

**PENAPISAN DAN UJI AKTIVITAS BAKTERI ALKALO  
TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE**



**EVA OKTARINA**

**030304018Y**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**DEPOK**

**2008**

**PENAPISAN DAN UJI AKTIVITAS BAKTERI ALKALO  
TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**Oleh:**

**EVA OKTARINA**

**030304018Y**



**DEPOK**

**2008**

SKRIPSI : PENAPISAN DAN UJI AKTIVITAS BAKTERI ALKALO  
TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE

NAMA : EVA OKTARINA

NPM : 030304018Y

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 30 JUNI 2008



DJAMIL, M.Si.

Dra. SITARESMI, M.Sc.

---

PEMBIMBING I

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana: 9 JULI 2008

Penguji I : Dra. Setiorini, M.Kes. (.....)

Penguji II : Drs. Iman Santoso, M.Phil. (.....)

Penguji III : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)



Untuk Sang Pencipta, yang menciptakan semua kehidupan

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas karunia serta rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir.

Penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada Djamil, M.Si. selaku pembimbing I dan Dra. Sitaresmi, M.Sc. selaku pembimbing II serta selaku pembimbing akademik untuk sumbangan pikiran, nasehat, perhatian, serta motivasi yang telah diberikan selama penelitian berlangsung hingga penyusunan skripsi. Penulis juga berterima kasih kepada Dra. Setiorini, M.Kes., Drs. Iman Santoso, M.Phil., dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. yang telah memberikan saran serta kritik yang membangun dan bermanfaat. Terima kasih kepada Dr. Abinawanto sebagai Ketua Departemen. Terima kasih pula kepada seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI untuk bekal ilmu pengetahuan dan rasa kekeluargaan yang erat.

Ucapan terima kasih penulis juga sampaikan kepada seluruh staf Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB)-BPPT Serpong yang telah memberikan saran-saran selama penulis melakukan penelitian. Terima kasih pula untuk mbak Rita, mbak Sari, mbak Widy, mbak Virly, mbak Mumu, mbak Titin, mas Mukti, mas Ucup, mas Oji, Pak Jun, Viola dan Ayuna yang telah memberikan bantuan selama penelitian berlangsung.

Penulis mengucapkan terima kasih yang mendalam untuk seluruh rekan-rekan Biologi khususnya angkatan '03 atas semua persahabatan serta

persaudaraan yang tetap terjalin sepanjang waktu. Terima kasih untuk Lisda dan Agnes untuk semua bantuan yang diberikan selama masa penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih kepada Ipul yang menemani penulis dalam suka dan duka. Terima kasih juga untuk Putri, Anisa Emonita, Susan, Nane, Toni, Tisha, Nanda, Tini, Pipit, Erni, Ipeh, Mala, Lana, Dhiza, Seto, Andreas, Agung, Vina, Nugri, Mona, Vinta, Franz, Mau2, Icha, Echa, Irene, dan Poppy atas semua kebahagiaan dan kenangan baik suka dan duka. Penulis berterima kasih kepada Nagao Environmental Education (NEF) atas beasiswa yang diberikan.

Terima kasih yang mendalam teruntuk keluargaku Bapak, Mama, kakakku Lina, dan adikku Erwin yang memberikan dukungan, kasih sayang dan doa di setiap langkah kehidupanku. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Pakde Margiyan, Keluarga Mudjiono, dan Keluarga Djito yang membantu penulis dan keluarga. Terima kasih pula pada Ingrat, Arsy beserta keluarga, Alfi, dan Widya yang membantu penulis. Terima kasih pada Ta yang memberikan penulis keberanian untuk menjadi diri penulis yang sekarang, terima kasih untuk perhatian dan kenangan yang indah.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis mengharapkan saran-saran yang berguna dan membangun. Semoga karya sederhana ini dapat memberikan manfaat untuk kita semua. Amin.

Penulis

2008

## ABSTRAK

Penelitian penapisan dan uji aktivitas xilanase isolat bakteri alkalo termofilik dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), BPPT, Serpong. Penapisan dilakukan menggunakan medium Nakamura yang dimodifikasi. Produksi enzim dilakukan dengan fermentasi substrat cair pada pH 9, suhu 55° C dan 150 rpm. Uji aktivitas dilakukan dengan metode Bailey yang dimodifikasi. Hasil penapisan xilanase terhadap 136 isolat bakteri menunjukkan bahwa 18 isolat menghasilkan xilanase. Tiga isolat yang memiliki indeks xilanolitik yang tinggi adalah isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM sebesar 3,095, Riau/Kayu/9/2/NM sebesar 0,955, dan Riau/Sludge/9/1/LB sebesar 0,91. Hasil uji aktivitas xilanase dari masing-masing isolat adalah Pawan/Tanah(2)/9/3/NM sebesar  $0,917 \pm 0,093$  U/ml, Riau/Kayu/9/2/NM sebesar  $8,529 \pm 0,093$  U/ml, dan Riau/Sludge/9/1/LB sebesar  $1,283 \pm 0,060$  U/ml. Isolat yang memiliki aktivitas xilanase tertinggi ialah Riau/Kayu/9/2/NM.

Kata kunci: aktivitas xilanase; bakteri alkalo termofilik; penapisan; xilanase.

ix + 72 hlm.; gbr.; lamp.; tab.

Bibliografi: 56 (1959--2006)

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
A. Xilanase.....	3
B. Xilan.....	5
C. Bakteri alkalo termofilik penghasil xilanase .....	6
D. Penapisan xilanase.....	8
E. Fermentasi.....	9
1. Substrat.....	9
2. Medium fermentasi.....	10
3. Suhu.....	11
4. pH.....	11
5. Agitasi.....	11
6. Waktu inkubasi.....	12



7. Zat tambahan sebagai sumber karbon.....	12
F. Regulasi biosintesis enzim.....	12
1. Inhibisi umpan balik.....	13
2. Induksi enzim.....	13
3. Represi enzim.....	13
G. Pengukuran aktivitas enzim.....	14
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA.....	17
A. Lokasi penelitian.....	17
B. Bahan.....	17
1. Mikroorganisme.....	17
2. Medium.....	17
3. Bahan.....	18
C. Peralatan.....	18
D. Cara kerja.....	18
1. Pembuatan medium modifikasi Nakamura (1993: 2311)..	18
2. Pembuatan medium Nutrient Agar (NA).....	19
3. Penapisan dan pengukuran indeks xilanolitik .....	19
4. Pembuatan <i>working culture</i> .....	20
5. Pembuatan <i>stock culture</i> dalam medium gliserol.....	20
6. Pembuatan <i>starter</i> .....	21
7. Kurva pertumbuhan dan kurva produksi.....	21
8. Penghitungan jumlah sel.....	21

9. Pengukuran aktivitas xilanase.....	22
10. Pembuatan kurva standar xilosa.....	23
11. Penentuan kadar protein xilanase.....	24
12. Pembuatan kurva standar BSA.....	24
13. Penyusunan, pengolahan dan analisis data.....	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
A. Hasil.....	26
1. Penapisan dan indeks xilanolitik.....	26
2. Kurva pertumbuhan.....	26
3. Aktivitas xilanase.....	28
4. Kadar protein.....	29
5. Aktivitas spesifik.....	30
B. Pembahasan.....	30
1. Penapisan dan pengukuran indeks xilanolitik.....	30
2. Hasil pengamatan mikroskopik.....	31
3. Pengukuran kurva pertumbuhan dan aktivitas xilanase....	32
4. Kadar protein.....	37
5. Aktivitas spesifik.....	38
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
A. Kesimpulan.....	39
B. Saran.....	39
DAFTAR ACUAN.....	40

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur xilan dan enzim penghidrolisis xilan.....	48
2. Pegukuran indeks xilanolitik.....	49
3. Skema pembuatan <i>stock culture</i> dalam medium gliserol.....	50
4. Skema penelitian.....	51
5. Skema pengujian aktivitas xilanase dengan metode modifikasi Bailey <i>dkk.</i> (1992: 261).....	52
6. Skema pengukuran konsentrasi protein dengan metode modifikasi Bradford <i>dkk.</i> (1992: 261).....	53
7. Diagram batang indeks xilanolitik isolat bakteri dengan metode modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211).....	54
8. Kurva standar xilosa.....	55
9. Kurva standar BSA.....	55
10. Kurva pertumbuhan Pawan/Tanah(2)/9/3/NM.....	56
11. Kurva pertumbuhan Riau/Kayu/9/2/NM.....	56
12. Kurva pertumbuhan Riau/ <i>Sludge</i> /9/1/LB.....	57
13. Kurva produksi Pawan/Tanah(2)/9/3/NM.....	57
14. Kurva produksi Riau/Kayu/9/2/NM.....	58
15. Kurva produksi Riau/ <i>Sludge</i> /9/1/LB .....	58

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengukuran indeks xilanolitik menggunakan metode modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211).....	60
2. Variasi konsentrasi kurva standar xilosa .....	62
3. Absorbansi xilosa dalam berbagai konsentrasi (kurva standar xilosa) pada $\lambda$ 540 nm.....	63
4. Variasi konsentrasi kurva standar BSA .....	64
5. Absorbansi BSA dalam berbagai konsentrasi (kurva standar BSA) pada $\lambda$ 595 nm .....	65
6. Data jumlah sel dari isolat Riau/Kayu/9/2/NM, Pawan/Tanah(2)/9/3/NM, dan Riau/Sludge/9/1/LB dengan metode TPC .....	65
7. Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM.....	66
8. Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Riau/Kayu/9/2/NM .....	67
9. Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Riau/Sludge/9/1/LB.....	68

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan larutan dan bahan untuk pengukuran aktivitas dan kadar protein xilanase.....	70
2. Pengukuran aktivitas xilanase dengan metode Bailey <i>dkk.</i> (1992: 261) yang dimodifikasi.....	71
3. Penghitungan <i>generation time</i> .....	72



# BAB I

## PENDAHULUAN

Produksi kertas di Indonesia pada tahun 2006 mencapai 10,30 juta ton per tahun (Dinas Perindustrian dan Perdagangan 2006: 1). Menurut data WALHI, 95% pabrik kertas di Indonesia masih menggunakan klorin sebagai pemutih (WALHI 1994: 1). Klorin menghasilkan limbah yang dapat merusak lingkungan. Di alam, klorin mudah bersenyawa dengan bahan organik menjadi organoklorin yang sangat beracun. Apabila organoklorin tersebut masuk ke dalam rantai makanan maka dapat membahayakan manusia dan hewan (Sardjoko 1991: 286; Khasin *dkk.* 1993: 1726). Menurut Garg *dkk.* (1996: 261) pabrik kertas menghasilkan organoklorin sebesar 5 kg per ton dari kertas yang diproduksi. Oleh karena itu, alternatif pemutih kertas yang ramah lingkungan diperlukan. Menurut Vikari *dkk.* (1994: 335) xilanase dapat menggantikan klorin pada proses *bleaching* di industri kertas.

Xilanase adalah enzim ekstraselular yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Xilan merupakan penyusun utama hemisellulosa, polisakarida kedua terbanyak yang terdapat pada dinding sel tumbuhan (Khasin *dkk.* 1993: 1725; Polizeli *dkk.* 2005: 577). Proses hidrolisis xilan berperan dalam delignifikasi pada proses *bleaching pulp* kertas di industri kertas. Proses *bleaching pulp* kertas dilakukan pada pH dan suhu yang tinggi (Khasin *dkk.* 1993: 1725; Srinivasan & Rele 1995: 93). Oleh karena itu, xilanase yang bersifat alkalo termofilik diperlukan.

Xilanase termofilik dapat diisolasi dari mikroorganisme termofilik (Haki & Rakshit 2003: 17). Mikroorganisme termofilik adalah mikroorganisme yang tumbuh dengan baik pada suhu di atas 45° C (Bauman 2004: 174).

Mikroorganisme alkalofil adalah mikroorganisme yang tumbuh dengan baik pada lingkungan basa dengan kisaran pH antara 7--11,5 (Black 1999: 146).

Mikroorganisme yang dapat menghasilkan xilanase adalah fungi, bakteri dan khamir (Polizeli *dkk.* 2005: 582). Pada umumnya fungi menghasilkan xilanase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri, namun fungi memiliki waktu tumbuh yang lebih lama dibandingkan bakteri (Ray 2004: 63). Menurut Hölker *dkk.* (2004: 181) xilanase dapat dihasilkan oleh bakteri melalui fermentasi padat dan cair.

Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB) BPPT memiliki 136 isolat bakteri yang belum diketahui aktivitas xilanasenya. Bakteri tersebut diisolasi dari sumber air panas di Desa Rambah Tengah Hulu, kecamatan Rambah, kabupaten Rokan Hulu, Provinsi Riau Darat. Sumber air panas tersebut memiliki suhu sekitar 57° C dan pH sekitar 7. Untuk mengetahui aktivitas xilanasenya, penapisan dilakukan terhadap 136 isolat bakteri tersebut pada suhu 55° C menggunakan medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311) pH 9. Aktivitas xilanase dilihat dari zona bening yang terbentuk dan dilakukan pengukuran indeks xilanolitik. Tiga isolat bakteri yang menghasilkan indeks xilanolitik tertinggi diteliti lebih lanjut untuk mengetahui nilai aktivitas xilanasenya. Penelitian bertujuan untuk melakukan penapisan dan pengujian aktivitas xilanase dari bakteri alkalo termofilik yang terseleksi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. XILANASE

Enzim merupakan biokatalis berupa protein yang berperan dalam metabolisme makhluk hidup. Enzim menurunkan energi aktivasi sehingga mempercepat laju reaksi, tanpa perubahan pada enzim tersebut (Brock *dkk.* 1994: 93).

Xilanase (1,4- $\beta$ -D-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) adalah enzim ekstraselular yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa (Polizeli *dkk.* 2005: 577; Khasin *dkk.* 1993: 1725). Xilan merupakan penyusun utama hemiselulosa, polisakarida kedua terbanyak yang terdapat pada dinding sel tumbuhan (Polizeli *dkk.* 2005: 577). Enzim pendegradasi xilan meliputi endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -D-xilosidase, asetilxilan esterase, arabinase, dan  $\alpha$ -glukoronidase. Endo-1,4- $\beta$ -xilanase yang menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa.  $\beta$ -D-xilosidase menghidrolisis xilooligosakarida menjadi xilosa. Asetilxilan esterase memisahkan O-asetil dari posisi 2 atau 3 pada  $\beta$ -D-xilopiranosil. Arabinase memisahkan L-arabinosa yang tersubstitusi pada posisi 2 atau 3 dari  $\beta$ -D-xilopiranosil.  $\alpha$ -Glukoronidase menghidrolisis asam glukoronik dengan  $\beta$ -D-xilopiranosil (Gambar 1) (Polizeli *dkk.* 2005: 579--582).



Xilanase digunakan pada industri makanan ternak (Khasin *dkk.* 1993: 1725; Touzel *dkk.* 2000: 315; Velázquez *dkk.* 2004: 59), pembuatan roti (Jiang *dkk.* 2005: 69), produksi bir (Khasin *dkk.* 1993: 1725), produksi etanol, produksi laktat (Touzel *dkk.* 2000: 315; Velázquez *dkk.* 2004: 59), produksi xilitol, pembuatan linen dan *hessian* pada industri tekstil (Polizeli *dkk.* 2005: 577), dan industri kertas (Khasin *dkk.* 1993: 1725; Nakamura *dkk.* 1993: 2311; Viikari *dkk.* 1994: 335; Gessesse & Gashe 1997: 402).

Xilanase banyak dikembangkan untuk industri kertas karena nilai ekonominya yang tinggi dan ramah lingkungan. Kertas dihasilkan dari tumbuhan berkayu dengan cara melarutkan lignin menggunakan klorin, agar diperoleh kertas dengan kualitas kecerahan yang tinggi (lebih putih). Akan tetapi, penggunaan klorin menghasilkan limbah organoklorin (klorin organik) yang toksik dan berbahaya bagi lingkungan karena sulit terdegradasi. Xilanase dapat menggantikan penggunaan klorin sebagai bahan pemutih kertas. Xilanase dapat melarutkan lignin dengan lebih baik (Sardjoko 1991: 286; Khasin *dkk.* 1993: 1726; Srinivasan & Rele 1995: 93). Xilanase melarutkan lignin dengan cara menghidrolisis xilan yang merupakan penyusun utama hemiselulosa serta membuka struktur *pulp* selulosa sehingga struktur lignin tersebut terbuka dan lebih mudah larut (Polizeli *dkk.* 2005: 587). Kertas yang dihasilkan menggunakan xilanase memiliki kualitas kecerahan yang lebih tinggi, lebih lentur, dan permukaannya lebih halus (Rifaat *dkk.* 2005:157--158).

Xilanase dihasilkan oleh fungi, bakteri, khamir, alga laut, protozoa, siput, crustaceae, insekta, dan biji-bijian. Fungi penghasil xilanase diantaranya *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, dan *Penicillium*. Bakteri penghasil xilanase antara lain *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Eschericia coli*, dan *Aeromonas* sp.. Beberapa Actinomycetes penghasil xilanase adalah *Streptomyces* dan *Nocardiosis dassonvillei* (Srinivasan & Rele 1995: 94). Fungi termofilik seperti *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Paecylomyces veriotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus*, dan *Thermoascus aranticus* dapat menghasilkan xilanase pada suhu (60--80)<sup>o</sup> C namun pada pH asam (4,5--6,5) (Polizeli *dkk.* 2005: 582).

## **B. XILAN**

Xilan merupakan penyusun utama hemiselulosa, polisakarida kedua terbanyak yang terdapat pada dinding sel tumbuhan (Polizeli *dkk.* 2005: 577). Xilan memiliki kandungan 20--35% dari total berat kering pada tumbuhan *hardwood* dan 8% pada tumbuhan *softwood* (Srinivasan & Rele 1995: 94).

Xilan merupakan heteropolisakarida, terdiri dari D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glukosa, D-galaktosa, D-asam glukoronik, dan D-asam galakturonik. Xilan tersusun dari polimer linear  $\beta$ -D-xilopiranosil yang terhubung dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikolisil, gugus utama tersebut mempunyai unit 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronopiranosil, unit D-glukuronosil yang mempunyai gugus metil pada posisi 4 dan berhubungan dengan  $\beta$ -D-xilopiranosil pada

posisi 2 atau 3 (Polizeli *dkk.* 2005: 577--578). Struktur pasti dari xilan sulit ditentukan karena sulit mengisolasi xilan dari alam tanpa adanya perubahan atau hilangnya struktur asli xilan (Srinivasan & Rele 1995: 93).

### C. BAKTERI ALKALO TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE

Bakteri alkalofil adalah bakteri yang tumbuh dengan baik pada lingkungan basa dengan pH 7--11,5 (Black 1999: 146). Bakteri termofilik adalah bakteri yang tumbuh dengan baik pada suhu di atas 45° C (Bauman 2004: 335). Bakteri termofilik dapat diisolasi dari lingkungan industri yang panas dan daerah pembangkit listrik (Brock *dkk.* 1994: 153), sumber air panas, tumbuhan yang membusuk, tanah dan laut yang terpapar matahari (Collins *dkk.* 2005: 12). Ketahanan bakteri terhadap suhu tinggi disebabkan oleh adanya enzim-enzim dan protein yang tahan terhadap panas. Selain itu, pada bagian membran sel bakteri tersebut terdapat asam-asam lemak jenuh yang memungkinkan membran sel berfungsi dengan baik dan stabil pada suhu tinggi (Brock *dkk.* 1994: 321; Cappuccino & Sherman 2002: 95).

Penelitian mengenai bakteri alkalo termofilik yang diketahui menghasilkan xilanase antara lain penelitian Sunna *dkk.* (1997: 209) menggunakan *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d dan *Bacillus flavothermus* strain LB3A. Kedua isolat tersebut masing-masing diisolasi dari sumber air panas di Jepang dan sedimen tanah basa di Kenya, keduanya menghasilkan xilanase pada pH 5,0--9,0 dan suhu (40--90)° C. Selain itu, penelitian mengenai bakteri alkalo termofilik penghasil xilanase adalah

penelitian Khasin *dkk.* (1993: 1725) menggunakan *Bacillus stearothermophilus* T-6 yang menghasilkan xilanase pada pH 9 dan suhu 65° C, penelitian Gessesse dan Gashe (1997: 402) menggunakan *Bacillus* sp. AR-009 yang menghasilkan xilanase pada pH 9 dan suhu (60--65)° C, penelitian Dhillon *dkk.* (2000: 273) menggunakan *Bacillus circulans* AB 16 yang menghasilkan xilanase pada pH 5,0--9,0 dan suhu 80° C, penelitian Touzel *dkk.* (2000: 315) menggunakan *Thermobacillus xylanilyticus* yang menghasilkan xilanase pada pH 6,5--8,5 dan suhu 63° C, serta penelitian Khandeparkar dan Bhosle (2004: 1) menggunakan *Enterobacter* sp. MTCC 5112 yang menghasilkan xilanase pada pH 9,0 dan suhu 100° C.

Pertumbuhan bakteri dapat diamati dari kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan terdiri dari empat fase utama yaitu fase lag, log, stasioner, dan kematian. Fase lag merupakan fase saat bakteri menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan pertumbuhan terjadi sangat lambat. Fase log (eksponensial) merupakan fase saat bakteri mulai memperbanyak sel sehingga terjadi pertumbuhan yang meningkat. Peningkatan tersebut dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Fase stasioner merupakan fase saat jumlah koloni tidak bertambah, walaupun metabolisme sel tetap berlangsung. Fase kematian merupakan fase saat jumlah koloni menurun karena bakteri mulai mati (Brock *dkk.* 1994: 327--328). Umumnya aktivitas enzim tertinggi terjadi pada fase stasioner (Brock *dkk.* 1994: 382).

#### D. PENAPISAN XILANASE

Penapisan (*screening*) bertujuan untuk mengetahui apakah suatu mikroorganismen tertentu menghasilkan senyawa kimia tertentu seperti enzim. Penapisan dilakukan dengan cara menumbuhkan mikroorganismen pada medium selektif. Medium selektif mengandung substrat yang sesuai dengan enzim tertentu yang diinginkan (Rachman 1989: 82,85).

Menurut Gessesse dan Gashe (1997: 402) serta Richana (2006: 28) hasil positif xilanase ditunjukkan dengan adanya zona bening. Zona bening tersebut menunjukkan bahwa substrat (xilan) yang tercampur di dalam media padat telah diurai oleh enzim (xilanase) yang dihasilkan bakteri tersebut (Stauffer 1998: 128). Hasil zona bening dapat dilihat lebih jelas dengan penambahan indikator warna (Rachman 1989: 82,85). Yang *dkk.* (1995: 434-435) menambahkan *congo red* 1% pada biakan di cawan petri dan didiamkan selama 30 menit, kemudian diberi NaCl 1 M untuk melihat hasil zona bening yang lebih jelas. *Congo red* bewarna merah pada pH 3,0 dan bewarna biru pada kisaran pH 5,0. NaCl berfungsi untuk mencuci kelebihan *congo red*.

Penapisan dapat juga dilakukan dengan penambahan indikator warna pada medium. Warna indikator akan berubah jika mikroorganismen tersebut menghasilkan suatu enzim tertentu (Rachman 1989: 82,85). Whitehead dan Hespell (1990: 2408) melakukan penapisan xilanase menggunakan indikator warna seperti *Remazol Brilliant Blue-xylan* (RBB-xylan), yang ditambahkan

pada medium Luria Bertani padat. Hasil hidrolisis xilanase dapat dilihat dengan perubahan warna medium dari biru tua menjadi biru muda. Menurut Highley (2004: 319) penapisan menggunakan medium padat lebih banyak digunakan karena prosesnya lebih cepat dan mudah dibandingkan dengan medium cair.

## **E. FERMENTASI**

Enzim dapat diproduksi dengan proses fermentasi (Rachman 1989: 17). Fermentasi dapat dilakukan pada dua jenis medium yaitu medium cair dan medium semi padat atau padat. Keuntungan fermentasi pada medium cair adalah komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah. Selain itu, oksigen, pH dan nutrisi dapat tersebar secara merata karena adanya proses agitasi (Rachman 1989: 90; Suhartono 1989: 166).

Xilanase dapat dihasilkan dengan fermentasi cair atau padat (Haltrich *dkk.* 1996: 133). Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi fermentasi cair pada produksi xilanase adalah jenis substrat, medium fermentasi dan kondisi fermentasi seperti suhu, pH, agitasi, waktu inkubasi dan zat tambahan sebagai sumber karbon (Haltrich *dkk.* 1996: 140--150).

### **1. Substrat**

Substrat dapat berpengaruh terhadap produktivitas dan aktivitas enzim. Substrat pada produksi xilanase tidak hanya berfungsi sebagai

sumber karbon dan sumber energi tetapi juga sebagai induser. Jenis substrat yang digunakan untuk produksi xilanase pada fermentasi cair dapat berupa xilan (*oat spelt xylan*, *beech xylan*, *birchwood xylan*, dan *larchwood xylan*), xilosa, xilobiosa, arabinosa, dan selulosa (Haltrich *dkk.* 1996: 139, 143). Penelitian Gessesse dan Gashe (1997: 403) menggunakan *oat spelt xylan* sebagai substrat menghasilkan aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp. AR-009 sebesar 45,2 U/ml sedangkan penggunaan arabinosa sebagai substrat menghasilkan aktivitas xilanase sebesar 14,1 U/ml. Konsentrasi substrat juga mempengaruhi produksi xilanase. Produksi xilanase tertinggi oleh *B. circulans* terjadi pada konsentrasi xilan 10 mg/ml, namun penggunaan xilan di atas konsentrasi tersebut menyebabkan penurunan produksi xilanase (Kyu *dkk.* 1994: 165).

## 2. Medium fermentasi

Medium akan berpengaruh terhadap pertumbuhan sel, pembentukan produk fermentasi dan pH (Rachman 1989: 94). Medium selain mengandung karbon juga harus mengandung nitrogen dan mineral. Medium untuk produksi xilanase selain mengandung karbon dan nitrogen, biasanya mengandung beberapa mineral (seperti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{NO}_3^-$ ) dan ion logam (seperti  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Haltrich *dkk.*1996: 148). George *dkk.* (2001: 222) melakukan optimasi sumber nitrogen untuk produksi xilanase pada *Thermomonospora* sp.. Penelitian tersebut membandingkan aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh tripton, pepton, amonium klorida,

sodium nitrat, dan *yeast extract*. Berdasarkan penelitian tersebut, sumber nitrogen yang menghasilkan produksi xilanase tertinggi adalah *yeast extract*.

### 3. Suhu

Suhu mempengaruhi pertumbuhan dan produksi xilanase (Haltrich *dkk.*1996: 148). Menurut Gessesse dan Gashe (1997: 403) suhu optimum untuk produksi xilanase sama dengan suhu optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme.

### 4. pH

Perubahan pH pada saat fermentasi dapat menyebabkan metabolisme mikroorganisme terhenti karena enzim terdenaturasi sehingga tidak dapat mengubah substrat (Hawcroft 1987: 12; Bauman 2004: 132). Oleh karena itu diperlukan penstabilan pH, yang dapat dilakukan dengan penambahan dapar (Haltrich *dkk.*1996: 148).

### 5. Agitasi

Agitasi bertujuan untuk menghomogenkan antara bakteri dengan medium dan pemberian aerasi (Judoamidjojo *dkk.* 1992: 280). Berdasarkan penelitian Richana (2006: 68--69) menggunakan bakteri alkalo termofilik, agitasi untuk menghasilkan xilanase optimum dapat berkisar 150--200 rpm.



## 6. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi optimum pada setiap mikroorganisme berbeda-beda, pada umumnya aktivitas enzim tertinggi dihasilkan pada fase stasioner dari kurva pertumbuhan (Brock *dkk.* 1994: 328). *Bacillus* sp. AR-009 menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi setelah waktu inkubasi 40 jam (pada fase stasioner akhir bakteri tersebut) (Gessesse & Gashe 1997: 403). *Enterobacter* sp. MTCC 5112 menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi setelah waktu inkubasi 50 jam, yang merupakan fase stasioner akhir bakteri tersebut (Khandeparkar & Bhosle 2003: 10).

## 7. Zat tambahan sebagai sumber karbon

Haltrich *dkk.* (1996: 148) menyatakan penambahan xilosa, xilobiosa, galaktosa dan arabinosa dapat meningkatkan aktivitas xilanase. Aktivitas xilanase naik dari 5,3 U/ml menjadi 11,4 U/ml dengan penambahan 3 mg/ml arabinosa pada medium dengan 10 mg/ml xilan (Kyu *dkk.* 1994: 166).

## F. REGULASI BIOSINTESIS ENZIM

Regulasi biosintesis enzim dapat dilakukan dengan mekanisme inhibisi umpan balik, induksi enzim dan represi enzim.

### 1. Inhibisi umpan balik

Inhibisi umpan balik terjadi jika produk akhir hasil sintesis enzim terakumulasi. Produk akhir pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat aktivitas enzim pertama pada tahap awal jalur biosintesis. Produk akhir terikat pada sisi alosterik dan mengubah konformasi enzim, sehingga substrat tidak dapat terikat pada sisi aktif enzim. Inhibisi umpan balik bersifat sementara dan akan kembali normal jika jumlah produk berkurang (Jawetz *dkk.* 1976: 67; Brock *dkk.* 1994: 116--117; Worthington 2004: 12).

### 2. Induksi enzim

Induksi terjadi jika terdapat senyawa penginduksi (induser) di dalam medium. Mekanisme induksi diatur oleh protein represor. Protein represor akan aktif ketika tidak ada induser sehingga biosintesis enzim oleh gen struktural terhambat. Apabila terdapat induser, represor akan menjadi tidak aktif, sehingga gen struktural dapat melakukan biosintesis enzim (Jawetz *dkk.* 1976: 68; Suhartono 1989: 41; Brock *dkk.* 1994: 170--171).

### 3. Represi enzim

Represi enzim terjadi bila pada suatu medium terdapat dua atau lebih substrat (sumber karbon). Substrat yang lebih sederhana akan terlebih dahulu digunakan untuk metabolisme sehingga enzim untuk substrat yang

lebih kompleks akan direpresi atau ditekan sintesisnya (Jawetz *dkk.* 1976: 68; Kulkarni *dkk.* 1999: 419; Bauman 2004: 161).

## G. PENGUKURAN AKTIVITAS ENZIM

Pengukuran aktivitas enzim dapat dilakukan dengan metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung memberikan hasil konsentrasi dari substrat atau produk hasil reaksi enzim secara langsung, sedangkan metode tidak langsung memberikan pembacaan absorbansi. Absorbansi tersebut selanjutnya harus dimasukkan dalam kurva standar untuk mengetahui konsentrasi substrat atau produk hasil reaksi enzim. Metode langsung terdiri dari metode optikal dan metode secara fisik. Metode optikal terdiri dari metode spektrofotometer, spektrofluorometri, nephelometri, reaksi optikal, kolorimetri dengan indikator, metode potensiometrik, gas terlarut dan elektroda, serta elektroda ion spesifik. Metode secara fisik yaitu metode viskositas. Metode tidak langsung yaitu metode dengan reaksi kimia, seperti kolorimetri dan titrasi (Stauffer 1998: 112--128).

Aktivitas xilanase dapat diukur dengan metode kolorimetri, pelepasan warna indikator oleh substrat, viskositas dan turbiditas (Ghose & Bisaria 1987: 1750; Haltrich *dkk.* 1996: 139). Metode kolorimetri mengukur aktivitas enzim berdasarkan hasil gula reduksi yang dilepaskan oleh substrat seperti metode Miller-Bailey dengan menggunakan *dinitrosalicylic acid* (DNS), metode Somogyi-Nelson dengan menggunakan arsenomolibdat, dan metode Lever dengan menggunakan *p-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide Solution*

(PAHBAH). Metode pelepasan warna indikator oleh substrat seperti metode Biely dengan menggunakan *Remazol Brilliant Blue-xylan* (RBB-xylan) (Ghose & Bisaria 1987: 1750; Haltrich *dkk.* 1996: 139).

Metode Somogyi Nelson menggunakan arsenomolibdat sebagai penghenti reaksi dan pemberi warna pada campuran filtrat dengan substrat. Namun, arsenomolibdat bersifat toksik dan mudah terpengaruh dengan komposisi dari campuran enzim. Metode RBB-xylan didasarkan pelepasan 4-O-metilglukoronoxilan (pelepasan substrat) yang diwarnai dengan *Remazol Brilliant Blue*. Metode turbidimetri didasarkan pada turbiditas (banyaknya cahaya yang diabsorpsi) oleh suspensi xilan yang tidak bereaksi dengan enzim (Bailey 1992: 262). Metode viskositas dan turbiditas jarang digunakan karena substrat harus bersifat larut (Haltrich *dkk.* 1996: 139).

Prosedur pengukuran aktivitas menggunakan DNS lebih banyak digunakan karena assay lebih cepat, mudah, dan memiliki sensitivitas yang tinggi (Haltrich *dkk.* 1996: 138; Damaso *dkk.* 2003: 6064). Metode tersebut mengukur aktivitas xilanase berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan saat proses hidrolisis antara xilanase dengan substrat xilan, dengan bantuan DNS. DNS merupakan senyawa aromatik yang akan bereaksi dengan gula pereduksi membentuk *3-amino-5-nitrosalicylic acid*, yang mengabsorbansi cahaya pada 540 nm. DNS juga berfungsi untuk menghentikan reaksi, yang dibantu dengan inkubasi enzim pada air mendidih (Mililer 1959: 426).

Aktivitas enzim dapat dinyatakan sebagai unit aktivitas dan aktivitas spesifik. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang diperlukan

untuk mengubah 1  $\mu\text{mol}$  substrat atau menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  produk dalam waktu 1 menit, dalam suhu dan pH yang telah ditentukan (Sadikin 2002: 133). Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim per miligram protein (Winarno 1995: 12).

Satu unit aktivitas xilanase adalah kemampuan enzim untuk menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  xilosa per satu menit pada suhu dan pH yang telah ditentukan (Gessesse & Gashe 1997: 402). Aktivitas xilanase dipengaruhi oleh suhu, pH, penambahan ion logam (Nakamura *dkk.* 1993: 2313--2314), jumlah sumber karbon (Richana 2006: 47), dan jenis substrat yang digunakan (Gessesse & Gashe 1997: 403).

## **BAB III**

### **BAHAN DAN CARA KERJA**

#### **A. LOKASI PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri (PTB), Departemen Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong dalam waktu enam bulan.

#### **B. BAHAN**

##### **1. Mikroorganisme**

Mikroorganisme yang digunakan adalah 136 bakteri alkalo termofilik hasil isolasi dari sumber air panas Desa Rambah Tengah Hulu, Kecamatan Rambah, Kabupaten Rokan Hulu, Provinsi Riau Darat milik Laboratorium Teknologi Bioindustri.

##### **2. Medium**

Medium penapisan, seleksi, pemeliharaan dan produksi menggunakan medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311). Medium untuk penghitungan jumlah koloni menggunakan medium Nutrient Agar (NA).

### 3. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Larutan dinitro asam salisilat (3,5 *Dinitro Salicylic acid*), dapar Tris-HCl pH 9, NaOH [Merck], oat spelt xylan [Sigma], yeast extract [Pronadisa], bacto pepton [Pronadisa],  $K_2HPO_4$  [Merck],  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  [Merck] dan pure agar powder [Fluka].

### C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan adalah *shaking incubator* [Kühner], *static incubator* [Memmert], autoklaf [Hitachi], timbangan analitik [Sartorius], sentrifuse [Hitachi], tabung sentrifuse [eppendorf], *thermomixer* [eppendorf], *vortex mixer* [Sargen Welch], pipet mikro [BioRad], *magnetic stirrer*, *hot plate & stirrer* [Bibby], *laminar air flow* [Babcock BFH], spektrofotometer [Pharmacia], kuvet, *water bath* [Memmert], alat gelas dan pH meter [Ino Lab].

### D. CARA KERJA

#### 1. Pembuatan medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311)

Sebanyak 0,5 g *oat spelt xylan* dicampur dengan yeast extract 0,5 g, bacto pepton 1 g,  $K_2HPO_4$  0,1 g, dan  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02 g dan untuk pembuatan medium padat ditambahkan *pure agar powder* 2 g. Campuran kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan sampai larut. Setelah medium dingin, pH diatur

dengan penambahan NaOH 30% hingga pH 9, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

## 2. Pembuatan medium Nutrient Agar (NA)

Sebanyak 4,6 g NA dilarutkan dalam 100 ml akuades. Campuran kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan sampai larut. Setelah medium dingin, pH diatur dengan penambahan NaOH 30% hingga pH 9, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

## 3. Penapisan dan pengukuran indeks xilanolitik

Isolat bakteri alkalo termofilik diinokulasikan ke dalam medium modifikasi Nakamura padat dalam cawan Petri dengan metode streak kuadran. Isolat bakteri yang positif menghasilkan xilanase, diinokulasikan ke dalam medium modifikasi Nakamura padat dalam cawan Petri yang telah dibagi menjadi empat kuadran dengan menggunakan tusuk gigi steril, tiap kuadrannya. Cawan Petri tersebut diinkubasi pada suhu 55° C selama 48 jam. Indeks Xilanolitik (IX) dihitung berdasarkan modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211) dengan rumus:

$$IX = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$



#### 4. Pembuatan *working culture*

Isolat bakteri alkalo termofilik yang menghasilkan zona bening pada medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311) digores pada medium miring modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311). Tabung kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 55° C selama 24 jam.

#### 5. Pembuatan *stock culture* dalam medium gliserol

Isolat bakteri alkalo termofilik penghasil xilanase, diinokulasikan sebanyak 2 ose ke dalam 25 ml medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311) cair, kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* selama 24 jam pada suhu 55° C dan 150 rpm. Setelah 24 jam, biakan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 50 ml. Sentrifugasi dilakukan dengan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C, jika pelet belum mengendap maka dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit pada suhu yang sama. Pelet yang diperoleh dicuci dua kali dengan 5 ml *peptone water* 0,1%. Sentrifugasi kembali dilakukan pada kondisi yang sama untuk memisahkan *peptone water* dengan pelet. Pelet yang diperoleh ditambahkan *skim milk* 10%, *monosodium glutamate* (MSG) 1% dan gliserol dengan konsentrasi akhir 10% lalu dihomogenkan dengan vorteks. *Stock culture* disimpan dalam suhu -84° C (Gambar 3).

## 6. Pembuatan *starter*

Isolat bakteri alkalo termofilik penghasil xilanase berumur 24 jam diinokulasikan sebanyak 2 ose ke medium modifikasi Nakamura (1993: 2311). Fermentasi dilakukan pada kondisi suhu 55° C, pH 9 dan 150 rpm sampai fase log dicapai.

## 7. Kurva pertumbuhan dan kurva produksi

Kurva pertumbuhan dan kurva produksi dilakukan dengan memfermentasikan isolat bakteri alkalo termofilik penghasil xilanase pada medium modifikasi Nakamura *dkk.* (1993: 2311) cair pH 9, suhu 55° C dan 150 rpm selama 24 jam. Pengambilan sampel fermentasi dilakukan dalam interval waktu 4 jam.

Kurva jumlah koloni merupakan grafik, dengan waktu inkubasi sebagai sumbu X dan jumlah koloni sebagai sumbu Y. Kurva produksi ditampilkan sebagai grafik, dengan waktu inkubasi sebagai sumbu X dan nilai aktivitas (U/ml) sebagai sumbu Y1 serta kadar protein (mg/ml) sebagai sumbu Y2.

## 8. Penghitungan jumlah koloni

Jumlah koloni dihitung dengan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Black (1999: 140), yaitu dengan mengencerkan medium secara bertingkat dan menginokulasikannya pada medium padat serta diratakan

dengan spatel *Drygalski* pada permukaan medium. Medium yang digunakan ialah medium Nutrient Agar (NA).

Jumlah *Colony Forming Unit* (CFU) dapat dihitung berdasarkan Black (1999: 141) dan Gandjar *dkk.* (1992: 40--41) menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ ml} = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Vol. inokulasi x faktor pengenceran}}$$

#### 9. Pengukuran aktivitas xilanase

Aktivitas xilanase diukur dengan metode Bailey (1992: 261) yang dimodifikasi yaitu dengan mengukur kadar gula pereduksi yang dibebaskan selama reaksi hidrolisis antara xilanase dengan xilan.

Sebanyak 70  $\mu\text{l}$  enzim kasar dicampur dengan 630  $\mu\text{l}$  substrat *oat spelt xylan* 1% dalam 50 mM dapar Tris-HCl pH 9. Campuran diinkubasi dalam *thermomixer* selama 5 menit pada suhu 55° C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 750  $\mu\text{l}$  DNS. Campuran kemudian diinkubasi selama 5 menit pada air mendidih dan didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 20° C dan 5500 rpm.

Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm.

Kontrol dibuat dengan menginkubasi 630  $\mu\text{l}$  substrat *oat spelt xylan* 1% dalam 50 mM dapar Tris-HCl pH 9 pada suhu 55° C selama 5 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 750  $\mu\text{l}$  DNS, lalu ditambahkan 70  $\mu\text{l}$  enzim kasar. Campuran diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 20° C

dan 5500 rpm. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm.

Blanko dibuat dengan cara menginkubasi 630 µl substrat *oat spelt xylan* 1% pada suhu 55° C selama 5 menit, lalu ditambahkan 70 µl dapar Tris-HCl 50 mM. 750 µl DNS ditambahkan ke dalam campuran, lalu diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 20° C dan 5500 rpm. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm.

#### 10. Pembuatan kurva standar xilosa

Kurva standar xilosa dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi standar xilosa (Tabel 2) di dalam larutan dapar Tris-HCl 50 mM pH 9. Sebanyak 70 µl larutan xilosa dari masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam eppendorf dan ditambah dengan 630 µl substrat *oat spelt xylan* 1% dalam 50 mM dapar Tris-HCl pH 9. Campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu 55° C, lalu ditambahkan 750 µl DNS dan diinkubasi kembali dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 20° C dan 5500 rpm. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar xilosa adalah grafik hubungan absorbansi dengan variasi konsentrasi xilosa.

## 11. Penentuan kadar protein xilanase

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford (1976: 249--250) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 50 µl enzim kasar direaksikan dengan 2,5 ml larutan pereaksi Bradford yang telah diencerkan 5 kali pada tabung reaksi. Campuran dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar *bovine serum albumin* (BSA).

## 12. Pembuatan kurva standar BSA

Pembuatan kurva standar *bovine serum albumin* (BSA) dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi standar BSA (Tabel 4) di dalam 50 mM larutan dapar Tris-HCl pH 9. Setiap variasi konsentrasi standar BSA diambil sebanyak 50 µl kemudian dicampur dengan 2,5 ml larutan Bradford dalam tabung reaksi. Larutan yang telah dicampur dihomogenkan dengan vorteks, kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar BSA adalah grafik hubungan konsentrasi protein standar (BSA dengan variasi konsentrasi) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 595 nm.

### 13. Penyusunan, pengolahan dan analisis data

Data penghitungan indeks xilanase terdapat pada Tabel 1, data penghitungan jumlah koloni terdapat pada Tabel 6, dan data aktivitas xilanase terdapat pada Tabel 7, 8, dan 9.

Aktivitas enzim didapatkan dengan memasukkan absorbansi sampel dan kontrol dalam persamaan kurva standar xilosa dan memasukkannya ke dalam persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{([K_{sp}] - [K_{kt}]) \times 1000 \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{BM xilosa} \times t \times V}$$

Keterangan:

[K<sub>sp</sub>] : Konsentrasi sampel (mg)

[K<sub>kt</sub>] : Konsentrasi kontrol (mg)

1000 : Faktor konversi dalam  $\mu\text{mol}$

BM : Berat molekul xilosa yaitu 150,13 g/mol

t : Waktu inkubasi pada suhu optimum (menit)

V : Jumlah (volume) enzim yang digunakan dalam analisis (ml)

1 Unit aktivitas xilanase  $\sim 1 \mu\text{mol/min}$ .

Kadar protein diperoleh dengan memasukkan absorbansi pada kurva standar protein  $Y = 0.2025X - 0.0077$  (Gambar 9). Aktivitas spesifik merupakan hasil bagi antara aktivitas xilanase dengan kadar protein.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

##### 1. Penapisan dan pengukuran indeks xilanolitik

Penapisan xilanase pada 136 isolat bakteri menunjukkan bahwa 18 isolat bakteri menghasilkan xilanase, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening. Isolat tersebut kemudian diukur indeks xilanolitiknya (Tabel 1). Tiga isolat bakteri penghasil indeks xilanolitik yang tinggi adalah isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM sebesar 3,095, Riau/Kayu/9/2/NM sebesar 0,955, dan Riau/Sludge/9/1/LB sebesar 0,910. Tiga isolat bakteri tersebut selanjutnya diukur kurva pertumbuhan, aktivitas xilanase, dan kadar protein.

##### 2. Kurva pertumbuhan

Kurva pertumbuhan dibuat dua kali, yaitu pada saat awal sebelum produksi yang bertujuan untuk mengetahui fase log dari bakteri tersebut dan pada saat produksi yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara jumlah koloni dengan aktivitas yang dihasilkan.

Hasil pengamatan kurva pertumbuhan isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM (Gambar 10) menunjukkan bahwa pada jam ke-0 hingga jam ke-4 jumlah koloni naik dari  $1,36 \times 10^8$  CFU/ml menjadi  $1,71 \times 10^8$  CFU/ml. Namun, jumlah koloni turun kembali pada jam ke-8 menjadi  $0,78 \times 10^8$  CFU/ml. Pada

jam ke-8 hingga jam ke-16, jumlah koloni meningkat menjadi  $3,30 \times 10^8$  CFU/ml, dan mencapai jumlah koloni tertinggi. Isolat mengalami penurunan jumlah koloni setelah jam ke-16, jumlah koloni turun menjadi  $0,12 \times 10^8$  CFU/ml pada jam ke-24.

Hasil pengamatan kurva pertumbuhan isolat Riau/Kayu/9/2/NM (Gambar 11) menunjukkan bahwa dari jam ke-0 hingga jam ke-12 jumlah koloni naik dari  $0,64 \times 10^8$  CFU/ml menjadi  $2,17 \times 10^8$  CFU/ml. Isolat mencapai jumlah koloni tertinggi pada jam ke-12 sebesar  $2,17 \times 10^8$  CFU/ml. Jumlah koloni mulai menurun setelah jam ke-12. Jumlah koloni turun dari  $2,17 \times 10^8$  CFU/ml pada jam ke-12 menjadi  $0,59 \times 10^8$  CFU/ml pada jam ke-32.

Hasil pengamatan kurva pertumbuhan isolat Riau/Sludge/9/1/LB (Gambar 12) menunjukkan jumlah koloni pada jam ke-0 naik dari  $0,80 \times 10^8$  CFU/ml menjadi  $1,03 \times 10^8$  CFU/ml pada jam ke-4. Jumlah koloni turun pada jam ke-8 menjadi  $0,64 \times 10^8$  CFU/ml dan naik pada jam ke-16 menjadi  $1,78 \times 10^8$  CFU/ml. Isolat Riau/Sludge/9/1/LB mencapai jumlah koloni tertinggi pada jam ke-16 sebesar  $1,78 \times 10^8$  CFU/ml. Jumlah koloni mulai menurun setelah jam ke-16, dari  $1,78 \times 10^8$  CFU/ml menjadi  $0,23 \times 10^8$  CFU/ml pada jam ke-24. Pada isolat Riau/Sludge/9/1/LB jumlah koloni naik kembali pada jam ke-28 menjadi  $0,38 \times 10^8$  CFU/ml.



### 3. Aktivitas xilanase

Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada isolat

Pawan/Tanah(2)/9/3/NM (Gambar 13 dan Tabel 7) menunjukkan bahwa aktivitas xilanase pada waktu fermentasi 0--4 jam mengalami kenaikan, dari  $0,540 \pm 0,060$  U/ml menjadi  $0,579 \pm 0,044$  U/ml. Aktivitas xilanase turun dari  $0,579 \pm 0,044$  U/ml pada jam ke-4 menjadi  $0,318 \pm 0,033$  U/ml pada jam ke-8. Aktivitas xilanase mulai mengalami kenaikan kembali pada waktu inkubasi fermentasi 8--16 jam, dari  $0,318 \pm 0,033$  U/ml menjadi  $0,917 \pm 0,093$  U/ml. Aktivitas xilanase mulai turun setelah waktu inkubasi fermentasi 16 jam, yaitu menjadi  $0,733 \pm 0,087$  U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 24 jam.

Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada isolat Riau/Kayu/9/2/NM (Gambar 14 dan Tabel 8) menunjukkan bahwa aktivitas xilanase pada waktu fermentasi 0--8 jam mengalami kenaikan, dari  $0,048 \pm 0,020$  U/ml menjadi  $5,615 \pm 0,326$  U/ml. Aktivitas xilanase terus mengalami kenaikan hingga waktu inkubasi fermentasi 24 jam, yaitu menjadi  $8,529 \pm 0,093$  U/ml. Aktivitas xilanase mulai turun setelah waktu inkubasi fermentasi 24 jam, yaitu menjadi  $1,341 \pm 0,111$  U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 28 jam.

Aktivitas xilanase pada isolat Riau/Sludge/9/1/LB (Gambar 15 dan Tabel 9) pada waktu inkubasi fermentasi 0--8 jam mengalami penurunan, yaitu dari  $0,492 \pm 0$  U/ml ke  $0,222 \pm 0,044$  U/ml. Aktivitas xilanase mulai mengalami kenaikan pada waktu inkubasi fermentasi 8--20 jam, yaitu dari

0,222 ± 0,044 U/ml ke 1,283 ± 0,060 U/ml. Aktivitas xilanase mulai turun setelah waktu inkubasi fermentasi 20 jam, yaitu menjadi 0,096 ± 0,044 U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 24 jam. Aktivitas xilanase naik kembali pada jam ke-28 yaitu menjadi 0,212 ± 0,093 U/ml.

#### 4. Kadar protein

Kadar protein didapat dengan memasukkan nilai absorbansi dari uji Bradford ke dalam persamaan  $Y = 0,2025X - 0,0077$  (Gambar 9). Uji Bradford bersifat sensitif dan spesifik. Uji Bradford menggunakan *Coomassie Brilliant Blue G-250* yang akan berikatan dengan protein, ikatan tersebut akan terdeteksi pada panjang gelombang 595 nm (Nobel 2000:1--2).

Kadar protein isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM naik dari 0,059 ± 0,022 mg/ml pada jam ke-0 menjadi 0,074 ± 0,012 mg/ml pada jam ke-8. Kadar protein menurun dari 0,074 ± 0,012 mg/ml pada jam ke-8 menjadi 0,057 ± 0,018 mg/ml pada jam ke-12. Kadar protein pada jam ke-16 mengalami kenaikan menjadi 0,084 ± 0,016 mg/ml dan mengalami penurunan pada jam ke-20 menjadi 0,083 ± 0,013 mg/ml.

Kadar protein pada isolat Riau/Kayu/9/2/NM mengalami kenaikan dari jam ke-0 sebesar 0,382 ± 0,049 mg/ml menjadi 0,571 ± 0,095 mg/ml pada jam ke-12. Kadar protein menurun dari 0,571 ± 0,095 mg/ml pada jam ke-12 menjadi 0,515 ± 0,038 mg/ml pada jam ke-16.

Kadar protein pada isolat Riau/*Sludge*/9/1/LB menurun dari jam ke-0 sebesar  $0,812 \pm 0,067$  mg/ml menjadi  $0,739 \pm 0,119$  mg/ml pada jam ke-8. Kadar protein naik dari jam ke-8 sebesar  $0,739 \pm 0,119$  mg/ml hingga jam ke-20 sebesar  $0,836 \pm 0,084$  mg/ml.

#### 5. Aktivitas spesifik

Aktivitas spesifik isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM mencapai nilai tertinggi pada jam ke-16 yaitu sebesar 10,973 U/mg saat aktivitas xilanase dan kadar protein mencapai nilai tertinggi. Aktivitas spesifik isolat Riau/Kayu/9/2/NM mencapai nilai tertinggi pada jam ke-24 yaitu sebesar 14,153 U/mg saat aktivitas xilanase berada dalam jumlah tertinggi. Aktivitas spesifik isolat Riau/*Sludge*/9/1/LB mencapai nilai tertinggi pada jam ke-20 yaitu sebesar 1,534 U/mg saat aktivitas xilanase dan kadar protein isolat tersebut mencapai nilai tertinggi.

## **B. PEMBAHASAN**

### 1. Penapisan dan pengukuran indeks xilanolitik

Penapisan aktivitas xilanolitik dilakukan terhadap 136 isolat bakteri alkalo termofilik. Delapan belas isolat bakteri yang positif menghasilkan xilanase diukur indeks xilanolitiknya menggunakan metode modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211) (Gambar 2). Menurut Highley (2004: 319) penapisan menggunakan medium padat lebih banyak digunakan karena prosesnya lebih

cepat dan mudah. *Oat spelt xylan* sebagai substrat, membuat medium terlihat keruh sehingga hasil positif dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening di sekitar bakteri (Richana 2006: 28). Zona bening terjadi akibat xilan dipecah oleh ekstraselular xilanase menjadi bentuk yang lebih sederhana.

Dari 18 isolat yang memberikan hasil positif dipilih tiga isolat dengan indeks xilanolitik tertinggi (Gambar 7 dan Tabel 1). Tiga isolat yang memberikan hasil pengukuran indeks xilanolitik tertinggi adalah isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM sebesar 3,095, Riau/Kayu/9/2/NM sebesar 0,955, dan Riau/Sludge/9/1/LB sebesar 0,91. Perbedaan indeks xilanolitik dari ketiga isolat tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh penggunaan *oat spelt xylan* sebagai substrat. *Oat spelt xylan* merupakan substrat yang tidak dapat larut sempurna, sehingga pada saat pembuatan medium xilan pada cawan petri, xilan yang tidak larut akan tersebar tidak merata pada medium di cawan petri. Hal tersebut menyebabkan daerah medium atas pada cawan petri sebagai daerah xilanase bekerja menjadi tidak merata dan dapat mengakibatkan difusi xilanase menjadi tidak seragam.

## 2. Hasil pengamatan mikroskopis

Hasil pengamatan mikroskopis dan uji biokimia menunjukkan bahwa isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM, Riau/Kayu/9/2/NM, dan Riau/Sludge/9/1/LB merupakan bakteri Gram positif, bersifat aerob, berbentuk batang, memiliki endospora, hasil uji katalase positif, asam sitrat positif dan indol negatif. Berdasarkan ciri-ciri tersebut, ketiga isolat merupakan genus *Bacillus*

menurut *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Buchanan & Gibbons 1974: 529). Genus *Bacillus* dicirikan dengan adanya endospora. Bakteri penghasil xilanase dapat berupa Gram positif dan negatif (Velázquez *dkk.* 2004: 60).

### 3. Pengukuran kurva pertumbuhan dan aktivitas xilanase

Berdasarkan Gambar 13, 14, dan 15, aktivitas xilanase pada ketiga isolat telah terukur pada jam ke-0. Hal tersebut terjadi karena isolat telah menghasilkan xilanase pada *starter*. *Starter* diinokulasikan ke dalam medium fermentasi saat mencapai fase log. *Starter* isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM diinokulasikan pada jam ke-12, isolat Riau/Kayu/9/2/NM diinokulasikan pada jam ke-12, dan isolat Riau/Sludge/9/1/LB diinokulasikan pada jam ke 8. Aktivitas xilanase telah terukur pada jam ke-0, kemungkinan aktivitas tersebut berasal dari *starter* yang berada pada akhir fase log menuju fase stasioner. Berdasarkan Brock *dkk.* (1994: 382), enzim telah dihasilkan pada fase log dan akan terakumulasi pada fase stasioner.

Aktivitas xilanase pada isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB mengalami penurunan pada jam ke-8 (Gambar 13 dan 15), namun aktivitas xilanase isolat Riau/Kayu/9/2/NM tidak mengalami penurunan pada jam ke-8 (Gambar 14). Hal tersebut dapat terjadi karena *starter* yang diinokulasikan selain mengandung sel dan xilanase, mungkin juga mengandung xilosa dan xilooligosakarida. Sehingga, pada medium

fermentasi terdapat tiga sumber karbon yaitu xilan, xilosa dan xilooligosakarida.

Aktivitas xilanase pada isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB mengalami penurunan karena terjadi represi katabolit oleh xilosa dan xilooligosakarida (Samain *dkk.* 1997: 73; Kulkarni *dkk.* 1999: 416). Xilosa dan xilooligosakarida merupakan sumber karbon yang lebih sederhana dibandingkan xilan, sehingga bakteri menghidrolisis xilosa dan xilooligosakarida terlebih dahulu dibandingkan xilan. Bauman (2004: 161) menyatakan, jika di dalam suatu medium terdapat dua atau lebih substrat (sumber karbon) maka substrat yang lebih sederhana akan terlebih dahulu digunakan daripada substrat yang lebih kompleks, sehingga enzim penghidrolisis substrat yang lebih kompleks akan ditekan. Hal tersebut menyebabkan sintesis enzim penghidrolisis xilan ditekan sehingga aktivitas xilanase turun. Aktivitas xilanase mulai naik kembali setelah jam ke-8. Hal tersebut mungkin karena konsentrasi xilooligosakarida dan xilosa mulai berkurang sehingga bakteri menghidrolisis xilan kembali. Menurut Samain *dkk.* (1997: 73) saat konsentrasi xilooligosakarida mulai berkurang, xilanase diproduksi kembali.

Aktivitas xilanase isolat Riau/Kayu/9/2/NM tidak mengalami penurunan pada jam ke-8 (Gambar 14). Hal tersebut dapat disebabkan oleh dua hal. Hal yang pertama, konsentrasi xilosa dan xilooligosakarida yang rendah dibandingkan isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB pada jam ke-0. Konsentrasi xilosa yang rendah diindikasikan dengan aktivitas

xilanase yang rendah pada isolat Riau/Kayu/9/2/NM dibandingkan isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB pada jam ke-0 (Tabel 7, 8 dan 9). Satu unit aktivitas xilanase adalah kemampuan enzim untuk menghasilkan satu  $\mu\text{mol}$  xilosa (Gessesse & Gashe 1997: 402), sehingga nilai aktivitas enzim sebanding dengan jumlah produk yang dihasilkan oleh enzim tersebut (Sadikin 2002: 134). Menurut Haltrich *dkk.* (1996: 139) xilosa dan xilooligosakarida dapat mengakibatkan represi katabolit, namun juga dapat berfungsi sebagai induser xilanase pada konsentrasi yang rendah. Hal yang kedua, produk aktivitas xilanase tidak selalu mengakibatkan represi, seperti yang dijelaskan oleh Biely (1985) bahwa xilosa merepresi produksi xilanase pada *Cryptococcus albidus* sedangkan tidak berpengaruh pada *Actinomyces* termofilik (*lihat* Kulkarni *dkk.* 1999: 417). Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi represi katabolit tergantung dari spesies yang digunakan.

Berdasarkan hasil pengamatan kurva pertumbuhan, fase log isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM kemungkinan pada jam ke-8 hingga jam ke-16, pada isolat Riau/Kayu/9/2/NM kemungkinan pada jam ke-0 hingga ke-12, dan pada isolat Riau/Sludge/9/1/LB kemungkinan pada jam ke-8 hingga ke-16. Peningkatan aktivitas juga terlihat di jam ke-8 pada isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB, dan di jam ke-0 pada isolat Riau/Kayu/9/2/NM. Menurut Bauman (2004: 189), pada fase log metabolisme sel meningkat. Tahun 1997, Subramaniyan *dkk.* melaporkan

bahwa *Bacillus* SSP-34 menghasilkan xilanase pada fase log dari kurva pertumbuhannya (*lihat Cordeiro dkk.* 2002: 415).

Aktivitas xilanase mencapai nilai tertinggi pada waktu inkubasi fermentasi yang berbeda. Isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM mencapai nilai tertinggi yaitu  $0,917 \pm 0,093$  U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 16 jam, isolat Riau/Kayu/9/2/NM mencapai nilai tertinggi yaitu  $8,529 \pm 0,093$  U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 24 jam, dan pada isolat Riau/Sludge/9/1/LB mencapai nilai tertinggi yaitu  $1,283 \pm 0,060$  U/ml pada waktu inkubasi fermentasi 20 jam. Hal tersebut dapat terjadi karena setiap bakteri memiliki *generation time* yang berbeda (Ray 2004: 59) sehingga aktivitas xilanase tertinggi juga dicapai pada waktu yang berbeda (Kulkarni *dkk.* 1999: 412). *Generation time* isolat Riau/Kayu/9/2/NM lebih lama dibandingkan isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/Sludge/9/1/LB (Lampiran 3). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas xilanase tertinggi dari ketiga isolat tersebut ialah Riau/Kayu/9/2/NM. Nilai aktivitas isolat Riau/Kayu/9/2/NM lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Gessesse dan Gashe (1993; 403) menggunakan *Bacillus* sp. AR-009 yaitu 45,2 U/ml. Nilai aktivitas xilanase yang didapat merupakan hasil dari pengukuran aktivitas enzim kasar. Supernatan yang digunakan untuk pengukuran aktivitas xilanase merupakan enzim kasar yang belum dimurnikan.

Produksi xilanase untuk mengukur aktivitas dilakukan dengan proses fermentasi. Tahun 1999, Mousdale *dkk.* menyatakan bahwa fermentasi



dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu fermentasi enzim yang berkaitan dengan kurva pertumbuhan bakteri (*growth associated*) dan fermentasi enzim yang tidak berkaitan dengan kurva pertumbuhan bakteri (*growth independent*) (lihat Mansi dkk. 1999: 171). Berdasarkan hal tersebut, ketiga isolat dapat dibedakan berdasarkan tipe fermentasi.

Fermentasi isolat Riau/Sludge/9/1/LB dan Pawan/Tanah(2)/9/3/NM merupakan tipe fermentasi *growth associated*. Fermentasi isolat Riau/Kayu/9/2/NM merupakan tipe fermentasi *growth independent*. Fermentasi xilanase dapat *growth associated* atau *growth independent* seperti yang dilaporkan oleh Gessesse dan Gashe (1997: 403) serta Cordeiro dkk. (2002: 415). Gessesse dan Gashe (1997: 403) melaporkan aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp. AR-009 mencapai maksimum setelah jam ke-20 dan jumlah koloninya mencapai jumlah maksimum setelah jam ke-20. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. AR-009 berhubungan dengan pertumbuhan bakteri (*growth associated*). Cordeiro dkk. (2002: 415) melaporkan *Bacillus* sp. AK 1 masuk fase stasioner sekitar jam ke-40 hingga jam ke-120 dan aktivitas xilanase tertinggi dihasilkan pada jam ke-72. Hal tersebut mengindikasikan bahwa xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. AK 1 tidak berhubungan dengan pertumbuhan bakteri (*growth independent*). Tahun 1992, Espinar dkk. menyatakan bahwa kenaikan xilanase saat fase akhir dari kurva pertumbuhan dapat terjadi karena xilanase di dalam sel keluar menuju medium, akibat terjadinya autolisis sel (lihat Cordeiro dkk. 2002: 415).

#### 4. Kadar protein

Kadar protein isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM, Riau/Kayu/9/2/NM, dan Riau/Sludge/9/1/LB tidak mengikuti pola aktivitas xilanase. Hal tersebut terjadi karena kadar protein menunjukkan jumlah protein yang terkandung dalam enzim kasar. Enzim kasar mengandung protein enzim, protein dari bahan penyusun medium dan juga protein dari lisisnya bakteri (Richana 2006: 43). Kadar protein isolat Riau/Kayu/9/2/NM turun pada jam ke-16 diperkirakan karena berkurangnya protein dalam medium. Heck *dkk.* (2002: 315) melaporkan berkurangnya kadar protein saat fermentasi xilanase pada *Bacillus* sp BL69 mengindikasikan dikonsumsi protein sebagai sumber nitrogen. Bakteri memerlukan protein sebagai salah satu nitrogen organik dalam pertumbuhannya (Rachman 1989: 93). Richana (2006: 68) melaporkan kadar protein *Bacillus pumilus* RXA III-5 pada jam ke-10 dan jam ke-30 menurun sedangkan aktivitas xilanase dari isolat tersebut mengalami kenaikan.

Kadar protein isolat Riau/Kayu/9/2/NM pada jam ke-32 mengalami kenaikan. Hal tersebut karena jumlah sel mulai mengalami penurunan dan mungkin beberapa sel mengalami lisis. Lisis sel akan menyebabkan kenaikan nilai protein, karena kandungan protein di dalam sel keluar ke medium (Brock & Brock 1978: 100).

## 5. Aktivitas spesifik

Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim per miligram protein (Winarno 1995: 12). Aktivitas spesifik mencerminkan kemampuan xilanase per satuan proteinnya dalam menghidrolisis xilan (Richana 2006: 69). Aktivitas spesifik dari isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM, Riau/Kayu/9/2/NM, dan Riau/*Sludge*/9/1/LB berada pada nilai tertinggi saat aktivitas xilanase berada pada nilai tertinggi. Isolat Riau/Kayu/9/2/NM memiliki kemampuan menghidrolisis xilan lebih tinggi per satuan proteinnya dibandingkan isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM dan Riau/*Sludge*/9/1/LB.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Isolat-isolat yang menghasilkan xilanase berjumlah 18 dan yang tidak menghasilkan xilanase berjumlah 118. Tiga isolat bakteri penghasil indeks xilanolitik yang tinggi adalah Pawan/Tanah(2)/9/3/NM, Riau/Kayu/9/2/NM, dan Riau/Sludge/9/1/LB.
2. Isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM memiliki nilai aktivitas xilanase sebesar  $0,917 \pm 0,093$  U/ml, Riau/Kayu/9/2/NM memiliki nilai aktivitas xilanase sebesar  $8,529 \pm 0,093$  U/ml, dan Riau/Sludge/9/1/LB memiliki nilai aktivitas sebesar  $1,283 \pm 0,060$  U/ml. Isolat Riau/Kayu/9/2/NM memiliki aktivitas xilanase yang paling tinggi dibandingkan isolat Riau/Sludge/9/1/LB dan Pawan/Tanah(2)/9/3/NM.

#### B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang optimasi produksi xilanase Riau/Kayu/9/2/NM.
2. Perlu dilakukan penghitungan aktivitas xilanase dengan metode Bailey (1992: 261) terhadap 15 isolat lainnya.

## DAFTAR ACUAN

- Bailey, M.J. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**: 257--270.
- Bauman, R.W. 2004. *Microbiology*. Benjamin Cummings, Toronto: xxv + 897 hlm.
- Black, J.G. 1999. *Microbiology principles and explorations*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxiv + 786 hlm.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation on microgram quantities of protein in utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248--254
- Brock & Brock. 1978. *Basic microbiology with applications*. 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey: xiii + 608 hlm.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker. 1994. *Biology of microorganism*. 7th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore: xxvi + 1268 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., San Fransisco: xvi + 491 hlm.
- Collins, T., C. Gerday & G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 3--23.

- Cordeiro, C.A.M., M.L.L. Martins, A.B. Luciano & R.F. da Silva. 2002. Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **45**(4): 413--418.
- Damaso, M.C.T., M.S. Almeida, E. Kurtenbach, O.B. Martins, N. Pereira, C.M.M.C. Andrade & R.M. Albano. 2003. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(10): 6064--6072.
- Dhillon, A., J.K. Gupta & S. Khanna. 2000. Enhanced production, purification and characterisation of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochem.* **35**: 849--856.
- Dinas Perindustrian dan Perdagangan. 2006. RI pulp and paper. 31 Oktober 2006: 1 hlm.: <http://disperindag-jabar.go.id/index.php?pilih=lihat&id=1679>, 20 Juni 2008, pk. 10.20.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi, FMIPA UI, Depok: vii + 87 hlm.
- Garg, A.P., A.J. McCharty & J.C. Roberts. 1996. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 261--267.
- George, S.P., A. Ahmad & M.B. Rao. 2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. *Bios. Technol.* **78**: 221--224.

- Gessesse, A. & B.A. Gashe. 1997. Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from an alkaline soda lake. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 402--406.
- Ghose, T.K. & V.S. Bisaria. 1987. Measurement of hemicellulase activities, part 1: xylanase. *Pure & Appl. Chem.* **59**(12): 1739--1752.
- Haki, G.D. & S.K. Rakshit. 2003. Development in industrially important thermostable enzyme: a review. *Bios. Technol.* **89**: 17--34.
- Haltrich, D., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, W. Steiner & S. Župančič. 1996. Production of fungal xylanases. *Bios. Technol.* **58**: 137--161.
- Hawcroft, D. 1987. *Diagnostic enzymology: analytical chemistry by open learning*. John Wiley & Sons, London: 47 hlm.
- Heck, J.X., P.F. Hertz & M.A.Z. Ayub. 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz. J. Microbiol.* **33**: 213--218.
- Highley, T.L. 2004. Carbohydrolase assays. *Methods in plant biochemistry and molecular biology.* **25**: 309--321.
- Hölker, U., M. Höfer & J. Lenz. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 175--186.
- Jiang, Z.Q., S.Q. Yang, S.S. Tan, L.T. Li & X.T. Li. 2005. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 69--76.

- Jawetz, E., J.L. Melnick & E.A. Adelberg. 1976. *Review of medical microbiology*. Lance, San Fransisco: 542 hlm.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis & E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi fermentasi*. PAU-Bioteknologi, IPB, Bogor: 333 hlm.
- Khandeparkar, R. & N.B. Bhosle. 2003. Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp MTCC 5112. *National Institute of Oceanography*. **7**: 1--25.
- Khasin, A., A. Iris & Y. Shoham. 1993. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(6): 1725--1730.
- Kouker, G. & K.E. Jaeger. 1986. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(1): 211-213.
- Kulkarni, N., A. Shendye & M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 411--456.
- Kyu, K.L., K. Ratanakhanokchai, D. Uttapap & M. Tanticharoen. 1994. Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6. *Bios. Technol.* **48**: 163--167.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 416--429.
- Mousdale, D.M., J.C. Melville & M. Fischer. 1999. Optimization of fermentation processes by quantitative analysis from analytical biochemistry to chemical engineering. *Dalam*: El-Mansi, E.M.T. &

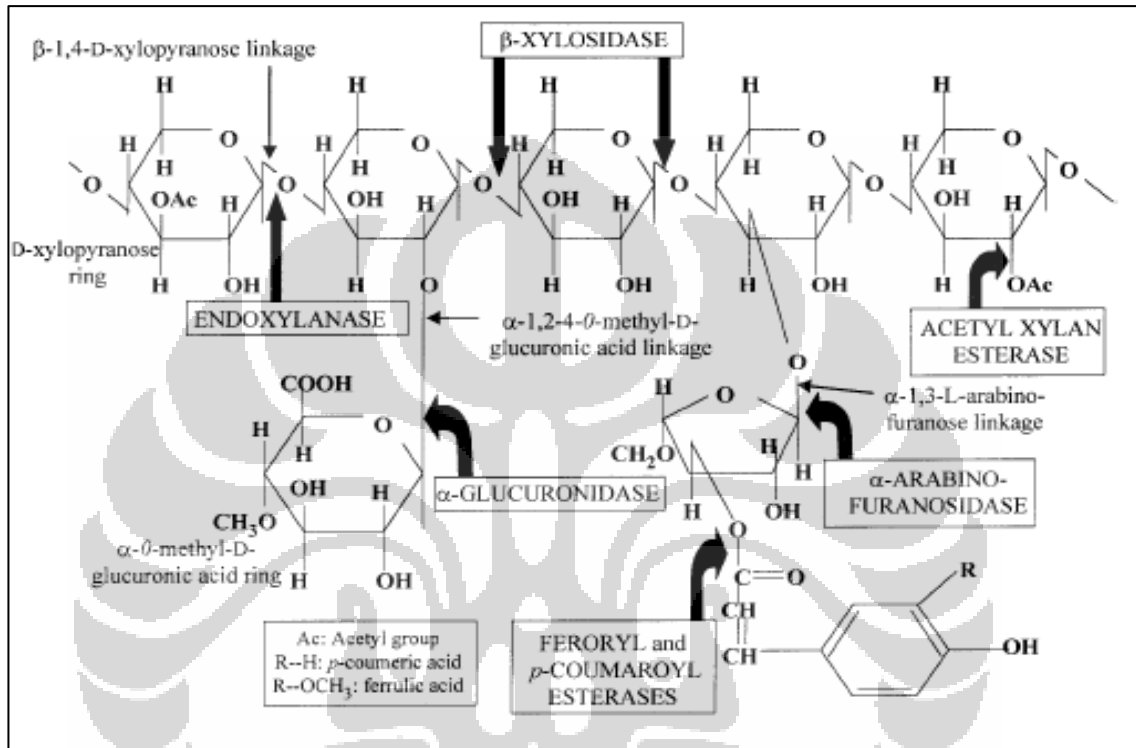


- C.F.A. Bryce (eds.). 1999. *Fermentation microbiology and biotechnology*. Taylor & Francis, London: xiv + 308 hlm.
- Nakamura, S., W. Kenji, N. Ryuichiro, A. Rikizo & H. Koki. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(7): 2311--2316.
- Nobel, A. 2000. *Quick start Bradford protein assay*. Bio-Rad Inc., California: 33 hlm.
- Pelczar, M.J. & E.S.C. Chan. 1986. *Dasar-dasar mikrobiologi*, Jilid 1. Penerj. R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo & S.L. Angka. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: viii + 443 hlm.
- Polizeli, M.L.T.M., A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H. Fterenzi, J.A. Jorge & D.S. Amorim. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**(10): 577--591.
- Rachman, A. 1989. *Pengantar teknologi fermentasi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor, Bogor: vii + 145 hlm.
- Ray, B. 2004. *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. CRC Press, New York: x + 608 hlm.
- Richana, N. 2006. Kajian proses produksi xilanase dari isolat bakteri alkalofilik menggunakan media xilan tongkol jagung. Disertasi Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor: 86 hlm.
- Rifaat, H.M., Z.A. Nagieb & Y.M. Ahmed. 2005. Production of xylanases by

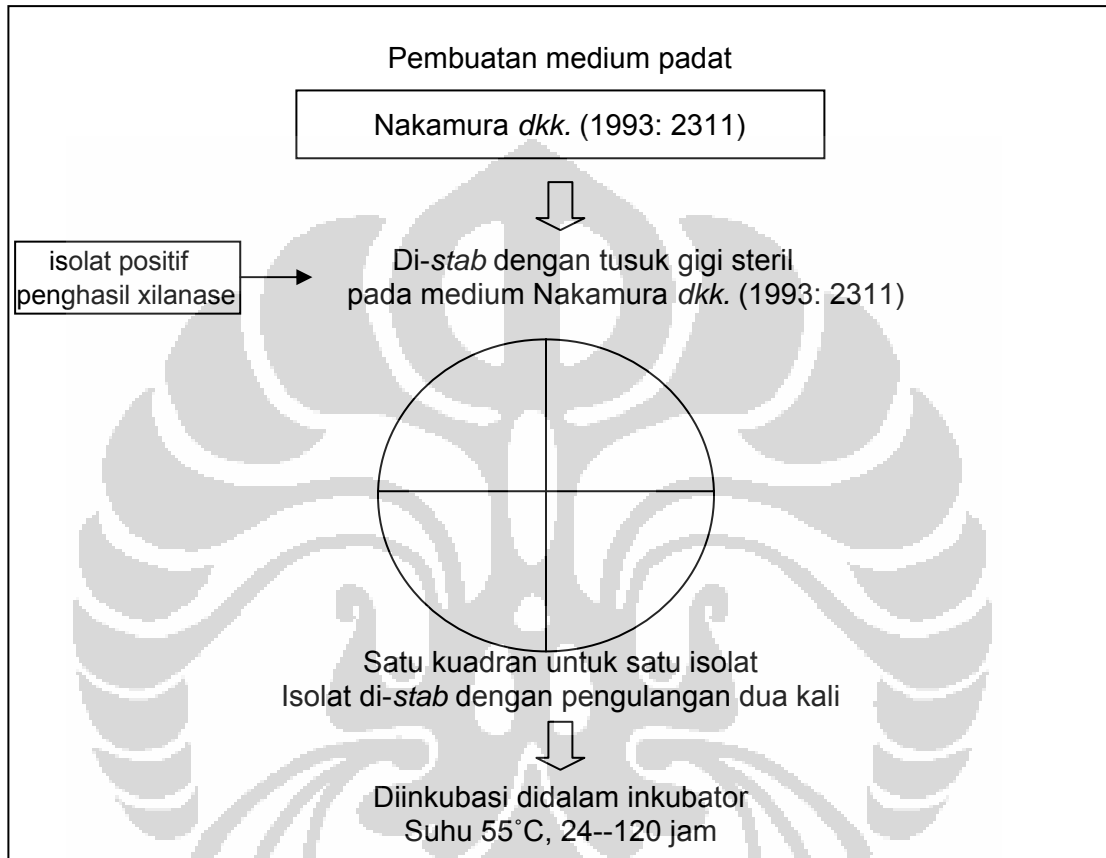
- streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp. *Appl. Ecol. & Environ. Res.* **4**(1): 151--160.
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia enzim*. Widya Medika, Jakarta: x + 379 hlm.
- Samain, E., Ph. Debeire & J.P. Touzel. 1997. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch culture of a thermophilic *Bacillus* strain. *J. Biotechnol.* **58**: 71--78.
- Sardjoko. 1991. *Bioteknologi: latar belakang dan beberapa penerapannya*. P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: ix + 307 hlm.
- Srinivasan, M.C. & M.V. Rele. 1995. Microbial xylanase for paper industry. *Ind. J. Microbiol.* **35**: 93--101.
- Stauffer, C.E. 1998. *Enzyme assay for food scientists*. Van Nostrand Reinhold, New York: v + 342 hlm.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor: vi + 322 hlm.
- Sunna, A., S.G. Prowe, T. Stoffregen & G. Antranikian. 1997. Characterization of the xylanases from the novel isolated thermophilic xylan-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d and *Bacillus flavothermus* strain LB3A. *FEMS Microbiol Lett.* **148**: 209--216.
- Touzel, J.P., O.D. Michael, D. Philippe, S. Eric & B. Christelle. 2000. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *Int. J. Sys. & Evol. Microbiol.* **50**: 315--320.

- Velázquez, E., M. Trinidad, P. Margarita, R. Raúl, R.M. Ramón & G.V. Tomás. 2004. *Paenibacillus favisporus* sp. Nov., a xylanolytic bacterium from cow faeces. *Int. J. Sys. & Evol. Microbiol.* **54**: 59--64.
- Viihari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist & M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 335--350.
- WALHI. 1994. Mencari alternative klorin. 1994: 1 hlm.  
<http://www.walhi.or.id/kampanye/cemar/industri/>, 26 Mei 2008, pk. 11.30.
- Whitehead, T.R. & R.B. Hespell. 1990. The genes for three xylan-degrading activities from bacteroides ovatus are clustered in a 3.8-kilobase region. *J. Bacteriol.* **172**(5): 2408--2412.
- Winarno, F.G. 1995. *Enzim pangan*. PT. Gramedia, Jakarta: xii + 115 hlm.
- Worthington. 2004. Introduction to enzyme. 2004: 17 hlm.  
<http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/Enzymes.pdf>, 29 November 2007, pk. 21.14.
- Yang, V.W., Z. Zhuang, G. Elegir & T.W. Jeffries. 1995. Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp. *J. Industrial Microbiol.* **15**: 434--441.

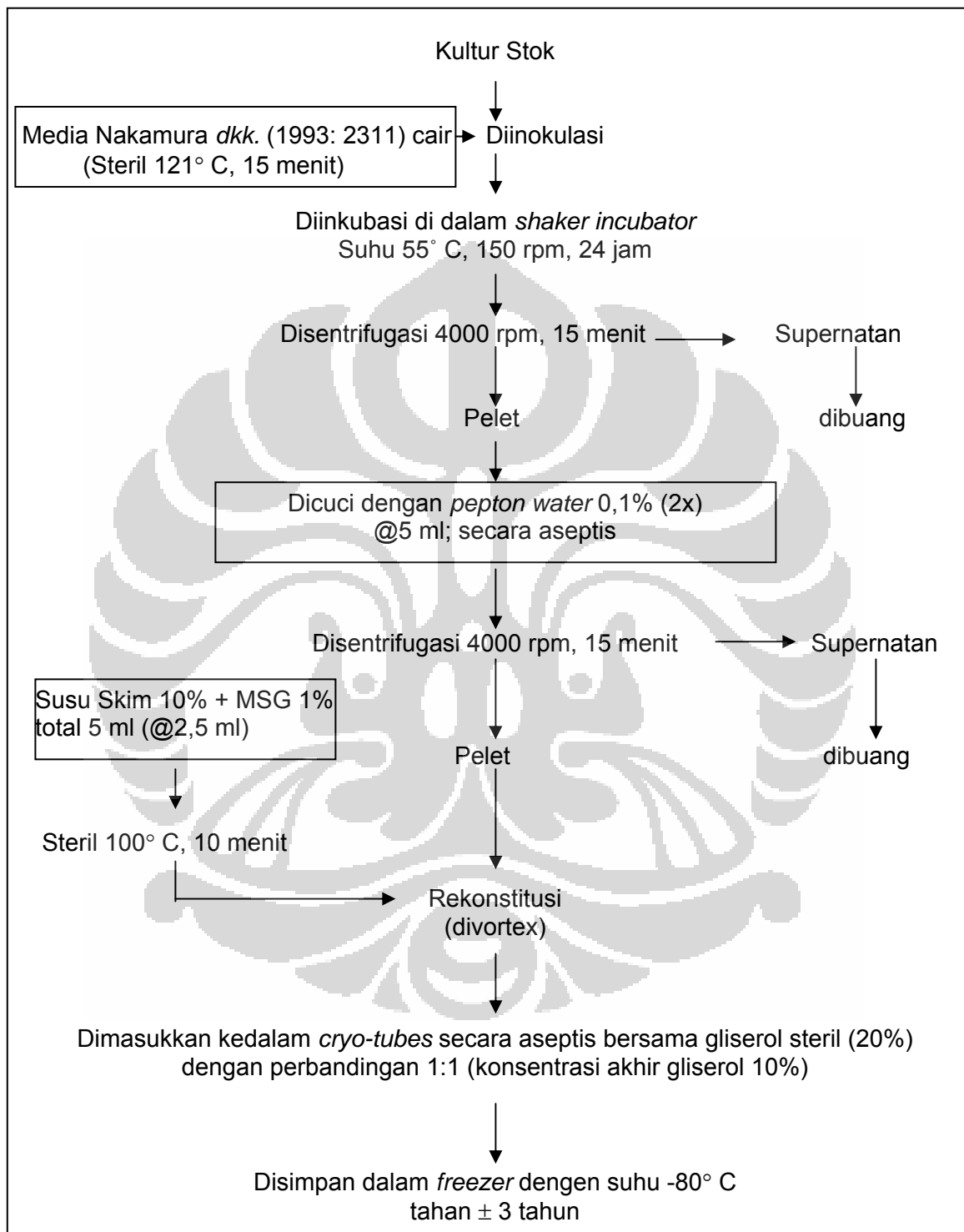




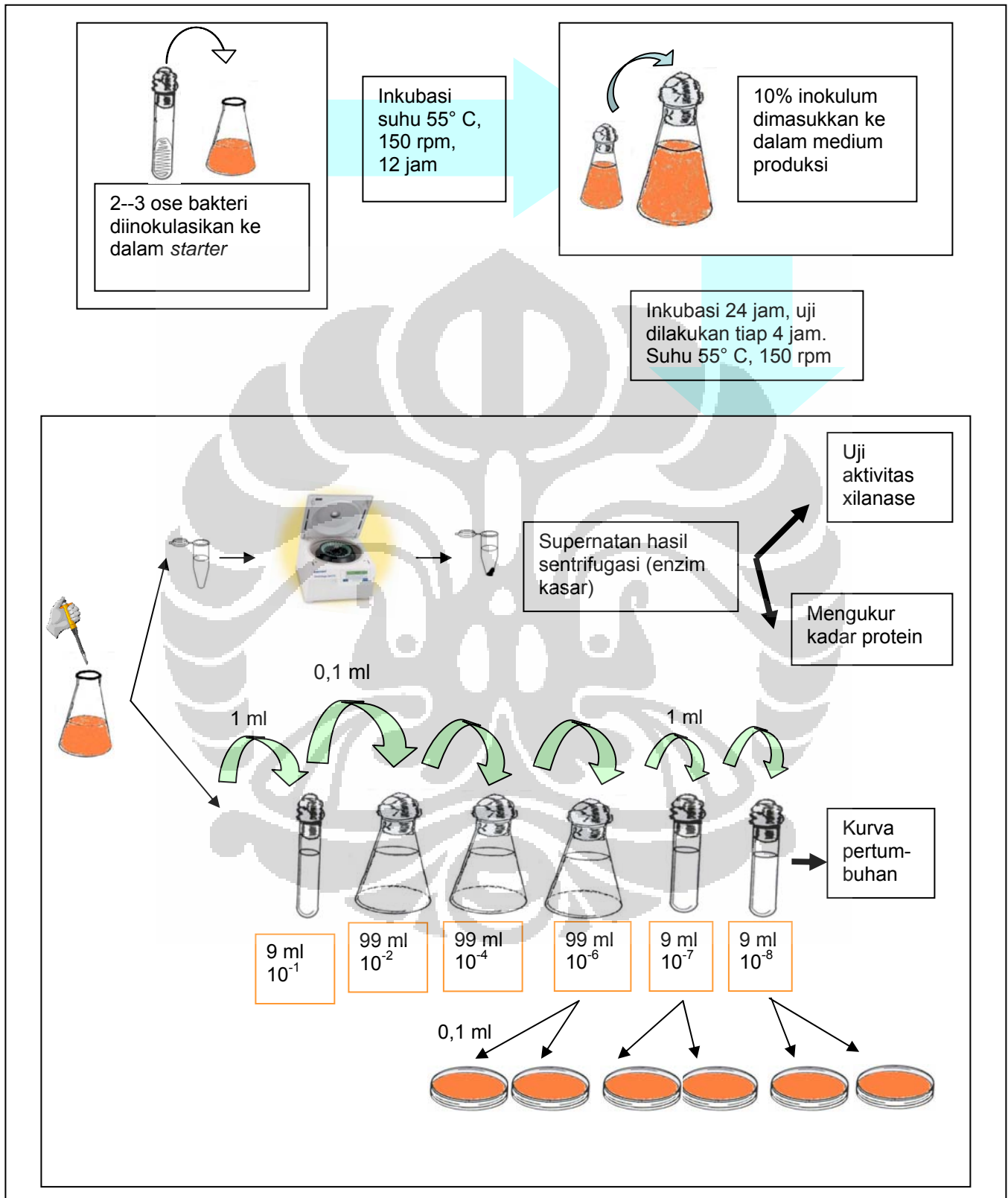
Gambar 1. Struktur xilan dan enzim penghidrolisis xilan  
[Sumber: Modifikasi Beg *dkk.* 2001: 327.]



Gambar 2. Pengukuran indeks xilanolitik

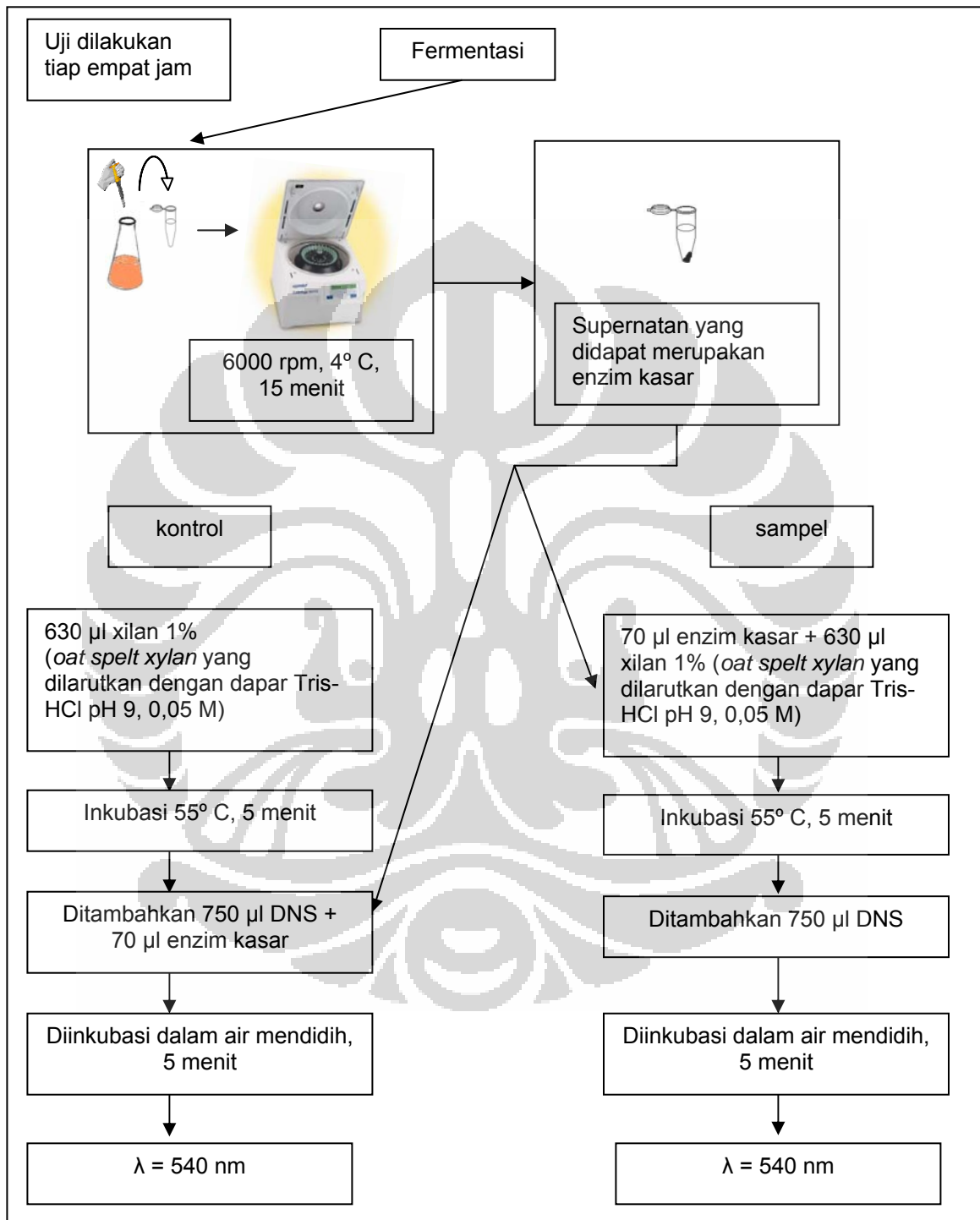


Gambar 3. Skema pembuatan *stock culture* dalam medium gliserol  
[Sumber : Pelatihan penyimpanan isolat Teknologi Pangan UGM 2003.]

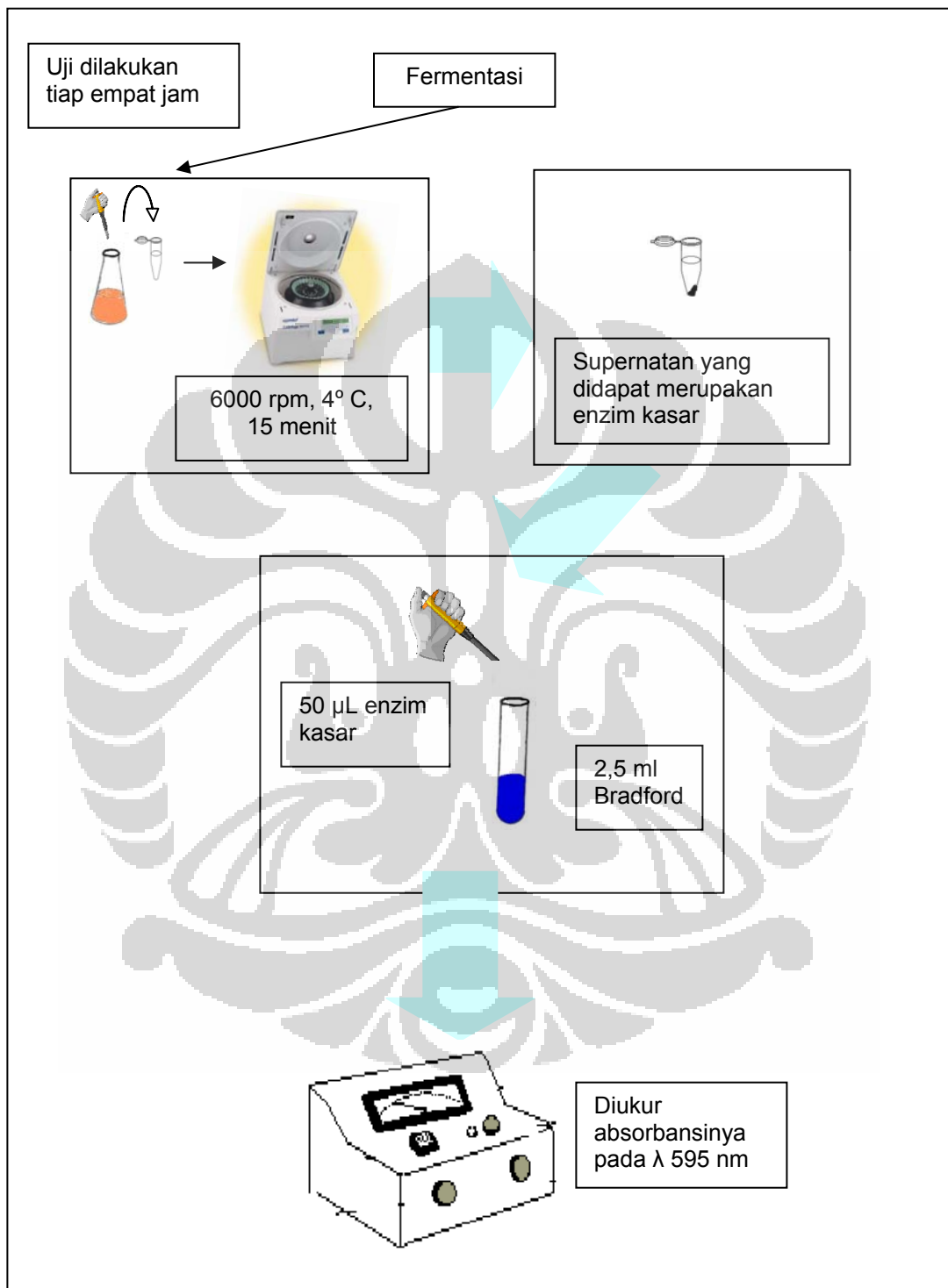


Gambar 4. Skema penelitian

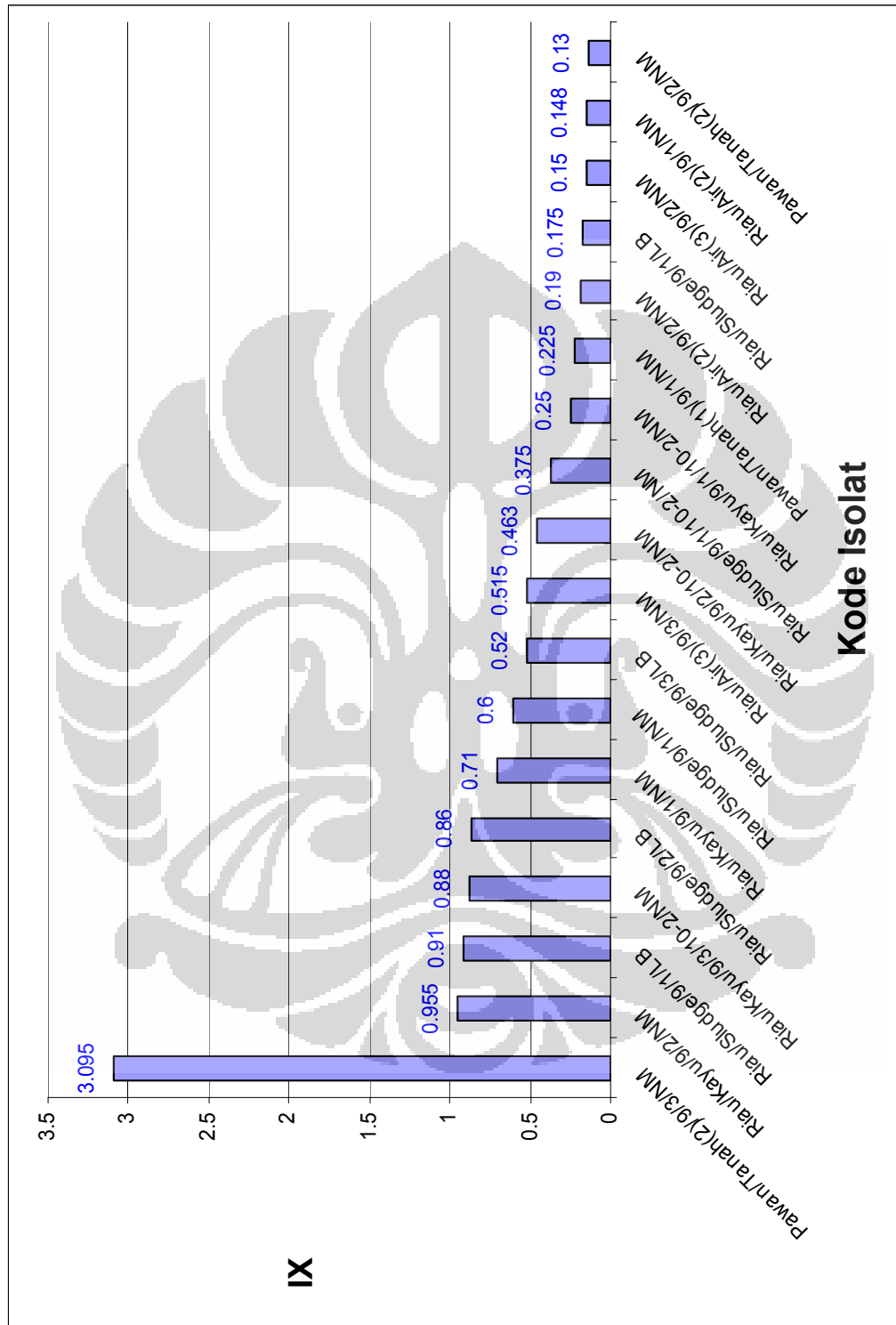




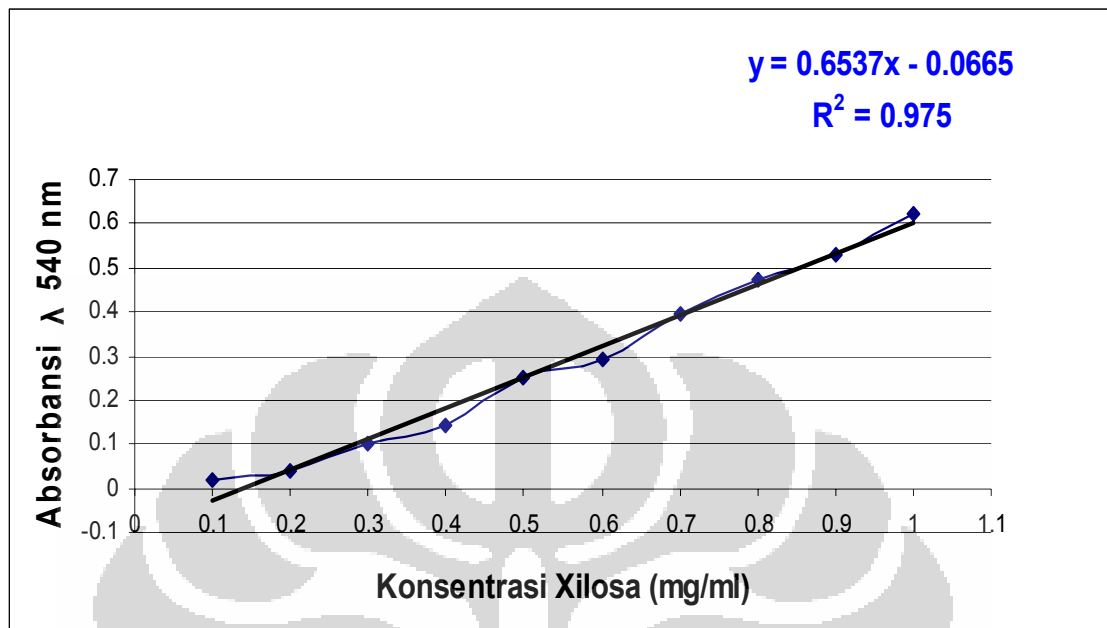
Gambar 5. Skema pengujian aktivitas xilanase dengan metode modifikasi Bailey (1992: 261)



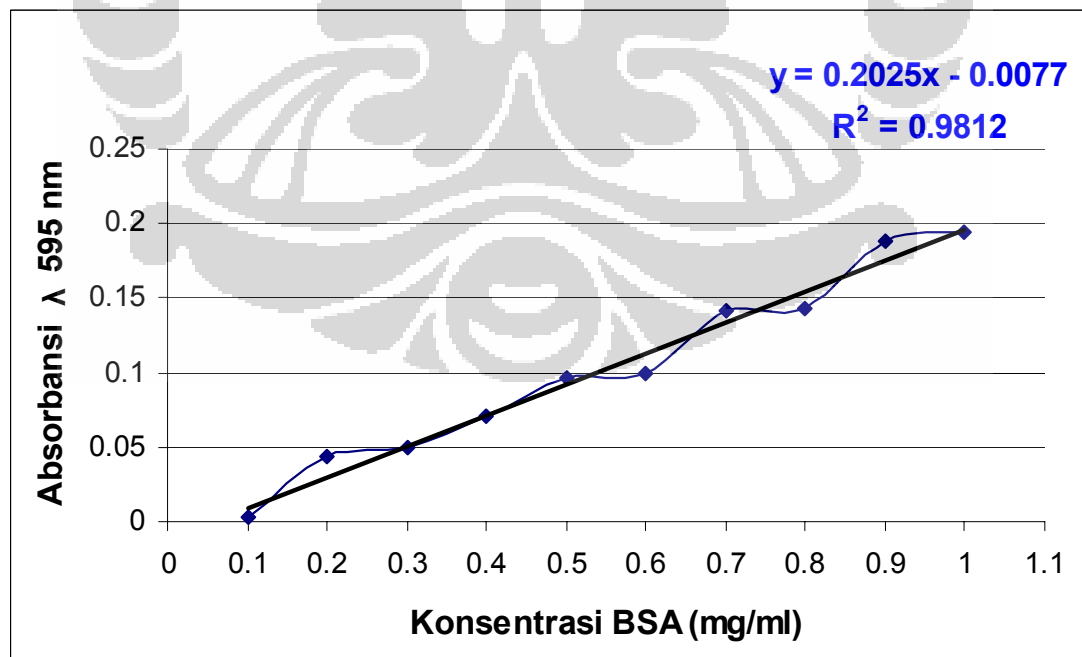
Gambar 6. Skema pengukuran konsentrasi protein dengan metode modifikasi Bradford (1976: 249--250)



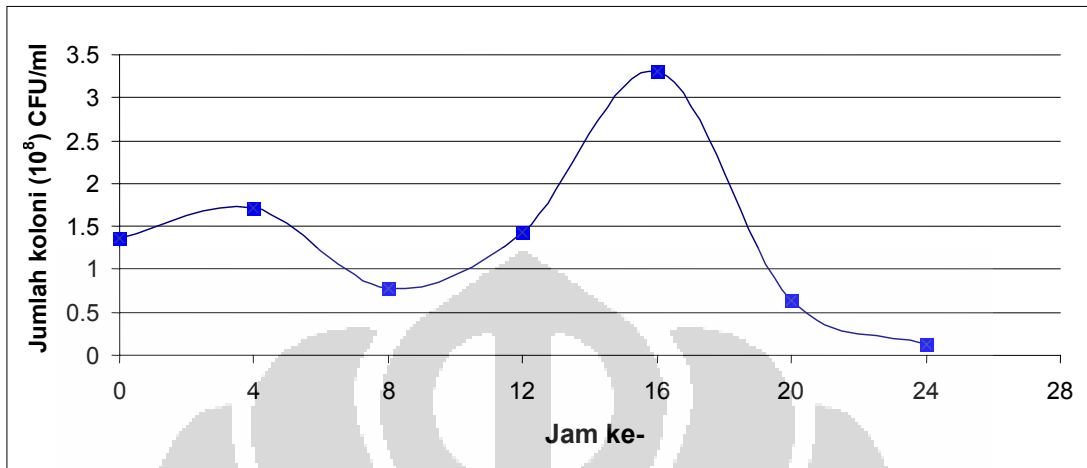
Gambar 7. Diagram batang indeks xilanolitik isolat bakteri dengan metode modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211).



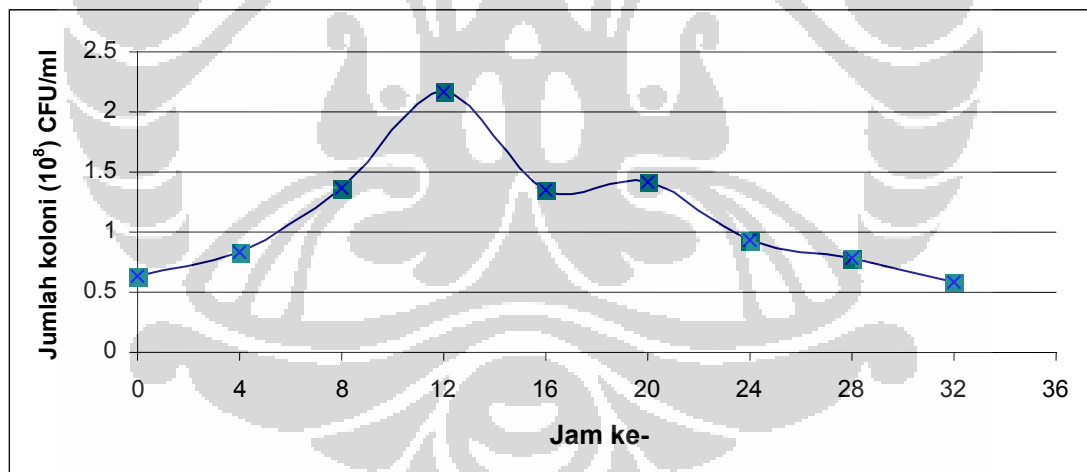
Gambar 8. Kurva standar xilosa



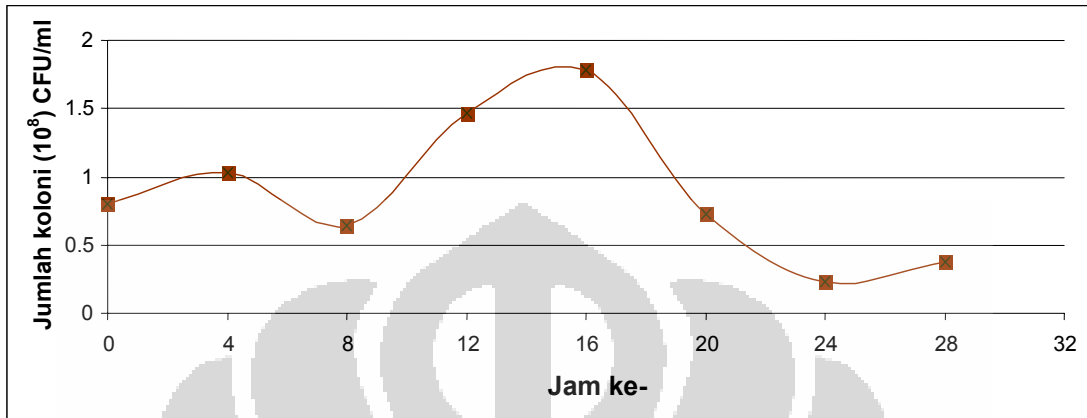
Gambar 9. Kurva standar BSA



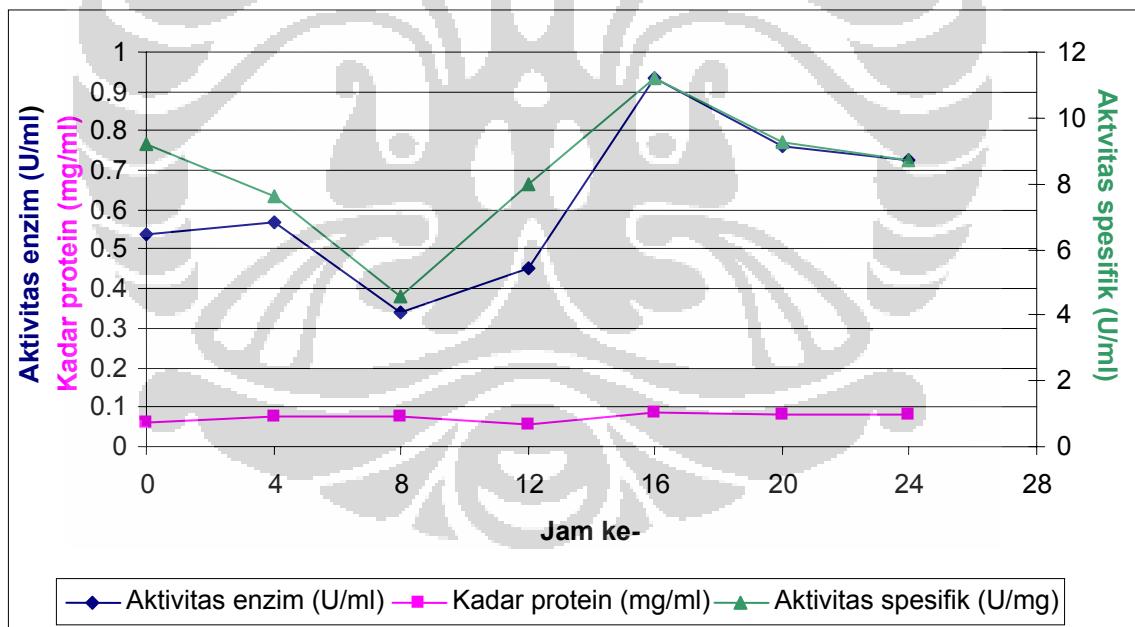
Gambar 10. Kurva pertumbuhan Pawan/Tanah(2)/9/3/NM



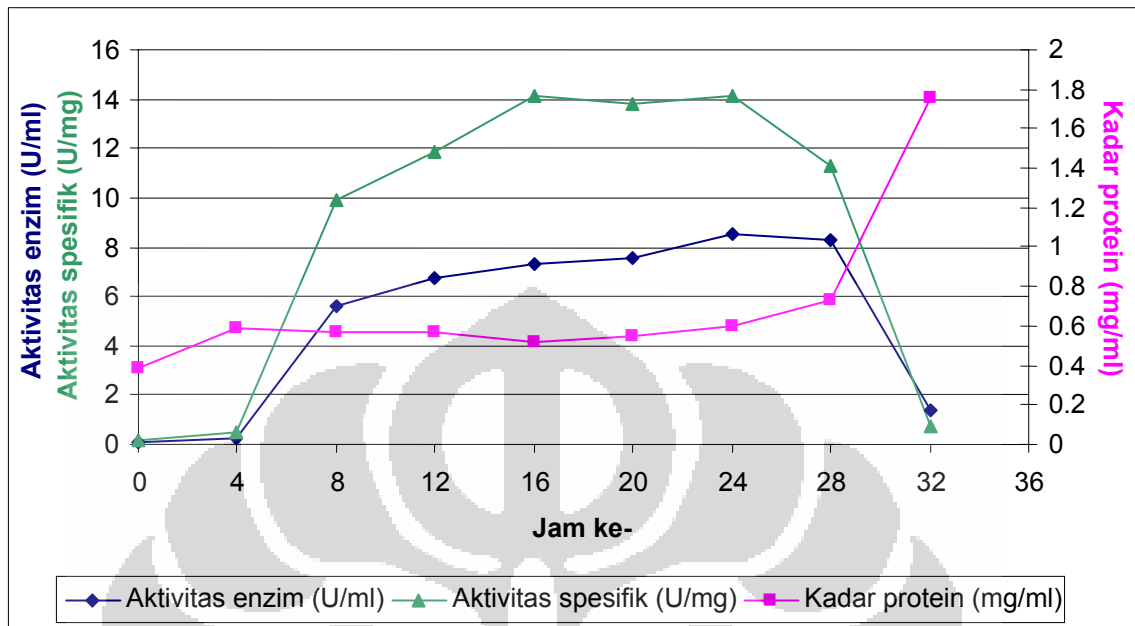
Gambar 11. Kurva pertumbuhan Riau/Kayu/9/2/NM



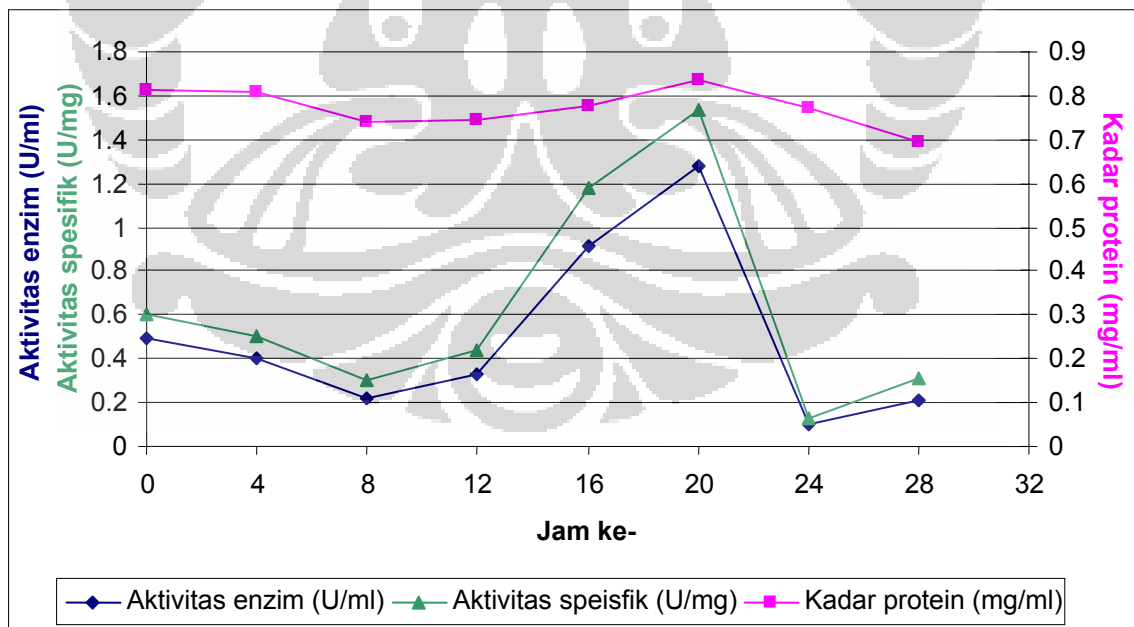
Gambar 12. Kurva pertumbuhan Riau/Sludge/9/1/LB



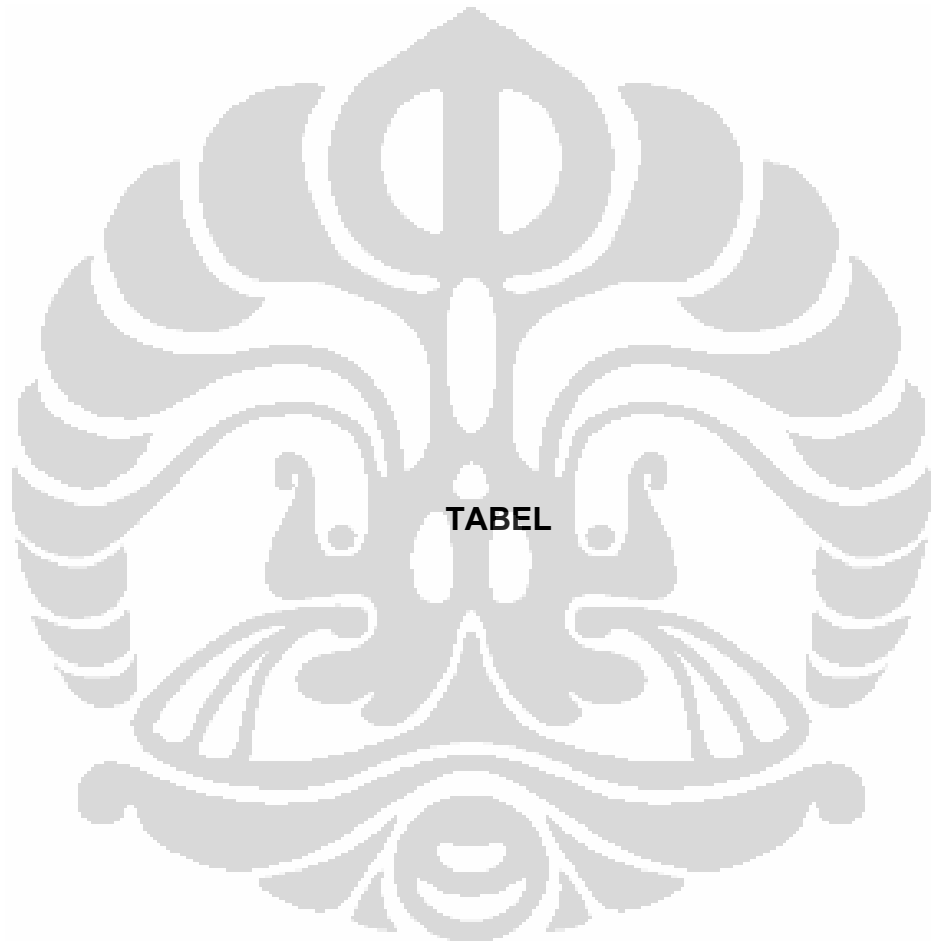
Gambar 13. Kurva produksi Pawan/Tanah(2)/9/3/NM



Gambar 14. Kurva produksi Riau/Kayu/9/2/NM



Gambar 15. Kurva produksi Riau/Sludge/9/1/LB





Tabel 1

Hasil pengukuran indeks xilanolitik menggunakan metode modifikasi Kouker dan Jaeger (1986: 211)

No	Kode Isolat	IAX
1	Pawan/Tanah(2)/9/3/NM	3,095
2	Riau/Kayu/9/2/NM	0,955
3	Riau/Sludge/9/1/LB	0,91
4	Riau/Kayu/9/3/10 <sup>-2</sup> /NM	0,88
5	Riau/Sludge/9/2/LB	0,86
6	Riau/Kayu/9/1/NM	0,71
7	Riau/Sludge/9/1/NM	0,6
8	Riau/Sludge/9/3/LB	0,52
9	Riau/Air(3)/9/3/NM	0,515
10	Riau/Kayu/9/2/10 <sup>-2</sup> /NM	0,463
11	Riau/Sludge/9/1/10 <sup>-2</sup> /NM	0,375
12	Riau/Kayu/9/1/10 <sup>-2</sup> /NM	0,25
13	Pawan/Tanah(1)/9/1/NM	0,225
14	Riau/Air(2)/9/2/NM	0,19
15	Riau/Air(3)/9/2/NM	0,15
16	Riau/Air(2)/9/1/NM	0,148
17	Pawan/Tanah(2)/9/2/NM	0,13
18	Pawan/Tanah-Air(1)/9/NM	0,11

Keterangan :

- Pawan/Tanah(2)/9/3/NM = sampel Pawan dari tanah (ke-2) pH 9 no.3 medium isolasi Nakamura  
 Riau/Kayu/9/2/NM = sampel Riau dari kayu pH 9 no. 2 medium isolasi Nakamura  
 Riau/Sludge/9/1/LB = sampel Riau dari lumpur pH 9 no.1 medium isolasi Luria Bertani

Riau/Kayu/9/3/10 <sup>-2</sup> /NM	= sampel Riau dari kayu pH 9 no.3 isolasi dengan pengenceran 10 <sup>-2</sup> dan menggunakan medium Nakamura
Riau/Sludge/9/2/LB	= sampel Riau dari lumpur ph 9 no. 2 medium isolasi Luria Bertani
Riau/Kayu/9/1/NM	= sampel Riau dari kayu pH 9 no. 1 medium isolasi Nakamura
Riau/Sludge/9/1/NM	= sampel Riau dari lumpur pH 9 no. 1 medium isolasi Nakamura
Riau/Sludge/9/3/LB	= sampel Riau dari lumpur pH 9 no. 3 medium isolasi Luria Bertani
Riau/Air(3)/9/3/NM	= sampel Riau dari air (ke-3) pH 9 no. 3 medium isolasi Nakamura
Riau/Kayu/9/2/10 <sup>-2</sup> /NM	= sampel Riau dari kayu pH 9 no. 2 isolasi dengan pengenceran 10 <sup>-2</sup> dan medium Nakamura
Riau/Sludge/9/1/10 <sup>-2</sup> /NM	= sampel Riau dari lumpur pH 9 no. 1 isolasi dengan pengenceran 10 <sup>-2</sup> dan medium Nakamura
Riau/Kayu/9/1/10-2/NM	= sampel Riau dari kayu pH 9 no. 1 isolasi dengan pengenceran 10-2 dan medium Nakamura
Pawan/Tanah(1)/9/1/NM	= sampel Pawan dari tanah (ke-1) pH 9 no. 1 medium isolasi Nakamura
Riau/Air(2)/9/2/NM	= sampel Riau dari air (ke-2) pH 9 no. 2 medium isolasi Nakamura
Riau/Air(3)/9/2/NM	= sampel Riau dari air (ke-3) pH 9 no. 2 medium isolasi Nakamura
Riau/Air(2)/9/1/NM	= sampel Riau dari air (ke-2) pH 9 no. 1 medium isolasi Nakamura
Pawan/Tanah(2)/9/2/NM	= sampel Pawan dari tanah (ke-2) pH 9 no. 2 medium isolasi Nakamura
Pawan/Tanah-Air(1)/9/NM	= sampel Pawan dari campuran tanah dan air (ke-1) pH 9 medium isolasi Nakamura

Tabel 2

Variasi konsentrasi kurva standar xilosa

<b>Konsentrasi (mg/ml)</b>	<b>Stok xilosa (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Dapar Tris-HCl (<math>\mu</math>l)</b>
0	0	1000
0,1	10	990
0,2	20	980
0,3	30	970
0,4	40	960
0,5	50	950
0,6	60	940
0,7	70	930
0,8	80	920
0,9	90	910
1	100	900

Konsentrasi stok xilosa 10mg/ml.

Tabel 3

Absorbansi xilosa dalam berbagai konsentrasi  
(kurva standar xilosa) pada  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi xilosa (mg/ml)	Absorbansi ( $\lambda$ 540 nm)
0,1	0,019
0,2	0,040
0,3	0,099
0,4	0,140
0,5	0,253
0,6	0,291
0,7	0,398
0,8	0,471
0,9	0,530
1	0,621

Tabel 4

Variasi konsentrasi kurva standar BSA,  
konsentrasi stok BSA 0,3 mg/ml

<b>Konsentrasi (mg/ml)</b>	<b>Stok xilosa (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Dapar Tris-HCl (<math>\mu</math>l)</b>
0	0	1000
0,03	10	990
0,06	20	980
0,09	30	970
0,12	40	960
0,15	50	950
0,18	60	940
0,21	70	930
0,24	80	920
0,27	90	910
0,3	100	900

Tabel 5

Absorbansi BSA dalam berbagai konsentrasi  
(kurva standar BSA) pada  $\lambda$  595 nm

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi ( $\lambda$ 595 nm)
0,1	0,003
0,2	0,043
0,3	0,049
0,4	0,071
0,5	0,097
0,6	0,099
0,7	0,141
0,8	0,143
0,9	0,188
1	0,195

Tabel 6

Data jumlah koloni dari isolat Riau/Kayu/9/2/NM, Pawan/Tanah(2)/9/3/NM,  
dan Riau/Sludge/9/1/LB dengan metode TPC

Jam ke-	$\Sigma$ ( $10^8$ ) CFU/ml Pawan/Tanah(2)/9/3/NM	$\Sigma$ ( $10^8$ ) CFU/ml Riau/Kayu/9/2/NM	$\Sigma$ ( $10^8$ ) CFU/ml Riau/Sludge/9/1/LB
0	1,36	0,64	0,80
4	1,71	0,83	1,03
8	0,78	1,36	0,64
12	1,44	2,17	1,47
16	3,30	1,35	1,78
20	0,63	1,42	0,73
24	0,12	0,94	0,23
28		0,78	0,38
32		0,59	

Tabel 7

Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM

<b>Jam ke-</b>	<b>Aktivitas enzim (U/ml)</b>	<b>Kadar protein (mg/ml)</b>	<b>Aktivitas spesifik (U/mg)</b>
0	0,540 ± 0,060	0,059 ± 0.022	9,148
4	0,579 ± 0,044	0,075 ± 0.021	7,756
8	0,318 ± 0,033	0,074 ± 0.012	4,323
12	0,463 ± 0,017	0,057 ± 0.018	8,145
16	0,917 ± 0,093	0,084 ± 0.016	10,973
20	0,782 ± 0,044	0,083 ± 0.013	9,468
24	0,733 ± 0,087	0,083 ± 0.006	8,831

Tabel 8

Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Riau/Kayu/9/2/NM

<b>Jam ke-</b>	<b>Aktivitas enzim (U/ml)</b>	<b>Kadar protein (mg/ml)</b>	<b>Aktivitas spesifik (U/mg)</b>
0	0,048 ± 0,020	0,382 ± 0,049	0,126
4	0,280 ± 0,121	0,586 ± 0,091	0,477
8	5,615 ± 0,326	0,566 ± 0,022	9,914
12	6,773 ± 0,077	0,571 ± 0,095	11,855
16	7,275 ± 0,385	0,515 ± 0,038	14,138
20	7,545 ± 0,329	0,547 ± 0,025	13,802
24	8,529 ± 0,093	0,603 ± 0,003	14,153
28	8,269 ± 0,521	0,731 ± 0,111	11,311
32	1,341 ± 0,110	1,755 ± 0,032	0,764



Tabel 9

Data aktivitas xilanase, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat Riau/*Sludge/9/1/LB*

Jam ke-	Aktivitas enzim (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0,492 ± 0,000	0,812 ± 0.067	0,606
4	0,405 ± 0,077	0,810 ± 0.069	0,500
8	0,222 ± 0,044	0,739 ± 0.119	0,300
12	0,328 ± 0,067	0,746 ± 0.128	0,440
16	0,917 ± 0,073	0,779 ± 0.084	1,177
20	1,283 ± 0,060	0,836 ± 0.084	1,534
24	0,096 ± 0,044	0,774 ± 0.027	0,125
28	0,212 ± 0,093	0,693 ± 0.097	0,306



## Lampiran 1

Pembuatan larutan dan bahan untuk aktivitas dan kadar protein xilanase

---

Substrat xilan *oat spelt* 1% dalam dapar Tris-HCl 50 mM pH 9 diperoleh dengan melarutkan xilan sebanyak 1,0 g dalam 100 ml larutan dapar Tris-HCl. Larutan dipanaskan hingga mendidih pada *hot plate magnetic stirrer*. Larutan kemudian didinginkan dan diaduk selama satu malam.

Larutan dinitro asam salisilat (*3,5 Dinitro Salicylic acid*), dibuat dengan cara menimbang 10 g DNS, 10 g NaOH, dan 2 g fenol, lalu melarutkannya ke dalam 250 ml air mili-Q. Larutan tersebut selanjutnya disebut larutan A. Larutan B dibuat dengan cara menimbang 400 g garam Rochell (K-Na tartrate) dan 0,5 g natrium sulfit lalu melarutkannya ke dalam 250 ml air mili-Q. Larutan A dan B dimasukkan ke dalam labu ukur 1 l, kemudian kedua larutan tersebut ditambahkan volumenya dengan air mili-Q hingga 1 l dan dihomogenkan.

Pereaksi Bradford dibuat dengan 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 ditambah 50 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan dengan 100 ml asam fosfat 85%, volume ditepatkan menjadi 1 l.

## Lampiran 2

Pengukuran aktivitas xilanase dengan metode  
Bailey (1992: 261) yang dimodifikasi

---

Pereaksi	Sampel ( $\mu$ l)	Kontrol ( $\mu$ l)	Blanko ( $\mu$ l)
Substrat ( <i>oat spelt xylan</i> 1% dalam 50 mM dapar Tris-HCl)	630	630	630
Enzim kasar	70	-	-
Diinkubasi pada suhu 55° C selama 5 menit.			
Dapar 50 mM Tris-HCl	-	-	70
DNS	750	750	750
Enzim kasar	-	70	-
Diinkubasi selama 5 menit dalam air mendidih kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang.			
Disentrifugasi pada 5000 rpm, 15 menit, dan 20° C. Diukur absorbansinya pada $\lambda$ 540 nm.			

## Lampiran 3

Penghitungan *generation time*

Rumus *generation time*, berdasarkan Pelczar dan Chan (1986: 102):

$$G = \frac{t}{3,3 \log (b/B)}$$

Keterangan:

- G = *Generation time*  
 t = interval waktu  
 B = populasi awal  
 b = populasi pada waktu-t  
 3,3 = nilai konversi

Isolat Pawan/Tanah(2)/9/3/NM

$$G = \frac{8}{3,3 \log (3,30 \times 10^8 / 0,78 \times 10^8)}$$

$$= 3,870 \text{ jam}$$

Isolat Riau/Kayu/9/2/NM

$$G = \frac{12}{3,3 \log (2,17 \times 10^8 / 0,64 \times 10^8)}$$

$$= 6,857 \text{ jam}$$

Isolat Riau/Sludge/9/1/LB

$$G = \frac{8}{3,3 \log (1,78 \times 10^8 / 0,64 \times 10^8)}$$

$$= 5,457 \text{ jam}$$