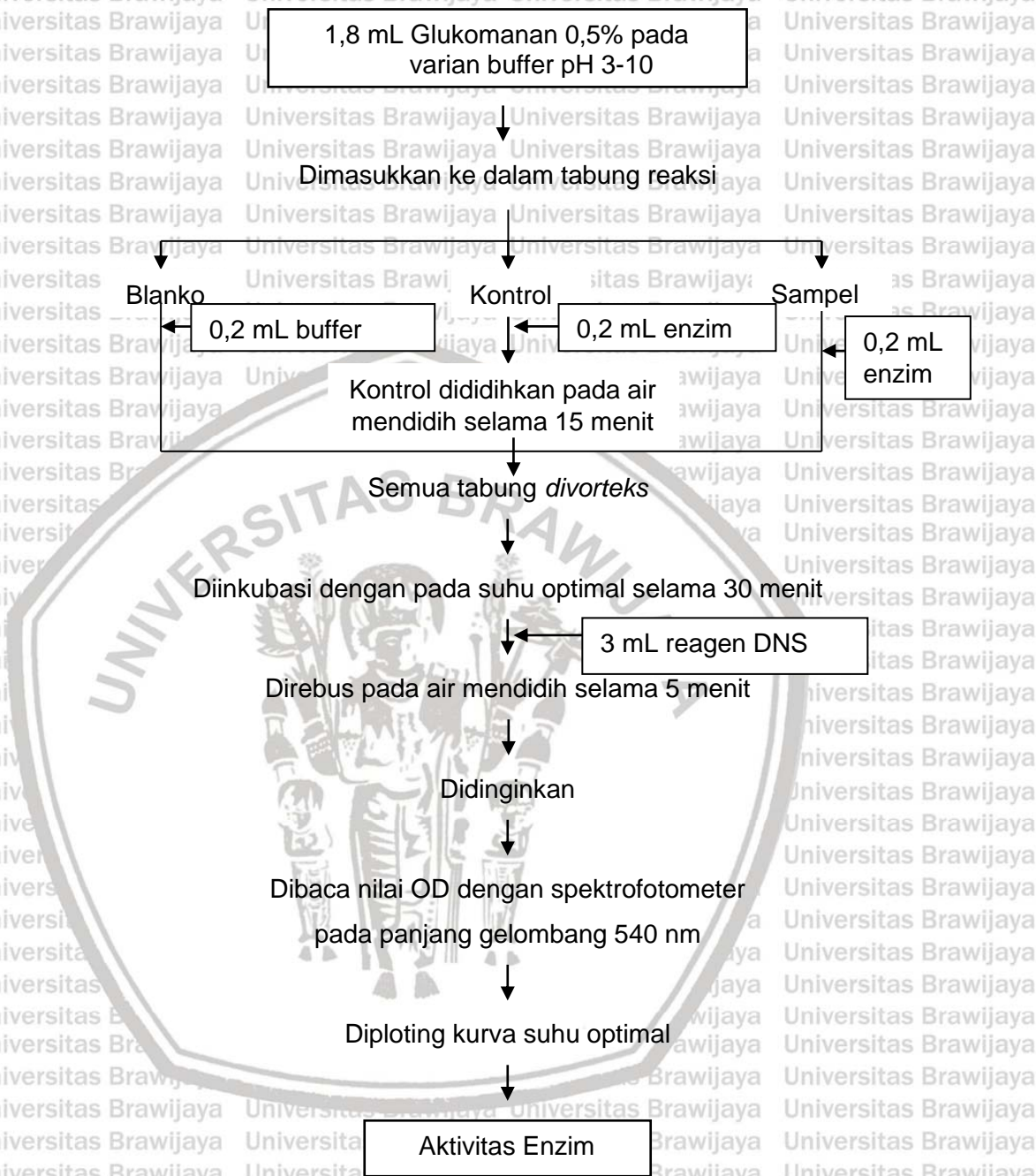
### 3.6.8 Diagram Alir Penentuan Suhu Optimal



Gambar 3.8 Diagram alir Penentuan Suhu Optimal modifikasi dari

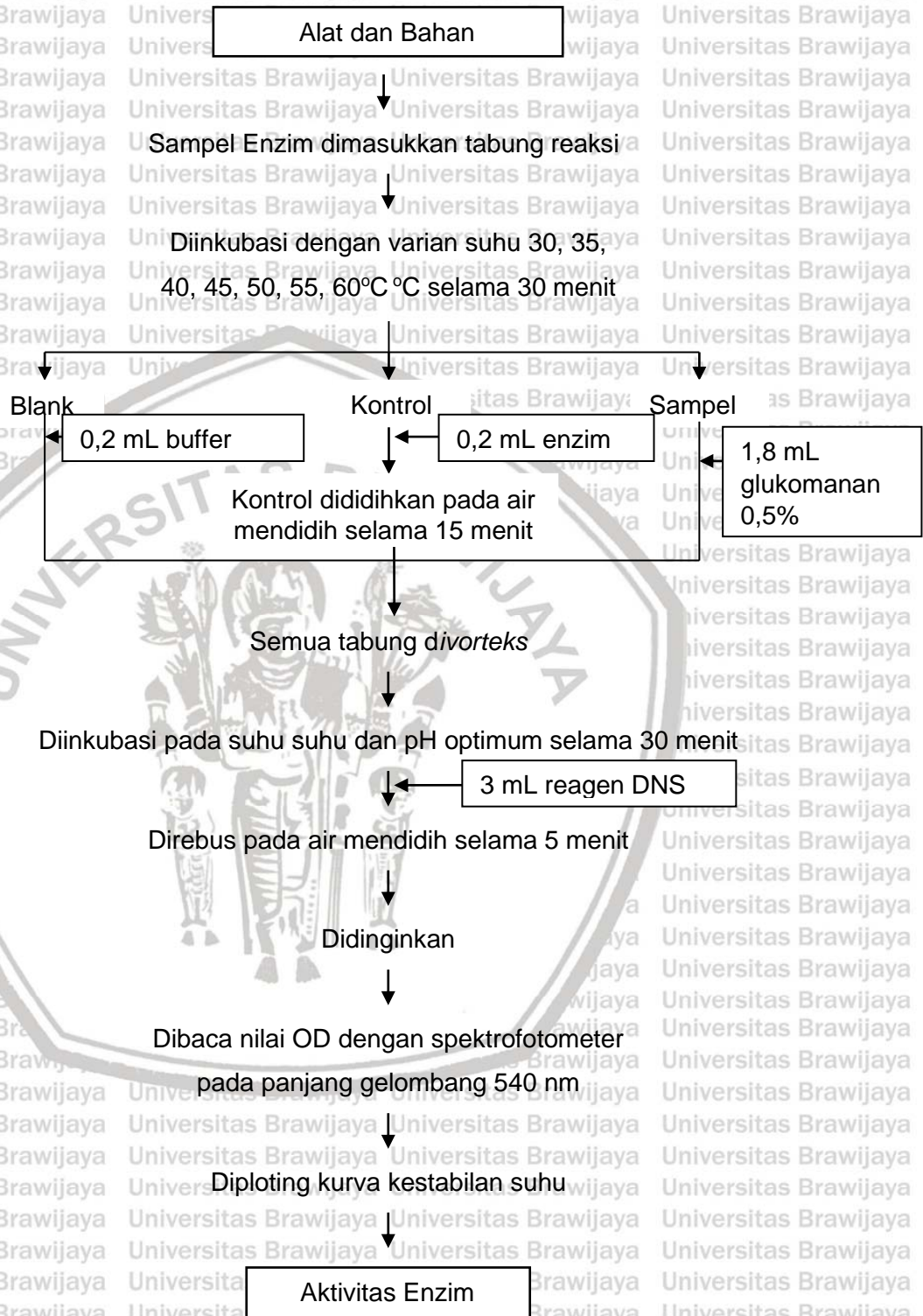
Yin *et al.* (2012)

### 3.6.9 Diagram Alir Penentuan pH Optimal



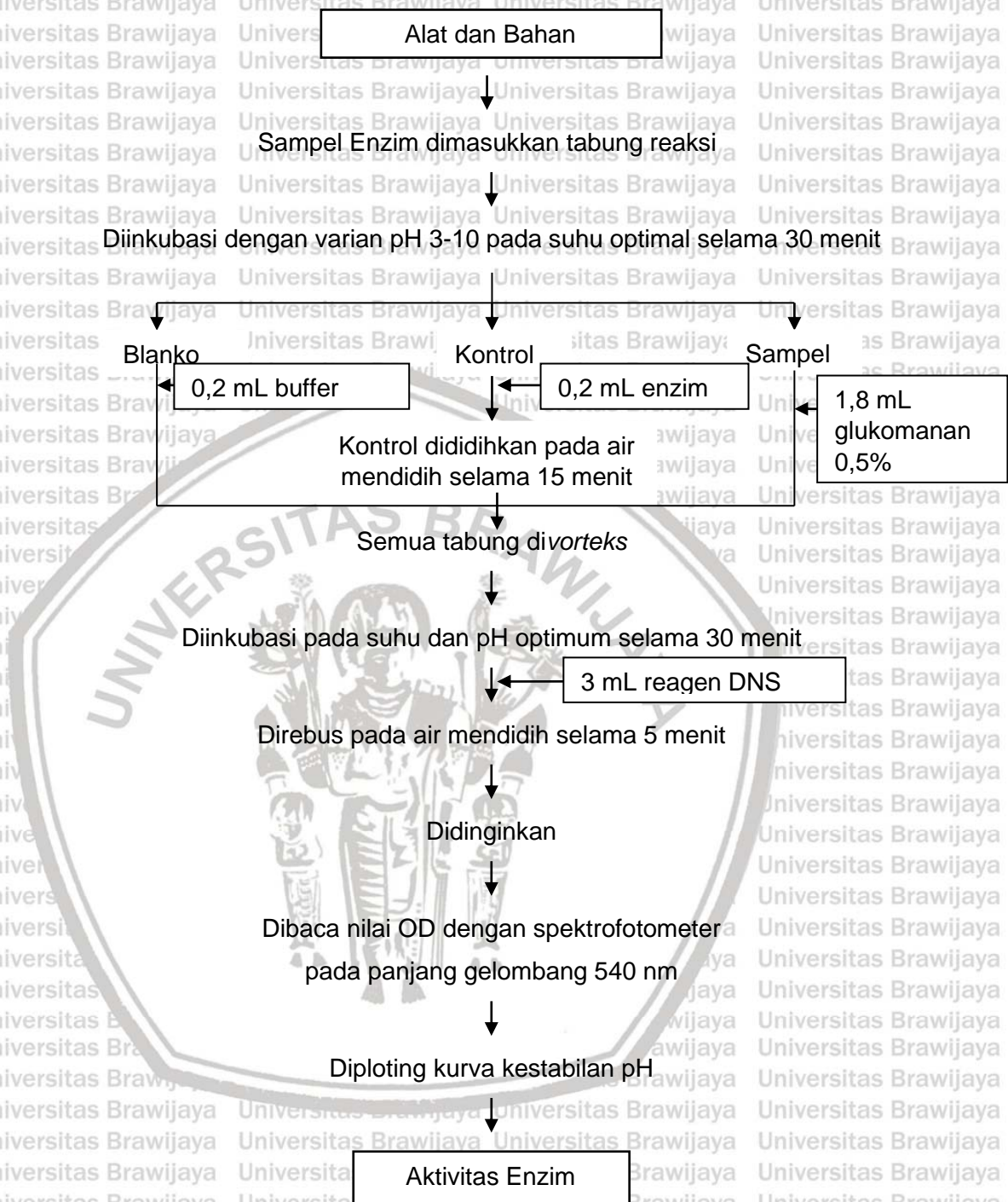
**Gambar 3.9** Diagram alir Penentuan pH Optimal modifikasi dari Yin *et al.* (2012)

### 3.6.10 Diagram Alir Penentuan Kestabilan Suhu



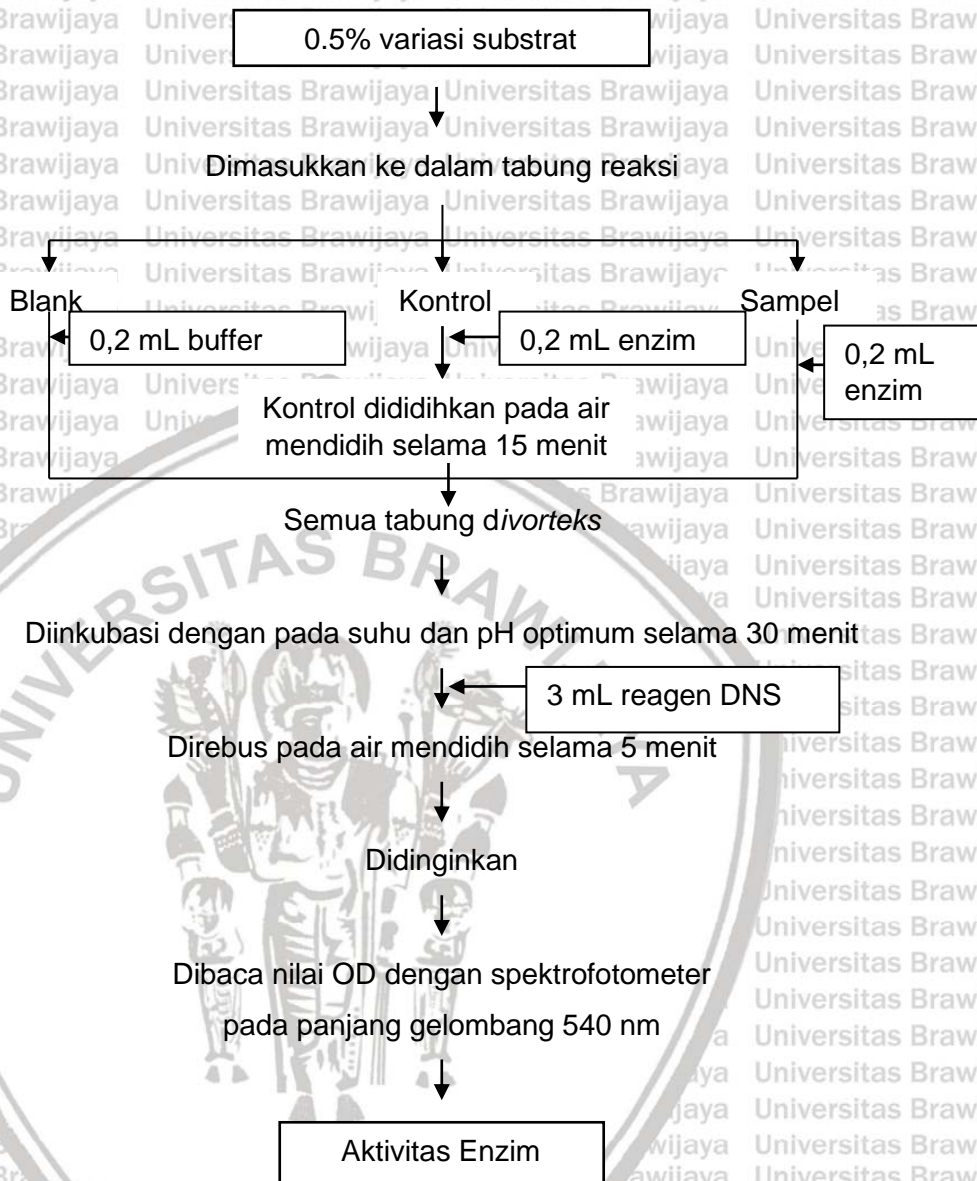
Gambar 3.10 Diagram alir Kestabilan Suhu modifikasi dari Yin *et al.* (2012)

### 3.6.11 Diagram Alir Uji Kestabilan pH



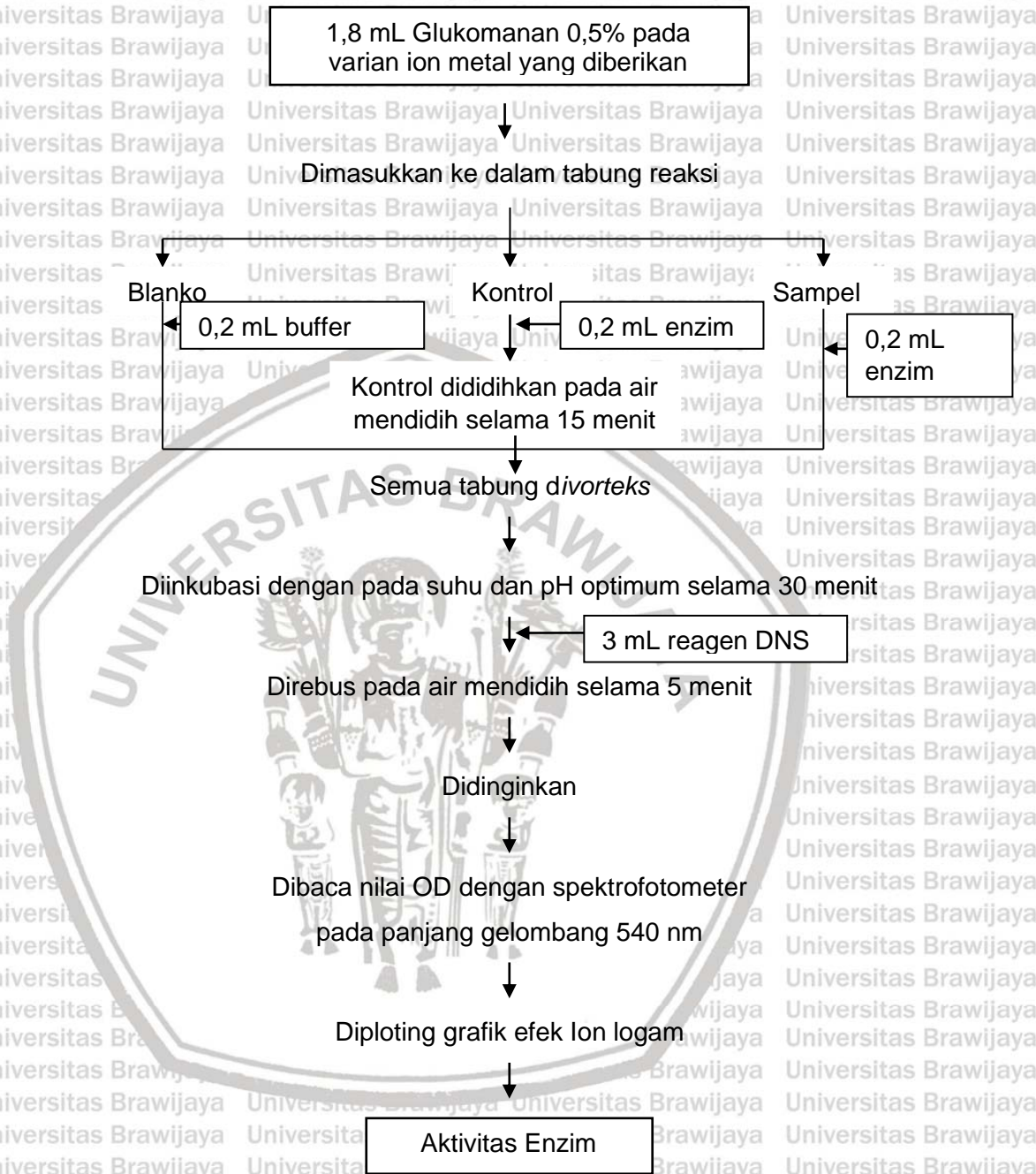
Gambar 3.11 Diagram alir Kestabilan pH modifikasi dari Yin *et al.* (2012)

### 3.6.12 Diagram Alir Spesifitas Substrat



Gambar 3.12 Diagram alir Spesifitas Substrat modifikasi dari Yin et al. (2012)

### 3.6.13 Diagram Alir Pengaruh Ion Logam



Gambar 3.13 Diagram alir Pengaruh Ion Logam dari Yin et al. (2012)

## BAB IV PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Mananolitik

#### 4.1.1 Isolasi Bakteri Mananolitik

Tahapan pertama dalam penelitian merupakan isolasi bakteri mananolitik. Sampel yang digunakan bukanlah tanah melainkan umbi porang yang dibusukkan. Alasan dipilihnya porang sebagai asal sampel isolasi bakteri adalah karena tingginya kadar glukomanan yang terdapat pada porang, sehingga diharapkan tumbuhnya bakteri yang mampu memecah glukomanan pada sampel porang tersebut (Thomas, 1997 dalam Purwanto, 2014). Sampel porang dibusukkan di dalam tanah dengan cara dikuburkan dengan kondisi setengah bagian mencuat ke permukaan tanah selama seminggu.

Sampel porang yang telah dibusukkan tersebut dicacah dengan ukuran 1 x 1 x 1 cm dan kemudian sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilakukan pengkayaan selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan *shaker waterbath* dalam media racik *broth* dengan kandungan tepung porang sebanyak 1%. Hasil tahap pengkayaan dilakukan pengenceran dengan total volume 10 mL dengan larutan pepton hingga  $10^{-8}$ . Kemudian dilakukan inokulasi dengan metode *spread plate* pada masing-masing pengenceran pada cawan petri berisikan media agar yang mengandung tepung porang sebanyak 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi diamati zona beningnya dengan *Congo red* 1% di mana koloni yang memiliki zona bening memiliki aktivitas mendegradasi glukomanan. Prinsip *staining* dengan *Congo red* adalah *Congo red* mengikat secara spesifik terhadap ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik pada selulosa. Bakteri yang mampu memproduksi selulase memotong ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik pada media CMC. Hal ini menyebabkan *Congo red* tidak dapat mengikat wilayah tersebut sehingga membentuk zona bening yang mengelilingi koloni tersebut (Ezeji, 2017). Glukomanan juga memiliki ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik pada rantai utama liniernya (Shukla, P. et al., 2013) yang akan dipotong oleh enzim mananase, sehingga *staining Congo red* dapat dilakukan juga pada enzim mananase.

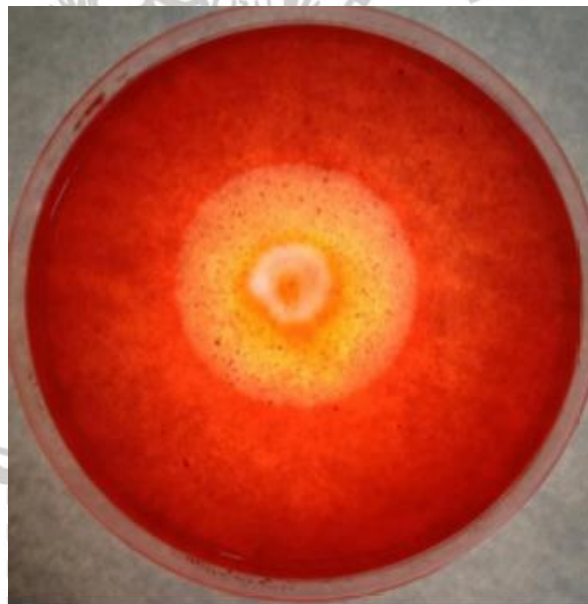
Isolat positif diambil dengan jarum ose dan dilakukan isolasi dengan metode *streak plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi tersebut diberikan *Congo red* 1% untuk diamati kuadran di mana koloni

yang dimurnikan mampu mendegradasi glukomanan. Hasil isolasi dengan metode *streak plate* diperoleh koloni murni yang akan diinokulasi masing-masing 1 koloni pada 1 cawan petri berisikan media racik dan diuji dengan *Congo red* 1% untuk dikonfirmasi aktivitas mananolitiknya.

**Tabel 4.1** Isolat Positif Hasil Streak

Nama Isolat	dd1 (mm)	dl1 (mm)	dd2 (mm)	dl2 (mm)	Xdd (mm)	Xdl (mm)	Zona Bening	Indeks Mananolitik
C1P6I5	10	55	30	65	32,5	47,5	15	0,5
C3P6I9	11	12	15	24	11,5	19,5	8	0,7
C2P4I7	15	15	40	40	15	40	25	1,7
C1P4I4	15	15	40	40	15	40	25	1,7
C1P6I5	15	26	40	27	20,5	33,5	13	0,6
C2P5I8	8	12	19	20	10	19,5	9,5	1
C1P4I1	12	11	38	38	11,5	38	26,5	2,3
C1P4I4	10	41	39	58	25,5	48,5	23	0,9
C1P4I3	12	12	21	21	12	21	9	0,8

\*Sampel yang diblok merupakan sampel dengan indeks mananolitik tertinggi



**Gambar 4.1** Konfirmasi Aktivitas Mananolitik Isolat C1P4I1



#### 4.1.2 Identifikasi Bakteri Mananolitik

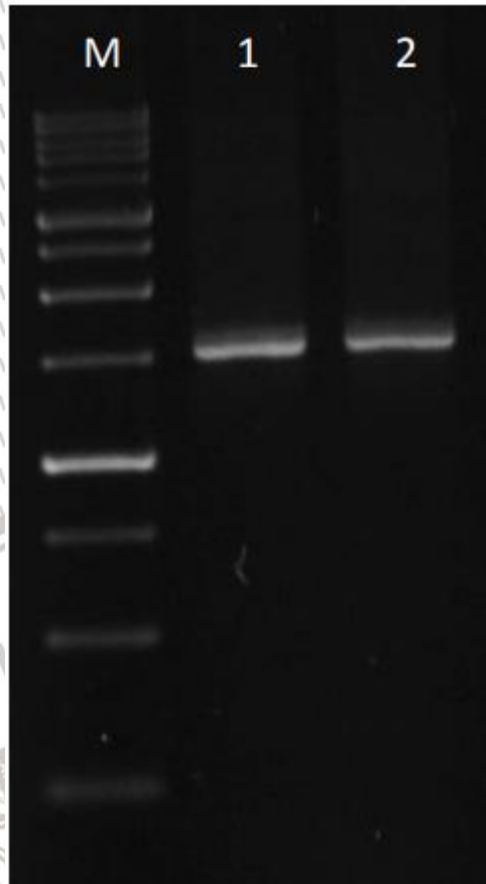
Identifikasi dalam skala molekuler juga dilakukan untuk mengetahui genus atau spesies dari isolat yang diperoleh. Pengujian ini dilakukan dengan jasa identifikasi bakteri oleh Genetika Science, Jakarta. Pada tahapan ini terlebih dahulu dilakukan ekstraksi genom DNA dari isolat yang sudah dimurnikan.

Ekstraksi dilakukan menggunakan kit *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit* yang diproduksi oleh Zymo Research. Proses lisis pada ekstraksi DNA menggunakan buffer lisis yang tersedia dalam kit dan dilakukan purifikasi DNA dengan kit *DNA Clean & Concentrator*. Hasil DNA yang diperoleh diukur dengan *Nanodrop*. Tingkat kemurnian DNA disajikan pada tabel 4.2

**Tabel 4.2** Tingkat Kemurnian DNA Ekstraksi

Sampel	Konsentrasi (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Volume (μl)
	530,8	1,89	1,6	30

Setelah dilakukan pengukuran kemurnian dilakukan diampifikasi DNA dengan metode PCR. Selanjutnya dilakukan elektroforesis DNA dengan 0,8% *TBE Agarose* untuk mendeteksi produk PCR. Hasil elektroforesis akan dibandingkan dengan *marker* untuk mengetahui ukuran hasil PCR dalam bp (*base pairs*). Hasil elektroforesis disajikan pada gambar 4.2 dan gambar *marker* yang digunakan pada gambar 4.3.



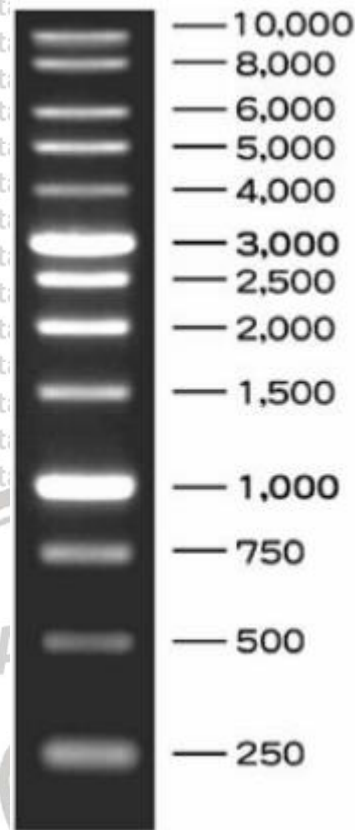
**Gambar 4.2** Foto Hasil Elektroforesis DNA Hasil PCR 16S rDNA

Keterangan:

M : *Marker* yang digunakan dalam elektroforesis

1 : Sampel rekan yang dielektroforesis bersama

2 : Sampel C1P4I1



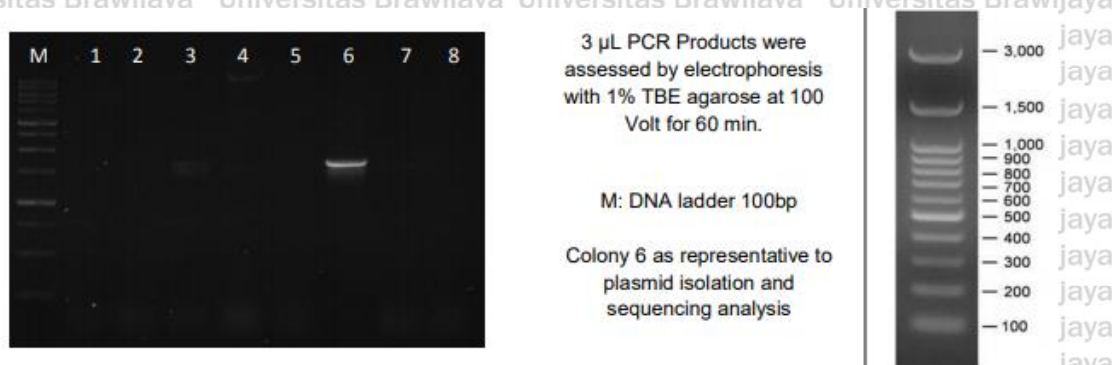
**Gambar 4.3** Marker yang Digunakan dalam Elektroforesis DNA

Hasil dari elektroforesis DNA diketahui adalah hasil sampel yang adalah sebesar 1500 bp. Bila hasil elektroforesis. Pita hasil elektroforesis tersebut diekstrak DNA nya menggunakan kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery*. DNA yang sudah diekstrak dilanjutkan dengan proses *sequencing*.

Proses *sequencing* dilakukan dengan metode *bi-directional sequencing*. Hasil *sequencing* dapat dilihat pada lampiran 1. Hasil *sequencing* menunjukkan bahwa terdapat *noise* pada *sequencing* sehingga perlu dilakukan proses kloning lebih lanjut untuk menghilangkan *noise* atau gangguan. *Noise* adalah puncak yang bertumbukan sehingga menunjukkan hasil *noise*.

Kloning dilakukan menggunakan *vector* Toyobo pTA2, spesifikasi *vector* dilampirkan pada lampiran 2. DNA yang telah dipurifikasi dari hasil elektroforesis dikloning pada *vector* tersebut. Kemudian *vector* yang sudah dimasukkan DNA ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* Zymo 5α dengan Mix and Go™ oleh Zymo Research. Setelah ditransformasi, *vector* dalam sel kompeten tersebut diduplikasi oleh sel tersebut dan diekstrak. Kemudian koloni di *PCR*

Colony dengan primer T3 dan T7 dengan KOD FX Neo (Toyobo). PCR Colony dilakukan untuk mengidentifikasi koloni yang memiliki vector yang telah ditransformasi yaitu adalah koloni 6, gambar PCR Colony dapat dilihat pada gambar 4.4



Gambar 4.4 Hasil PCR Colony dan marker yang digunakan

Setelah diperoleh koloni memiliki vector dilakukan ekstraksi vector menggunakan kit ZR Plasmid MiniPrep (Zymo Research). Vector telah diekstraksi dilakukan *sequencing* dengan metode *bi-directional plasmid sequencing*. Hasil *sequencing* secara utuh dapat dilihat di lampiran 3, di mana urutan basa yang diberikan tanda merupakan urutan basa sampel yang diinsersikan ke dalam vector. Sekuen basa sampel dapat dilihat pada gambar 4.5 di halaman berikutnya.

**SEQUENCE OF INSERT 1514bp**

```

1      TACGGCTACC TTGTTACGAC TTCACCCCAA TCATCTATCC CACCTTAGGC GGCTGGCTCC
61     TAAAAGGTTA CCTCACCGAC TTCGGGTGTT ACAAACTCTC GTGGTGTGAC GGGCGGTGTG
121    TACAAGGCCG GGAACAGTAT TCACCGCGGC GTGCTGATCC GCGATTACTA GCGATTCCGA
181    CTTTCATGTAG GCGAGTTGCA GCCTACAATC CGAACTGAGA TTGGCTTTAA GAGATTGTCT
241    TGCCGTCACC GACTTGGCAG TCCTGTGACC AACCATGTGA GCACGTGTGT AGCCAGGTC
301    ATAAGGGGCA TGATGATTTG AGCTCATCCC CACCTTCCTC CGGTTTATTA CCGGCAGTCT
361    CGCTAGAGTG CCCAACTGAA TGATGGCAAC TAACAATAGG GGTGCGCTC GTTGC GGAGC
421    TTAACCCAAAC ATCTCAGCAC ACAGCTGAC GACAACCATG CACCACCTGT CACCGATGTT
481    CCGAAGAAAC TTTCTATCTC TAGAAAATAGC ATCGGGATGT CAAGACCTGG TAAGGTTCCT
541    CGCGTTGCTT CGAATTA AACATGCTCC ACCGCTTGTG CGGGCCCCG TCAATTCCTT
601    TGAGTTTCAA CTTGCGGTC GTACTCCCCA GGCGGAGTGC TTAATGCGTT AGCTGCGGCA
661    CTAAGCCCCG GAAAGGGCCT AACACCTAGC ACTCATCGTT TACGGCGTGG ACTACCAGGG
721    TATCTAATCC TGTTTGCTCC CCACGCTTTC GAGCCTCAGC GTCAGTTACA GACCAGAGAG
781    CCGGTTTCCG CACCGGTGTT CCTCCATATA TCTACGCATT TCACCGCTAC ACATGGAATT
841    CCACTCTCCC CTCTGCACT CAAGTTTAAAC AGTTTCCAAA GCGAACAAATG GTTAAGCCAC
901    TGCCTTAAAC TTCAGACTTA TTAACCAGCC TGCGCTCGCT TTACGCCCAA TAAATCCGGA
961    CAACGCTCGG GACCTACGTA TTACCGCGGC TGCTGGCAGC TAGTTAGCCG TCCTTTCTG
1021   GTAAGTTACC GTCACTGTGT GAACTTTCCA CTCTCACACA CGTTCTTCTC TTACAACAGA
1081   GCTTTACGAT CCGAAAACCT TCTTCACTCA CGCGCGTGTG CTCGGTCAGG GTTGCSCCCA
1141   TTGCCGAAGA TTCCCTACTG CTGCCTCCCG TAGGAGTCTG GGCCGTGTCT CAGTCCAGT
1201   GTGGCCGATC ACCCTCTCAG GTCGGCTATG TATCGTCCGC TTGGTAGGCC GTTACCCAC
1261   CAACTAGCTA ATACAACGCA GGTCCATCTA CTAGTGATGC AATTGCATCT TTCAAGTCTC
1321   TAACATGTGT TAAACACTAT TATGCGGTAT TAGCTATCGT TTCCAATAGT TATCCCCAC
1381   TAATAGGTAG GTTACTACG CGTTACTCAC CCGTTCGCAA CTCTTCCAAC TCTAGCAAGC
1441   TAAAGTCTTC AGCGTTCTAC TTGCATGTAT TAGGCACGCC GCCAGCGTTC GTCCTGAGCC
1501   AGGATCAAAC TCTA
    
```

**Gambar 4.5** Sekuen DNA Sampel

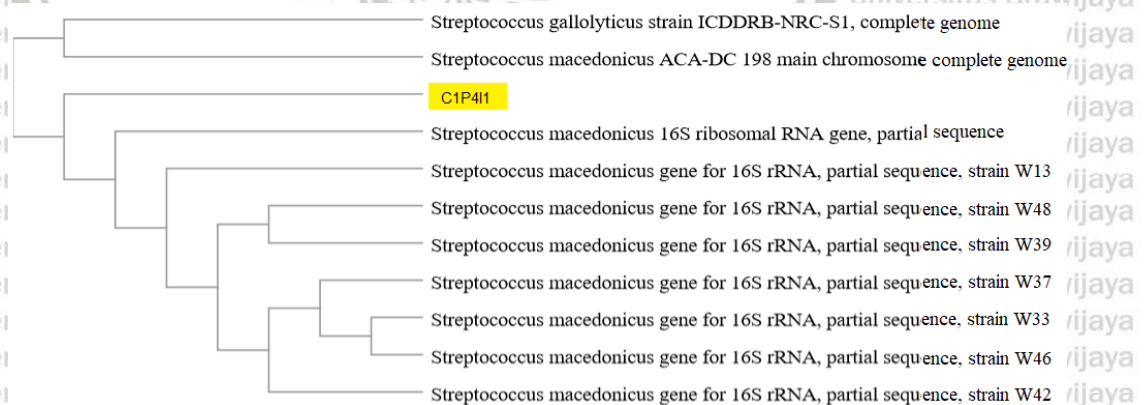
Sekuen DNA sampel dibandingkan pada *database* NCBI dengan menggunakan BLAST untuk menemukan spesies mikroorganisme yang memiliki kedekatan kesamaan sekuen DNA dengan sampel. Tabel 4.3 menunjukkan hasil penelusuran BLAST terdekat pada sampel.

**Tabel 4.3** Hasil 5 Teratas Penelusuran BLAST

No.	Description	Max. Score	Total Score	Query Coverage	E Value	%
1.	<i>Streptococcus macedonicus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2.722	2.722	100%	0,0	99,9%
2.	<i>Streptococcus macedonicus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: W48	2.711	2.711	99%	0,0	99,7%
3.	<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain ICDDR-B-NRC-S1, complete genome	2.707	16.243	99%	0,0	99,7%
4.	<i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 main chromosome complete genome	2.707	16.243	99%	0,0	99,7%
5.	<i>Streptococcus macedonicus</i> gene for 16S Rrna, partial sequence, strain W42	2.702	2.702	99%	0,0	99,6%

Penjelasan arti kolom adalah:

1. *Description* (Deskripsi) merupakan judul informasi yang biasanya terdiri dari genus, spesies, jenis strain, jenis fragmen gen/DNA, dan tipe kelengkapan sekuens DNA yang ditampilkan per informasi tersebut.
2. *Max Score* adalah total nilai yang didapatkan dari pensejajaran antara sekuens masukan dengan sekuens *database*.
3. *Total Score* adalah total nilai yang didapatkan dari semua pensejajaran antara sekuens masukan dengan sekuens database yang sejajar.
4. *Query Coverage* adalah persentase yang menggambarkan seberapa besar/panjang kesesuaian sekuens masukan jika dibandingkan dengan sekuens DNA target dan jika sekuens DNA masukan sepanjang/menyelimuti (*covering*) seluruh sekuens DNA target pada *database* NCBI, maka persentase tersebut adalah 100%.
5. *E Value* adalah merupakan nilai pengharapan (*expectation value*) merupakan suatu ukuran yang mana pensejajaran ini terjadi secara kebetulan, *E value* yang baik adalah mendekati nol.
6. *Percentage Identity* merupakan suatu persentase yang menunjukkan seberapa sesuai antara sekuens DNA masukan dengan sekuens DNA target.



Gambar 4.6 Pohon Filogenik Sampel

Hasil perbandingan sekuen sampel dengan *database* NCBI menunjukkan sampel memiliki kesamaan paling tinggi dengan *Streptococcus macedonicus* dengan tingkat kesamaan 99,9% dan *Query Coverage* 100%. Sampel dengan uji 16S rRNA dengan nilai tingkat kesamaan di atas 97,5% memiliki kesamaan pada tingkat spesies sedangkan pada nilai tingkat kesamaan di atas 95% memiliki kesamaan pada genus (Stackenbrandt and Goebel, 1994). Sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel memiliki hubungan yang erat dengan spesies *Streptococcus macedonicus*. Spesies *Streptococcus macedonius* merupakan bakteri dari filum *Firmicutes*, kelas *Bacilli*, family *Streptococcaceae*, genus *Streptococcus* dan spesies *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Macedonicus* (BacDive, 2019)

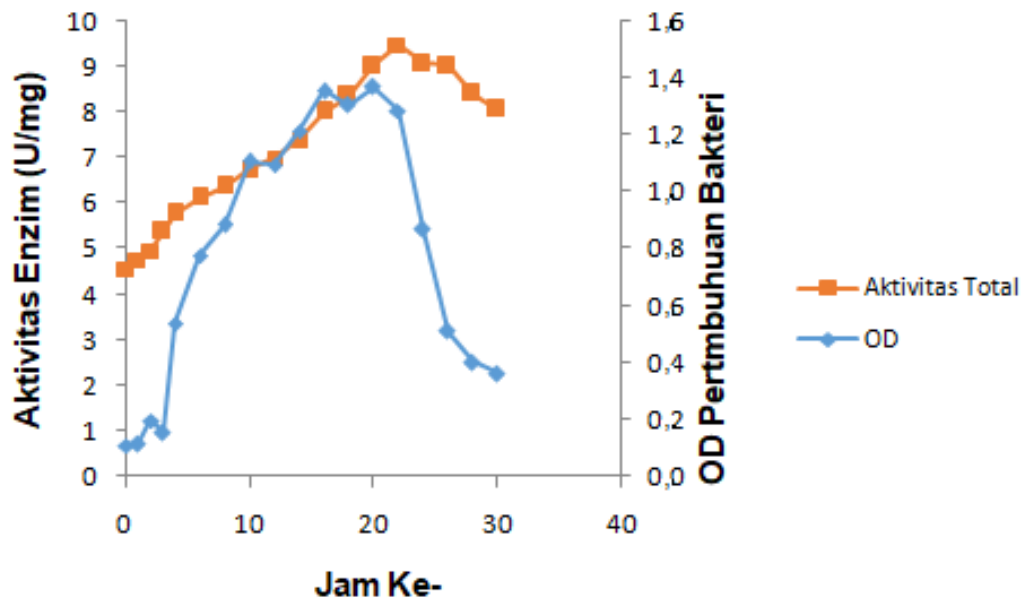
*Streptococcus macedonicus* merupakan subspecies dari *Streptococcus gallolyticus*. Bakteri ini merupakan salah satu bakteri yang berperan dalam fermentasi makan terutama yang berasal dari produk susu. Sifat patogenik dari bakteri ini kurang diketahui karena hanya *Streptococcus thermophilus* yang dianggap nonpatogenik dalam genus *Streptococcus* dan juga masuk dalam *Streptococcus bovis/equines complex*. Salah satu varian *Streptococcus macedonicus* (strain ACA-DC 198) memiliki sifat *food grade* dan nonpatogenik. Varian tersebut juga bersifat termofilik, homofermentatif, gram-positif, mampu sedikit menghasilkan asam dan proteolitik juga memproduksi *bacteriocin* (*anti-clostridial lantibiotic macedocin*) (Papadimitriou *et al.*, 2014).

#### 4.2 Produksi dan Isolasi Enzim

Penentuan waktu produksi enzim mananase perlu dilakukan sehingga diketahuinya kondisi optimum enzim mananase akan dihasilkan. Penentuan waktu produksi enzim dilakukan dengan cara menguji tiap periode waktu inkubasi tertentu dan memilih waktu di mana aktivitas enzim mananase paling tinggi. Satu unit aktivitas enzim mananase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1  $\mu$ mol manosa dalam 1 menit. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kurva pertumbuhan bakteri diiringi dengan kurva aktivitas enzim mananase.

Penentuan waktu produksi enzim mananase menggunakan media racik yang disuplementasi tepung porang sebanyak 1%. Tepung porang mengandung glukomanan yang merupakan substrat dari mananase. Interval waktu yang digunakan adalah setiap jam hingga 6 jam pertama dan setelah itu menjadi tiap 2

jam. Sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 470 nm. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan metode DNS dari penelitian Jin *et al.* (2013) yang telah dimodifikasi dengan komposisi reagen DNS oleh Miller (1959).



Gambar 4.7 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim

Hasil kurva menunjukkan pertumbuhan sel pada 6 jam awal lambat. Hal ini merupakan fase lag di mana bakteri yang diinokulasikan masih dalam tahap adaptasi. Kemudian mengalami pertumbuhan secara drastis jam ke-16 yang merupakan fase log dari bakteri tersebut. Pertumbuhan mengalami stagnansi hingga jam ke-22 di mana merupakan fase stasioner dari bakteri tersebut. Setelah jam ke-22 pertumbuhan bakteri menurun yang merupakan fase kematian.

Hasil kurva aktivitas enzim menunjukkan aktivitas enzim mananase meningkat dari jam ke-0 hingga jam ke-22. Puncak aktivitas enzim mananase ada pada jam ke-22 di mana merupakan fase akhir stasioner. Setelah jam ke-22 aktivitas enzim mananase menurun. Sehingga waktu produksi mananase dapat dianggap adalah 22 jam.

Tahapan produksi mananase dari percobaan sebelumnya adalah dimulai dengan inokulasi pada media racik *broth* sebanyak satu ose. Kemudian



dilakukan *scale up* produksi di mana inokulum pada produksi utama adalah 5% dari total volume media racik *broth*. Inkubasi untuk inokulum adalah 37°C selama 24 jam. Kondisi produksi utama adalah media racik *broth* dengan kandungan 1% tepung porang dan kondisi inkubasi pada *shaker waterbath* pada suhu 37°C dengan rotasi 105 rpm selama 22 jam. Ekstraksi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan sentrifugasi dilakukan menggunakan *cold centrifuge* dengan kecepatan 7.000 rpm, 4°C selama 15 menit.

### 4.3 Purifikasi Enzim

Purifikasi enzim dilakukan menggunakan 2 tahap yaitu presipitasi dan dialisis.

**Tabel 4.4** Purifikasi Enzim Mananase

Tahap Pemurnian	Volume Enzim (mL)	Total Aktivitas (Unit)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield (%)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak Kasar Enzim	500	3101,9	8602,6	0,4	100	1
Pengendapan Amonium Sulfat 80%	17	2304,4	454,3	5,1	74,3	14,1
Dialisis	14	1967,1	324	6,1	63,4	16,8

Aktivitas spesifik enzim dari setiap tahap pemurnian mengalami peningkatan bila dibandingkan dengan ekstrak kasar atau tahap purifikasi sebelumnya. Pada ekstrak kasar enzim; pengendapan amonium sulfat 80%; dan dialisis secara berturut turut memiliki aktivitas spesifik 0,4; 5,1; dan 6,1 U/mg. Peningkatan dari aktivitas enzim menunjukkan peningkatan tingkat kemurnian enzim.

### 4.3.1 Presipitasi Amonium Sulfat

Presipitasi amonium sulfat dilakukan untuk mengkonsentrasikan protein dan memisahkan enzim dari zat pengotor. Prinsip presipitasi adalah protein memiliki interaksi kuat dengan air dan memiliki wujud yang mudah larut bila terhidrasi oleh air. Bila ketersediaan konsentrasi air berkurang dengan penambahan garam atau pelarut organik protein dapat terpresipitasi sehingga terpisah dari larutan (Buxbaum, 2015).

**Tabel 4.5** Aktivitas Enzim pada Beberapa Fraksi Pengendapan

Fraksi Amonium Sulfat (%)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik Enzim (U/mg)
50	223,7	10,0	22,3
60	279,4	12,5	22,4
70	379,1	13,4	28,7
80	667,6	16,0	41,7

Aktivitas enzim dari beberapa fraksi pengendapan terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi amonium sulfat. Pengendapan pada fraksi 80% memiliki aktivitas enzim tertinggi yaitu 41,7 U/mg. Namun tidak dilakukan pengendapan lebih dari 80% karena setelahnya *magnetic stirrer* yang digunakan tidak dapat berputar.

### 4.3.2 Dialisis

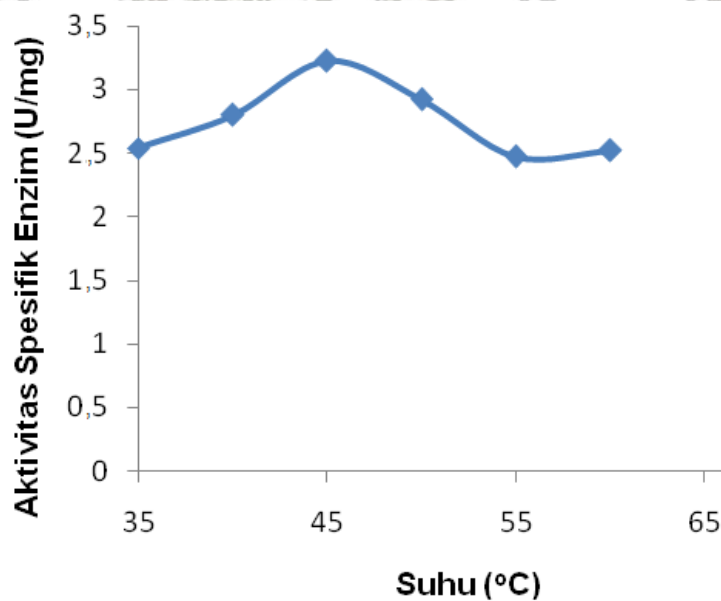
Dialisis merupakan proses purifikasi yang dilakukan setelah presipitasi amonium sulfat agar mengurangi amonium sulfat yang dapat mengganggu aktivitas enzim. Setelah dilakukan dialisis terdapat kenaikan aktivitas enzim menjadi 6,1 U/mg dengan tingkat kemurnian 16,8. Kantung dialisis yang digunakan adalah *dialysis tubing cellulose membrane D9777* Sigma, dengan ukuran *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 14 kDa.

#### 4.4 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui sifat dari enzim yang diperoleh. Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui suhu optimum, pH optimum, kestabilan suhu, kestabilan pH, pengaruh ion metal dan spesifitas substrat dari enzim tersebut.

##### 4.4.1 Suhu Optimum

Enzim memiliki suhu optimum tertentu untuk bekerja secara optimal. Enzim mananase yang diperoleh ditentukan suhu optimumnya dengan cara dilakukan inkubasi terhadap enzim tersebut pada suhu 35-60°C. Aktivitas enzim mananase tersebut akan meningkat seiring kenaikan suhu hingga mencapai suhu optimalnya. Kemudian aktivitas enzim tersebut akan menurun setelah suhu optimum tersebut.



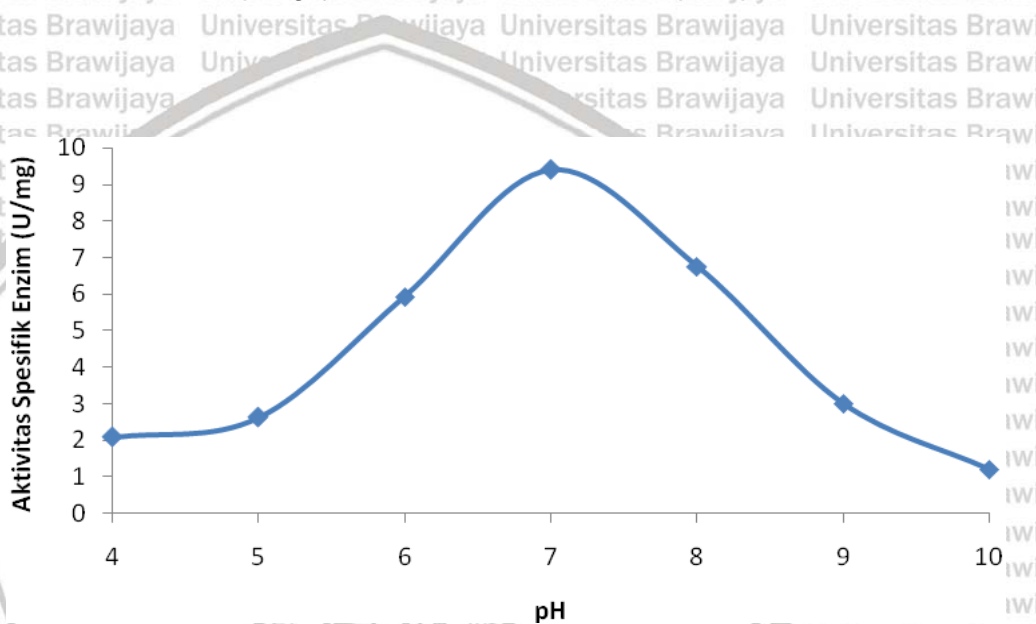
Gambar 4.8 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Mananase

Aktivitas spesifik dari enzim mananase yang tertinggi atau optimal adalah pada suhu 45°C yaitu 3,2 U/mg. Setelah suhu 45°C tersebut enzim mengalami penurunan aktivitas spesifik pada suhu 50-60°C. Penurunan ini disebabkan adanya denaturasi protein. Karakteristik enzim mananase ini berbeda dengan

karakteristik enzim mananase lainnya seperti *B. subtilis* yang memiliki suhu optimum yaitu 65°C (Cheng *et al.*, 2016), *A. terreus* dengan suhu optimum 70°C (Soni *et al.*, 2016) dan *B. amyloliquefaciens* dengan suhu optimum 40°C (Wizna *et al.*, 2017).

#### 4.4.2 pH Optimum

Pengujian pH optimum pada enzim yang diperoleh untuk menentukan pH optimum dari enzim tersebut. Pengujian dilakukan dengan variasi pH 4-10. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas ada suhu dan pH optimum.

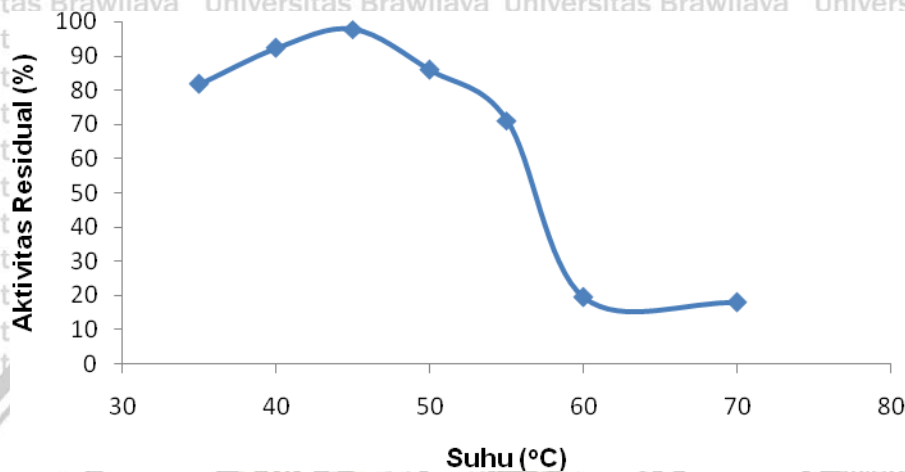


Gambar 4.9 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Mananase

Hasil yang diperoleh adalah ditentukannya bahwa aktivitas spesifik enzim tertinggi ada pada pH 7 yaitu 9,4 U/mg. Kebanyakan enzim memiliki pH optimum mendekati pH netral (Nagodawithana dan Reed, 1993). Enzim mananase yang diproduksi bakteri tersebut memiliki perbedaan pH optimum dengan beberapa mikroorganismenya lainnya seperti *B. amyloliquefaciens* dengan pH optimum 6,5 (Wizna *et al.*, 2017), *A. terreus* dengan pH optimum 7 (Soni *et al.*, 2016) dan *B. subtilis* pada pH optimum 6 (Chang *et al.*, 2016).

#### 4.4.3 Kestabilan Suhu

Pengujian kestabilan suhu enzim yang telah diperoleh dilakukan pada rentang 35-70°C selama 30 menit. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas pada suhu optimal.

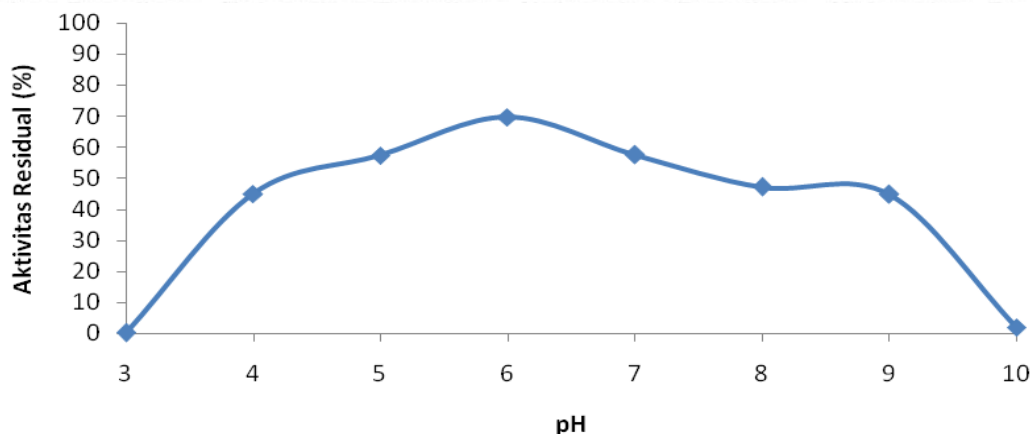


**Gambar 4.10** Kestabilan Aktivitas Enzim Mananase terhadap Variasi Suhu

Diketahui kestabilan suhu enzim tersebut adalah 35-55°C yang masih memiliki 80% dari aktivitas residualnya selama 30 menit dari masa inkubasi. Karakteristik kestabilan suhu dari enzim mananase berbeda dengan beberapa karakteristik enzim mananase lainnya seperti *A. terreus* yang stabil pada suhu 50°C (Soni *et al.*, 2016) dan *B. subtilis* yang masih dapat mempertahankan 80% aktivitasnya hingga suhu 70°C (Cheng *et al.*, 2016).

#### 4.4.4 Kestabilan pH

Pengujian kestabilan pH enzim yang telah diperoleh dilakukan pada rentang pH 3-10 selama 30 menit. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas pada suhu dan pH optimal.

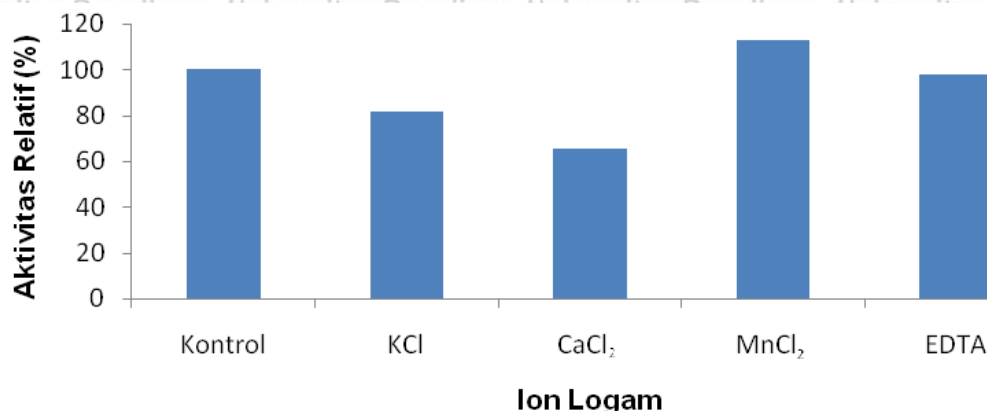


Gambar 4.11 Kestabilan Aktivitas Enzim Mananase terhadap variasi pH

Hasil yang diperoleh adalah enzim tersebut stabil pada pH 5-7 di mana dia dapat mempertahankan lebih dari 50% dari aktivitasnya. Hasil ini mirip dengan karakterisasi kestabilan enzim dari beberapa mananase seperti *A. terreus* yang stabil pada pH 4-7 (Soni *et al.*, 2016) dan *B. subtilis* yang masih dapat mempertahankan 80% aktivitasnya pada pH 4,5-7 (Cheng *et al.*, 2016).

#### 4.4.5 Pengaruh Ion Logam

Pengaruh ion logam terhadap enzim yang diperoleh dilakukan menggunakan ion logam  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  dan  $Na^+$ , juga menggunakan EDTA sebagai inhibitor enzim. Kontrol yang digunakan adalah enzim dengan substrat tanpa adanya penambahan ion logam maupun EDTA. Enzim dan penambahan ion diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}C$  pada pH 7 selama 30 menit. Kemudian aktivitas spesifik diukur dan dibandingkan dengan kontrol.



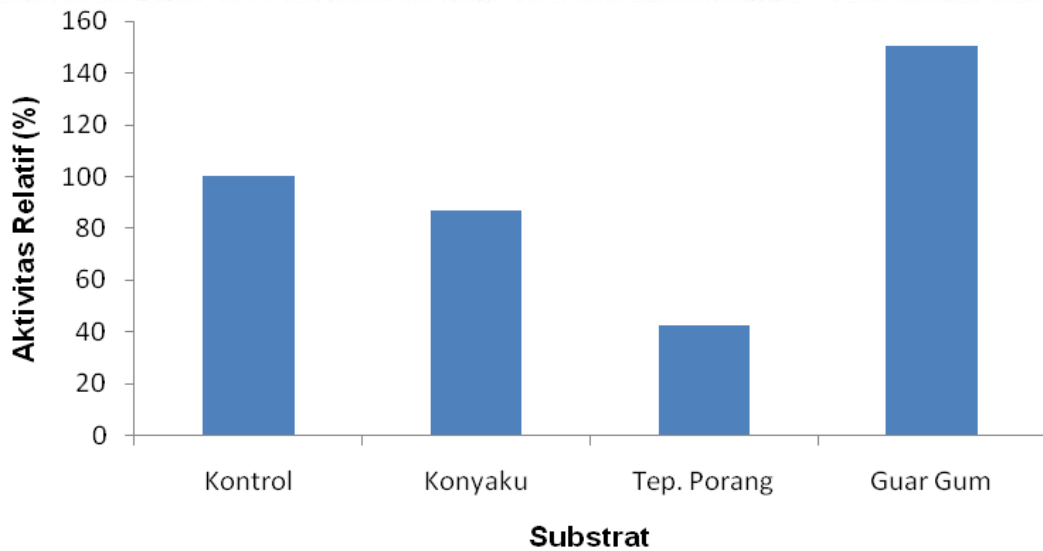
**Gambar 4.12** Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Mananase

Hasil dari percobaan yang dilakukan adalah diketahui bahwa ion  $Mn^{2+}$  dalam  $MnCl_2$  meningkatkan aktivitas spesifik dari enzim yang diuji. Sedangkan ion  $K^+$  dan  $Ca^{2+}$  mengurangi aktivitas relatif dari enzim yang diuji. Enzim mananase dari *B. subtilis* juga diinduksi secara signifikan oleh  $Mn^{2+}$  dan  $K^+$  tidak memberikan efek terhadap aktivitas enzim (Cheng *et al.*, 2016). EDTA mengurangi aktivitas relatif enzim namun tidak signifikan. EDTA (*Ethylene diamine tetra acetic acid*) merupakan senyawa pengkelat yang mampu mengikat ion logam. Penambahan EDTA bertujuan memberikan kondisi perlakuan di mana lingkungan enzim tidak ada ion logam yang bisa digunakan oleh enzim dalam aktivitasnya. Senyawa pengkelat seperti EDTA dapat meningkatkan aktivitas beberapa jenis enzim karena dapat mengikat ion logam yang bersifat *inhibitor* sehingga sisi aktif enzim tersedia untuk berikatan dengan substrat. Namun EDTA dapat mengurangi aktivitas enzim terhadap enzim yang membutuhkan ion logam dalam menjalankan mekanismenya (apoenzim) (Pereira *et al.*, 2017). Perubahan tidak signifikan terhadap aktivitas enzim dengan adanya penambahan EDTA menyimpulkan bahwa aktivitas enzim mananase tersebut tidak membutuhkan ion logam namun ion logam seperti  $Mn^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas enzim mananase tersebut.

#### 4.4.6 Spesifitas Substrat

Spesifitas substrat terhadap enzim ditujukan untuk mengetahui pengaruh dari berbagai variasi jenis substrat terhadap aktivitas spesifik enzim yang diperoleh. Pengujian terhadap spesifitas substrat menggunakan variasi jenis substrat yaitu konyaku, tepung porang dan *guar gum* dengan glukomanan murni

sebagai kontrolnya. Hasil aktivitas dari masing-masing varian jenis substrat dibandingkan dengan kontrol.



**Gambar 4.13** Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Enzim Mananase

Hasil percobaan diperoleh bahwa substrat dengan aktivitas tertinggi bila dibandingkan dengan control adalah *guar gum*. Sedangkan baik konyaku dan tepung porang memberikan aktivitas relatif lebih rendah ketimbang kontrol.



## BAB V KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Skrining yang dilakukan terhadap sampel yang merupakan campuran umbi porang dan tanah diperoleh beberapa isolat mananolitik. Identifikasi terhadap salah satu isolat bakteri mananolitik dengan indeks mananolitik terbesar merupakan bakteri yang memiliki kekerabatan dengan *Streptococcus macedonicus*.

Purifikasi parsial yang dilakukan untuk mengisolasi enzim dari isolat tersebut adalah presipitasi amonium sulfat dengan konsentrasi optimal amonium sulfat sebanyak 80%. Aktivitas optimal enzim mananase pada suhu 45°C sebesar 3,2 U/mg dan pH 7 sebesar 9,4 U/mg. Kestabilan suhu enzim mananase tersebut berkisar pada suhu 35–55°C dan pH 5-7. Substrat yang meningkatkan aktivitas enzim mananase tersebut adalah *guar gum*. Ion logam yang meningkatkan aktivitas enzim mananase tersebut adalah  $Mn^{2+}$ .

### 5.2 Saran

1. Perlu adanya proses purifikasi lanjutan yang dilakukan dengan proses kromatografi *ion exchange* dan *filtration gel*.
2. Perlu diketahuinya massa molekuler enzim mananase yang diperoleh dengan analisa SDS – PAGE diikuti dengan *Zymogram*.
3. Untuk aplikasi di bidang industri pangan diperlukan adanya penelitian mengenai sifat patogenik dari *Streptococcus macedonicus* dikarenakan sifat patogeniknya masih belum diketahui secara jelas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amyes, S. G. B. 2013. *Bacteria A Very Short Introduction*. Oxford University Press, Oxford
- BacDive. 2019. Name and Taxonomic Classification *Streptococcus macedonicus*. [bacdive.dsmz.de/strain/14819](http://bacdive.dsmz.de/strain/14819). Tanggal akses 6 Januari 2020.
- Bayes, J. W., Dominiczak, M. H. 2014. *Medical Biochemistry* 4<sup>th</sup> Edition. Saunders Elsevier, Oxford
- Bettleheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., Farrell, S. O. 2010. *Introduction to Organic and Biochemistry* 7<sup>th</sup> Edition. Cengage Learning, Belmont, CA
- Buxbaum, E. 2015. *Fundamentals of Protein Structure and Function* 2<sup>nd</sup> Edition. Springer International, Kluwer, Dordrecht
- Chairiyah, N., Harijanti, R. Mastuti. 2014. Pengaruh Waktu Panen Terhadap Kandungan Glukomanan pada Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) Periode Tumbuh Ketiga. *Research Journal of Life Science*, 1 (1) : 37-42. <https://doi.org/10.21776/ub.rjls.2014.001.01.6>
- Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N. Mannanases: Microbial Sources, Production, Properties and Potential Biotechnological Applications. *Application Microbiol Biotechnol* (2012) 93:181-1830
- Cheng, L., Duan, S., Feng, X., Zheng, K., Yang, Q., Liu, Z. 2016. Purification and Characterization of a Thermostable B-Mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: Potential Application in Inflammatory Diseases. *BioMed Research International* Vol. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6380147>
- Dewanto, J., B. H. Purnomo. 2009. Pembuatan Konyaku dari Umbi Iles-Iles (*Amorphophallus oncophyllus*). Tugas Akhir D3. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Ezeji, T. 2017. *Biofuels and Biochemicals Production*. MDPI, Basel, Swiss
- Ganjari, L. E. 2014. Pembibitan Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) dengan Model Agroekosistem Botol Plastik. *Widya Warta* No. 01 Tahun 2014 : 43 – 58
- Hilge M., Gloor, S. M., Rypniewski, W. 1998. High Resolution Native and Complex Structures of Thermostable Mannanase from *Thermomonospora fusca* Substrat Specificity in Glycosyl Hydrolase Family 5. *Research Article*, Netherlands. DOI: 10.1016/s0969-2126(98)00142-7

- Janairo, G., Linley, M., Yap, L., Llanos-Lazaro, N., Robles, J. 2011. Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments. e-Journal of Science & Technology 2011 JoVE Education. 2020. 16rRNA Sequencing: A PCR-based Technique to Identify Bacterial Species. <https://www.jove.com/science-education/10510/16s-rna-sequencing-pcr-based-technique-to-identify-bacterial>. Tanggal akses 20 Mei 2020
- Katie, R. 2017. Salting Out and Salting In. <http://hchem2017.blogspot.com/2017/05/salting-out-and-salting-in.html>. Tanggal akses 29 Juni 2020
- Khampeng, P., Nitisinprasert, S., Keawsompong, S. 2006. Isolation, Screening and Identification of Mannanase Producing Microorganisms. Kasetsart Journal – Natural Science 40 (Suppl) pp. 26-38
- Koswara, S. 2013. Teknologi Pengolahan Umbi-umbian: Pengolahan Umbi Porang. Institut Pertanian Bogor
- Kusakabe, I., Takahasi, R. 1986. Beta-mannase of Streptomyces. Method in Enzymology 60, pp. 611-614. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60175-3](http://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60175-3)
- Malgas, S., Dyk, J. S., Pletschke, B. I. 2015. A Review of the Enzymatic Hydrolysis of Mannans and Synergistic Interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2015. DOI 10.1007/s11274-015-1878-2
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinintrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nagodawitahan, T., Reed, G. 1993. Enzymes in Food Processing 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press, New York, New York State
- Olaniyi, O. O., Arotupin, D. J. 2013. Isolation and Screening of Mannanase Producing Bacteria from Agricultural Wastes. British Microbiology Research Journal 3(4): 654-663. DOI: 10.9734/BMRJ/2013/4221
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Mavrogonatou, E., Blom, J., Papandreou, N. C., Hamodrakas, S. J., Ferreira, S., Renault, P., Supply, P., Pot, B., Tsakalidou, E. 2014. Comparative Genomic of the Dairy Isolate *Streptococcus macedonius* ACA-DC 198 Against Related Members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. BMC Genomics Vol. 14 pp 15:272. DOI: 10.5061/dryad.7d039

Patil, U. K., Muskan, K. 2009. Essentials of Biotechnology. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi

Pereira, J. C., Giese, E. C., Moretti, M. M. S., Gomes, A. C. S., Perrone, O. M., Boscolo, M., Silva, R., Gomes, E., Marins, D. A. B. 2017. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. INTECH. DOI: 10.5772/65934

Pommerville, J. C. 2011. Alcamo's Laboratory Fundamental of Microbiology. Jones & Bartlett Learning, Burlington, Massachusetts

Purwanto, A. 2014. Pembuatan Brem padat dari Umbi Porang (*Amorphophallus Omcophyllus* Prain). Widya Warta, No. 01 Tahun 2014 : 16-28

Pusat Penelitian dan Pengembangan Porang Indonesia. 2013. Budidaya dan Pengembangan Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) Sebagai Salah Satu Potensi Bahan Baku Lokal. Universitas Brawijaya Malang

Rahmani, N., Kashiwagi, N., Lee, J., Nakamura, S. N., Matsumoto, H., Kahar, P., Lisdiyanti, P., Prasetya, B., Ogino, C., Kondo, A.. 2017. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of mannoooligosaccharides from mannan polymers. AMB Express (2017) 7:100. DOI:10.1186/s13568-017-0401-6

Ratnakomala, S., Yopi, Prasetya, B., Suhartono, M. T., Maryandini, A. 2015. Characterization and identification of mannanolytic actinomycete *Nonomuraea* sp. ID06-379. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 11(3) 2015, pp. 284-293. DOI: 10.21161/mjm.66514

Rijal, N. 2017. Spread Plate Technique: Principle, Procedure and Results. <https://microbeonline.com>. Tanggal akses 20 Mei 2020

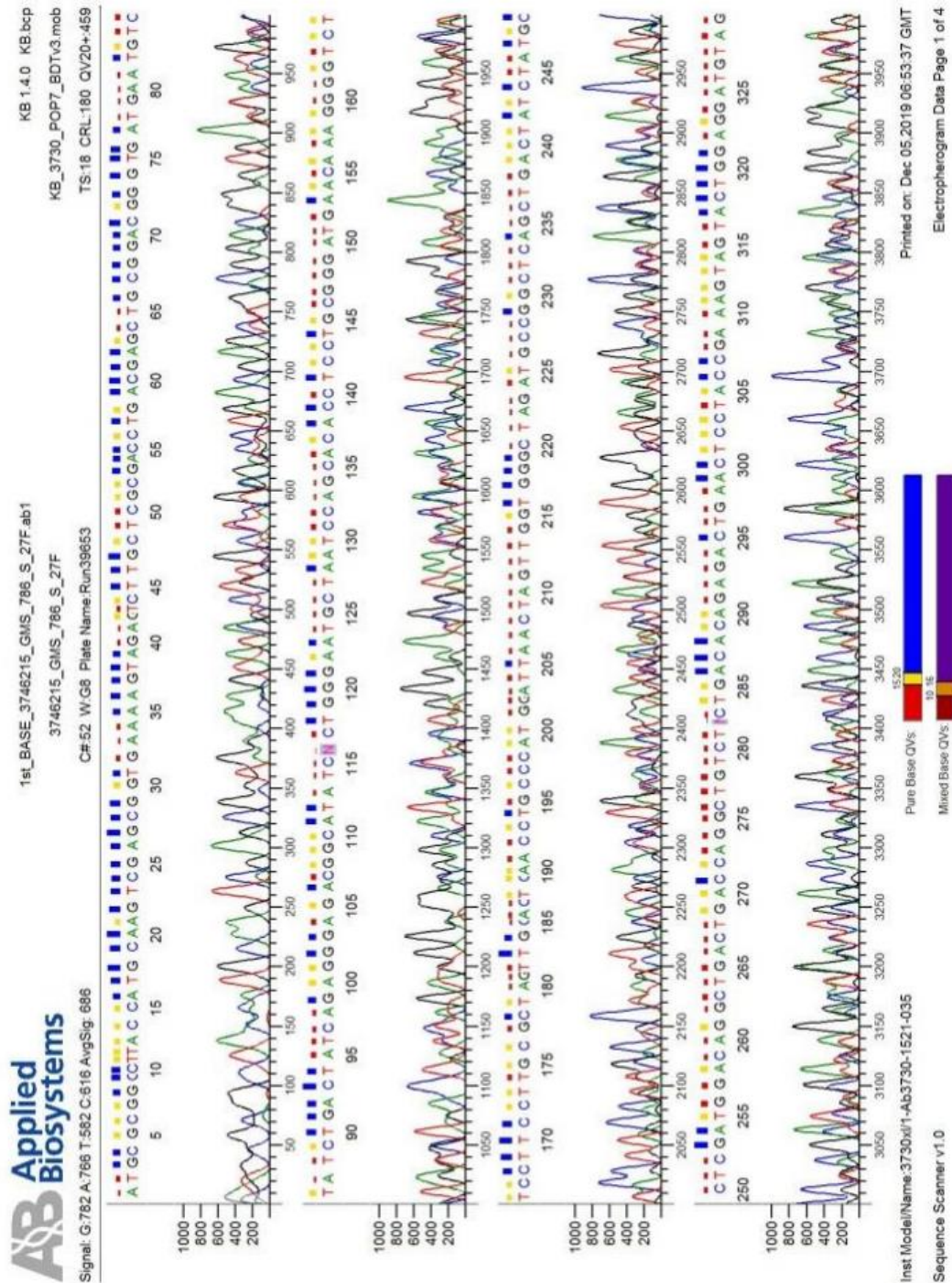
Sari, R., Suhartati. 2015. Tumbuhan Porang: Prospek Budidaya sebagai Salah Satu Sistem Agroforestry. Info Teknis EBONI Vol. 12 No. 2, 97 – 110. <https://doi.org/10.20886/buleboni.5061>

Seftiono, H. 2017. Penentuan Aktivitas Enzim Mananase dari Berbagai Mikroorganisme di Indonesia dan Peranannya dalam Bidang Pangan: Kajian Pustaka. AGROINTEK Vol. 11, No. 1 pp. 14-20. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v11i1.2939>

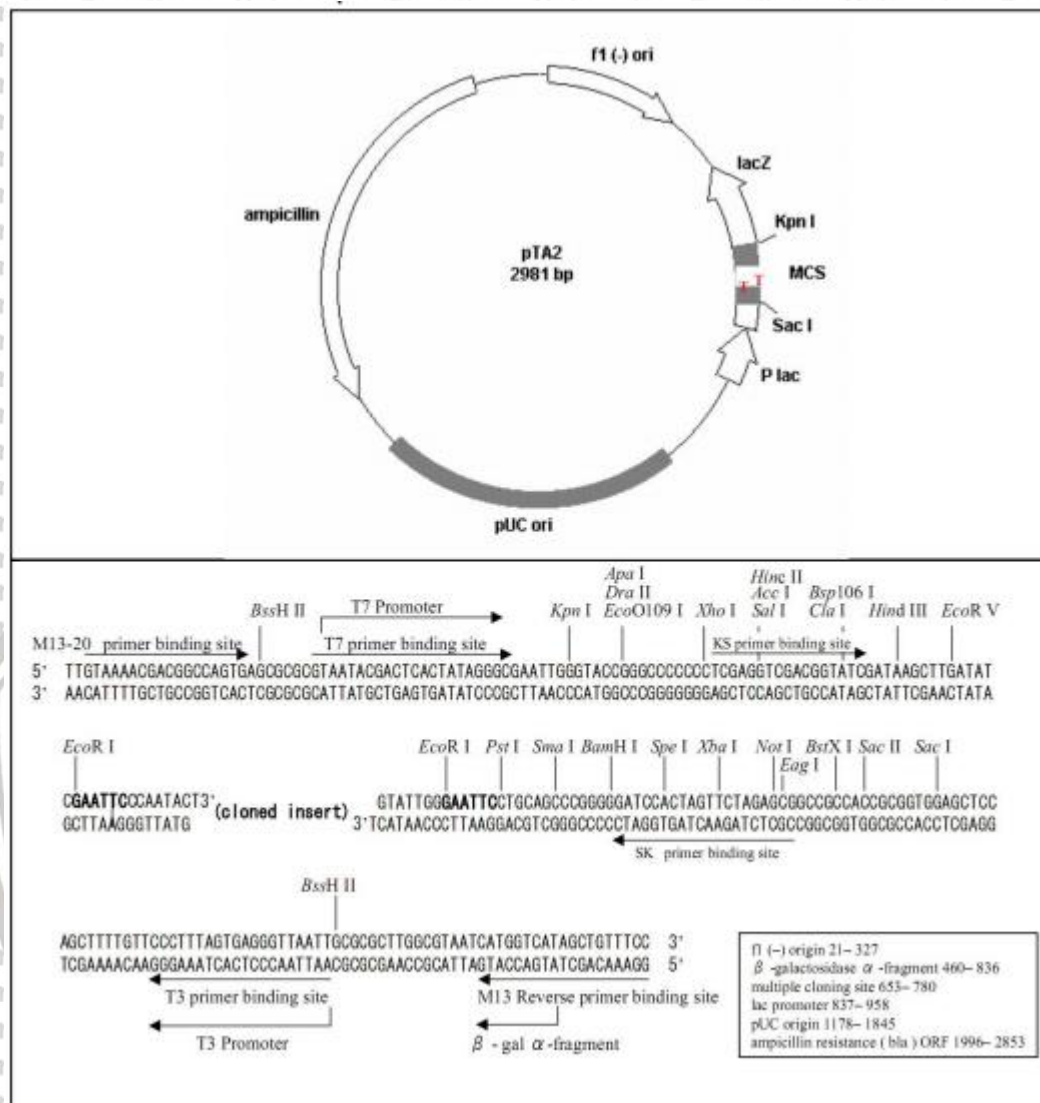
Shukla, P., Pletschke, B. I. 2013. Advances in Enzyme Biotechnology. : Springer India, New Delhi

- Sigres, D. P., Sutrisno, A. 2015. Enzim Mananase dan Aplikasi di Bidang Industri: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No.3 p.899-908
- Soni, H., Rawat, H. K., Pletschke, B. I., Kango, N. 2016. Purification and Characterization of  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus terreus* and its Applicability in Depolymerization of Mannans and Saccharification of Lignocellulosic Biomass. *Springer Biotech* (2016) 6:136. DOI 10.1007/s13205-016-0454-2
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi Enzim*. UB Press, Malang, Jawa Timur
- Syauqi, A. 2017. *Peranan Mikroorganisme dalam Kehidupan*. ANDI, Yogyakarta, Yogyakarta
- Wahyuni, S., Lianto, Khaeruni, A. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Mananolitik asal Bonggol Pohon Sagu. *Jurnal Agrotekno* Vol. 4 No. 3 Hal 174-179
- Yin, L. J., Tai, H. M., Jiang, S. T. 2012. Characterization of Mannanase from a Novel Mannanase Producing Bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60 pp. 6425-6431. <https://doi.org/10.1021/jf301944e>
- Zurmiati, Wizna, Abbas, Mahata. 2017. Production of Extracellular  $\beta$ -mannanase by *Bacillus amyloliquefaciens* on a Coconut Waste Substrate. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16: 700-707. DOI: 10.3923/pjn.2017.700.707

Lampiran 1. Hasil Sequencing dari Sampel



Lampiran 2. Vector pTA2

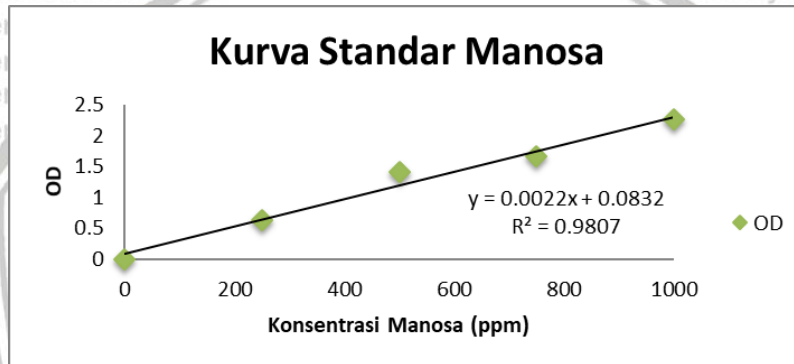


Lampiran 3. Kurva Standar Manosa

Kurva Standar Manosa

Panjang Gelombang 540nm

Konsentrasi µg/mL	OD
0	0
250	0,638
500	1,404
750	1,66
1000	2,264



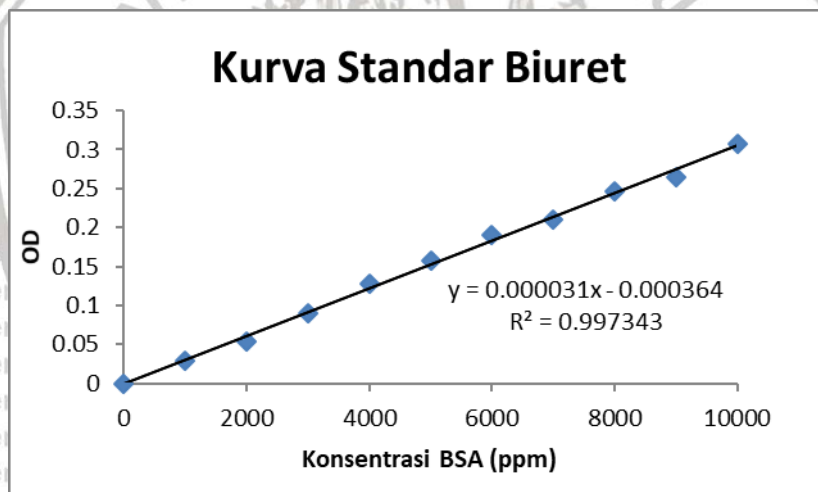


Lampiran 4. Kurva Standar Biuret

Kurva Standar Biuret

Panjang Gelombang 545 nm

Konsentrasi µg/mL	Kontrol	OD Sampel	OD
0	0	0	0
1000	0,06	0,089	0,029
2000	0,06	0,114	0,054
3000	0,06	0,15	0,09
4000	0,06	0,188	0,128
5000	0,06	0,217	0,157
6000	0,06	0,25	0,19
7000	0,06	0,27	0,21
8000	0,06	0,306	0,246
9000	0,06	0,325	0,265
10000	0,06	0,368	0,308



### Lampiran 5. Suhu Optimum

Suhu (°C)	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Konsentrasi Kontrol (µg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Total Enzim (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik Enzim U/mg
			1	2							
30	0,191	0,621	0,634	0,644	0,639	278,000	269,000	3,333	1,667	8,603	0,194
35	0,148	0,524	0,755	0,765	0,760	338,500	220,500	43,704	21,852	8,603	2,540
40		0,551	0,803	0,819	0,811	364,000	234,000	48,148	24,074	8,603	2,798
45		0,507	0,791	0,822	0,807	361,750	212,000	55,463	27,731	8,603	3,224
50		0,574	0,830	0,861	0,846	381,250	245,500	50,278	25,139	8,603	2,922
55		0,555	0,734	0,699	0,717	316,750	236,000	29,907	14,954	8,603	1,738
60		0,508	0,731	0,754	0,743	329,750	212,500	43,426	21,713	8,603	2,524

### Lampiran 6. Kestabilan Suhu

Suhu (°C)	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Konsentrasi Kontrol (µg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Residual
			1	2					
35	0,142	0,399	0,632	0,656	0,644	280,500	158,000	45,370	81,803
40	0,153	0,483	0,749	0,770	0,760	338,250	200,000	51,204	92,320
45	0,154	0,575	0,864	0,871	0,868	392,250	246,000	54,167	97,663
50		0,478	0,734	0,736	0,735	326,000	197,500	47,593	85,810
55	0,194	0,563	0,744	0,726	0,735	326,000	240,000	31,852	57,429
60	0,163	0,687	0,758	0,758	0,758	337,500	302,000	13,148	23,706
70	0,162	0,751	0,472	0,513	0,493	204,750	334,000	13,981	25,209



### Lampiran 7. pH Optimal

pH	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Konsentrasi Kontrol (µg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Total Enzim (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik Enzim (U/mg)
			1	2							
4		0,220	0,591	0,627	0,609	263,000	68,500	36,019	18,009	8,603	2,093
5		0,501	0,750	0,740	0,745	331,000	209,000	45,185	22,593	8,603	2,626
6		0,535	0,751	0,752	0,752	334,250	226,000	101,991	50,995	8,603	5,928
7		0,242	0,837	0,706	0,772	344,250	79,500	161,806	80,903	8,603	9,404
8		0,271	0,935	0,904	0,920	418,250	94,000	120,093	60,046	8,603	6,980
9		0,269	0,593	0,503	0,548	232,500	93,000	51,667	25,833	8,603	3,003
10		0,455	0,550	0,584	0,567	242,000	186,000	20,741	10,370	8,603	1,205

### Lampiran 8. Kestabilan pH

pH	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Konsentrasi Kontrol (µg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Residual (%)
			1	2					
3	0,156	0,820	0,440	0,466	0,453	185,000	368,500	0,278	0,172
4		0,680	0,771	0,778	0,775	345,750	298,500	72,778	44,978
5		0,770	0,652	0,639	0,646	281,250	343,500	92,639	57,253
6		0,323	0,609	0,688	0,649	282,750	120,000	112,639	69,614
7		0,362	0,547	0,474	0,511	213,750	139,500	92,917	57,425
8		0,289	0,577	0,520	0,549	232,750	103,000	91,157	56,337
9		0,690	0,817	0,738	0,778	347,250	303,500	72,407	44,750
10		0,827	0,431	0,512	0,472	194,250	372,000	3,056	1,888



### Lampiran 9. Ion Logam

Ion logam	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	Konsentrasi Kontrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Relatif (%)
			1	2					
Kontrol	0,170	0,389	0,364	0,468	0,416	166,500	153,000	64,167	100,000
KCl		0,476	0,402	0,402	0,402	159,500	196,500	52,222	81,385
CaCl <sub>2</sub>		0,457	0,346	0,372	0,359	138,000	187,000	42,037	65,512
MnCl <sub>2</sub>		0,446	0,488	0,440	0,464	190,500	181,500	72,222	112,554
EDTA		0,346	0,391	0,403	0,397	157,000	131,500	62,870	97,980

### Lampiran 10. Spesifitas Substrat

Substrat	Blanko	Kontrol	Sampel		Rerata Sampel	Konsentrasi Sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	Konsentrasi Kontrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Relatif (%)
			1	2					
Kontrol	0,170	0,961	0,695	0,900	0,798	357,250	439,000	51,019	99,999
Konyaku		0,684	0,765	0,962	0,864	390,250	300,500	44,322	86,873
Tep. Porang		0,550	0,508	0,436	0,472	194,500	233,500	21,574	42,286
Guar Gum		0,387	0,857	0,747	0,802	359,500	152,000	76,852	150,634