

## SELEKSI DAN FORMULASI MEDIA PERTUMBUHAN BAKTERI PENGHASIL XILANASE

Nur Richana<sup>1</sup>, Tun Tedja Irawadi<sup>2</sup>, Anwar Nur<sup>2</sup>, Illah Sailah<sup>3</sup>, dan Khaswar Syamsu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapenen Pertanian

<sup>2</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Seleksi bakteri penghasil xilanase dan formulasi media pertumbuhan bakteri penghasil xilanase telah dilakukan di Laboratorium Bioproses, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapenen Pertanian. Seleksi isolat bakteri dilakukan terhadap lima isolat penghasil xilanase yaitu RXAI-5, RXAII-5, RXAIII-1, RXAIII-5 dan RXNI-3, dengan membandingkan hasil kultivasi meliputi biomasa, protein terlarut, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik. Formulasi media dilakukan dengan mengoptimasi konsentrasi peptone, ekstrak khamir sebagai sumber nitrogen dan *oat spelt xylane* sebagai sumber karbon. Analisis percobaan menggunakan rancangan acak faktorial, faktor (A) peptone terdiri atas empat taraf yaitu A1=0, A2=0,1; A3=0,3; A4=0,5%. Faktor (B) ekstrak khamir terdiri atas tiga taraf (B1=0,1; B2=0,2; B3=0,3%) dan faktor (C) *oat spelt xylane* terdiri atas tiga taraf (C1=0,5; C2=0,75; C3=1,0%) dengan tiga kali ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri *Bacillus pumilus* RXAIII-5 dinyatakan sebagai isolat bakteri unggul diantara kelima isolat bakteri penghasil xilanase. Pada formulasi media ternyata protein terlarut tertinggi (0,596 g/l) pada media dengan komposisi 0,75% xilan, pepton 0,5%, ekstrak khamir 0,2%. Aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik tertinggi berturut-turut ialah 186,37 U/ml dan 436,45 U/mg protein. Keduanya dicapai pada komposisi media yang sama yaitu pepton 0,1%, ekstrak khamir 0,1%, dan xilan 0,5%. Dengan demikian komposisi tersebut merupakan komposisi media terpilih yang optimum. Isolat bakteri unggul bersifat alkali ini diharapkan dapat menghasilkan xilanase yang tahan pada pH tinggi sehingga dapat digunakan untuk proses pemutihan kertas yang ramah lingkungan.

**Kata kunci:** xilanase, bakteri, media pertumbuhan

**ABSTRACT.** Nur Richana, Tun Tedja Irawadi, Anwar Nur, Illah Sailah and Khaswar Syamsu. 2006. Selection and growth medium-formulation of xylanase producing bacterium. This research was carried out in the bioprocess laboratory of Indonesian Center for Agricultural Postharvest Research and Development, Bogor. Selection of five isolates (RXAI-5, RXAII-5, RXAIII-1, RXAIII-5 and RXNI-3), xylanase producing bacteria were based on comparative study of cultivation yield consists of biomass of bacterium cells, dissolved protein, xylanase activity and specific activity. Formulation of growth medium using peptone and yeast extract as nitrogen source and oat spelt xylan as carbon source. Design experiment used at formulation of growth medium was randomized factorial design, with factor(A) peptone consist of four level, A1=0, A2=0.1; A3=0.3; A4=0.5%, factor (B) yeast extract consist of third level (B1=0.1; B2=0.2; B3=0.3%) and factor (C) oat spelt xylan consist of three level (C1=0.5; C2=0.75; C3=1.0%), with three replication. Research result showed that *Bacillus pumilus* RXAIII-5 is the best bacterium isolate among five isolates of xylanase producing bacteria. In growth medium formulation showed that highest dissolved protein (0.596 g/l) was achieved in the medium containing 0.75% xylan, 0.5% pepton, and 0.2% yeast extract. The highest value of both of xylanase activity and specific activity are 186.37 u/ml and 436.45 U/ml respectively. In fact these were reached at similar growth medium composition of 0.1% pepton, 0.1% yeast extract, and 0.5% xylan, and consequently became the best of growth media formulation. The potential alcaliphilic bacterial isolate is expected to produce xylanase with high pH stability. The enzyme can be used as environmentally safe agent for paper bleaching.

**Keywords:** xylanase, bacteria, growth medium

### PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Penggantian penggunaan khlorin dengan enzim xilanase untuk pemutihan *pulp*, telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi dan sekarang telah digunakan pada beberapa pabrik kertas (Arribas *et al.* 1995, Bourbonnais *et al.* 1997). Untuk proses pembuatan kertas diharapkan xilanase yang digunakan adalah yang termostabil dan tahan pada pH alkali (Nakamura *et al.* 1993). Jumlah pabrik kertas yang sudah beroperasi di Indonesia saat ini lebih dari 14 perusahaan, dan belum

banyak yang menggunakan proses enzimatik dalam proses pemutihan. Dengan demikian untuk mendukung pelestarian lingkungan maka perlu segera diaplikasikan proses ramah lingkungan tersebut di Indonesia.

Xilanase komersial untuk proses pemutihan *pulp* pertama kali dipasarkan oleh Novo Nordisk A/s dengan nama Pulpzyme HA, yang berasal dari *Trichoderma reesei*. Setelah itu bermunculan nama-nama lain yang semuanya telah dicoba dalam proses pemutihan *pulp* dan hasilnya menunjukkan penurunan yang nyata terhadap penggunaan ClO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Namun demikian semua enzim komersial masih belum memenuhi kriteria ideal yang dibutuhkan untuk aktivitas enzimatik yang diperlukan

yaitu aktivitas optimum pada pH 10 dan suhu lebih dari 90°C (Kulkarni *et al.*, 1999). Oleh karena itu masih diperlukan untuk mencari strain mikroorganisme unggul alkalofilik termofilik. Dilain pihak pakar dari negara maju mengakui bahwa negara yang kaya akan keanekaragaman hayatinya, termasuk Indonesia, merupakan sumber mikroorganisme maupun tanaman yang potensial untuk bioproses (Fox, 1994).

Zat makanan utama bagi pertumbuhan mikroorganisme adalah sumber karbon, nitrogen dan komponen mineral terutama fosfat. Produksi xilanase oleh mikroorganisme menggunakan substrat xilan sebagai sumber karbon. Xilan merupakan polimer kompleks dari xilosa sebagai komponen utama. Pada umumnya substrat yang digunakan untuk media pertumbuhan mikroorganisme penghasil xilanase pada skala laboratorium adalah xilan komersial dari *Sigma* yaitu *oat spelt xylan* atau *birchwood xylan*.

Sumber nitrogen dipergunakan sebagai nutrisi cadangan apabila karbon dalam media mulai menipis. Sebagai sumber nitrogen biasanya digunakan garam amonium, urea, ekstrak khamir dan pepton. Ekstrak khamir mengandung asam amino, peptida, vitamin dan karbohidrat. Komposisi penggunaan ekstrak khamir yang tepat sangat diperlukan dalam proses kultivasi. Hal tersebut disebabkan penggunaan jumlah ekstrak khamir yang cukup tinggi akan menyebabkan timbulnya buih pada media kultivasi jika diaduk, karena pengadukan akan menyebabkan protein dalam media kontak dengan udara (Suhartono, 1989).

Pepton (hidrolisat protein) sering digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme tetapi relatif mahal untuk diaplikasikan pada skala industri. Sumber pepton di antaranya adalah daging, kasein, gelatin, kreatin, dan biji-bijian. Komposisi pepton bervariasi tergantung dari asalnya. Pepton dan gelatin kaya akan prolin dan hidroprolin, tetapi hampir tidak ada asam amino mengandung sulfur. Sedangkan pepton dari kreatin kaya akan prolin dan sistein tetapi kurang lisin (Crueger dan Crueger, 1984).

Substrat yang digunakan dalam proses kultivasi berpengaruh terhadap aktivitas dan produktivitas enzim. Adanya substrat tertentu di dalam medium produksi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresi metabolit selnya (Boing, 1982). Formulasi media dalam pertumbuhan dan produksi hasil kultivasi merupakan suatu tahap penting dalam mendesain percobaan dalam skala kerja (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi keanekaragaman hayati dengan mendapatkan strain mikroorganisme alkalofilik penghasil xilanase serta mengetahui media yang optimal untuk pertumbuhannya.

## BAHATAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioproses Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Lingkup penelitian meliputi seleksi dan identifikasi bakteri penghasil xilanase, serta formulasi media. Bahan yang digunakan yaitu *oat spelt xylan* berasal dari SIGMA, sedangkan isolat bakteri yang digunakan adalah hasil penelitian sebelumnya di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor, yaitu RXAI-5, RXAII-5, RXAIII-1, RXAIII-5 dan RXNI-3. Pengkodean isolat berdasarkan jenis media dan asal contoh tanah yaitu R= Richana, X=xilanase, A= Media alkali pH:9, N= media netral pH 7, sedangkan I, II, dan III = asal contoh tanah (I: tanah kapur Boyolali, II: tanah kapur Purworejo, III: tanah kapur Ciampea) dan nomor 1-5 adalah nomor kode dalam satu cawan petri. Sebagai kontrol digunakan isolat *Clostridium acetobutylicum* ATCC 769 sebagai isolat penghasil xilanase yang diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Veteriner Bogor.

### Seleksi bakteri penghasil xilanase

Seleksi awal dilakukan terhadap lima isolat tersebut berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekeliling koloni pada media padat di petridish yang bersifat alkali. Tahapan ini merupakan langkah awal untuk mengetahui apakah isolat tersebut dapat mendegradasi substrat (xilan) pada media pertumbuhannya. Apabila mampu mendegradasi dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni maka isolat dinyatakan menghasilkan xilanase. Tahapan ini masing-masing isolat dilakukan ulangan sebanyak tiga cawan petri.

Pengujian selanjutnya dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni bakteri dari masing-masing isolat pada media cair. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui seberapa jauh kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan xilanase. Media cair dibuat berdasarkan modifikasi dari Nakamura *et al.* (1993), sebanyak 50 ml dalam erlemeyer. Komposisi media cair untuk satu liter adalah 0,1 g ekstrak khamir, 0,5 g pepton, 0,1 g  $K_2HPO_4$ , 0,02 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dan 0,1 g *oat spelt xylan* (Sigma). Media diatur pH 9,5 dengan penambahan  $Na_2CO_3$ . Konsentrasi inokulan yang digunakan sebanyak 10%. Inkubasi dilakukan pada agitasi 150 rpm suhu 30 - 38°C selama tiga hari. Setelah pemanenan, dilakukan beberapa pengamatan.

Analisis statistik yang digunakan pada tahap ini adalah rancangan acak lengkap dengan perlakuan lima isolat bakteri dan *Cl. Acetobutylicum* ATCC 769 sebagai kontrol dengan empat kali ulangan. Dari percobaan ini diambil satu isolat unggul.

Parameter yang diukur yaitu biomasa dengan mengukur kerapatan optik pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer. Protein terlarut diukur

dengan metode Bradford (1976). Aktivitas xilanase diukur dengan uji kemampuan enzim menghidrolisis xilan menjadi gula reduksi menurut Winterhalter dan Liebl (1995). Analisis gula reduksi dilakukan dengan pereaksi DNS (3,5 dinitro salisilic acid) dan berdasarkan serapannya pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai standar digunakan deret standar xilosa. Satu unit aktivitas xilanase adalah sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi (xilosa) sebanyak 1 m mol/menit (Kubata *et al.*, 1992).

#### Identifikasi bakteri unggul penghasil xilanase

Identifikasi dilakukan untuk isolat unggul penghasil xilanase. Pencirian isolat berdasarkan sifat fisiologi. Selanjutnya berdasarkan hasil uji terhadap mikroorganisme tersebut dapat diketahui spesies mikroorganisme dengan menggunakan metode Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, di dalam Buchanan dan Gibbons (1984). Untuk mendukung hasil identifikasi secara sintetik maka dilakukan identifikasi berdasarkan pada sekuen 16S ribosomal RNA.

#### Formulasi media kultivasi produksi xilanase dengan media bersubstrat xilan dari tongkol jagung.

Formulasi media dilakukan dengan cara memvariasi komposisi media untuk pertumbuhan bakteri penghasil xilanase. Rancangan penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan acak faktorial, faktor (A) peptone terdiri atas 4 taraf yaitu A1=0, A2=0,1; A3=0,3; A4=0,5%. Faktor (B) ekstrak khamir terdiri atas 3 taraf (B1=0,1; B2=0,2; B3=0,3%) dan faktor (C) *oat spelt xylane* terdiri atas 3 taraf (C1=0,5; C2=0,75; C3=1,0%) dengan tiga kali ulangan. Kultivasi dilakukan di dalam labu erlemeyer 100 ml menggunakan konsentrasi inokulan 10%.

Isolat bakteri terpilih diuji kemampuannya menghidrolisis *oat spelt xylan* tersebut, dengan mengukur aktivitas xilanase dan kandungan protein terlarut. Sampel dipanen sesudah 3 hari inkubasi, kemudian diukur protein terlarut dengan metode Bradford (1976) dan aktivitas enzim xilanase menurut Winterhalter dan Liebl (1995).

Tabel 1. Seleksi isolat bakteri alkalofilik penghasil xilanase.

Table 1. Selection of alcaliphilic bacteria isolates xylanase producer

Kode isolate Isolate code	Biomasa (mg/ml) Biomassa (mg/ml)	Protein terlarut (mg/ml) Soluble Protein (mg/ml)	Aktiv. Xilanase (U/ml) Xylanase activity (U/ml)	Aktiv. Spesifik (U/mg protein) Specific activity (U/mg protein)
RXA1-5	0,0894	0,295	25,07	91,84
RXAII-5	0,0490	0,365	22,26	64,09
RXAIII-1	0,1096	0,310	22,48	74,30
RXAIII-5	0,0864	0,317	75,31	236,04
RXNI-3	0,0504	0,286	25,58	103,45
<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 769	0,098	0,382	72,17	188,93

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata dari empat kali ulangan  
Remarks: These data represent means of four replicates

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi Bakteri Penghasil Xilanase

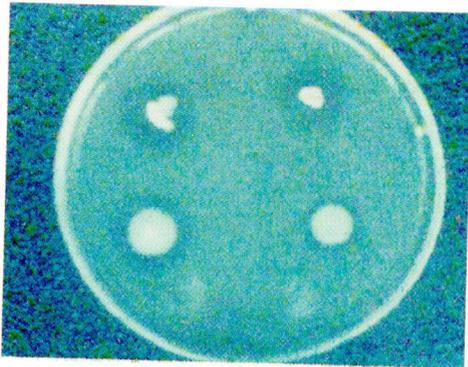
Seleksi dilakukan terhadap lima isolat unggul yang diperoleh dari isolasi bakteri penghasil xilanase yang berasal dari jenis tanah yang berbeda-beda. Penentuan isolat unggul berdasarkan kemampuan bakteri untuk menghidrolisa xilan pada media yang bersifat alkali. Kemampuan bakteri tersebut ditandai dengan adanya zona bening yang dihasilkan disekeliling koloni (Gambar 1.)

Dalam penelitian ini isolasi bakteri berasal dari tanah berkapur dengan pH lebih besar atau sama dengan 7. Hal tersebut dimaksudkan agar memperoleh isolat yang mampu tumbuh pada media ber pH 7 atau lebih. Pada umumnya isolasi bakteri diambil atau berasal dari bahan berlignoselulosa seperti tumpukan limbah pertanian, tetapi biasanya limbah tersebut dalam keadaan asam, pH kurang dari 7. Seperti halnya penelitian Saha (2002) yang juga melakukan isolasi mikroba (*Fusarium proliferatum*) penghasil xilanase dari limbah jagung (silase) dengan pH kurang dari 7, ternyata hasil xilanase ekstraselulernya tumbuh stabil pada pH 5-7,5.

Seleksi dilakukan dengan menguji kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan xilanase. Hasil pengamatan meliputi biomasa, protein terlarut, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik.

### Biomasa

Pengamatan perolehan biomasa dari lima isolat bakteri penghasil xilanase berkisar antara 0,049 sampai 0,1096 g/l (Tabel 1). Perolehan biomasa tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri RXAIII-1 paling baik tumbuh pada media yang digunakan, sedangkan isolat RXAII-5 dan RXNI-3 kurang baik. Sebagai kontrol isolat *Cl. acetobutylicum* ATCC 769 penghasil xilanase menghasilkan biomasa 0,098 dengan media yang sama. Hasil penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan penelitian Lee *et al.* (1985) yaitu produksi xilanase dari *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 yang menghasilkan biomasa antara 0,091 sampai 0,322 g/l.



Gambar 1. Penampakan koloni bakteri penghasil xilanase  
Figure 1. Representation of bacteria colony to produce xylanase

Rendahnya biomasa yang dihasilkan oleh kelima isolat tersebut tidak merupakan kendala utama untuk seleksi, karena yang terpenting dari penelitian ini adalah hasil sekresinya yaitu xilanase. Dengan demikian pemilihan isolat penghasil xilanase diutamakan berdasarkan kualitas sel yang ditunjukkan oleh *yield* dan bukan kuantitas selnya.

#### Protein

Protein terlarut yang dihasilkan merupakan pencerminan dari enzim hasil sekresi bakteri. Enzim tersebut mungkin xilanase atau enzim lainnya. Hal tersebut dapat diketahui dengan melihat data aktivitas xilanasenya. Hasil pengamatan protein terlarut dalam penelitian ini berkisar antara 0,286 sampai 0,365 g/l (Tabel 1). Tertinggi dicapai oleh isolat RXAII-5 dan terendah RXNI-3. Isolat RXNI-3 terendah, mungkin karena kronologis dari isolat tersebut adalah isolat yang diisolasi dengan media netral (pH 7). Namun karena bakteri tersebut mempunyai aktivitas yang tinggi maka potensial untuk dikembangkan, kemudian dimutasi dengan media alkali secara bertahap sehingga mampu tumbuh di media alkali pH 9,5. Namun demikian ternyata isolat tersebut mempunyai kemampuan tumbuh (biomasa) lebih rendah dibanding isolat bakteri yang diisolasi dengan media alkali. Isolat *Cl. acetobutylicum* ATCC 769 ternyata menghasilkan protein terlarut lebih tinggi yaitu 0,382 mg/ml.

#### Aktivitas xilanase

Aktivitas xilanase merupakan pencerminan kemampuan isolat bakteri tersebut dalam menghasilkan xilanase. Semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi xilanase yang dihasilkan. Hasil pengamatan aktivitas xilanase berkisar antara 22,26 sampai 75,31 U/ml (Tabel 1). Tertinggi dicapai oleh isolat RXAIII-5, hasil ini jauh lebih tinggi dibanding isolat lainnya, bahkan bila dibandingkan dengan isolat *Cl. acetobutylicum* ATCC 769 penghasil xilanase juga lebih tinggi atau hampir sama yaitu RXA III-

5 mempunyai aktivitas xilanase 75,31 U/ml sedangkan *Cl. acetobutylicum* ATCC 769 adalah 72,17 U/ml. Sebagai data dukung dilakukan analisis aktivitas enzim dengan metode yang sama dari xilanase (Sigma). Hasil aktivitas enzim tersebut menunjukkan bahwa aktivitas xilanase untuk RXA III-5 setara dengan 23,86 Unit xilanase (Sigma). Aktivitas xilanase dari isolat RXA III-5 masih lebih tinggi dibanding penelitian Dhillon dan Khanma (2000) yaitu xilanase dari *B. circulans* AB16 mempunyai aktivitas 50 U/ml. Demikian juga penelitian Gessesse dan Mamo (1999) aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp 67,24 U/ml.

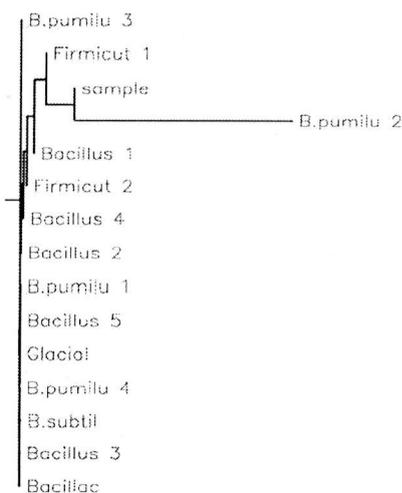
#### Aktivitas spesifik

Aktivitas spesifik merupakan hasil perhitungan aktivitas xilanase dibagi hasil protein terlarut. Data ini mencerminkan kemampuan xilanase tiap satuan proteinnya dalam menghidrolisis xilan. Hasil perhitungan aktivitas spesifik berkisar 64,09 sampai dengan 236,04 U/mg protein. Hasil tertinggi dicapai oleh isolat RXAIII-5, kemudian disusul oleh isolat *Cl. acetobutylicum* ATCC 769, RXNI-3 dan RXAI-5.

Dari hasil penelitian ini, isolat RXNI-3 yang semula mempunyai aktivitas xilanase yang tinggi pada pH netral ternyata juga tinggi pada media ber pH alkali (103,45 U/mg protein). Namun data tersebut masih lebih rendah dibanding isolat RXAIII-5 (Tabel 1).

Tabel 2. Identifikasi isolat bakteri unggul penghasil xilanase  
Table 2. Identification of potential bacteria isolates xylanase producer

Karakteristik/ Characteristics	RXA III-5
- Morfologi koloni/Colony morphology	H 2 mm
- Pewarnaan Gram/Gram Stain	G + Batang
- Pertumbuhan pada 37°C/Growth at 37°C	+
- Pertumbuhan pada 55°C/Growth at 55°C	+
- Katalase/Catalase	+
- Oksidase/Oxidase	-
- Pertumbuhan pada Mac Conkey/ Growth at Mac Conkey	-
- Pertumbuhan pada nutrien agar/ Growth at Nutrient agar	+
- Motility	+
- Hemolysis	+
- Sitrat /Citrate	+
- MR test	-
- Vp test	+
- Indol/Indol	-
- Gelatin/Gelatine	+
- Urease	-
- Nitrat /Nitrate	-
- Glukosa/Glucose	+
- Manitol/Manitol	+
- Xilosa/Xylose	+
- Arabinosa/Arabynose	+



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat RXAIII-5  
 Figure 2. Phylogenetic tree of RXAIII-5 isolate

Berdasarkan hasil pengamatan biomasa, protein terlarut, aktivitas xilanase, dan aktivitas spesifik xilanase maka isolat RXAIII-5 merupakan isolat paling potensial. Namun demikian karena hasil biomasa lebih rendah dibanding RXAIII-1 maka perlu dilakukan formulasi media sehingga dapat menghasilkan biomasa, protein terlarut dan aktivitas xilanase yang tinggi.

**Identifikasi isolat bakteri unggul penghasil xilanase.**

**a. Identifikasi bakteri menggunakan medium sintetik**

Kelima isolat yang telah diuji pada tahap seleksi sehingga didapat isolat unggul terpilih yaitu isolat RXAIII-5 yang diisolasi dari media alkali. Hasil analisis sifat morfologi dan reaksi fisiologis dan biokimiawi, isolat bakteri RXA III-5 merupakan bakteri gram positif berbentuk batang (Tabel 2.).

Isolat tersebut merupakan bakteri gram positif bentuk batang, bersifat katalase positif dan oksidase negatif, tidak mampu tumbuh pada media Mc Conkey, namun mampu pada media nutrisi agar. Isolat mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Uji MR, indole, gelatin dan urease negatif, sedangkan uji Vp positif. Tidak mampu mereduksi

nitrat menjadi nitrit. Mampu membentuk asam dari glukosa, manitol, trehalosa, xilosa dan arabinosa. Menurut Bergey's Manual dalam Buchanan dan Gibbons (1984) maka isolat RXA III-5 adalah *Bacillus pumilus*.

**b. Identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16-S-rRNA**

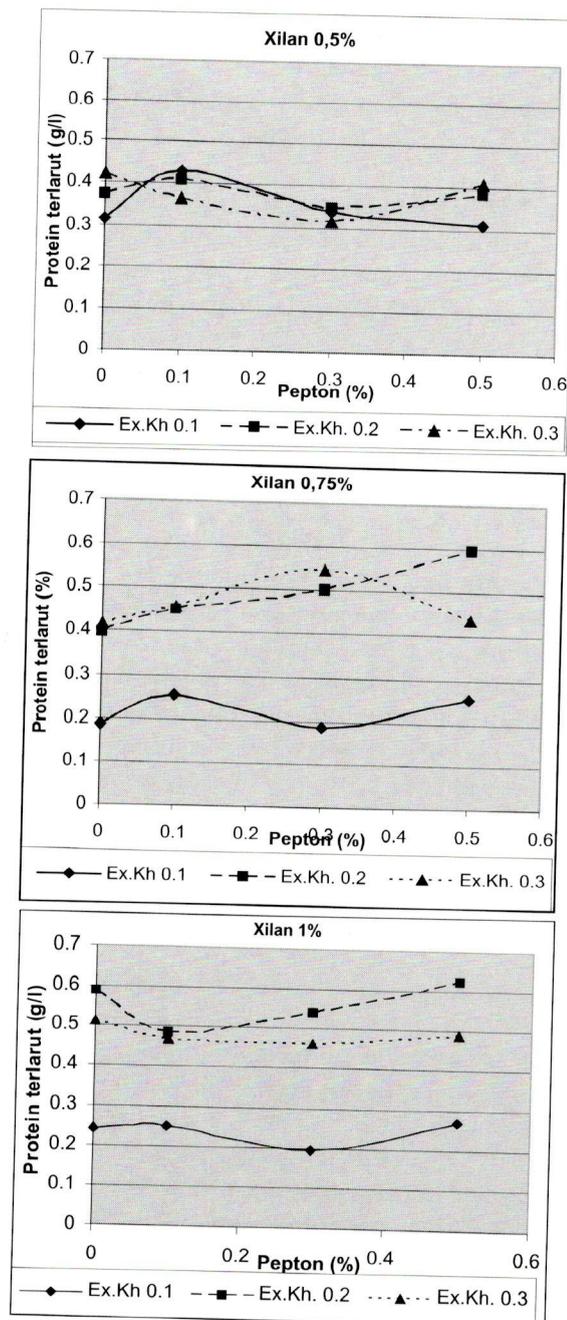
Identifikasi ini untuk meyakinkan hasil identifikasi dengan menggunakan medium sintetik. Alasan yang digunakan untuk memanfaatkan sekuen 16S-rRNA ini adalah karena molekul rRNA mengandung sekuen yang sangat konservatif secara evolusi. Daerah yang sangat konservatif dapat digunakan sebagai situs pelekatan primer sehingga dapat diamplifikasi secara invitro dengan PCR. Dengan cara ini kita dapat mempelajari adanya keragaman genetik dari suatu lingkungan lebih detil karena mikroorganisme yang tidak dapat dikulturkanpun dapat kita peroleh gen 16S-rRNANYA. Sekuen yang lebih konservatif dapat digunakan untuk menghasilkan pohon filogenetik yang lebih diskriminatif sehingga dapat membagi organisme ke dalam tiga Domain yaitu Archaea, Bacteria dan *Eucarya*. Sekuen yang lebih variatif dari molekul 16S-rRNA sangat cocok untuk membedakan suatu organisme kedalam taksa yang lebih rendah seperti genus dan spesies. Sekuen 16S-rRNA ini juga menyediakan data yang secara statistik cukup valid (Amann *et al.*, 1995).

Berdasarkan hasil analisis sekuen 16S-rRNA dalam penelitian ini, diketahui bahwa isolat unggul RXAIII-5 termasuk ke dalam genus *Bacillus* dan mempunyai kedekatan dengan *Bacillus pumilus* pada nilai 769 bits (388). Dari hasil taksonomi, pernyataan sebagai bakteri adalah 100 hits, sebagai *Bacillaceae* dinyatakan 90 hits, *Bacillus* 86 hits dan sebagai *Bacillus pumilus* dinyatakan 59 hits, angka ini tertinggi dibanding *Bacillus* lain yaitu antara 1-7 hits (data selengkapnya tidak disajikan). Sedangkan dari pohon filogenik terlihat bahwa RXAIII-5 mempunyai jarak yang dekat dengan *Bacillus pumilus* 2 (Gambar 2). Dengan demikian berdasarkan kedua pertimbangan tersebut isolat bakteri RXA III-5 mendekati *Bacillus pumilus*.

Tabel 3. Hasil analisis ragam protein terlarut, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik dari formulasi media.  
 Table 3. Results of analysis varians of soluble protein, xylanase activity and specific activity of growth media formulation

Perlakuan/treatment	Protein Protein (mg/ml)	Aktivitas xilanase Xylanase activity (U/ml)	Aktivitas spesifik Specific activity (U/mg protein)
Rerata/Mean	0,396	88,425	232,484
R2	0,845	0,869	0,74
Maksimum/Maximum	0,596	186,37	436,45
Pepton /Peptone(X1)	ns	**	**
Ekstrak khamir/yeast extract (X2)	**	**	**
Xilan /Xylane(X3)	**	**	ns
Interaksi /Interaction (X1)(X2)	*	**	**
Interaksi /Interaction (X1)(X3)	*	**	*
Interaksi /Interaction (X2)(X3)	**	**	**
Interaksi /Interaction (X1)(X2)(X3)	ns	**	**

Keterangan: \*, \*\*, ns : berturut-turut ialah berbeda nyata, sangat berbeda nyata dan tidak berbeda nyata  
 Remarks: \*, \*\*, ns : i.e. significance, high significance, and no significance respectively



Keterangan: Ex.Kh. : ekstrak khamir  
Remarks: Ex Kh : yeast extract

Gambar 3. Protein terlarut pada formulasi media dari xilan, pepton dan ekstrak khamir.

Figure 3. Soluble protein at media formula with of xylane, pepton and yeast extract

Berdasarkan hasil identifikasi dengan dua cara yaitu menggunakan medium sintetik dan berdasarkan analisis sekuen 16S-rRNA, ternyata hasil keduanya tidak berbeda yaitu mendekati *Bacillus pumilus*. Dengan demikian isolat RXA III-5 untuk penulisan berikut disebut *Bacillus pumilus* RXA III-5.

### Formulasi Media Bersubstrat Oat Spelt Xylan

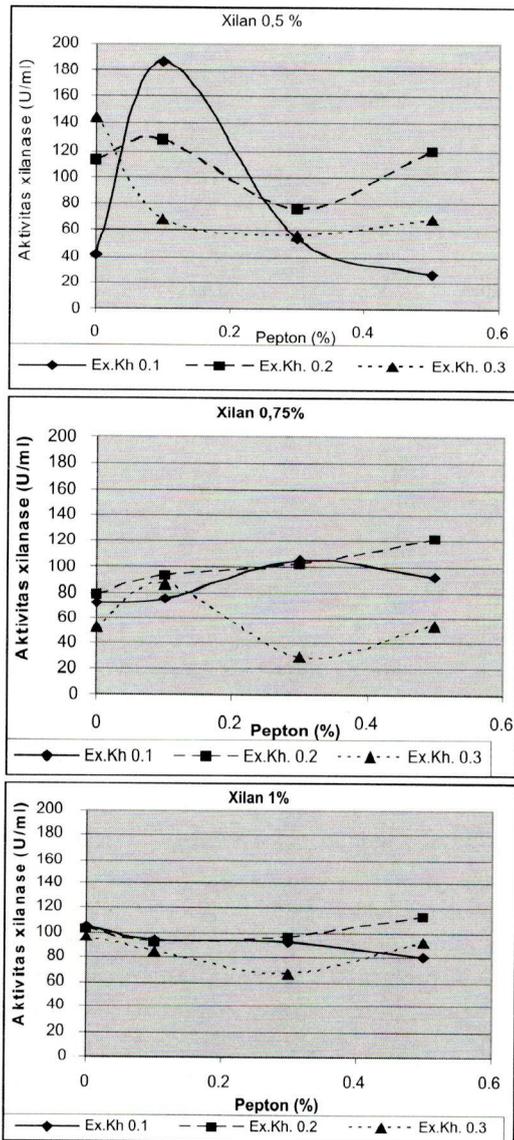
Kajian formulasi media dilakukan untuk mengetahui media yang optimal untuk kultivasi isolat bakteri penghasil xilanase alkalofilik *Bacillus pumilus* RXAIII-5. Isolat tersebut merupakan hasil seleksi pada penelitian tahap awal. Formulasi media dilakukan untuk menentukan a) konsentrasi oat spelt xylan sebagai sumber karbon. B). konsentrasi ekstrak khamir dan pepton sebagai sumber N yang sesuai bagi pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus pumilus* RXAIII-5 dan hasil ekstra selulernya. Sumber nitrogen pada penelitian ini ada dua yaitu pepton dan ekstrak khamir yang diharapkan kombinasi dari keduanya akan saling melengkapi. Analisis ragam protein terlarut, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik disajikan pada Tabel 3.

Hasil analisis ragam yang tercantum pada Tabel 3, menunjukkan bahwa untuk protein terlarut ternyata pepton tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Kedua peubah lainnya yaitu oat spelt xylan dan ekstrak khamir memberikan pengaruh sangat nyata. Interaksi antar dua peubah uji sangat signifikan, tetapi interaksi antara ketiga peubah uji tidak signifikan.

Pada Gambar 3, tampak bahwa ada interaksi antara konsentrasi ekstrak khamir dan pepton pada ketiga konsentrasi xilan. Pada substrat xilan 0,75% dan 1% interaksi kedua perlakuan sangat signifikan dan cenderung lebih tinggi dibanding hasil protein terlarut pada substrat xilan 0,5%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi xilan 0,5% belum optimal untuk media pertumbuhan bakteri. Pepton tidak berpengaruh terhadap pembentukan protein, sedangkan ekstrak khamir optimum adalah 0,2% kemudian menurun dengan penambahan konsentrasi ekstrak khamir. Hal tersebut diduga karena penggunaan jumlah ekstrak khamir yang cukup tinggi akan menyebabkan timbul buih pada media kultivasi, sehingga menghambat pertumbuhan mikroba.

Tingginya nilai biomasa menunjukkan meningkatnya pertumbuhan bakteri pada media tersebut, tetapi tidak menjamin tingginya produk metabolisme sekundernya. Menurut penelitian Fontes et al. (2000) media dengan sumber karbon glukosa atau xilan untuk *Cellvibrio mixtus* penghasil xilanase ternyata keduanya menghasilkan biomasa yang tinggi. Pada media glukosa pertumbuhan sel lebih cepat (36 jam) dibanding xilan (84 jam). Namun demikian dalam media glukosa tidak terdeteksi aktivitas xilanasenya.

Hasil tertinggi dalam penelitian ini dicapai pada konsentrasi xilan 0,75%, pepton 0,5% dan ekstrak khamir 0,2% (0,596 g/l). Hasil analisis ragam aktivitas xilanase (U/ml) ternyata bahwa pepton maupun ekstrak khamir dan interaksi tiga faktor memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas xilanase. Pada Gambar 4, ternyata bahwa pepton dan ekstrak khamir saling berpengaruh.



Keterangan : Ex.Kh. : ekstrak khamir  
Remarks : Ex Kh : yeast extract

Gambar 4. Aktivitas xilanase pada formulasi media xilan, pepton dan ekstrak khamir

Figure 4. Xylanase activity at media formula with xylane, pepton and yeast extract

Data tertinggi dicapai pada konsentrasi pepton dan ekstrak khamir sama yaitu 0,1%. Semakin tinggi pepton yang ditambahkan kebutuhan ekstrak khamir rendah. Penambahan ekstrak khamir 0,2% masih menghasilkan aktivitas xilanase yang tinggi. Demikian juga penambahan pepton maksimum 0,3%. Konsentrasi xilan sangat berpengaruh terhadap aktivitas xilanase yang dihasilkan. Untuk konsentrasi xilan rendah (0,5%), aktivitas tertinggi dicapai pada pepton 0,1% dan ekstrak khamir 0,1% yaitu sebesar 186,37 U/ml. Pada konsentrasi xilan 0,75% aktivitas xilanase tertinggi dicapai pada pepton 0,5% dan ekstrak khamir 0,2% yaitu (121,42 U/ml) dan untuk xilan 1% tertinggi masih pada pepton 0,5% dan ekstrak khamir 0,2% yaitu 112,42%.

Pada analisis ragam aktivitas spesifik (Tabel 3), ternyata bahwa ekstrak khamir dan pepton berpengaruh sangat signifikan, sedangkan xilan tidak berpengaruh. Interaksi ekstrak khamir dan pepton serta interaksi ketiga faktor memberikan pengaruh yang sangat signifikan. Interaksi xilan dan pepton berpengaruh nyata.

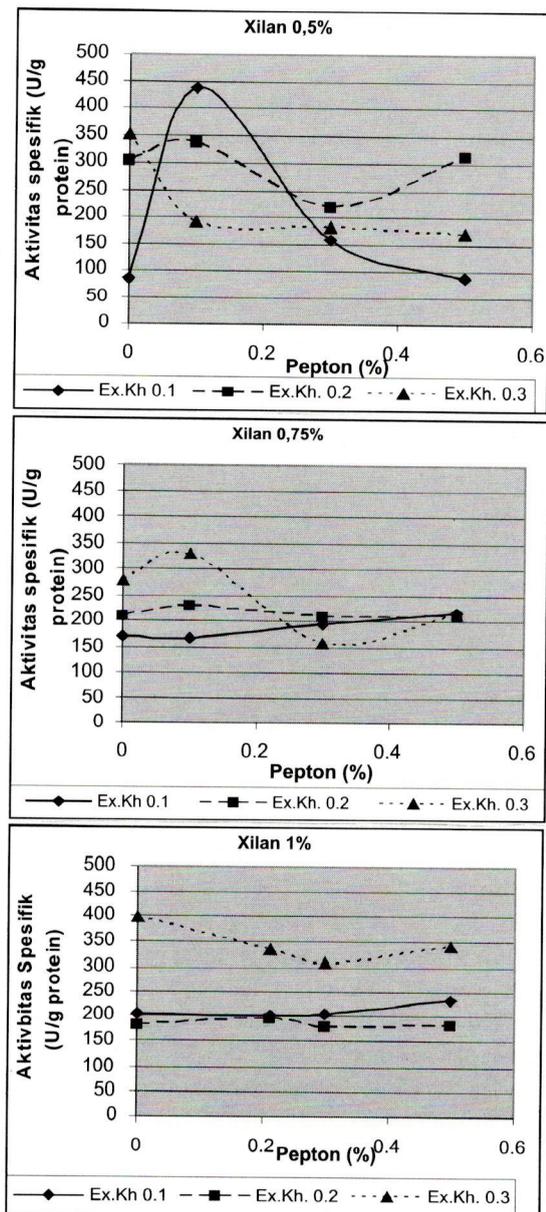
Selanjutnya ada kecenderungan tanpa pepton dengan ekstrak khamir 0,3% meningkatkan aktivitas spesifik hal tersebut berlaku untuk semua kadar xilan seperti yang terlihat pada gambar 5.

Pada kadar xilan 1% dengan ekstrak khamir 0,3%, aktivitas spesifik tinggi yang berlaku untuk pepton 0-0,5%. Dari hasil penelitian ini data tertinggi dicapai pada media dengan kandungan ekstrak khamir 0,1%, pepton 0,1% dan xilan 0,5%.

Berdasarkan hasil pengamatan protein terlarut, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik (Tabel 4), maka pemilihan optimasi media dilakukan dengan mempertimbangkan kebutuhan utama dari kultivasi ini. Kebutuhan utama kultivasi ini ialah untuk menghasilkan enzim yang bertujuan untuk memilih optimum proses berdasarkan aktivitas xilanase atau aktivitas spesifik, sehingga dalam penelitian ini tidak diamati biomasanya. Dari hasil optimasi tersebut maka dipilih optimasi untuk data aktivitas xilanase dengan pertimbangan bahwa yang diharapkan dari kultivasi ini adalah produksi enzim xilanase yang dinyatakan sebagai aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik. Kedua pengamatan tersebut mempunyai komposisi media optimum yang sama yaitu pada xilan 0,5%, pepton 0,1% dan ekstrak khamir 0,1%, dengan hasil tertinggi yaitu aktivitas xilanase 186,37 U/ml dan aktivitas spesifik 436,45 U/mg protein. Berdasarkan nilai ratio C/N, maka nilai asli variabel-variabel optimum tersebut adalah konsentrasi karbon sebesar 59,808 g/l, konsentrasi nitrogen sebesar 6,829 g/l,  $K_2HPO_4$  1 g/l dan  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  sebesar 0,2 g/l.

Kadar xilan optimum untuk pertumbuhan *B. pumilus* RXAIII-5 dari hasil penelitian ini lebih rendah dibanding hasil penelitian Yang *et al.* (1995) yaitu media terbaik dengan *oat spelt xylan* 1% dengan lama kultivasi 2 hari. Semakin tinggi kadar xilan akan memperpanjang lama kultivasi (4-5 hari) dan ternyata sumber karbon dari *birchwood xylan* lebih tinggi aktivitas xilanasenya dibanding *oat spelt xylan*. Namun demikian pernyataan Winterhalter dan Liebl (1995) xilan yang berasal dari *oat spelt* dari Sigma mempunyai aktivitas tertinggi, kemudian berturut-turut *oat spelt xylan* (Roth), methyl glucuronoxilan (Sigma), larchwood xylan dan birchwood xylan (Sigma).

Berdasarkan pernyataan yang berbeda tersebut maka diduga setiap mikroorganisme mempunyai tanggapan yang berbeda terhadap jenis sumber karbon. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Tonukari *et al.* (2002) bahwa



Keterangan : Ex.Kh. : ekstrak khamir  
Remarks : Ex Kh : yeast extract

Gambar 5. Aktivitas spesifik pada formulasi media xilan, pepton dan ekstrak khamir

Figure 5. Specific activity at media formula with xylane, pepton and yeast extract

jenis sumber karbon pada media dipengaruhi oleh jenis gen mikrobiana. Hasil penelitiannya mencoba menggunakan medium yang mengandung glukosa, sukrosa, xilosa, xilan, pektin, dan selulosa untuk media pertumbuhan *Cochliobolus carbanum* yang mempunyai beberapa gen dan menghasilkan endo-1,4- $\alpha$ -xilanase. Hasilnya gen xyl1 dan gen xyl2 dapat tumbuh pada xilan juga selulosa, sedangkan gen xyl3 dan xyl4 pada xilosa juga xilan, dan gen xyp dapat tumbuh pada xilose, xilan, pektin, dan selulosa. Tetapi tak satupun gen-gen tersebut dapat tumbuh pada glukosa dan sukrosa.

Tabel 4. Hasil formulasi media berdasarkan pengamatan protein, aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik

Table 4. Result of media formulation based on observation of protein, xylanase activity and specific activity

Hasil Optimum / Optimum Result	Formulasi Media (%) / Media Formulation (%)		
	Xilan/ Xylane	Pepton/ Pepton	Ekstrak khamir/ Yeast extract
Protein/ Protein (0,596 g/l)	0,75	0,5	0,2
Aktivitas Xilanase/ Xylanase activity (186,37 U/ml)	0,5	0,1	0,1
Aktivitas Spesifik / Specific activity (436,45 U/mg protein)	0,5	0,1	0,1

## KESIMPULAN

1. Isolat bakteri *Bacillus pumilus* RXAIII-5 dinyatakan sebagai isolat bakteri unggul diantara ke-5 isolat bakteri penghasil xilanase.
2. Pada formulasi media tumbuh ternyata protein terlarut tertinggi (0,596 g/l) pada media dengan komposisi 0,75% xilan, pepton 0,5%, ekstrak khamir 0,2%. Aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik tertinggi berturut-turut ialah 186,37 U/ml dan 436,45 U/mg protein. Keduanya dicapai pada komposisi media yang sama yaitu pepton 0,1%, ekstrak khamir 0,1%, dan xilan 0,5%. Berdasarkan kedua kriteria terakhir maka formulasi terbaik untuk *Bacillus pumilus* RXAIII-5 penghasil xilanase adalah pepton 0,1%, ekstrak khamir 0,1%, dan xilan 0,5%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R.I., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1995. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News*. 60:360-365.
- Arribas R. A., J.M Fernandez-Abalos, P Sanches, AL Gardu, and RI Santamaria. 1995. Over production, purification and biochemical characterization of xylanase I (xys I) from *Streptomyces halstedii*. *JM8. Appl And Environ Microbiol* 61 (6): 2414 - 2419.
- Boing J.T.P. 1982. Enzyme production. Avi Publishing Company, Inc. West Port. pp:135-196
- Bourbonnais R, MG Paice, B Friermuth, E Bodie, and S Borneman. 1997. Reactives of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol* 63 : 4632.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive methods for quantitative proteins utilizing the principles of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-354.
- Buchanan, R.E. and Gibbons. 1984. *Bergey's manual for determinative bacteriology*. William and Willins. Baltimore.
- Crueger, W.M. and A. Crueger. 1984. *Biotechnology a textbook og industrial microbiology*. Scient Tech. Inc., Madison.

- Dhillon, A. and Khanna, S. 2000. Production of a thermostable alkaliphilic xylanase from *B. circulans* AB.16 grown on wheat straw. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 27(3):325-327.
- Fontes, C.M., H.J. Gilbert, G.P. Hazlewood, J.H. Clarke, J.A.M. Pratas, K.A. McKee, T. Nigam, T.H. Fernandez, L.M.A. Ferreira. 2000. A novel cellulolytic family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *J. Microbiol.* 145: 1959-1967.
- Fox, J. L. 1994. Biodiversity promises great prospecting. *Bio. Technology.* 13 : 544 - 545.
- Gessesse A. and G. Mamo. 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. By using solid-state fermentation. *Enz. Microbiol. Technol.* 25:68-72.
- Kubata, K.B., H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa and T. Suzuki. 1992. Xylanase I of *Aeromonas caviae* ME-1 isolated from the intestine of a herbivorous insect (*Samia cynthia pryeri*) Bioschi. *Biotech. Biochem* 56 (9) : 1463 - 1464.
- Kulkarni N, A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 23:411-456.
- Lee, S.F, C.W. Forsberg, and L.N. Gibbins. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 50(4):1068-1076.
- Nakamura S, K Wakabayashi, R Nakai, R Aono, and K Horikoshi. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M1. *Appl and Environ Microbiol* 59 (7) : 2311 - 2316.
- Saha B.C. 2002. Production, purification, and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry.* 37: 1279-1284.
- Stanbury, P. F. and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, London. pp: 26-71
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Tonukari, N.J., J.S. Scott-Craig, and J.D. Walt. 2002. Influence of carbon source on the expression of *Cochliobolus carbonum* xylan-degrading enzyme genes. *African J. Biotechnol* 1(2):64-66.
- Winterhalter C and W. Liebl. 1995. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSBB. *Appl Environ Microbiol* 61 (5) : 1810 - 1815.
- Yang, V.W., Z. Zhuang, G. Elegir, and T.W. Jeffries. 1995. Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp (VI-4). Isolated from kraft pulp. *J. Industrial Microbiol.* 15: 434 - 441.