



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR XILANASE
DARI *Acinetobacter baumannii* M-13.2A**

SKRIPSI

**RANI ELSA PRIMA
0606070200**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR XILANASE
DARI *Acinetobacter baumannii* M-13.2A**

SKRIPSI


Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**RANI ELSA PRIMA
0606070200**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Rani Elsa Prima
NPM : 0606070200
Tanda Tangan : 
Tanggal : 28 Juni 2012





HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Rani Elsa Prima
NPM : 0606070200
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M.13.2A

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....) 
Pembimbing II : Ir. Yusro Nuri Fawzya, M.Si. (.....) 
Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D. (.....) 
Penguji II : Dra. Titi Soedjiarti, S.U. (.....) 

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 28 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, dan shalawat salam selalu tercurah kepada kekasih Allah, Nabi Muhammad SAW, rahmat semesta alam. Alhamdulillah, atas semua ujian yang berbuah nikmat, berupa pelajaran sangat berharga dalam sebuah perjalanan menuntut ilmu sebagai seorang mahasiswi, istri dan ibu, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. “*Hasbunallah wa ni'mal wakiil, ni'mal maula wa ni'mannashiir*”, cukup bagiku Allah, dan Allah adalah sebaik-baik pelindung dan pemberi pertolongan.

Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak ternilai. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc, dan Ir. Yusro Nuri Fawzya, M.Si selaku Pembimbing I dan II yang telah berbagi ilmu, membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, semangat, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi.
2. Ibu Ariyanti Oetari, Ph.D dan ibu Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Penguji I dan II. Terimakasih atas segala saran, perbaikan, dukungan, dan doa yang diberikan kepada penulis sehingga skripsi dapat disempurnakan dengan baik.
3. Prof. Dr. Hari Eko Irianto, selaku Kepala Balai Besar Penelitian Pengembangan Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBP4BKP), terimakasih atas kesempatan untuk melakukan penelitian di laboratorium bioteknologi dan mikrobiologi BBP4BKP dengan biaya dari anggaran APBN TA 2011 dan mengizinkan penulis menggunakan data hasil penelitian untuk penyusunan skripsi.

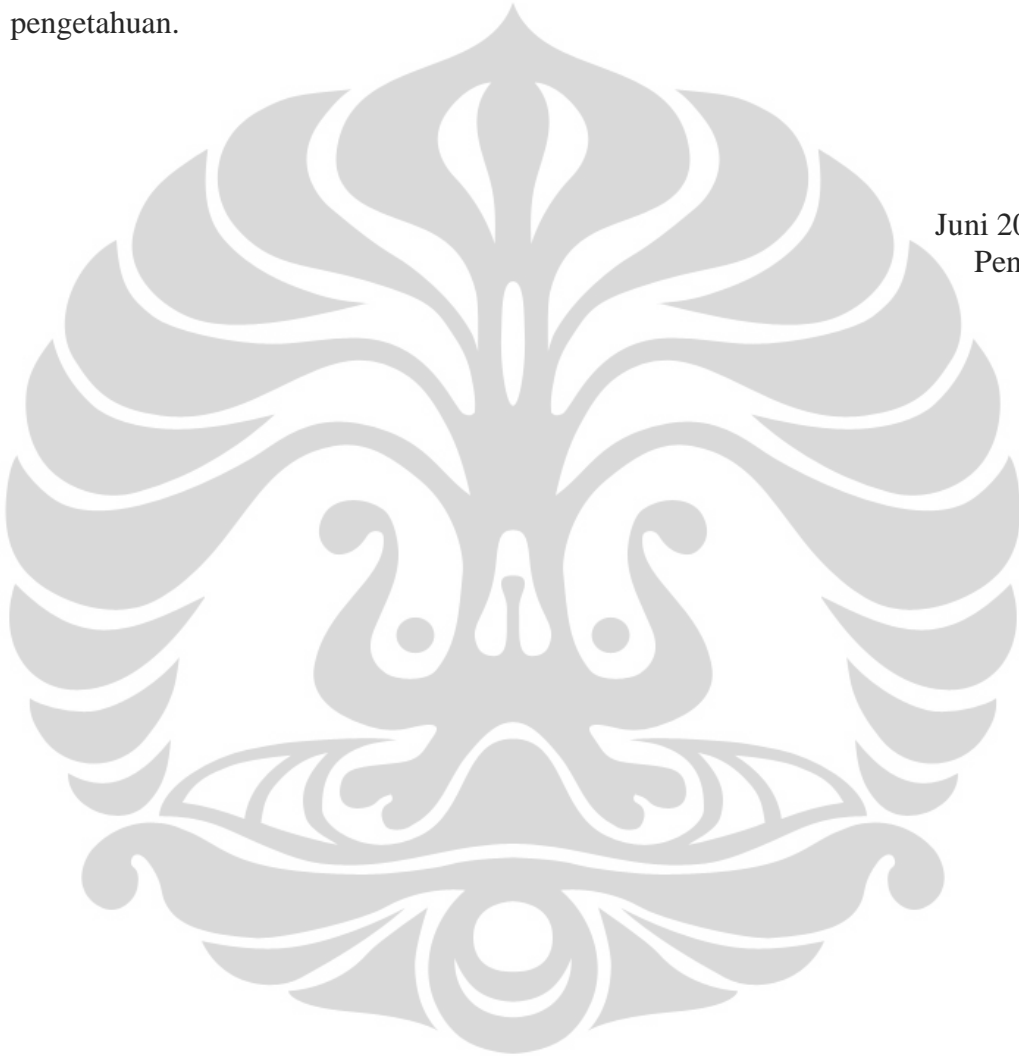
4. Dr. Upi Chairun Nisa, M.Sc selaku Penasihat Akademis atas segala kasih sayang, semangat, dukungan, doa dan saran yang selalu diberikan kepada penulis.
5. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc dan Dra. Setiorini, M.Kes selaku Koordinator Seminar, Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama menuntut ilmu di Biologi FMIPA-UI. Terima kasih pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA-UI, atas segala dukungan dan bantuan yang telah diberikan.
6. Keluarga Lab. Bioteknologi BBP4BKP: Bu Dewi, kak Maya, kak Ayu, Mba Ria, Mba Asri, Isna, Amel, Stenny, Pak Tomi, Bu Devi, Mas Untung, Mas Yoyo, Bu Yani, Mas Gintung, atas bantuan dalam mendapatkan data, ilmu, dan dukungannya.
7. Keluarga tercinta, Mama, Papa, Teja, Tania, atas doa, kasih sayang, cinta, dukungan, semangat dan nasihat yang selalu diberikan kepada penulis. Terimakasih kepada suamiku Ayib Kasriadi, S.Kom, M.M atas kesabaran dan dukungan lahir batin, *'love u because of Allah'*. Putriku tercinta Puti Aqilah Kasriadi terimakasih atas pengertian, kesabaran dan kemandiriannya. Opa, amak, nenek, uwak, ayah ibu mertua, Ibu Iswari dan Ayah Syahlil, kak Afni, bang Hendang, Acha, da Adel, ni Ice, Naufal, terimakasih atas doa dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Teh Ria, mba Tini, dan mba Yuyun, trimakasih telah menjaga Aqilah selama penulis penelitian dan penulisan skripsi.
8. Teman seperjuangan: Indah, Andis, Nana, Ana dan Moon, terimakasih atas semangat, keceriaan, kegilaan dan segala suka dukanya. Sahabat terbaik: Nina, Eka, Vita, A ang, Destia, Widi, Hilwa, Boent, Fido, Rara redenk, Yen-Yen, Indri, Iqbal, Nia, serta *all Felix 06*, thank u guy's. Semua pihak yang

telah membantu penulis selama kuliah di Biologi FMIPA-UI yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

9. My Mio soul, atas petualangan kita *wink ;)

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Juni 2012,
Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Rani Elsa Prima
NPM : 0606070200
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-eksklusif** (*Non-exclusive Royalti-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 28 Juni 2012

Yang menyatakan



(Rani Elsa Prima)

ABSTRAK

Nama : Rani Elsa Prima
Program Studi : Biologi
Judul : Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari
Acinetobacter baumannii M-13.2A

Acinetobacter baumannii M-13.2A yang diisolasi dari perairan laut Manado diketahui menghasilkan xilanase dengan indeks xilanase 20. Penelitian bertujuan untuk memproduksi dan karakterisasi xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A. Sebanyak $(2,4\text{--}3,3) \times 10^8$ CFU/ml inokulum *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dengan konsentrasi 9,09% (v/v) diinokulasikan dalam medium *xylan broth*. Fermentasi selama 6 hari pada suhu 30 °C, 150 rpm dan aktivitas xilanase diuji dengan metode asam dinitro salisilat (DNS). Aktivitas xilanase dihitung berdasarkan absorbansi warna yang terbentuk dari reaksi xilosa dan DNS pada λ 540 nm. Aktivitas xilanase tertinggi pada hari ke-2 inkubasi, sebesar 5,17 U/ml. Xilanase optimum pada pH 8 (1,55 U/ml) dan suhu 70 °C (0,8 U/ml). Ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase hingga 107,3 % dan 278,1%. Ion Fe^{3+} dan Ca^{2+} menurunkan aktivitas xilanase hingga 75% dan 8,3%, sedangkan ion K^+ tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas xilanase.

Kata kunci:

Acinetobacter baumannii M-13.2A, DNS, fermentasi, karakterisasi, pengaruh ion logam, pH optimum, produksi, suhu optimum, xilanase, *xylan broth*.

xiv + 79 halaman : 3 tabel; 15 gambar; 21 lampiran
Daftar Acuan : 69 (1975--2012)

ABSTRACT

Name : Rani Elsa Prima
Study Program : Biology
Title : Xylanase Production and Characterization from Crude Enzyme
Acinetobacter baumannii M-13.2A

Acinetobacter baumannii M-13.2A isolated from Manado's marine environment produce xylanase by index xylanolytic 20. The research aims to produce and characterization of xylanase from *Acinetobacter baumannii* M-13.2A. Inoculum of $(2.4--3.3) \times 10^8$ CFU/ml inoculated into *xylan broth* medium. The fermentation was carried out for 6 days at 30 °C, 150 rpm and xylanase activity assay with *Dinitro salisilic acid* (DNS) method. Xylose and DNS will made complex color at λ 600 nm. The highest activity of xylanase obtained at 5.17 U/ml after 2 days incubation. Xylanase are optimum at pH 8 (1.55 U/ml) and 70 °C (0.8 U/ml). The effect of Mg^{2+} and Zn^{2+} ions were able to increase the activity of xylanase up to 107.3 % and 278.1%. Fe^{3+} and Ca^{2+} ions inhibited the activity of xylanase to 75% and 8.3 %. However have no effect of K^+ ion on the xylanase activity.

Keywords:

Acinetobacter baumannii M-13.2A, characterization, DNS, fermentation, pH optimum, production, temperature optimum, the effect of metal ion, xylanase, *xylan broth*.

xiv + 79 pages ; 3 table; 15 pictures; 21 appendix
Bibliography : 69 (1975--2012)

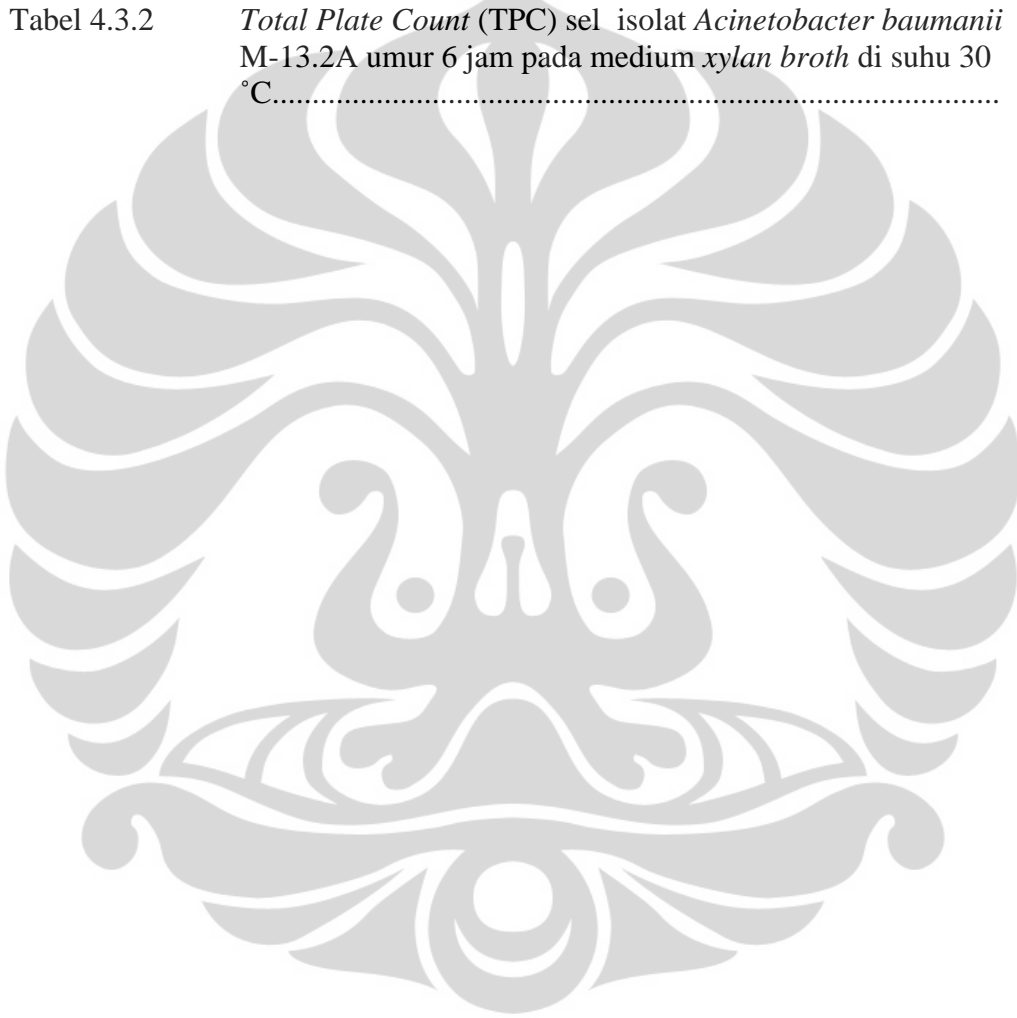
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bakteri.....	5
2.2 Enzim.....	7
2.3 Xilanase.....	10
2.4 Xilan.....	14
2.5 Fermentasi.....	15
2.6 Pertumbuhan Mikroorganisme.....	16
2.7 Uji Aktivitas Xilanase.....	17
2.8 Uji Protein.....	18
2.9 Karakterisasi.....	19
2.9.1 Suhu optimum.....	19
2.9.2 pH optimum.....	20
2.9.3 Pengaruh ion logam.....	21
3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	22
3.2 Peralatan.....	22
3.3 Bahan.....	23
3.3.1 Mikroorganisme.....	23
3.3.2 Medium.....	23
3.3.3 Bahan kimia.....	23
3.4 Cara Kerja.....	24
3.4.1 Pembuatan medium.....	24
3.4.1.1 <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	24
3.4.1.2 <i>Nutrient Broth</i> (NB).....	24
3.4.1.3 <i>Xylan Agar</i> , Annamalai <i>dkk.</i> (2009).....	24
3.4.1.4 <i>Xylan Broth</i> , Annamalai <i>dkk.</i> (2009).....	24
3.4.2 Pembuatan <i>stock culture</i> dan <i>working culture</i>	25
3.4.3 Pengamatan morfologi dan aktivitas biokimia bakteri.....	25
3.4.3.1 Pengamatan morfologi secara makroskopik.....	25

3.4.3.2	Pengamatan morfologi secara mikroskopik.....	25
3.4.3.2.1	Pembuatan preparat olesan bakteri.....	25
3.4.3.2.2	Pewarnaan Gram.....	26
3.4.3.3	Uji aktivitas biokimia isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	26
3.4.3.3.1	Uji katalase.....	26
3.4.3.3.2	Uji oksidase.....	27
3.4.4	Uji aktivitas xilanase.....	27
3.4.4.1	Uji kualitatif xilanase.....	27
3.4.4.2	Uji kuantitatif xilanase.....	27
3.4.5	Uji protein.....	29
3.4.6	Produksi xilanase oleh <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	30
3.4.6.1	Pembuatan starter.....	30
3.4.6.2	Enumerasi sel bakteri.....	30
3.4.6.3	Penentuan waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi)..	31
3.4.6.4	Fermentasi dan pengumpulan ekstrak kasar xilanase..	31
3.4.7	Karakterisasi.....	32
3.4.7.1	Penentuan pH optimum.....	32
3.4.7.2	Penentuan suhu optimum.....	32
3.4.7.3	Pengaruh konsentrasi ion logam.....	33
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1	Pengamatan Morfologi Bakteri dan Aktivitas Biokimia.....	34
4.2	Uji Kualitatif Xilanase.....	37
4.3	Produksi Xilanase oleh <i>Acinetobacter baumannii</i> M.13.2A.....	39
4.3.1	Starter.....	39
4.3.2	Enumerasi sel bakteri dengan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	40
4.3.3	Waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi).....	42
4.3.4	Fermentasi dan pengumpulan ekstrak kasar xilanase.....	46
4.4	Karakterisasi Xilanase.....	47
4.4.1	Penentuan pH optimum.....	47
4.4.2	Penentuan suhu optimum.....	49
4.4.3	Pengaruh ion logam terhadap aktivitas.....	51
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1	Kesimpulan.....	53
5.2	Saran.....	53
6.	DAFTAR REFERENSI.....	54

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A umur 24 jam pada medium <i>xylan agar</i>	34
Tabel 4.2.	Hasil pengamatan uji kualitatif xilanase isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A umur 48 jam pada medium <i>xylan agar</i> suhu 37 °C.....	38
Tabel 4.3.2	<i>Total Plate Count</i> (TPC) sel isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A umur 6 jam pada medium <i>xylan broth</i> di suhu 30 °C.....	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Koloni <i>Acinetobacter baumannii</i> dengan perbesaran 12.739 x.....	7
Gambar 2.2	Kurva laju reaksi enzimatik.....	8
Gambar 2.3(1)	Struktur tiga dimensi xilanase dari <i>Bacillus circulans</i> (1XNB).....	11
Gambar 2.3(2)	Regulasi biosintesis xilanase.....	13
Gambar 2.4	Struktur hidrolisis xilan.....	14
Gambar 2.6	Kurva pertumbuhan bakteri.....	17
Gambar 4.1.(1)	Pengamatan makroskopik <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A pada medium NA, umur 24 jam, suhu 37 °C.....	35
Gambar 4.1.(2)	Pengamatan Mikroskopik <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A dengan pewarnaan Gram pada medium NA, umur 24 jam, suhu 37 °C.....	36
Gambar 4.2	Hasil pengamatan uji kualitatif xilanase isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A umur 48 jam, pada medium <i>xylan agar</i> , suhu 37 °C.....	38
Gambar 4.3.1	Kurva pertumbuhan isolat <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A pada media <i>xylan broth</i> untuk menentukan waktu penuangan starter ke medium produksi.....	40
Gambar 4.3.3.(1)	Kurva produksi.....	42
Gambar 4.3.3.(2)	Aktivitas spesifik xilanase.....	44
Gambar 4.4.1	Hasil pengamatan penentuan pH optimum aktivitas xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A pada suhu 50 °C, substrat <i>xylan beechwood</i>	47
Gambar 4.4.2	Hasil pengamatan penentuan suhu optimum aktivitas xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A, pH 8, substrat <i>xylan beechwood</i>	49
Gambar 4.4.3	Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas xilanase.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema alur kerja penelitian.....	61
Lampiran 2.	Skema cara kerja pengamatan mikroskopik dan makroskopik bakteri.....	62
Lampiran 3.	Skema cara kerja pengamatan aktivitas biokimia bakteri..	63
Lampiran 4.	Skema cara kerja uji kualitatif xilanase dengan metode zona bening.....	64
Lampiran 5.	Skema cara kerja pembuatan kurva standar xilosa.....	65
Lampiran 6.	Kurva standar xilosa.....	66
Lampiran 7.	Skema cara kerja uji kuantitatif xilanase (Biely 2003: 10)....	67
Lampiran 8.	Skema cara kerja pembuatan kurva standar BSA.....	68
Lampiran 9.	Kurva standar BSA.....	69
Lampiran 10.	Skema cara kerja pengukuran kadar protein (Bradford 1976)	70
Lampiran 11.	Skema cara kerja perhitungan sel bakteri.....	71
Lampiran 12.	Skema cara kerja penentuan waktu panen xilanase.....	72
Lampiran 13.	Skema cara kerja produksi xilanase.....	73
Lampiran 14.	Skema cara kerja karakterisasi pH.....	74
Lampiran 15.	Skema cara kerja karakterisasi suhu.....	75
Lampiran 16.	Skema cara kerja pengaruh ion logam.....	76
Lampiran 17.	Perhitungan penentuan waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi) xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	77
Lampiran 18.	Hasil pengamatan uji protein dengan metode Bradford (1976) dan aktivitas spesifik.....	77
Lampiran 19.	Hasil perhitungan penentuan pH optimum xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	78
Lampiran 20.	Hasil perhitungan penentuan suhu optimum xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	78
Lampiran 21.	Hasil perhitungan pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas xilanase dari <i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A.....	79

BAB 1 PENDAHULUAN

Indonesia merupakan Negara bahari yang sebagian besar wilayahnya terdiri dari lautan. Laut Indonesia memiliki keanekaragaman hayati berlimpah dan beragam. Keanekaragaman hayati tersebut dapat dimanfaatkan untuk kesejahteraan manusia. Pemanfaatan keanekaragaman hayati laut sebagai sumber asupan protein hewani, mikroorganisme laut seperti kapang dan bakteri banyak dimanfaatkan sebagai penghasil metabolit sekunder, enzim ekstraseluler, sumber *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) dan penghasil beragam makanan dari produk fermentasi (Venugopal 2009: 51--365). Produk fermentasi dari mikroorganisme laut seperti *shoyu* merupakan fermentasi ganggang cokelat, *ika-shiokara* merupakan makanan dari cumi-cumi yang melibatkan mikroorganisme laut dalam proses pemasakannya (Sidharta 2000: 74).

Salah satu keanekaragaman hayati laut yang belum banyak diteliti adalah bakteri (Venugopal 2009: 361). Seiring kemajuan sains dan teknologi, bakteri laut dimanfaatkan di bidang bioteknologi sebagai penghasil antibiotik, metabolit sekunder untuk kepentingan farmasi, sumber *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) seperti *docosahexaenoic acid* (DHA) dan *eicosapentaenoic acid* (EPA), penghasil enzim ekstraselular misalnya xilanase, alginase, protease dan selulase untuk kepentingan industri (Sidharta 2000: 75; Annamalai dkk. 2008: 291; Venugopal 2009: 359--362).

Enzim adalah serangkaian asam amino dalam susunan rantai teratur dan tetap yang berfungsi sebagai katalis berbagai reaksi kimia, mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dengan menurunkan energi aktivasinya (Sadikin 2002: 29; Pelczar & Chan 2008: 317--318). Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler yang dapat memproduksi enzim untuk metabolismenya. Berdasarkan fungsinya, enzim terdiri atas enzim intraselular dan enzim ekstraseluler. Enzim intraselular berperan dalam mengkatalis reaksi pada jalur metabolisme di dalam sel, sedangkan enzim ekstraseluler berperan dalam mengkatalis senyawa-senyawa makromolekul di luar sel (lingkungan) menjadi senyawa mikromolekul sehingga dapat digunakan oleh sel (Pelczar & Chan 2008: 318).

Xilanase (EC 3.2.1.8) merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dihasilkan oleh mikroorganisme melalui proses fermentasi. Xilanase bersifat xilanolitik dan berperan dalam hidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi gula pereduksi (xilo-oligosakarida dan xilosa) (Richana dkk. 2008: 24). Xilanase dimanfaatkan oleh berbagai industri. Industri *pulp* dan kertas membutuhkan xilanase dalam proses *deinking* dan *bleaching* sebagai pengganti khlorin yang bersifat toksik bagi lingkungan (Li dkk. 2010: 73). Industri makanan menggunakan xilanase sebagai bahan tambahan dalam pembuatan roti, yaitu dalam menghidrolisis xilan menjadi gula xilosa untuk konsumsi penderita diabetes melitus (Richana 2002: 32). Xilanase dapat dihasilkan oleh berbagai jenis bakteri, khamir, kapang, protozoa, serangga dan siput (Mamo dkk. 2006: 1494; Ruangklek dkk. 2007: 19--21); Li dkk. 2010: 71--75).

Penelitian sebelumnya telah melaporkan produksi xilanase dari beberapa jenis bakteri laut. *Vibrio* sp. XY-214 (Araki dkk. 1999: 2017--2019), *Bacillus subtilis* (Annamalai dkk. 2009: 291--297), dan *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1 (Hung dkk. 2011: 1257--1263) merupakan bakteri lingkungan laut yang mampu memproduksi enzim xilanase.

Produksi enzim xilanase dipengaruhi oleh tipe fermentasi dan nutrisi dalam medium fermentasi. Salah satu tipe fermentasi untuk produksi xilanase dari bakteri adalah fermentasi substrat cair. Melalui fermentasi substrat cair, komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah, penyebaran nutrisi lebih merata dan mengurangi resiko kontaminasi dibandingkan penggunaan metode fermentasi substrat padat (Richana dkk. 2007: 74). Agitasi diperlukan pada fermentasi substrat cair untuk homogenisasi antara medium dan mikroba sehingga suhu, pH, nutrisi dan oksigen tersebar merata (McNeil & Harvey 2008: 232). Nutrisi dalam proses fermentasi meliputi makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien, misalnya karbon dan nitrogen memiliki peran penting dalam metabolisme sel dan pembentukan biomassa sel. Karbon berperan sebagai komponen *building block* selama pertumbuhan (Madigan dkk. 2012: 86). Xilan merupakan salah satu sumber karbon (makronutrien) dalam produksi xilanase (Richana 2002: 31). Xilan termasuk jenis hemiselulosa, kelompok polisakarida terbesar kedua setelah selulosa dan merupakan salah satu komponen

terbesar penyusun struktur dinding sel, 20--40% berat kering tanaman (Annamalai dkk. 2009: 291). Xilan alami dapat diperoleh dari limbah industri pertanian seperti jerami, sekam padi, bagas tebu dan kulit pisang (Richana 2002: 31; Seyis & Aksoz 2005: 37). Xilan murni dapat berupa *oat spelt xylan*, *xylan from brichwood*, dan *xylan from beechwood*.

Aktivitas enzim xilanase dapat diketahui dengan menentukan konsentrasi gula pereduksi (xilo-oligosakarida dan xilosa) yang dihasilkan dari reaksi enzimatik. Terdapat dua metode perhitungan konsentrasi gula pereduksi, yaitu metode Somogyi-Nelson dan metode *2,4-dinitrosalicylic acid* (DNS). Metode DNS lebih reaktif terhadap xilooligosakarida dan xilosa dari pada metode Somogyi-Nelson. Xilosa dan xilooligosakarida hasil reaksi enzimatik akan bereaksi dengan DNS dan membentuk kompleks warna, kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan internasional unit (IU). Satu unit aktivitas xilanase merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah xilan menjadi 1 μmol xilosa per menit. (Biely 2003: 10)

Karakterisasi merupakan suatu rangkaian kegiatan pencirian suatu enzim. Karakterisasi suatu enzim di laboratorium biasanya dilakukan dengan penentuan pH optimum, suhu optimum, termostabilitas, pengaruh ion logam, penentuan berat molekul, titik isoelektrik, dan zimogram (Richana dkk. 2008: 29--32). Annamalai dkk. (2009: 296) melaporkan hasil karakterisasi enzim xilanase *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari perairan laut optimum pada pH 9, suhu 55 °C, ion Fe^{2+} , Ca^{2+} dan Mg^{2+} meningkatkan aktivitas enzim, ion Hg^{2+} dan EDTA menghambat aktivitas enzim. Karakterisasi enzim xilanase dari *Vibrio* sp. XY-214 perairan laut optimum pada pH 7, suhu 37 °C, dan ion Cu^{2+} dan Hg^{2+} menurunkan aktivitas enzim (Araki dkk. 1999: 2017).

Upaya pemanfaatan enzim dari bakteri laut terus dilakukan. Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Penelitian Pengembangan Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan Perikanan (BBP4BKP) memiliki koleksi isolat potensial penghasil xilanase. Wikanta (2010: 22) telah melakukan penelitian seleksi isolat potensial penghasil xilanase dari sampel air laut, sedimen, dan rumput laut perairan Manado dengan metode zona bening. Berdasarkan penelitian tersebut

diperoleh empat isolat dengan aktivitas tertinggi yaitu M-13.2A, SGS 2 JUN, M-09.2 dan M-08.1 C. Isolat M-13.2A merupakan salah satu isolat potensial penghasil xilanase yang berasal dari sampel air laut Manado. Isolat tersebut telah teridentifikasi dan memiliki kedekatan dengan *Acinetobacter baumannii* dan memiliki index aktivitas xilanase 20 ketika dilakukan penapisan dengan metode pewarnaan menggunakan *congo red*. *Acinetobacter baumannii* merupakan bakteri Gram negatif, tidak membentuk spora, dengan suhu tumbuh berkisar 15--44 °C, oksidase negatif dan katalase positif (Bergey. 2005: 425--435).

Berdasarkan potensi isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A untuk menghasilkan enzim xilanase pada penelitian Wikanta (2010: 22), maka perlu dilakukan penelitian lanjutan. Isolat potensial tersebut membutuhkan informasi mengenai karakteristik enzim xilanase yang dihasilkan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai produksi dan karakterisasi ekstrak kasar enzim xilanase dari isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi ekstrak kasar enzim xilanase dari isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A untuk melengkapi informasi dalam pemanfaatan enzim. Karakterisasi enzim yang dilakukan meliputi penentuan pH optimum, suhu optimum dan pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme uniseluler, prokariot, dan memiliki ukuran berkisar (0,5--0,1 x 0,5--2,5) μm . Proses reproduksi bakteri secara aseksual, yaitu dengan pembelahan biner. Beberapa jenis bakteri dapat tumbuh pada suhu 0 °C, namun ada pula yang dapat tumbuh baik pada suhu ekstrim diatas 100 °C. Bakteri dapat memproduksi enzim untuk metabolisme sel. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan mengkatalis senyawa-senyawa makromolekul di luar sel (lingkungan) menjadi senyawa sederhana sehingga mudah diserap oleh bakteri. (Pelczar & Chan 2008: 100--145)

Bakteri termasuk ke dalam kingdom *Bacteria* (Cavalier-Smith 2004: 1252). Pengamatan morfologi bakteri secara mikroskopik, makroskopik dan aktivitas biokimia bakteri sangat penting untuk klasifikasi bakteri. Pengamatan morfologi makroskopik meliputi ukuran koloni, bentuk koloni, tepi koloni, warna koloni dan permukaan koloni (Gandjar dkk. 1992: 25 & 28; Benson 2001: 160). Pengamatan morfologi mikroskopik meliputi morfologi sel bakteri dan pewarnaan Gram (Benson 2001: 64--66). Morfologi sel bakteri meliputi bentuk dan ukuran sel. Sel bakteri dapat berbentuk bulat (*coccus*), batang (*bacillus*), spiral (*spirillum*) dan koma (*vibrio*) (Pelczar & Chan 2008: 101--102). Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan kelompok bakteri Gram negatif dan kelompok bakteri Gram positif (Benson 2001: 64).

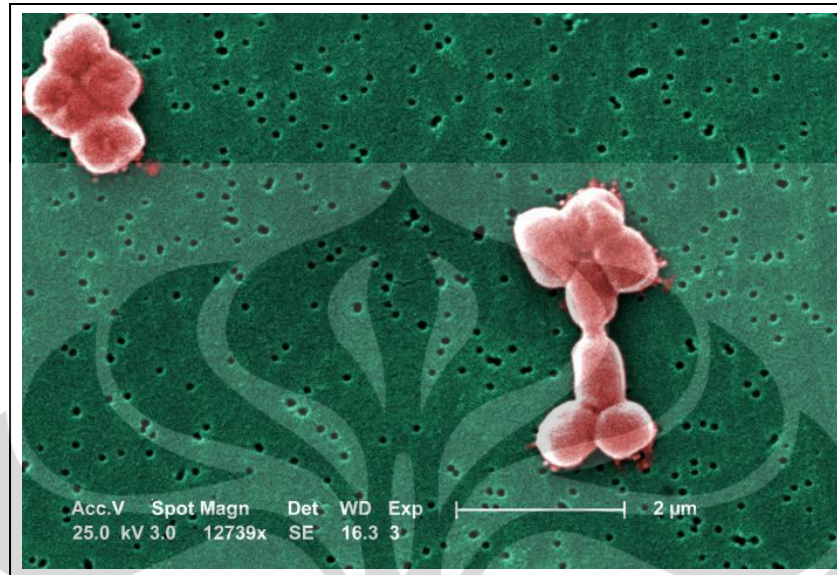
Aktivitas biokimia terdiri dari uji oksidase dan katalase (Gandjar dkk. 1992: 53). Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim sitokrom oksidase. Enzim sitokrom oksidase memegang peranan penting dalam transport elektron selama respirasi aerob. Sitokrom oksidase mengkatalisis oksidasi sitokrom c dan reduksi molekul oksigen untuk pembentukan molekul air (Shields & Cathcart 2010: 1). Enzim tersebut merupakan bagian dari kompleks enzim yang berperan dalam proses fosforilasi oksidatif. Enzim sitokrom oksidase biasanya dihasilkan oleh beberapa bakteri

aerob, fakultatif anaerob, dan mikroaerofilik (Gandjar dkk. 1992: 53--54). Mikroorganisme tersebut menggunakan oksigen, sebagai akseptor elektron terakhir selama penguraian karbohidrat untuk menghasilkan energi. Kemampuan bakteri memproduksi sitokrom oksidase dapat diketahui dari reaksi yang ditimbulkan setelah koloni bakteri dioleskan ke oksidase strips yang mengandung reagen *N,N-dimethyl-1,4-phenylene diamine* dan *alpha-naphtol*, sebagai donor elektron buatan untuk sitokrom c. Terjadi perubahan warna ke senyawa biru atau ungu tua *indophenol*, ketika reagen dioksidasi oleh sitokrom c (Shields & Cathcart 2010: 1).

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen (O_2) dan air (H_2O) dengan enzim katalase. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan oksidator kuat yang sangat reaktif dan dapat membentuk radikal hidroksil yang bersifat toksik bagi sel. Radikal hidroksil tersebut mengoksidasi protein, sehingga mengakibatkan mutasi pada DNA. Hidrogen peroksida (H_2O_2) dihasilkan melalui transfer 1--2 elektron pada respirasi aerob (fosforilasi oksidatif) walaupun pada proses tersebut sitokrom c mampu mereduksi oksigen menjadi air yang tidak bersifat toksik (Wong & Whitaker 2003: 6). Senyawa tersebut dihasilkan oleh mikroorganisme aerob, fakultatif aerob maupun mikroaerofilik yang menggunakan jalur respirasi aerob. Bakteri aerob obligat maupun fakultatif memiliki enzim katalase sehingga mampu merubah H_2O_2 menjadi O_2 dan H_2O sehingga sifat toksiknya hilang (Benson 2001: 168).

Acinetobacter baumannii dikelompokkan pada kingdom *Bacteria*, filum *Proteobacteria*, kelas *Gammaproteobacteria*, orde *Pseudomonadales*, famili *Moraxellaceae*, genus *Acinetobacter*. Genus *Acinetobacter* pada umumnya berbentuk batang (basil), Gram negatif, dengan ukuran 0,9--1,6 x 1,5--2,5 μm , dan bentuknya menjadi bulat (*coccus*) pada fase stasioner. Suhu pertumbuhan strain *Acinetobacter* adalah 20--37 °C dan optimum pada suhu 33--35 °C, akan tetapi beberapa strain tidak dapat tumbuh pada suhu 37 °C dan bersifat katalase positif, oksidase negatif. *Acinetobacter baumannii* dapat tumbuh dalam kisaran suhu 15--44 °C, dengan diameter koloni sebesar 1,5--2 mm setelah 24 jam. Genus *Acinetobacter* biasanya diisolasi dari tanah, air, laut dan limbah. Genus tersebut

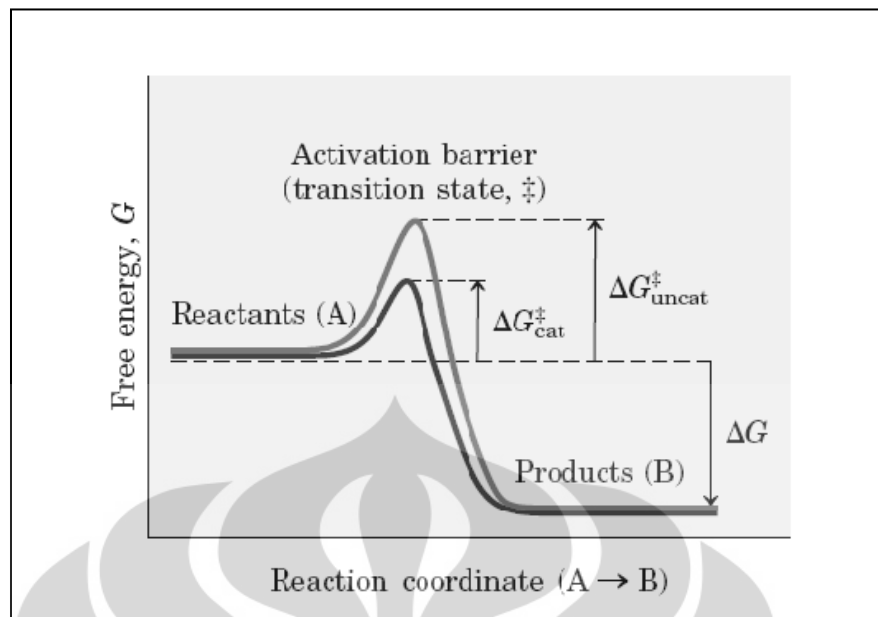
mensintesis berbagai enzim degradatif sehingga mempunyai kemampuan mendegradasi berbagai senyawa organik (Bergeys 2005: 425--435).



Gambar. 2.1 Koloni *Acinetobacter baumannii* dengan perbesaran 12.739 x [Sumber: Gwartney 2011: 1]

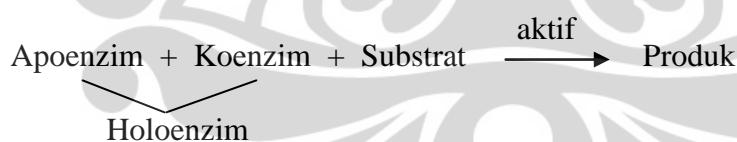
2.2 Enzim

Enzim adalah serangkaian asam amino dalam susunan rantai teratur dan tetap, berfungsi sebagai biokatalis dalam berbagai reaksi kimia dengan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik (Sadikin 2002: 29; Pelczar & Chan 2008: 317--318). Enzim tidak ikut bereaksi, akan tetapi enzim mempercepat reaksi kimia pembentukan produk dari substrat dengan menurunkan energi aktivasi reaksi. Energi aktivasi adalah energi kinetik minimum yang diperlukan partikel-partikel pereaksi untuk membentuk kompleks teraktivasi (Toha 2001: 12).



Gambar 2.2 Kurva laju reaksi enzimatik
[Sumber: Lehninger dkk. 2005: 27.]

Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dengan komponen nonprotein (koenzim dan kofaktor). Bagian protein disebut dengan apoenzim. Koenzim merupakan molekul organik yang dapat berikatan dengan apoenzim sehingga enzim menjadi aktif. Gabungan apoenzim dengan koenzim disebut dengan holoenzim atau enzim lengkap. Holoenzim bersifat aktif, sedangkan apoenzim dan koenzim bersifat tidak aktif. Kofaktor merupakan koenzim anorganik karena tersusun dari molekul anorganik yaitu ion logam. (Sadikin 2002: 72--73; Pelczar & Chan 2008: 319--320)



Substrat dapat didefinisikan sebagai senyawa yang dikenali serta diikat secara spesifik oleh enzim, dan selanjutnya diaktifkan sehingga mengalami perubahan kimia. Pengaturan secara spesifik gugus samping (*side chain*) asam amino enzim terletak pada situs aktifnya (*active site*) yang menentukan tipe molekul substrat yang dapat terikat dan bereaksi pada sisi tersebut (Stryer 1975: 139).

Pengikatan substrat dengan enzim terjadi pada bagian spesifik yang disebut situs aktif enzim. Terdapat dua model pengikatan enzim, yaitu model kunci dan anak kunci (*lock and key*) dan model *induced fit*. Model kunci dan anak kunci

menggambarkan bahwa interaksi antara substrat dengan enzim seperti kunci dan anak kunci. Substrat yang berikatan harus memiliki bentuk yang tepat dengan situs aktif enzim. Model *induced fit* menggambarkan bahwa situs aktif enzim memiliki konfigurasi, yaitu situs aktif enzim mengalami perubahan konformasi sesuai dengan bentuk substrat yang terikat (Stryer 1975: 121--124).

Penggolongan dan tata nama enzim sangat beragam. Akhiran *-ase* sangat lazim digunakan dalam penamaan enzim. Penamaan dengan akhiran *-ase* tersebut diberikan berdasarkan substrat spesifik (amilase, protease, xilanase), jenis ikatan kimia substrat (peptidase, esterase) dan jenis reaksi (transaminase, laktat dehidrogenase). *International Union of Biochemistry* (IUB) mengelompokkan enzim menjadi enam kelas berdasarkan reaksi kataliknya, yaitu: oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (Sadikin 2002: 104--116).

Regulasi biosintesis enzim dapat dilakukan melalui mekanisme inhibisi umpan balik, induksi dan represi enzim. Akumulasi produk akhir dapat menyebabkan inhibisi umpan balik. Produk akhir pada konsentrasi tinggi dapat menghambat aktivitas enzim pertama pada tahap awal jalur biosintesis. Inhibitor terikat pada sisi alosterik dan mengubah konformasi enzim, sehingga substrat tidak dapat terikat pada situs aktif enzim (Nester dkk. 1973: 211). Inhibisi umpan balik bersifat sementara, aktivitas enzim akan kembali normal apabila jumlah produk akhir mulai berkurang (Kandel & McKane 1986: 253). Mekanisme induksi enzim terjadi apabila terdapat senyawa penginduksi atau induser. Induksi enzim diatur oleh adanya protein represor. Protein represor aktif ketika tidak ada induser, sehingga menghambat gen struktural dalam biosintesis enzim. Protein represor menjadi tidak aktif apabila terdapat induser, dan gen struktural dapat melakukan biosintesis enzim (Brock dkk. 1994: 170--172). Represi enzim terjadi apabila bakteri ditumbuhkan pada medium mengandung dua sumber karbon. Bakteri akan lebih dahulu memetabolisme gula sederhana sehingga biosintesis enzim untuk metabolisme gula lebih kompleks akan terhambat (Brock dkk. 1994: 176--177).

Jumlah enzim dapat digambarkan melalui aktivitasnya. Aktivitas enzim dapat dinyatakan sebagai unit aktivitas. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang mampu mengubah substrat menjadi 1 μmol produk per

menit pada keadaan optimum pengukuran, sedangkan aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim per milligram protein. Aktivitas spesifik merupakan ukuran kemurnian enzim (Lehninger 2005: 248--249).

Aktivitas enzim melalui reaksi enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu; suhu, pH, senyawa inhibitor dan aktivator (Raven & Johnson 2002: 152; Sadikin 2002: 136--138). Suhu sangat memengaruhi aktivitas enzim karena enzim adalah rangkaian asam amino yang konformasinya berkaitan erat dengan suhu lingkungannya. Suhu optimum setiap enzim sangat spesifik. Aktivitas tertinggi enzim akan dicapai apabila direaksikan pada suhu optimum (Sadikin 2002: 138). Reaksi enzimatik yang terjadi dibawah suhu optimum akan menyebabkan kakunya struktur protein, sehingga digesti substrat tidak optimal, sehingga aktivitas menurun. Suhu di atas suhu optimum menyebabkan rusaknya struktur lipatan protein enzim, sehingga aktivitas enzim turun. Rusaknya struktur lipatan protein sehingga protein berada dalam struktur primer disebut dengan denaturasi (Madigan dkk. 2012: 185).

Derajat keasaman (pH) sangat berkaitan dengan keberadaan ion hidrogen. Konsentrasi ion hidrogen sangat memengaruhi aktivitas enzim, karena enzim aktif apabila asam amino yang merupakan sisi aktif enzim berada dalam keadaan ionisasi tepat (Volk & Wheeler 1995: 76). pH terlalu asam atau terlalu basa akan menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga enzim tidak aktif (Kandel & McKane 1986: 222).

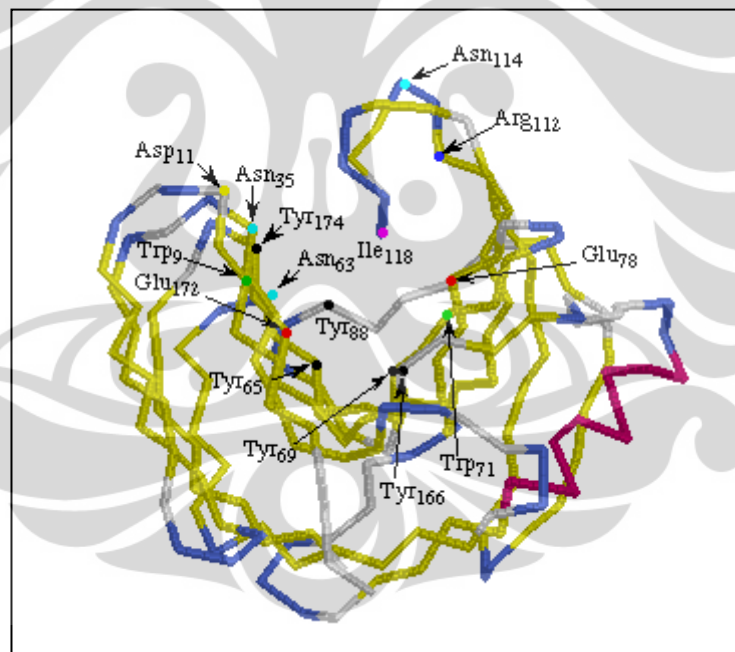
Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh adanya senyawa spesifik yang terikat pada enzim. Senyawa inhibitor dapat menghambat aktivitas enzim, sedangkan senyawa aktivator dapat meningkatkan aktivitas enzim (Volk & Wheeler 1995: 77).

2.3 Xilanase

Xilanase merupakan enzim xilanolitik. Enzim xilanolitik adalah enzim ekstraseluler yang berperan dalam hidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Berdasarkan klasifikasi enzim oleh *International Union of Biochemistry* (IUB) sistem enzim xilanolitik termasuk EC 3, karena jenis reaksi

enzimatik adalah hidrolisis. Menurut Biely (2003: 3), sistem enzim xilanolitik terdiri dari beberapa enzim, yaitu: endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), asetil xilan esterase (EC 3.1.1.72), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) dan α -D-glukoronidase (EC 3.2.1.139). Endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) merupakan enzim xilanase yang dihasilkan secara ekstraseluler.

Reaksi hidrolisis xilan oleh xilanase terjadi pada situs aktif. Xilanase memiliki situs aktif yang terdiri dari situs pengikatan substrat dan kelompok katalitik. Kelompok katalitik tersebut terdiri dari residu asam amino yang menyusun situs pengikatan substrat. Asam amino penyusun situs katalitik xilanase adalah dua molekul glutamat, akan tetapi terkadang terdiri dari satu molekul glutamat dan satu molekul aspartat (Biely 2003. 8--9). Asam amino glutamat dan aspartat merupakan dua asam amino yang memiliki gugus R bermuatan negatif (Lehninger 1995: 116). Struktur tiga dimensi xilanase dari *B. circulans* (1XNB) dapat dilihat pada Gambar 2.3(1).



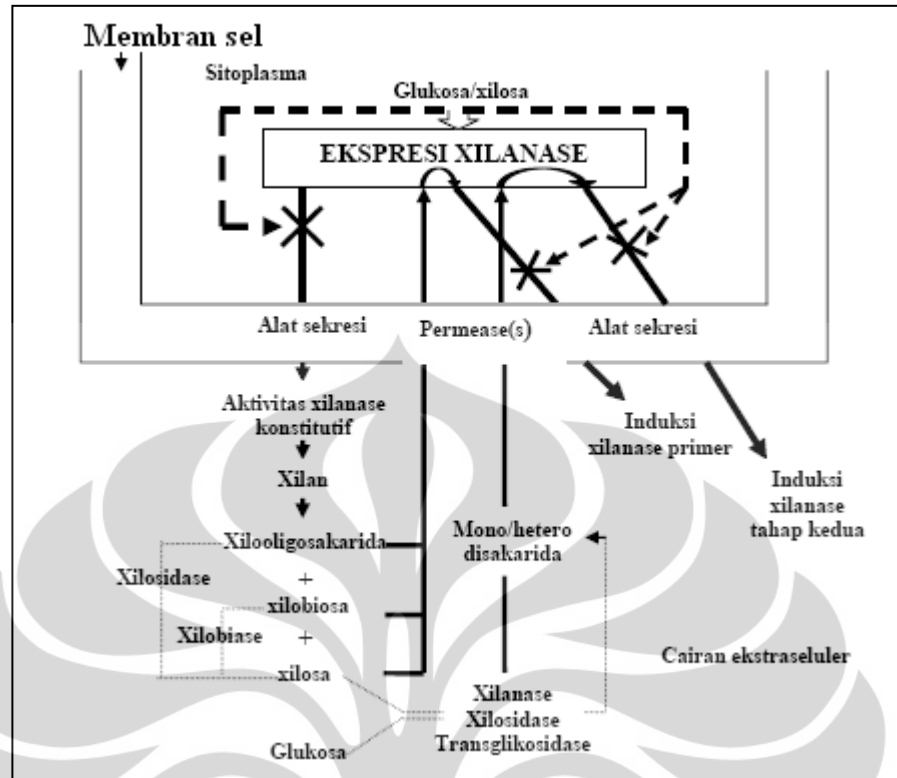
Gambar 2.3(1) Struktur tiga dimensi xilanase dari *Bacillus circulans* (1XNB) [Sumber: Jeffries 1996: 338]

Xilanase dapat dihasilkan secara konstitutif dan inducibel. Xilanase konstitutif dihasilkan oleh mikroorganisme dalam jumlah sedikit dan konstan tanpa memperdulikan komposisi medium. Secara inducibel, xilanase hanya diekspresikan pada kondisi tertentu apabila terdapat induser. Hasil hidrolisis xilan

seperti xilooligosakarida dan xilosa masuk ke dalam sel bakteri dan menginduksi sintesis xilanase inducibel dalam jumlah besar (Kulkarni dkk. 1999: 417--418).

Regulasi sintesis xilanase dapat dilihat pada Gambar 2.3(2).

Terdapat dua mekanisme induksi xilanase oleh xilooligosakarida dan xilosa (Wang dkk. 1992 & Gomes dkk. 1994 *dalam* Setyawati 2006: 18). Mekanisme pertama, xilooligosakarida ditransport langsung ke dalam sel dan kemudian dihidrolisis oleh β -xilosidase intraselular menjadi xilosa. Mekanisme tersebut didukung oleh keberadaan β -xilosidase intraselular yang secara umum terdapat di dalam mikroorganisme. Mekanisme kedua, xilooligosakarida dihidrolisis menjadi xilosa selama proses transportasi melalui membran ke dalam matriks sel. Hidrolisis dilakukan oleh transporter penghidrolisis (*hydrolitic transporters*) yang memiliki situs aktif untuk memecah ikatan ekso- β -1,4 seperti yang dimiliki oleh β -xilosidase. Tahapan tersebut dapat dilakukan jika enzim β -xilosidase juga memiliki aktivitas transferase. Kedua mekanisme tersebut akan menghasilkan xilosa yang merupakan inducer dalam sintesis xilanase. Senyawa xilosa juga kemudian mengalami proses transglukosilasi menghasilkan XylB1-2Xyl dan GlcB1-2Xyl dan bertindak sebagai inducer tambahan terhadap gen penyandi enzim xilanolitik. Menurut Kulkarni dkk. (1999: 643), xilanase dihasilkan oleh *Bacillus circulans* pada media mengandung xilosa, manosa dan selobiosa, tetapi tidak dihasilkan pada media mengandung glukosa. Represi katabolit oleh glukosa merupakan fenomena umum dijumpai dalam biosintesis xilanase.



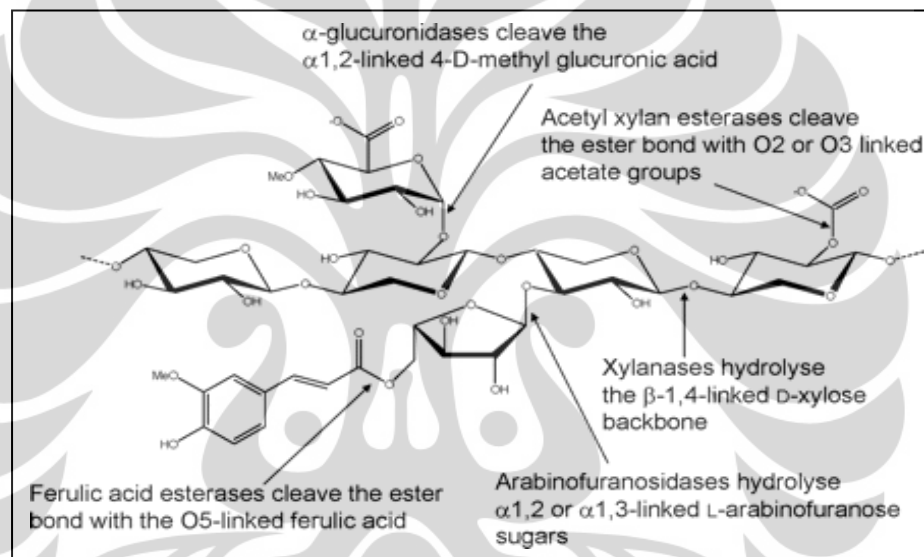
Gambar 2.3(2) Regulasi biosintesis xilanase
[Sumber: Kulkarni dkk. 1999: 418]

Xilanase dapat dihasilkan oleh berbagai jenis bakteri, khamir, kapang, protozoa, serangga dan siput (Mamo dkk. 2006: 1494; Ruangklek dkk. 2007: 19--21); Li . 2010: 71--75)). Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh bakteri melalui proses fermentasi (Richana dkk. 2008: 24). Berdasarkan penelitian, xilanase telah diproduksi dari beberapa isolat bakteri, *Vibrio* sp. XY-214 (Araki dkk. 1999: 2017--2019), *Bacillus subtilis* (Annamalai dkk. 2009: 291--297), *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1 (Hung dkk. 2011: 1257--1263), *Bacillus licheniformis* I-5 (Wahyuntari & Mangunwardoyo 2011: 205--305).

Xilanase dimanfaatkan dalam industri *pulp* dan kertas dalam proses *deinking* dan *bleaching* sebagai pengganti khlorin yang bersifat toksik bagi lingkungan. Industri makanan menggunakan xilanase untuk bahan tambahan dalam pembuatan roti, yaitu dalam menghidrolisis xilan menjadi gula xilosa untuk konsumsi para penderita diabetes melitus. Xilanase juga dimanfaatkan sebagai campuran makanan ternak untuk meningkatkan pencapaian berat dan efisiensi konversi makanan (Richana 2002: 31--33).

2.4 Xilan

Xilan termasuk jenis hemiselulosa yang merupakan polisakarida terbesar kedua setelah selulosa dan merupakan salah satu komponen terbesar penyusun struktur dinding sel, 20--40% berat kering tanaman (Annamalai dkk. 2009: 291). Struktur xilan sangat kompleks, sebagian besar terdiri dari 2--4 heteroglikan. Heteroglikan yang umum dijumpai adalah arabino-D-xilan, L-arabino-D-glukorono-D-xilan, 4-o-metil-D-glukorono-D-xilan, D-gluko-D-mannan, D-galakto-D-gluko-D-mannan, dan L-arabino-D-galaktan (Richana 2002: 31).



Gambar 2.4 Struktur hidrolisis xilan
[Sumber: Emami dkk. 2008: 1088]

Hidrolisis xilan melibatkan sistem enzim xilanolitik, yaitu: (1) endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) menghidrolisis rantai utama xilan pada ikatan β -1,4 menjadi xilobiosa dan xilooligosakarida; (2) β -xilosidase (EC 3.2.1.37) menghidrolisis xilooligosakarida dan xilobiosa menjadi xilosa; (3) asetil xilan esterase (EC 3.1.1.72) menghidrolisis gugus asetil; (4) α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) menghidrolisis gugus arabinosil; dan (5) α -D-glukoronidase (EC 3.2.1.139) menghidrolisis gugus glukurosil. Gugus asetil, arabinosil dan glukurosil, masing-masing dihidrolisis oleh asetil xilan esterase, α -L-arabinofuranosidase dan α -D-glukoronidase. Gugus tersebut merupakan susunan rantai samping xilan (Beg dkk. 2001: 328 & 331; Collins dkk. 2005:4).

2.5 Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses katabolisme senyawa organik yang menghasilkan energi (Stanbury dkk. 2003: 1). Fermentasi berdasarkan substratnya dibedakan menjadi fermentasi substrat padat (*solid substrate fermentation*) dan fermentasi substrat cair (*liquid substrate fermentation*).

Fermentasi substrat padat berlangsung dalam medium padat, seperti daging, singkong, beras, dan agar, sedangkan fermentasi substrat cair berlangsung dalam medium cair, misalnya air kelapa, susu, dan sari buah (Gandjar dkk. 1992: 62).

Produksi enzim xilanase dari bakteri dapat dilakukan dengan fermentasi substrat cair (Richana dkk. 2008: 24). Annamalai dkk. (2009: 292) menggunakan fermentasi substrat cair untuk produksi enzim xilanase dari *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari lingkungan laut. Fermentasi substrat cair memiliki beberapa keuntungan, diantaranya komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah, penyebaran nutrisi lebih merata dan mengurangi resiko kontaminasi dibandingkan penggunaan metode fermentasi substrat padat (Richana 2007: 74). Agitasi diperlukan pada fermentasi substrat cair untuk homogenisasi antara medium dan mikroba sehingga suhu, pH, nutrisi dan oksigen tersebar merata (McNeil & Harvey 2008: 232).

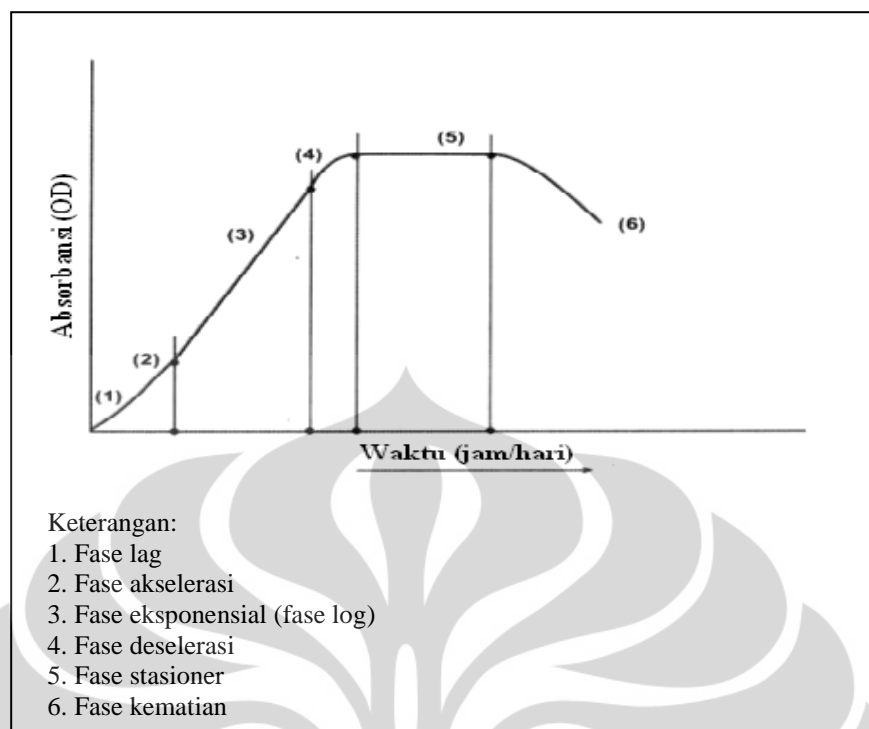
Proses fermentasi dipengaruhi oleh kondisi suhu dan derajat keasaman (pH). Suhu sangat berpengaruh pada pertumbuhan sel. Peningkatan suhu mengakibatkan aktivitas enzim ekstraseluler dan metabolisme sel meningkat. Suhu rendah mengakibatkan konformasi enzim mengerut, sehingga aktivitas enzim turun, dan metabolisme tidak terjadi. Suhu terlalu tinggi dapat merusak enzim yang dihasilkan bakteri, sehingga aktivitas enzim turun dan metabolisme sel menjadi terganggu. Derajat keasaman (pH) menyatakan konsentrasi ion H^+ dan OH^- dalam lingkungan. Konsentrasi ion H^+ yang tinggi dalam lingkungan menyebabkan pH asam, sedangkan tingginya konsentrasi ion OH^- dalam lingkungan menyebabkan pH basa (Madigan dkk. 1997: 162, 168). Derajat keasaman terlalu asam atau terlalu basa mengakibatkan terganggunya aktivitas enzim tertentu karena harus berada dalam keadaan ionisasi tepat pada derajat keasaman tertentu, sehingga metabolisme sel terganggu (Volk & Wheeler 1995:

76). *Acinetobacter baumannii* memiliki suhu tumbuh berkisar antara 15--44 °C (Bergey 2005: 464) dan menurut Annamalai dkk. (2009: 291) pH optimum bagi bakteri laut umumnya adalah basa, misalnya *Bacillus subtilis* dari perairan laut optimum pada pH 9.

Medium fermentasi harus mengandung makronutrien dan mikronutrien yang dibutuhkan oleh sel bakteri. Makronutrien, misalnya karbon dan nitrogen memiliki peran penting dalam metabolisme sel dan pembentukan biomassa sel. Karbon berperan sebagai komponen *building block* selama pertumbuhan (Madigan dkk. 2012: 86). Xilan merupakan salah satu sumber karbon (makronutrien) dalam produksi xilanase (Richana 2002: 31).

2.6 Pertumbuhan mikroorganisme

Pertumbuhan adalah proses peningkatan jumlah sel dari proses pembelahan biner oleh bakteri (Madigan dkk. 2012: 3). Terdapat beberapa fase pertumbuhan pada mikroorganisme, yaitu fase lag, fase akselerasi, fase log (logaritmik), fase deselerasi, fase stasioner, dan fase kematian (McNeil & Harvey 2008: 195). Fase lag merupakan fase adaptasi sel dengan lingkungan substrat dan sel-sel mulai membentuk enzim-enzim untuk mendegradasi substrat. Fase akselerasi atau percepatan adalah fase dimulainya pembelahan sel. Fase logaritmik atau eksponensial merupakan fase peningkatan aktivitas sel seperti pembelahan sel sehingga jumlah sel meningkat dengan pesat. Fase deselerasi merupakan akhir dari fase eksponensial. Jumlah oksigen dan nutrisi dalam media mulai berkurang, sehingga sel bakteri kurang aktif membelah dan terjadi perlambatan pertumbuhan sel. Fase stasioner menunjukkan keadaan jumlah sel bakteri konstan, karena jumlah sel hidup relatif seimbang dengan jumlah kematian sel. Fase kematian menunjukkan penurunan jumlah sel akibat kematian sel, menandakan ketidaktersediaan nutrisi untuk pertumbuhan.



Gambar 2.6 Kurva pertumbuhan bakteri
[McNeil & Harvey 2008: 195]

Kurva pertumbuhan dapat digunakan untuk menentukan waktu optimum produksi enzim xilanase. Annamalai dkk. (2009: 294) melakukan fermentasi cair selama dua hari untuk produksi enzim xilanase dari *Bacillus subtilis*.

2.7 Uji aktivitas xilanase

Aktivitas xilanase dapat diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif aktivitas xilanase dapat diketahui dengan metode pewarnaan dengan *congo red*. Uji kualitatif xilanase didasarkan pada kemampuan bakteri untuk menghidrolisis xilan pada media diferensial yang bersifat alkali (Richana dkk. 2006: 43). Terbentuknya zona bening setelah pewarnaan dan pembilasan menggunakan NaCl 1M, menandakan adanya aktivitas xilanase. Pewarna *congo red* akan berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diserap oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β -D-glukan, sehingga *congo red* dapat digunakan sebagai indikator pemutusan ikatan β -D-glukan pada substrat xilan (Zhang dkk. 2006: 453). *Congo red* juga diketahui sebagai pH indikator berdasarkan perubahan warna dari biru pada pH 3 ke merah pada pH 5,2 (Yoon

dkk. 2007: 22). Bakteri dapat mendegradasi xilan menjadi gula pereduksi seperti xilosa dan xilooligosakarida yang kemudian digunakan dalam metabolisme sel dengan produk akhir berupa asam-asam organik yang bersifat asam. Aktivitas xilanase diketahui dari zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri setelah medium xilan berisi bakteri tersebut diinkubasi dan ditetesi *congo red*. Zona bening terbentuk akibat *congo red* tidak dapat berikatan dengan substrat xilan yang telah terhidrolisis menjadi xilosa dan xilobiosa akibat aktivitas xilanase. Asam-asam organik hasil metabolisme sel pada medium menurunkan pH, sehingga terbentuk zona bening akibat perubahan warna medium oleh *congo red* sebagai pH indikator. Pembilasan dengan larutan NaCl 1M akan membuat zona bening hasil hidrolisis xilanase akan tampak lebih jelas (Richana dkk. 2006: 43).

Aktivitas enzim xilanase secara kuantitatif dapat diketahui dengan menentukan konsentrasi gula pereduksi (xilo-oligosakarida dan xilosa) yang dihasilkan dari reaksi enzimatik. Terdapat dua metode perhitungan konsentrasi gula pereduksi, yaitu metode Somogyi-Nelson dan metode 2,4-*dinitrosalicylic acid* (DNS). Metode DNS lebih reaktif terhadap xilooligosakarida dan xilosa dari pada metode Somogyi-Nelson (Biely 2003: 10).

Prinsip uji aktivitas xilanase dengan metode 2,4-*dinitrosalicylic acid* (DNS) didasarkan pada kadar xilosa yang dilepaskan dari substrat (xilan) pada reaksi enzimatik. Reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100 °C. Reagen DNS yang terdiri dari NaK tartrat akan bereaksi dengan xilosa hasil reaksi enzimatik dan membentuk kompleks berwarna orange hingga coklat. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Miller 1950 dalam Kumala dkk. 2006: 52).

2.8 Uji protein

Pengujian konsentrasi protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satunya adalah metode Bradford. Keunggulan metode Bradford yaitu reaksi berjalan cepat, tahapan pengerjaan sangat sedikit, tidak memerlukan pemanasan, dan kompleks warna yang dihasilkan lebih stabil. Kekurangan metode Bradford

sangat rentan terhadap pengaruh dari sumber non protein, khususnya detergen dan akan semakin non linear pada kisaran konsentrasi tertinggi protein. Respon terhadap protein juga tergantung pada variasi komposisi protein (Bickar 2004: 1).

2.9 Karakterisasi

Karakterisasi merupakan suatu rangkaian kegiatan pencirian suatu enzim. Karakterisasi suatu enzim di laboratorium biasanya dilakukan dengan penentuan pH optimum, suhu optimum, termostabilitas, pengaruh logam terhadap aktivitas enzim, penentuan berat molekul, titik isoelektrik, dan zimogram (Richana dkk. 2008: 29--32).

2.9.1 Suhu optimum

Reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh suhu. Dalam reaksi enzimatik, suhu berperan dalam meningkatkan gerak termodinamik sehingga meningkatkan kemungkinan terbentuknya kompleks enzim-substrat. Suhu optimum suatu reaksi enzimatik sangat spesifik. Suhu optimum memungkinkan terjadinya gerak termodinamik pada reaksi enzimatik sehingga laju reaksi maksimum dan dapat mencapai kondisi optimum terbentuknya kompleks enzim-substrat. Apabila reaksi enzimatik berlangsung di bawah suhu optimum, maka aktivitas enzim kecil karena kurangnya energi termodinamik, sehingga kemungkinan tumbukan antara molekul enzim dan substrat kecil. Reaksi enzimatik di atas suhu optimum akan meningkatkan energi termodinamik, sehingga tumbukan antara enzim dan substrat meningkat, akan tetapi tidak mencapai kondisi optimum karena dengan meningkatnya suhu struktur bangun tiga dimensi enzim akan berubah secara bertahap dan akan merusak struktur protein (denaturasi). Kenaikan suhu melebihi suhu optimum menyebabkan semakin besar deformasi struktur tiga dimensi enzim dan substrat sulit duduk secara tepat pada situs aktif molekul enzim. Hal tersebut akan mengakibatkan aktivitas enzim turun karena tidak terbentuk kompleks enzim substrat, sehingga konsentrasi produk rendah (Sadikin 2002: 138--139).

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa aktivitas optimum xilanase berkisar antara suhu 50--75 °C. Menurut Wahyuntari dan Mangunwardoyo (2011: 210) suhu optimum aktivitas xilanase adalah 50 °C. Annamalai dkk. (2009: 296) melaporkan hasil karakterisasi enzim xilanase *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari perairan laut optimum pada suhu 55 °C. Araki dkk. (1999: 2017) melaporkan aktivitas xilanase dari *Vibrio* sp. XY-214 dari perairan laut optimum pada suhu 50 °C.

2.9.2 pH optimum

Reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh derajat keasaman (pH). Derajat keasaman (pH) memengaruhi struktur bangun tiga dimensi protein enzim, sehingga memengaruhi aktivitas enzim. Aktivitas tertinggi suatu enzim akan terjadi di lingkungan dengan nilai derajat keasaman (pH) tertentu, sehingga nilai pH setiap enzim sangat spesifik. Nilai pH tertentu yang memungkinkan enzim dapat bekerja secara maksimum disebut dengan pH optimum. Struktur bangun tiga dimensi protein enzim pada nilai derajat keasaman (pH) optimum sangat tepat sehingga enzim dapat mengikat substrat secara tepat dan laju reaksi enzimatik menjadi maksimum. Nilai pH selain pH optimum akan menyebabkan berubahnya struktur tiga dimensi protein enzim, sehingga substrat tidak dapat duduk pada situs aktif enzim, sehingga laju reaksi enzimatik akan turun. Jika nilai pH dikembalikan secara perlahan, beberapa enzim dapat kembali aktivitasnya seperti semula (Sadikin 2002: 136--138).

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa aktivitas optimum xilanase berkisar antara pH 5--10. Menurut Wahyuntari dan Mangunwardoyo (2011: 210) pH optimum aktivitas xilanase adalah pada pH 7. Annamalai dkk. (2009: 296) melaporkan hasil karakterisasi enzim xilanase *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari perairan laut optimum pada pH 9. Araki dkk. (1999: 2017) melaporkan aktivitas optimum xilanase *Vibrio* sp. XY-214 dari perairan laut optimum pada pH 7.

2.9.3 Pengaruh ion logam

Ion logam dapat berfungsi sebagai kofaktor, aktivator ataupun inhibitor dalam reaksi enzimatik. Ion logam disebut sebagai kofaktor apabila enzim tidak dapat bereaksi tanpa kehadiran ion logam tertentu. Ion logam disebut sebagai aktivator ataupun inhibitor apabila konsentrasi ion logam tertentu meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim dalam reaksi enzimatik (Sadikin 2002: 72--73; Pelczar & Chan 2008: 319--320).

Sebagai aktivator, ion logam meningkatkan aktivitas reaksi enzimatik dengan cara katalisis asam basa, katalisis kovalen, pendekatan reaktan dan induksi dalam enzim atau substrat (Murray dkk. 2003: 101). Sebagai inhibitor ion logam dapat berikatan dengan situs aktif enzim, sehingga merubah struktur tiga dimensi enzim dan menyebabkan substrat tidak dapat menduduki situs aktif enzim (Sadikin 2002: 79).

Annamalai dkk. (2009: 296) telah melaporkan bahwa ion Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase, sedangkan ion Hg^{2+} dan EDTA menghambat aktivitas xilanase dari *Bacillus subtilis*. Araki dkk. (1999: 2017) melaporkan enzim xilanase *Vibrio* sp. XY-214 dari perairan laut diinhibisi oleh ion Cu^{2+} dan Hg^{2+} .

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Penelitian Pengembangan Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBP4BKP) J. K.S Tubun Petamburan Jakarta Pusat. Penelitian dilakukan selama 5 bulan, dimulai dari bulan Mei 2011 hingga Oktober 2011.

3.2 Peralatan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama], kompor listrik, lemari pendingin [Glacio], mikropipet [Acura], oven [Contherm], laminar [Labconco], pemanas air (*water bath*) [Memmert], sentrifugator [Beckman Coulter], timbangan digital [Mettler toledo], spektrofotometer [Spektronic 20 genesys], *orbital shaking incubator* [Shel Lab], inkubator [Ambi hi-lo chamber], *colled incubator* [Gallenkamp], *colony counter* [Chiltern], pH meter, vortex, pengaduk magnetik, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (*ose*), spatel *drygalsky*, rak tabung reaksi, korek api, gunting, pembakar spritus, botol alkohol, . Peralatan habis pakai yang digunakan adalah *aluminium foil*, kapas, tabung [Eppendorf], tip [Axygen], sarung tangan [Sensi gloves], tisu, dan plastik tahan panas. Peralatan gelas yang digunakan adalah, batang pengaduk, *beaker glass*, cawan petri, gelas ukur, labu Erlenmeyer [Iwaki Pyrex], tabung reaksi.

3.3 Bahan

3.3.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian yaitu *Acinetobacter baumannii* M-13.2A. Isolat tersebut merupakan koleksi Balai Besar Penelitian Pengembangan Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBP4BKP) J. K.S Tubun Petamburan Jakarta Pusat.

3.3.2 Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan *Acinetobacter baumannii* M-13.2A adalah *nutrient agar* (NA). Medium yang digunakan untuk uji kualitatif xilanase adalah *xylan agar*. Medium untuk fermentasi xilanase adalah *xylan broth*.

3.3.3 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan adalah *nutrient agar* (NA) [Merck], *nutrient broth* (NB) [Merck], agar [Bacto], pepton [Merck], ekstrak khamir (*yeast extract*) [Bacto], K_2HPO_4 [Merck], $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Merck], xilan *beechwood* [SIGMA], xilosa [SIGMA], bovin serum albumin standar [Merck], $CuSO_4$ [Merck], Na_2CO_3 [Merck], Sodium tartarat [Merck], Asam dinitrosalisilat (DNS) [SIGMA], bufer sitrat-fosfat, bufer glicin-HCl, *Congo red* [SIGMA], aquades, alkohol teknis, spiritus teknis.

3.4 Cara Kerja

Skema alur kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1 Pembuat Medium

3.4.1.1 *Nutrient Agar* (NA)

Medium NA dibuat mengikuti petunjuk kemasan. Sebanyak 28 g NA dilarutkan dalam 1 l akuades. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15--20 ml per petri.

3.4.1.2 *Nutrient Broth* (NB)

Medium NB dibuat mengikuti petunjuk kemasan. Sebanyak 28 g NB dilarutkan dalam 1 l akuades. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.1.3 *Xylan Agar* Annamalai dkk. (2009)

Sebanyak 10 g polipepton, 5 g yeast extract, 1 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g Na_2CO_3 , 5 g *beechwood* xilan, 3 g NaCl dan 22 g bacto agar dilarutkan ke dalam akuades hingga volume total larutan sebanyak 1 l. Larutan diatur pada pH 9,0 dengan menggunakan NaOH 0,1N. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.1.4 *Xylan Broth* Annamalai dkk. (2009)

Sebanyak 10 g polipepton, 5 g yeast extract, 1 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g Na_2CO_3 , 5 g *beechwood* xilan dan 3 g NaCl dilarutkan ke

dalam akuades hingga volume total larutan sebanyak 1 l. Larutan diatur pada pH 9,0 dengan menggunakan NaOH 0,1N. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2 Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan dengan menginokulasikan *Acinetobacter baumannii* M-13.2A ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml NA miring dan cawan petri berisi medium NA. Inokulasi dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam bulat (ose). Medium yang telah diinokulasikan diinkubasi pada suhu 37 °C, selama 24 jam. Tabung reaksi berisi isolat yang ditumbuhkan pada NA miring disimpan sebagai *stock culture* pada suhu 4 °C, sedangkan cawan petri berisi isolat yang ditumbuhkan pada NA digunakan sebagai *working culture*.

3.4.3 Pengamatan morfologi dan aktivitas biokimia bakteri

3.4.3.1 Pengamatan morfologi secara makroskopik

Pengamatan morfologi secara makroskopik bakteri meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, dan warna koloni (Gandjar dkk. 1992: 25 & 28). Pengamatan dilakukan pada *Acinetobacter baumannii* M-13.2A yang ditumbuhkan di media NA pada suhu 37 °C selama 24 jam (Lampiran 2).

3.4.3.2 Pengamatan morfologi secara mikroskopik

3.4.3.2.1 Pembuatan preparat olesan bakteri

Beberapa ose akuades steril diletakkan di atas permukaan gelas objek. Sebanyak satu ose biakan bakteri diletakkan di dalam akuades, kemudian diratakan hingga seluas kira-kira 1 cm². Tetesan tersebut dikeringkan dan difiksasi dengan cara melewatkan gelas objek di atas api spiritus 3--4 kali.

3.4.3.2.2 Pewarnaan Gram

Pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan dengan metode pewarnaan Gram (*Gram staining*). Pengamatan dilakukan pada *Acinetobacter baumannii* M-13.2A yang ditumbuhkan di media NA pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pewarnaan Gram dilakukan berdasarkan Benson (2001: 64--66). Sebanyak 2--3 tetes larutan Gram A (*Hucker's Crystal Violet*) diteteskan pada preparat olesan bakteri, kemudian dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu preparat olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap. Preparat kemudian ditetesi larutan Gram B (*Mordan Lugol's Iodine*) dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, preparat olesan bakteri ditetesi larutan Gram C (alkohol aseton) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat olesan bakteri kemudian ditetesi larutan Gram D (safranin) selama 30 detik, dicuci dan dikeringkan. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 970 kali menggunakan minyak imersi. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah.

3.4.3.3 Uji aktivitas biokimia isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

Skema cara kerja pengamatan aktivitas biokimia dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.3.3.1 Uji katalase

Sebanyak satu ose *Acinetobacter baumannii* M-13.2A berumur 24 jam disebar di atas gelas objek, kemudian isolat tersebut ditetesi dengan H₂O₂ 3%. Terbentuknya gelembung menunjukkan isolat tersebut mampu memecah H₂O₂ menjadi O₂ dan H₂O (Gandjar dkk. 1992: 53).

3.4.5.2 Uji oksidase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan *oxidase strips*. Sebanyak satu ose *Acinetobacter baumannii* M-13.2A berumur 24 jam di oleskan ke *oxidase strips*. Terbentuknya warna ungu muda menunjukkan bahwa isolat menghasilkan enzim oksidase.

3.4.4 Uji aktivitas xilanase

3.4.4.1 Uji kualitatif xilanase

Sebanyak satu ose *Acinetobacter baumannii* M-13.2A diinokulasi ke dalam media *xylan agar* dengan metode *stab* sebanyak tiga kali ulangan. Isolat kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Uji kualitatif dilakukan dengan metode pewarnaan dengan *congo red* 0,1% (Richana dkk. 2006: 43). Setelah diinkubasi selama 48 jam, cawan petri berisi *Acinetobacter baumannii* M-13.2A digenangi dengan *congo red* 0,1% dan didiamkan selama 15--30 menit, lalu *congo red* 0,1% dibuang. Cawan petri kemudian digenangi NaCl 1 M selama 15--30 menit, lalu NaCl 1 M dibuang (Lampiran 4). Zona bening yang terbentuk menunjukkan aktifitas xilanase. Indeks xilanase dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks xilanase} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)} - \text{diameter koloni (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

3.4.4.2 Uji kuantitatif xilanase

Uji kuantitatif aktivitas xilanase dilakukan dengan metode DNS menurut Biely (2003: 10) yang telah dimodifikasi. Substrat yang digunakan adalah 1% *xylan beechwood* terlarut dalam buffer sitrat fosfat pH 7. Bufer sitrat fosfat dibuat dengan mencampurkan 0,3708 g asam sitrat dan 2,932 g Na₂HPO₄ ke dalam akuades hingga volume 100 mL, kemudian diatur pada pH 7. Reagen DNS dibuat dengan mencampurkan 18,2 g NaK tartrat, 1 g NaOH, 1 g DNS, 0,2 g

fenol, dan 0,05 g Na₂SO₄ untuk 100 mL campuran dan disimpan di botol gelap pada suhu 4 °C. Larutan standar xilosa 0,1% dibuat dengan melarutkan 0,1 g xilosa dalam 100 mL dH₂O.

Kurva standar xilosa dibuat dengan pembuatan larutan standar xilosa 0,1% dengan berbagai konsentrasi (0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm). Sebanyak 1,8 ml bufer berisi substrat xilan 1% ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Larutan kemudian diinkubasi di *water bath* pada suhu 50 °C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml larutan ditambah dengan 1 ml pereaksi DNS dan diinkubasi kembali di *water bath* pada suhu 100 °C selama 15 menit. Absorbansi diukur pada λ 540 nm. (Lampiran 5--6)

Sebanyak 1,8 ml larutan substrat direaksikan dengan 200 μ l larutan enzim ekstrak kasar (*crude enzyme*) di *water bath* pada suhu 50 °C selama 15 menit. Sebelum direaksikan, campuran dihomogenisasi menggunakan vortex. Penghentian reaksi dilakukan dengan pemanasan campuran enzim-substrat di *water bath* pada suhu 100 °C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml campuran ditambah dengan 1 ml pereaksi DNS, dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Setelah dingin, absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol yang digunakan adalah enzim ekstrak kasar yang telah diinaktivasi pada suhu 100 °C selama 15 menit, dan blanko yang digunakan adalah akuades. Kontrol dan blanko mendapatkan perlakuan yang sama seperti sampel. (Lampiran 7)

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah xilan menjadi 1 μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi pengujian. Aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas xilanase (U/ml)} = \frac{C \times 1000 \times p}{v \times \text{BM} \times t}$$

Keterangan : C = konsentrasi xilosa
p = pengenceran
BM = Berat molekul xilosa

v = volume sampel
t = waktu inkubasi

Persamaan kurva standar xilosa yang diperoleh:

Universitas Indonesia

$$y = 0,933x - 0,018$$

Keterangan : nilai x = Konsentrasi xilosa (C)
 nilai y = Absorbansi: $(A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}})$

3.4.5 Uji Protein

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford (1976). Larutan stok dibuat dengan melarutkan 100 ml 95% etanol, 200 ml 88% asam fosfat, 350 mg Serve Blue G pada suhu ruang. *Working buffer* dibuat dengan melarutkan 425 ml akuades, 15 ml 95% etanol, dan 30 ml larutan stok Bradford. Larutan kemudian disaring menggunakan kertas Whatman No. 1. *Working buffer* disimpan di botol gelap pada suhu ruang.

Kurva standar BSA dibuat dengan mereaksikan pereaksi Bradford dengan berbagai konsentrasi BSA (0--0.2 mg/ml BSA). Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. (Lampiran 8--9)

Uji dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 100 μ l ekstrak enzim kasar (*crude enzyme*) dengan 1 ml pereaksi Bradford. Filtrat enzim yang direaksikan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah 100 μ l akuades ditambah dengan 1 ml pereaksi Bradford. Konsentrasi protein ditentukan dengan mengkalibrasi nilai x pada persamaan kurva standar *bovine serum albumin* (BSA). (Bollag & Edelstein 1991: 50--53) (Lampiran 10)

3.4.6 Produksi xilanase oleh *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

3.4.6.1 Pembuatan starter

Sebanyak satu ose isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dari *working culture* diinokulasi ke dalam Erlenmeyer 250 ml berisi 100 ml medium NB dan diinkubasi di *orbital shaker incubator* pada suhu 30 °C, 150 rpm dan diukur absorbansinya pada λ 600 nm setiap 3 jam untuk menentukan fase logaritmiknya. Sebanyak 10% inokulum, yaitu 5 ml *Acinetobacter baumannii* M-13.2A di medium NB pada jam ke- 8 di inokulasi ke dalam Erlenmeyer 100 ml berisi 45 ml media *Xylan Broth* (XB) sebanyak dua kali ulangan. Isolat bakteri kemudian diinkubasi di *orbital shaker incubator* pada suhu 30 °C, 150 rpm dan diukur absorbansinya pada λ 600 nm setiap 3 jam untuk menentukan fase logaritmiknya.

3.4.6.2 Enumerasi sel bakteri

Enumerasi sel bakteri dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Sebanyak 1 ml biakan bakteri dari starter yang siap digunakan pada jam ke-6 diukur absorbansinya dan diencerkan menggunakan NaCl fisiologis sampai faktor pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . Selanjutnya dari masing-masing pengenceran tersebut sebanyak 0,1 ml suspensi diinokulasikan pada medium NA dengan cara sebar (*spread method*) menggunakan spatel Drygalski sebanyak tiga kali ulangan, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk diamati dan dihitung jumlah koloninya. Jumlah sel bakteri dihitung menggunakan rumus berdasarkan Cappucino dan Sherman (1996: 119). (Lampiran 11)

$$\text{Jumlah CFU / ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni yang tumbuh}}{\text{volume inokulum (ml) x faktor pengenceran}}$$

3.4.6.3 Penentuan waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi)

Sebanyak 5 ml inokulum starter dengan kepadatan $(2,4--3,3) \times 10^8$ CFU/ml di tuang ke Erlenmeyer 100 ml berisi 45 ml medium produksi *xylan broth*, kemudian diinkubasi di *orbital shaker incubator* pada suhu 30 °C, 150 rpm selama 6 hari. Pengamatan t_0 dilakukan pada saat penuangan starter ke media produksi. Pengamatan dilakukan selama 6 hari, dengan rentang waktu 24 jam, dan setiap pengambilan sampel diambil 3 ml, kemudian di ukur absorbansinya pada λ 600 nm. Sampel kemudian dikumpulkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4 °C, selama 15 menit. Supernatan dikumpulkan untuk uji aktifitas xilanase dan uji protein. (Richana dkk. 2007: 76) (Lampiran 12)

3.4.6.4 Fermentasi dan pengumpulan ekstrak kasar xilanase

Fermentasi dilakukan berdasarkan Annamalai dkk. (2009: 292) menggunakan metode fermentasi cair dengan pengocokan. Xilanase diproduksi sebanyak tiga kali ulangan pada tiga Erlenmeyer 250 ml masing-masing berisi 90 ml media produksi. Starter menggunakan 10 ml *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dalam medium *xylan broth* dengan kepadatan $(2,4--3,3) \times 10^8$ CFU/ml untuk masing-masing Erlenmeyer. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C, 150 rpm selama dua hari (waktu aktivitas xilanase tertinggi). Sampel kemudian dikumpulkan pada tabung sentrifus 100 ml kemudian disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar (*crude enzyme*) xilanase. Ekstrak kasar (*crude enzyme*) kemudian disimpan di lemari es pada suhu 4 °C. (Lampiran 13)

3.4.7 Karakterisasi

3.4.7.1 Penentuan pH optimum

Sebanyak 200 µl ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) diinkubasi dengan 1,8 ml substrat (xilan 1%) yang terlarut dalam variasi pH 4--10 dengan menggunakan 0,1 M bufer sitrat fosfat (pH4--9) dan 0,2 M bufer glisin-HCl (pH 10). Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 15 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan cara diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml campuran ditambah dengan 1 ml DNS, di vortex, dan kemudian diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak kasar enzim xilanase (*crude enzyme*) yang telah di inaktivasi, dan blanko yang digunakan adalah akuades. Absorbansi di ukur pada panjang gelombang 540 nm. (Annamalai dkk. 292) (Lampiran 14)

3.4.7.2 Penentuan suhu optimum

Sebanyak 200 µl ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) diinkubasi dengan 1,8 ml substrat (xilan 1%) yang terlarut dalam bufer sitrat fosfat pH 8 (pH optimum). Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada variasi suhu 40, 50, 60, 70, 80 dan 90 °C selama 15 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan cara diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml campuran ditambah dengan 1 ml DNS, di vortex, dan kemudian diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak kasar enzim xilanase (*crude enzyme*) yang telah di inaktivasi, dan blanko yang digunakan adalah akuades. Absorbansi di ukur pada panjang gelombang 540 nm. (Annamalai dkk. 2009: 292) (Lampiran 15)

3.4.7.3 Pengaruh konsentrasi ion logam

Ion logam yang digunakan adalah KCl (monovalen), CaCl₂, MgCl₂, ZnCl (divalen), dan FeCl₃ (trivalen) dengan konsentrasi 5 mM dan 10 mM. Untuk konsentrasi 5 mM, sebanyak 200 µl ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) diinkubasi dalam 1,790 µl substrat (xilan 1%) yang terlarut dalam bufer sitrat fosfat pH 8, dan 10 µl masing-masing ion logam. Untuk konsentrasi 10 mM, sebanyak 200 µl ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) diinkubasi dalam 1.780 µl substrat (xilan 1%) yang terlarut dalam buffer sitrat fosfat pH 8, dan 20 µl masing-masing ion logam. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 15 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan cara diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml campuran ditambah dengan 1 ml DNS, di vortex, dan kemudian diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak kasar enzim xilanase (*crude enzyme*) yang telah diinaktivasi, dan blanko yang digunakan adalah akuades. Aktivitas enzim tanpa ion logam ditetapkan sebagai aktivitas 100%. (Annamalai dkk. 2009: 293) (Lampiran 16)

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Morfologi Bakteri dan Aktivitas Biokimia

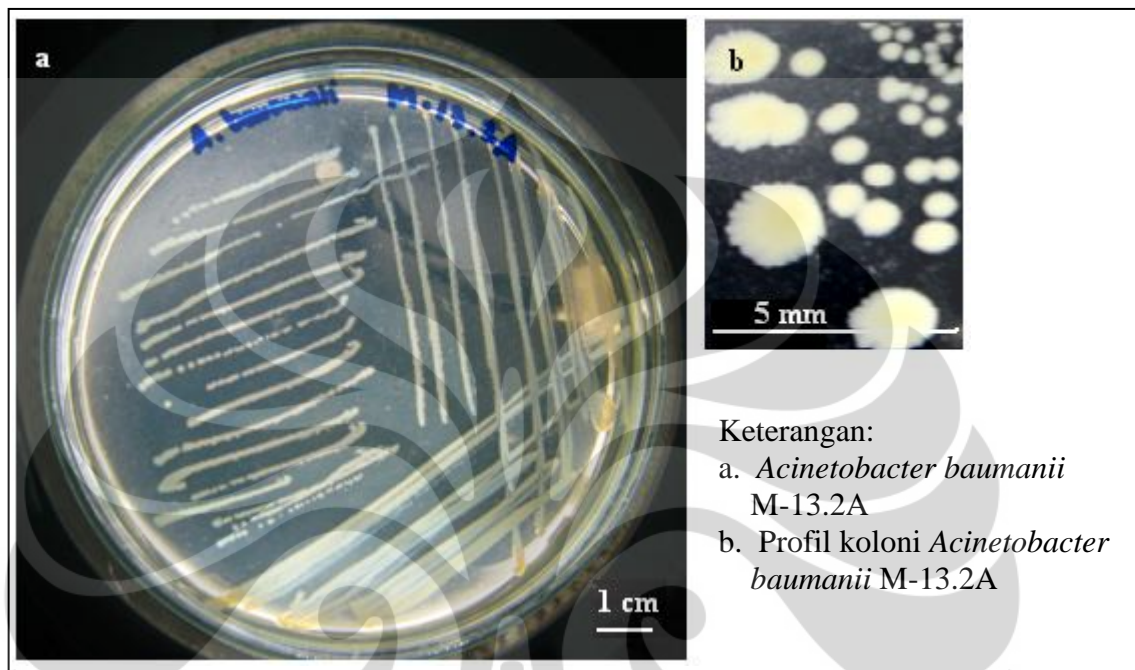
Bakteri yang digunakan adalah *Acinetobacter baumannii* M-13.2A, koleksi Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Penelitian Pengembangan Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan Perikanan (BBP4BKP). Bakteri tersebut diisolasi dari perairan laut Manado. Hasil pengamatan morfologi makroskopik, mikroskopik dan aktivitas biokimia *Acinetobacter baumannii* M.13.2A adalah sebagai berikut (Tabel 4.1):

Tabel 4.1 Hasil pengamatan morfologi makroskopik, mikroskopik dan uji aktivitas biokimia *Acinetobacter baumannii* M-13.2A umur 24 jam pada medium NA

Pengamatan	Keterangan
1. Morfologi mikroskopik	
Bentuk sel bakteri	<i>Cocobasil</i>
Gram	Gram negatif
2. Morfologi makroskopik:	
Ukuran koloni	1,2--1,8 mm
Bentuk koloni	Bulat
Tepi koloni	Tidak rata (<i>undulate</i>)
Warna koloni	Putih susu
Permukaan koloni	Cembung
3. Uji aktivitas biokimia	
Katalase	Positif
Oksidase	Negatif

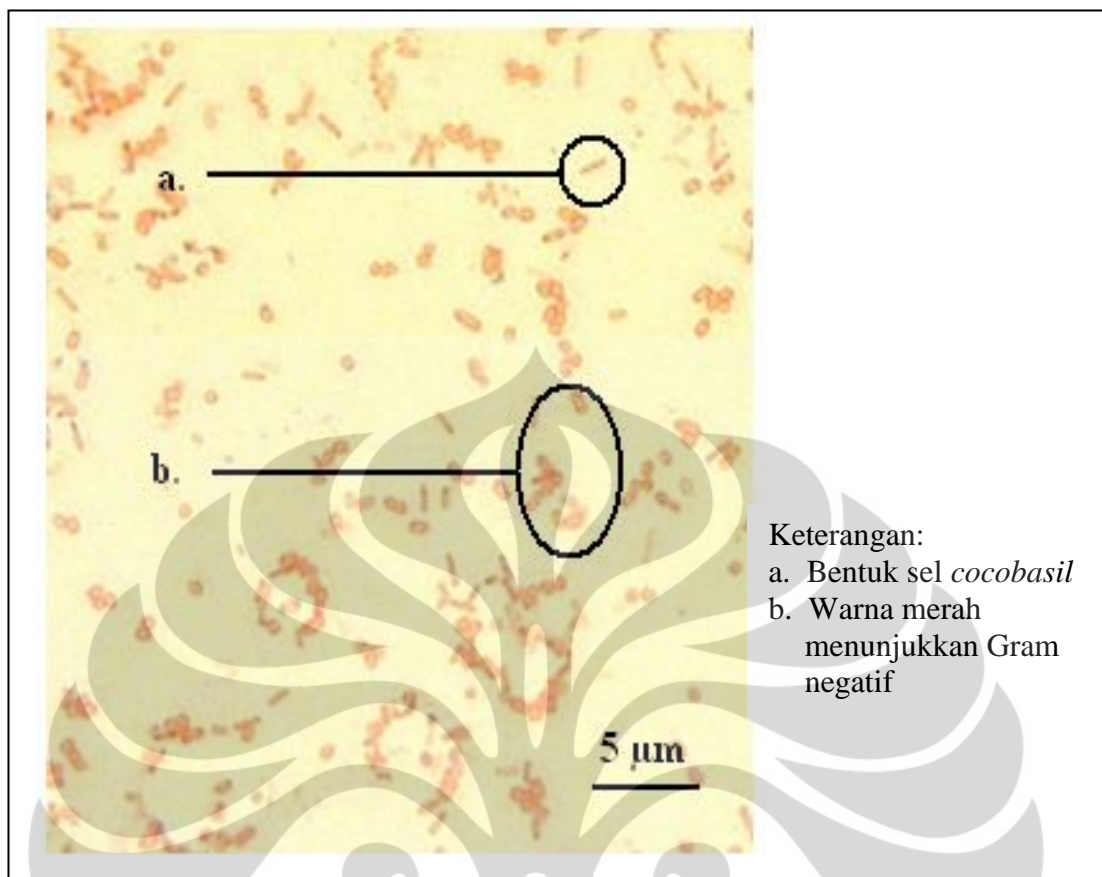
Berdasarkan hasil pengamatan morfologi secara makroskopis, *Acinetobacter baumannii* M-13.2A menunjukkan koloni berwarna putih susu, bentuk koloni bulat, permukaan koloni cembung, tepi koloni tidak rata (*undulate*),

dan ukuran koloni 1,2--1,8 mm. Bergey dkk. (2005: 435) menyatakan bahwa *Acinetobacter baumannii* memiliki ukuran diameter 1,5--2 mm pada umur 24 jam, 3--4 mm pada umur 48 jam, bentuk koloni bulat, tepi koloni tidak rata (*undulate*), permukaan koloni cembung, dan suhu pertumbuhan berkisar antara 15--44 °C.



Gambar 4.1.(1). Pengamatan makroskopik *Acinetobacter baumannii* M-13.2A pada medium NA, umur 24 jam, suhu 37 °C

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi mikroskopik dengan pewarnaan Gram, bentuk sel *Acinetobacter baumannii* M-13.2A berbentuk *cocobasil* dan berwarna merah. Warna merah yang terbentuk merupakan hasil pewarnaan oleh safranin. Menurut Benson (2001: 64) bakteri yang tidak dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet dan terwarnai oleh safranin, termasuk ke dalam kelompok bakteri gram negatif. Bergey dkk. (2005: 425) dan Cunha (2011: 1) menyatakan bahwa *Acinetobacter baumannii* termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif.

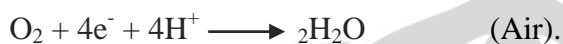
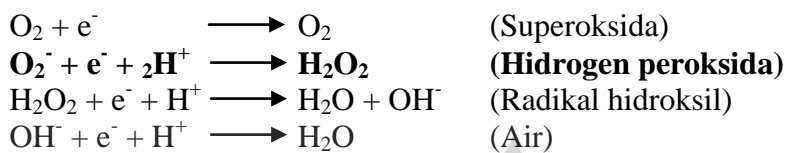


Gambar 4.1.(2). Pengamatan mikroskopik *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dengan pewarnaan Gram pada medium NA, umur 24 jam, suhu 37 °C

Aktivitas biokimia yang diamati meliputi uji katalase dan uji oksidase. Pengamatan uji katalase dilakukan terhadap *Acinetobacter baumannii* M-13.2A berumur 24 jam pada medium NA. Gelembung terbentuk setelah isolat ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%. Terbentuknya gelembung membuktikan bahwa *Acinetobacter baumannii* M-13.2A memiliki enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi oksigen (O₂) dan air (H₂O) (Gandjar dkk. 1992: 53). Constantiniu dkk. (2004: 35) dan Bergey dkk. (2005: 425) melaporkan bahwa genus *Acinetobacter* bersifat katalase positif. Hidrogen peroksida (H₂O₂) merupakan oksidator kuat yang sangat reaktif dan dapat membentuk radikal hidroksil yang bersifat toksik bagi sel. Radikal hidroksil tersebut mengoksidasi protein, sehingga mengakibatkan mutasi pada DNA. Hidrogen peroksida (H₂O₂) merupakan produk antara pada tahap fosforilasi oksidatif, dihasilkan melalui transfer 1--2 elektron pada respirasi aerob, walaupun pada proses tersebut

sitokrom c mampu mereduksi oksigen menjadi air yang tidak bersifat toksik (Wong & Whitaker 2003: 6).

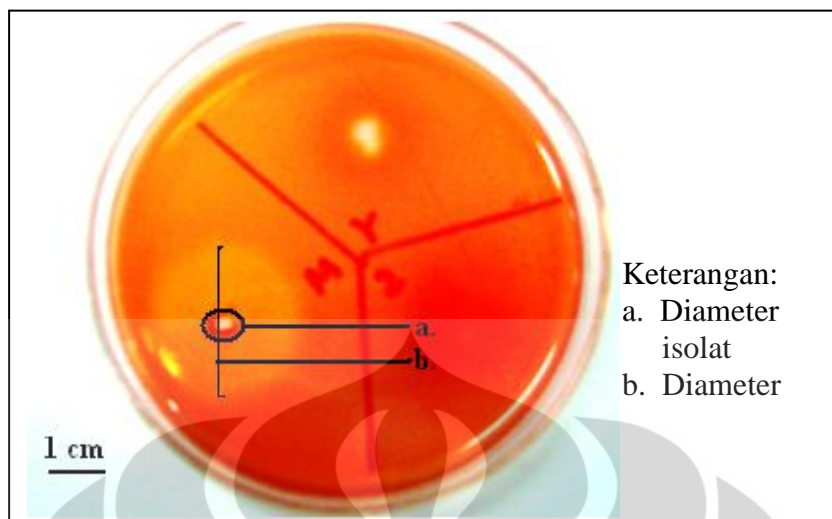
Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim oksidase. Berdasarkan hasil penelitian menggunakan oksidase strip, tidak terbentuk warna ungu pada olesan bakteri pada strip. Hal tersebut membuktikan bahwa *Acinetobacter baumannii* M-13.2A bersifat oksidase negatif, karena tidak dapat menghasilkan enzim oksidase yang dapat membentuk kompleks warna ungu pada oksidase strip. Constantiniu dkk. (2004: 35) dan Bergey dkk. (2005: 425) melaporkan bahwa spesies *Acinetobacter baumannii* memiliki karakter oksidase negatif.

4.2 Uji Kualitatif Xilanase

Uji kualitatif xilanase bertujuan untuk mendapatkan informasi aktivitas xilanase dari isolat bakteri dengan menggunakan pewarnaan *red congo* 1%. Pengamatan dilakukan terhadap isolat berumur 48 jam dengan harapan seluruh isolat berada pada fase eksponensial dan telah mendegradasi xilan pada media diferensial (*xylan agar*). Hasil pengamatan uji kualitatif xilanase *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Tabel 4.2.



Gambar 4.2 Hasil pengamatan uji kualitatif xilanase isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A umur 48 jam, pada medium *xylan agar*, suhu 37 °C

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji kualitatif xilanase isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A umur 48 jam, pada medium *xylan agar*, suhu 37 °C

Ulangan	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Index Xilanase (mm)
I	19,50	2,10	8,285
II	20,20	2,51	7,047
III	19,70	2,32	7,492
rata-rata	19,80	2,31	7,535

Berdasarkan hasil pengamatan, index xilanase *Acinetobacter baumannii* M-13.2A adalah 7,53. Index xilanase merupakan angka yang menunjukkan kemampuan isolat menghidrolisis substrat yang mengandung xilan menjadi xilosa dan oligosakarida berdasarkan perbandingan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni. Kemampuan isolat tersebut menghasilkan xilanase ditandai dengan terbentuknya zona bening yang dihasilkan di sekeliling koloni setelah pewarnaan dengan *red congo* 0,1%.

Zona bening terbentuk akibat *congo red* tidak dapat berikatan dengan substrat xilan yang telah terhidrolisis menjadi xilosa dan xilobiosa akibat aktivitas xilanase. Asam-asam organik hasil metabolisme sel pada medium menurunkan pH, sehingga terbentuk zona bening akibat perubahan warna medium oleh *congo*

red sebagai pH indikator (Yoon dkk. 2007: 22). Pewarna *red congo* akan berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diserap oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β -D-glukan, sehingga *congo red* dapat digunakan sebagai indikator pemutusan ikatan β -D-glukan pada substrat xilan. NaCl berfungsi sebagai pencuci warna yang terbentuk akibat reaksi *congo red*. *Congo red* yang berikatan dengan ikatan β -D-glukan akan mempertahankan warna merah, sedangkan *congo red* yang tidak dapat berikatan dengan xilosa dan xilobiosa yang terdapat pada permukaan medium akan larut dalam NaCl, sehingga zona bening yang terbentuk terlihat lebih jelas (Richana dkk. 2006: 43; Zhang dkk. 2006: 453).

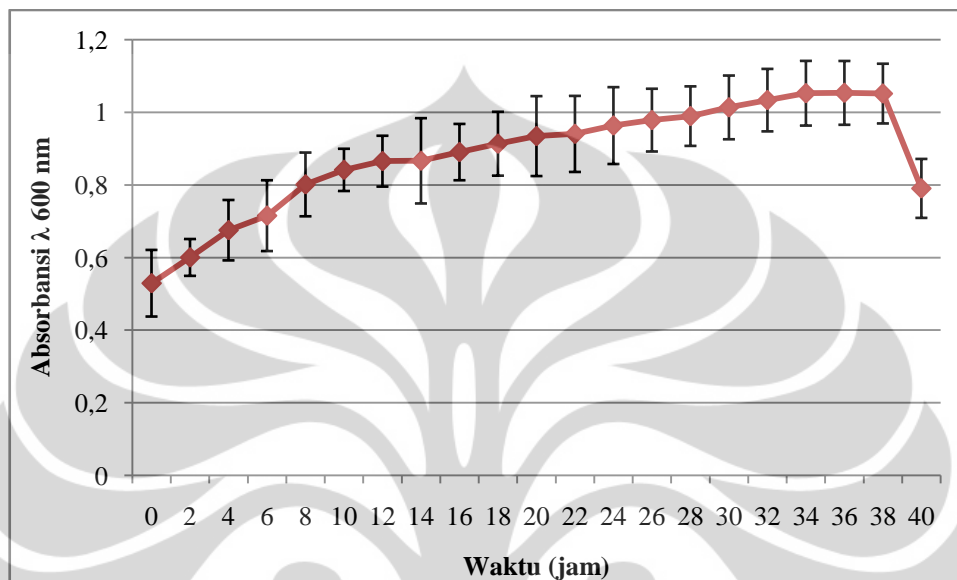
Metode pewarnaan menggunakan *red congo* 1% digunakan untuk pengujian kualitatif xilanase dari *Bacillus subtilis* cho40 (Khandeparker dkk. 2011: 816), *Bacillus* sp. XTR-10 (Saleem dkk. 2009:1120), *Bacillus halodurans* S7 (Mamo dkk. 2006: 1493) dan untuk pengujian kualitatif selulase. Yosylina (2004: 30) melaporkan indeks aktivitas selulase (I.A.S) dari khamir isolat M.117 menggunakan pewarnaan *red congo* 1% sebesar 0,655 di substrat CMC dan 0,119 di substrat selobiosa, Latifa (2012: 54) melaporkan index aktivitas selulase (I.A.S) dari SGS 1609, PMP1206 dan PC3 menggunakan pewarnaan *red congo* 1% yaitu sebesar 3,25; 1,8 dan 0,7.

4.3 Produksi Xilanase oleh *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

4.3.1 Starter

Starter adalah populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi. Berdasarkan hasil pengamatan, starter siap diinokulasikan pada jam ke- 6 fermentasi (Gambar 4.3.1). Hal tersebut dikarenakan pada jam ke- 6 isolat berada pada fase eksponensial, sehingga diharapkan isolat sudah siap secara kuantitas (jumlah) maupun kualitas (kemampuan untuk membelah diri dan beradaptasi pada media xilan). Medium yang digunakan dalam pembuatan starter identik dengan medium produksi, yaitu *xylan broth*. Inokulum starter tidak dipersiapkan dari segi jumlah saja, akan tetapi

inokulum juga harus telah beradaptasi di medium spesifik untuk memperpendek fase lag atau fase adaptasi mikroorganisme pada saat produksi. Waktu untuk adaptasi dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk mensintesis xilanase inducibel agar dapat mendegradasi xilan yang terdapat dalam medium (Madigan dkk. 2012: 126).



Gambar 4.3.1 Kurva pertumbuhan isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A pada media *xylan broth* untuk menentukan waktu penuangan starter ke medium produksi

Starter untuk bakteri penghasil xilanase biasanya dapat diinokulasikan jika absorbansi mencapai 0,6--0,8 pada λ 600 nm (Saleem dkk. 2009:1120). Absorbansi (0,6--0,8) menunjukkan intensitas gelombang yang diserap oleh spektrofotometer pada λ 600 nm yang dapat menggambarkan kepadatan sel bakteri yang ada pada medium.

4.3.2 Enumerasi sel bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC)

Perhitungan sel bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) dilakukan untuk mengetahui jumlah inokulum sel bakteri yang digunakan dalam fermentasi untuk memproduksi enzim xilanase. Enumerasi dilakukan terhadap inokulum starter yang siap digunakan pada jam ke-6. Berdasarkan perhitungan TPC, jumlah sel *Acinetobacter baumannii* M-13.2A yang diinokulasikan untuk fermentasi adalah $(2,4--3,3) \times 10^8$ CFU/ml. Hasil perhitungan sel *Acinetobacter baumannii*

M-13.2A dapat dilihat pada Tabel 4.3.2. Jumlah tersebut diperkirakan sudah memadai untuk *Acinetobacter baumannii* M-13.2A selama fermentasi untuk menghasilkan xilanase, karena pada kepadatan sel $(2,4--3,3) \times 10^8$ CFU/ml dan kerapatan optik pada λ 600 menunjukkan 0,715. Menurut Saleem dkk. (2009:1120), starter untuk bakteri penghasil xilanase biasanya siap untuk diinokulasikan saat absorbansi mencapai 0,6--0,8 pada λ 600 nm.

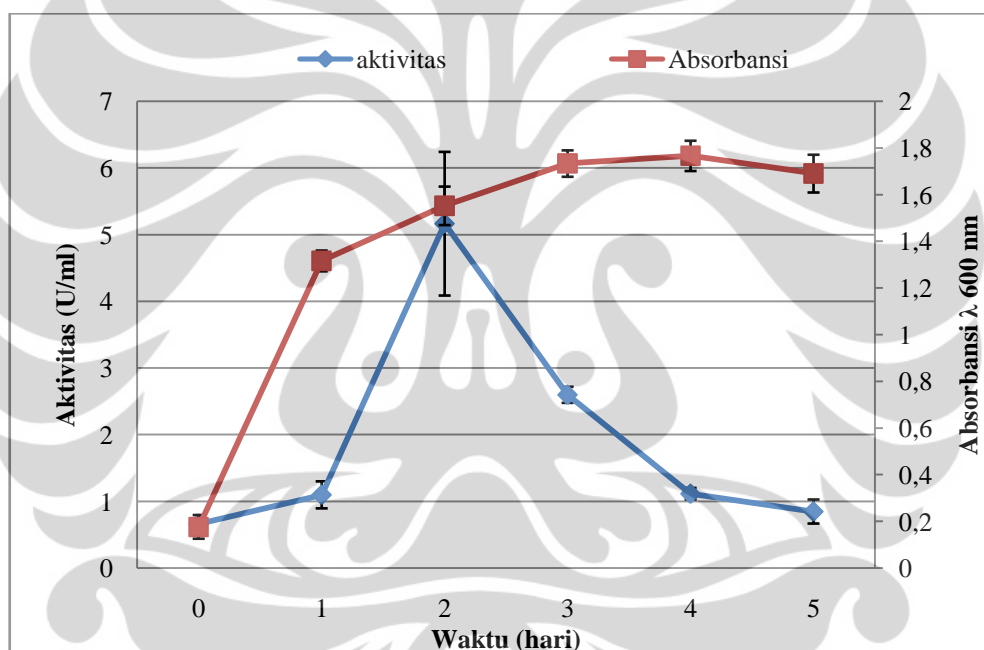
Jumlah mikroorganisme starter yang digunakan untuk produksi xilanase telah dilaporkan oleh beberapa penelitian sebelumnya. Saleem dkk. (2009: 1120) menggunakan 8×10^8 CFU/ml, pada absorbansi 0,8 pada λ 600 nm. Annamalai dkk. (2009: 292) menggunakan inokulum *Bacillus subtilis* dengan kepadatan sel $1,85 \times 10^6$ CFU/ml dalam fermentasi untuk produksi xilanase.

Tabel 4.3.2 *Total Plate Count* (TPC) sel *Acinetobacter baumannii* M-13.2A berusia 6 jam pada medium *xylan broth* di suhu 30 °C

Mikroorganisme	Pengenceran	Pengulangan	Jumlah Koloni	Jumlah cfu/ml	Nilai Total cfu/ml
<i>Acinetobacter baumannii</i> M-13.2A	10^{-7}	1	241	$2,4 \times 10^8$	$(2,4--3,3) \times 10^8$
		2	258		
		3	233		
	10^{-8}	1	38	$3,1 \times 10^8$	
		2	27		
		3	28		
	10^{-9}	1	4	$3,3 \times 10^8$	
		2	3		
		3	3		

4.3.3 Waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi)

Tiga parameter yang di ukur pada saat penentuan waktu panen, yaitu: kerapatan optik atau absorbansi, aktivitas xilanase yang dihasilkan, dan konsentrasi protein terlarut. Waktu panen dapat ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara pertumbuhan bakteri dengan aktivitas xilanase yang dihasilkan. Inokulum yang diinokulasikan sebanyak 5 ml ke dalam 45 ml medium *xylan broth*, artinya jumlah inokulum setara dengan konsentrasi 10 % (v/v). Inokulum *Bacillus* sp. XTR-10 yang digunakan dalam proses fermentasi untuk menentukan waktu panen sebanyak 10 % (Saleem dkk. 2009: 1120).



Gambar 4.3.3.(1) Kurva produksi

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.3.3.(1) dan Lampiran 17. Berdasarkan hasil pengamatan, aktivitas xilanase pada waktu inkubasi fermentasi 0--1 hari rendah, mencapai 0,66--1,11 U/ml. Hal tersebut kemungkinan disebabkan bakteri masih berada dalam fase lag dan fase log. Fase lag merupakan fase adaptasi sel pada medium atau kondisi lingkungan baru sehingga pertumbuhan sel masih lambat. Pelczar dan Chan (2008: 152) melaporkan bahwa pada fase lag, sel mengalami perubahan komposisi kimiawi dan penambahan

ukuran. Fase logaritmik atau eksponensial merupakan fase peningkatan aktivitas sel seperti pembelahan sel sehingga jumlah sel meningkat dengan pesat (McNeil & Harvey 2008: 195). Aktivitas xilanase pada fase log masih belum maksimum karena xilanase inducibel masih terdapat dalam jumlah kecil akibat kecilnya konsentrasi xilosa sebagai inducer sintesis xilanase oleh gen struktural.

Medium fermentasi pada fase log kaya akan makro dan mikronutrien yang mudah digunakan dalam metabolisme bakteri, sehingga terjadi mekanisme represi enzim. Represi enzim terjadi apabila terdapat dua sumber karbon dalam medium produksi, sehingga bakteri akan memetabolisme gula sederhana sehingga biosintesis xilanase untuk memetabolisme xilan yang lebih kompleks akan terhambat (Madigan dkk. 2012: 180--186).

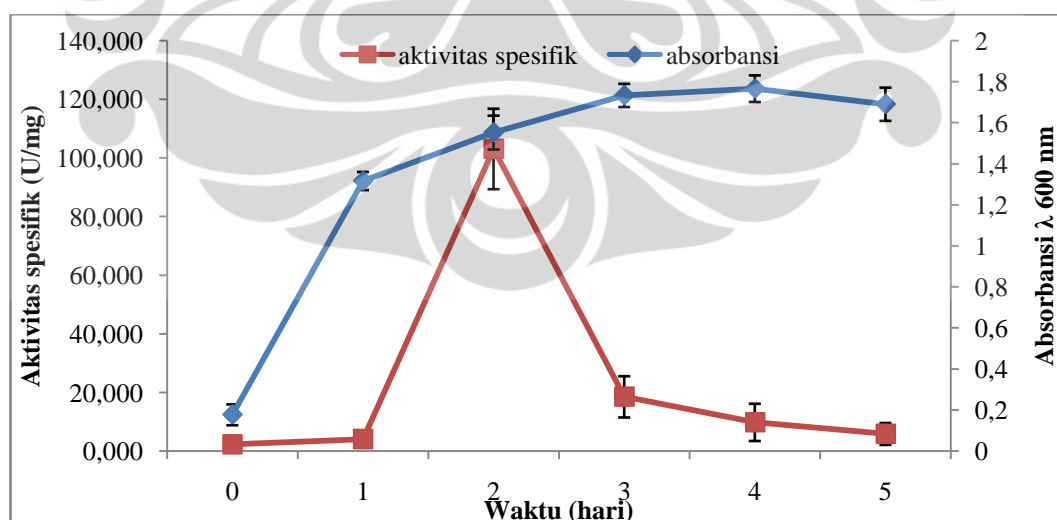
Aktivitas tertinggi dicapai pada hari ke-2 sebesar 5,17 U/ml (Gambar 4.3.3.(1)). Aktivitas tersebut dicapai pada fase deselerasi. Fase deselerasi merupakan akhir dari fase eksponensial dan awal fase stasioner, dimana pada fase tersebut jumlah oksigen dan nutrisi dalam media mulai berkurang, sehingga sel bakteri kurang aktif membelah dan terjadi perlambatan pertumbuhan sel (McNeil & Harvey 2008: 195). Aktivitas xilanase tertinggi terjadi pada fase deselerasi kemungkinan disebabkan oleh berkurangnya nutrisi dalam media fermentasi menyebabkan bakteri mensintesis xilanase inducibel dalam jumlah banyak untuk memecah xilan pada medium fermentasi menjadi xilosa dan xilooligosakarida dalam bentuk gula yang lebih sederhana untuk proses metabolismenya. Xilanase yang dihasilkan merupakan xilanase inducibel karena xilosa dan xilooligosakarida berperan sebagai inducer setelah ditransport ke dalam sel melalui sitoplasma. Inducer akan berikatan dengan protein represor sehingga represor menjadi tidak aktif dan metabolisme xilanase terinduksi. Represor inaktif menyebabkan operon lac dalam keadaan on sehingga gen struktural dapat melakukan biosintesis xilanase dalam jumlah besar (Madigan dkk. 2012: 185).

Aktivitas xilanase turun pada hari ke 3,4 dan 5, yaitu sebesar 2,60; 1,12; dan 0,85 U/ml. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh bakteri berada di fase stasioner pada hari ke- 3 dan 4, dan fase kematian pada hari ke-5. Pada fase stasioner jumlah sel bakteri konstan, karena jumlah sel hidup relatif seimbang dengan jumlah kematian sel. Bakteri tetap menghasilkan xilanase, akan tetapi

tidak sebanyak pada fase deselerasi karena konsentrasi xilan dalam medium berkurang. Bakteri menggunakan xilosa, jenis gula sederhana, untuk metabolisme selnya sehingga masih bisa bertahan hidup. Penurunan aktivitas enzim terjadi pada fase kematian. Jumlah sel mengalami penurunan akibat kematian sel. Hal tersebut menandakan ketidaktersediaan nutrisi untuk pertumbuhan sehingga aktivitas xilanase pada medium sangat kecil (McNeil & Harvey 2008: 195).

Enzim xilanase biasanya dipanen pada awal fase stasioner karena pada fase tersebut nutrisi dalam media fermentasi berkurang, sehingga menyebabkan bakteri mengeluarkan xilanase untuk memecah xilan pada medium fermentasi menjadi xilosa dan xilooligosakarida dalam bentuk gula yang lebih sederhana untuk proses metabolismenya. Khandeparker dkk. (2011: 815) membutuhkan waktu 4 hari untuk memanen xilanase dari *Bacillus subtilis* cho40. Jiang dkk. (2010: 457) membutuhkan waktu 6 hari untuk memanen xilanase dari *Chaetomium* sp. dan Li dkk. (2010: 71) melaporkan *Streptomyces rameus* L2001 membutuhkan waktu selama 7 hari untuk pemanenan xilanase.

Kadar protein dihitung untuk mengetahui aktivitas spesifik xilanase. Aktivitas spesifik merupakan perbandingan antara aktivitas dengan konsentrasi protein. Hasil pengamatan aktivitas spesifik dapat dilihat pada Gambar 4.3.3.(2) dan Lampiran 18.



Gambar 4.3.3.(2) Aktivitas spesifik xilanase

Berdasarkan hasil pengamatan, aktivitas spesifik tertinggi xilanase yang dihasilkan adalah pada hari ke-2, yaitu sebesar 103,04 U/mg. Hal tersebut menggambarkan kecilnya kemungkinan isolat menghasilkan enzim lain selain xilanase. Kadar protein sangat tinggi pada hari ke-0 dan ke-1 fermentasi yaitu 0,29 mg/ml dan 0,27 mg/ml kemungkinan disebabkan oleh terdapatnya protein dari medium fermentasi seperti pepton dan *yeast extract*. Aktivitas spesifik pada hari ke-0 dan ke-1 kecil, yaitu 2,24 U/mg dan 4,04 U/mg. Hal tersebut karena protein yang terdapat dalam ekstrak kasar xilanase tidak hanya protein enzim, tetapi terdapat pula sumber protein dari medium pertumbuhan. Kadar protein pada ekstrak kasar xilanase turun pada hari ke-2 hingga 0,05 mg/ml. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh habisnya sumber protein medium pertumbuhan, sehingga aktivitas spesifik xilanase meningkat hingga 103,04 U/mg. Hari ke-3, 4 dan 5 kadar protein ekstrak kasar xilanase cenderung naik, yaitu 0,14 mg/ml, 0,11 mg/ml dan 0,13 mg/ml. Hal tersebut belum diketahui penyebabnya, kemungkinan terdapat protein-protein lain pada ekstrak kasar xilanase. Aktivitas spesifik xilanase pada hari ke-3, 4 dan 5 turun hingga 18,5 U/mg, 9,79 U/mg dan 5,84 U/mg.

Berdasarkan hasil pengamatan, aktivitas spesifik tertinggi dicapai pada hari ke-2 produksi xilanase, sama dengan aktivitas xilanase tertinggi pada penentuan waktu panen xilanase. Hal tersebut menunjukkan bahwa sangat kecil kemungkinan adanya aktivitas enzim lain selain xilanase sehingga menguatkan hasil pengamatan aktivitas tertinggi dicapai pada hari ke-2. Haryati dkk. (2010: 63) melaporkan aktivitas spesifik xilanase dari *Bacillus pumilus* PU4-2 sebesar 765,2 U/mg protein. Ruangkanlekk dkk. 2007: 20 melaporkan aktivitas spesifik xilanase dari *Aspergillus niger* tertinggi pada hari ke-7 fermentasi, yaitu sebesar 7352 U/mg. Giridhar dan Chandra (2010: 1734) melaporkan xilanase dari *Gracilibacillus* sp. TSCPVG memiliki aktivitas spesifik sebesar 15,36 U/mg protein. Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan oleh kapang jauh lebih tinggi dari pada aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan oleh bakteri.

4.3.4 Fermentasi dan pengumpulan ekstrak kasar xilanase

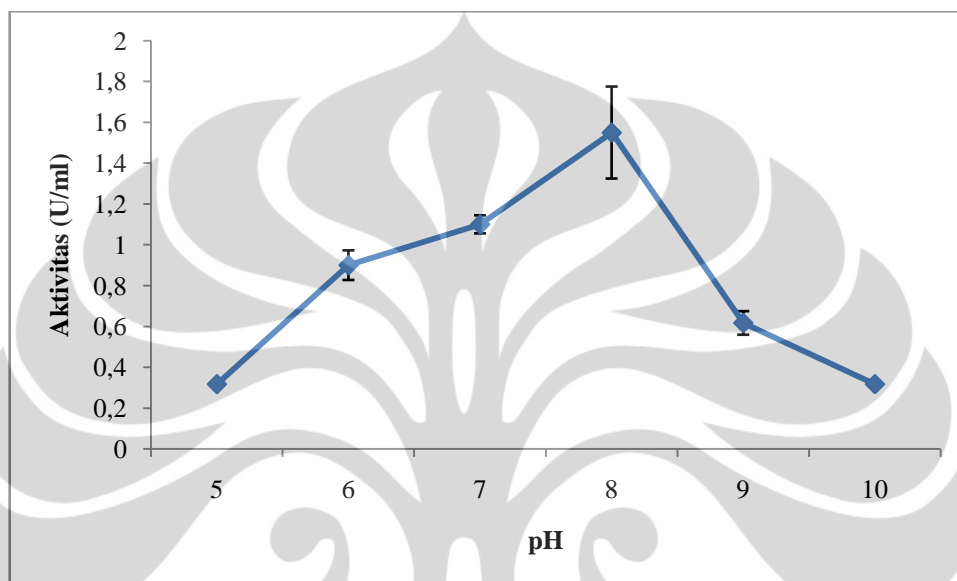
Fermentasi *Acinetobacter baumannii* M-13.2A untuk memproduksi xilanase dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi cair dalam medium *xylan broth* pada suhu 30 °C, agitasi 150 rpm selama dua hari. Inokulum yang digunakan dalam proses fermentasi, untuk menentukan waktu panen, yaitu sebanyak 10 ml inokulum ke dalam 90 ml medium *xylan broth*, artinya jumlah inokulum setara dengan konsentrasi 10 % (v/v). Inkubasi pada suhu 30 °C merupakan suhu pertumbuhan *Acinetobacter baumannii* M-13.2A pada saat pengambilan sampel awal. Pengumpulan ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan dengan metode sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 15 menit. Sentrifugasi merupakan metode pemisahan campuran berdasarkan berat molekul dengan kecepatan tertentu. Molekul yang lebih berat akan terendapkan sebagai pelet, sedangkan molekul yang lebih ringan tidak terendapkan berupa supernatan. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar (*crude enzyme*) xilanase.

Menurut Richana dkk. (2007: 74), fermentasi substrat cair untuk produksi xilanase memiliki beberapa keuntungan, diantaranya komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah, penyebaran nutrisi lebih merata dan mengurangi resiko kontaminasi dibandingkan penggunaan metode fermentasi substrat padat. Agitasi bertujuan untuk homogenisasi antara medium dan mikroba sehingga suhu, pH, nutrisi dan oksigen tersebar merata (McNeil & Harvey 2008: 232). Suhu yang digunakan dalam proses sentrifugasi adalah 4 °C. Hal tersebut bertujuan agar enzim tidak rusak selama proses pemisahan. Menurut Richana dkk. (2008: 32) proses pemisahan enzim dengan metode sentrifugasi harus dilakukan pada suhu rendah. Gaya sentrifugasi yang cukup tinggi dalam kurun waktu tertentu juga dapat menghasilkan energi panas yang dapat merusak struktur protein enzim selama pemisahan. Ekstrak kasar (*crude enzyme*) kemudian disimpan di lemari es pada suhu 4 °C agar struktur tiga dimensi enzim tetap stabil selama proses penyimpanan.

4.4 Karakterisasi Xilanase

4.4.1 pH optimum

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.4.1 dan Lampiran 19.



Gambar 4.4.1. Hasil pengamatan penentuan pH optimum aktivitas xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A pada suhu 50 °C, substrat *xylan beechwood*

Berdasarkan hasil pengamatan, xilanase dari isolat *Acinetobacter baumannii* M-13.2A bekerja optimal pada pH 8 dengan nilai aktivitas xilanase sebesar 1,09 U/ml (Gambar 4.4.1). Enzim ekstrak kasar yang dihasilkan dipengaruhi oleh konsentrasi H^+ dan bekerja optimal pada pH basa yaitu 8, sehingga bersifat alkalofilik. Enzim yang optimum pada pH basa umumnya memiliki asam amino bersifat asam pada situs aktif enzim. Berdasarkan Biely (2003. 8--9), situs aktif xilanase terdiri dari dua asam amino glutamat, tetapi terkadang terdiri dari satu asam amino glutamat dan satu asam amino aspartat. Asam amino glutamat dan aspartat merupakan dua asam amino yang memiliki gugus R bermuatan negatif (Lehninger 1995: 116). Aktivitas optimum xilanase pada pH 8 juga dilaporkan oleh Menon dkk. (2010: 998). Xilanase tersebut diproduksi oleh *Bacillus pumilus* strain GESF-1 yang diisolasi dari perairan laut. Annamalai dkk. (2009: 296) melaporkan hasil karakterisasi enzim xilanase

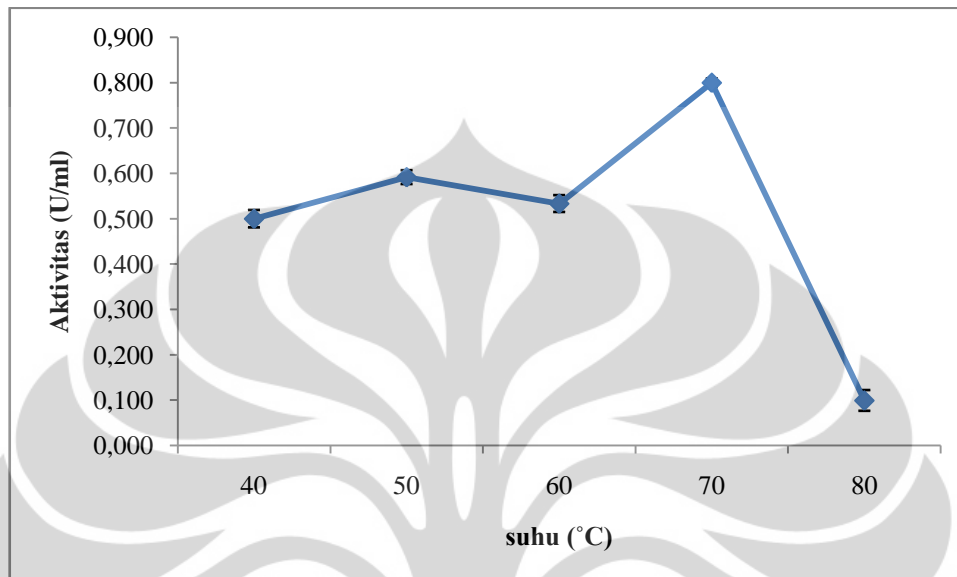
Bacillus subtilis yang diisolasi dari perairan laut optimum pada pH 9. Xilanase *Geobacillus* sp. yang diisolasi dari laut dalam optimum pada pH 7 (Wu dkk. 2006: 1210). Kulkarni dan Rao (1996: 171) melaporkan bahwa xilanase dari *Bacillus* sp. NCIM 59 optimum pada pH 9. Mamo dkk. (2006: 1495) melaporkan xilanase dari *Bacillus halodurans* S7 optimum pada pH 9. Berdasarkan referensi tersebut memungkinkan bahwa xilanase yang diproduksi dari bakteri laut cenderung optimum pada pH netral--basa (alkali). Hal tersebut dikarenakan xilanase yang bersifat alkalofilik dapat menyesuaikan diri pada kondisi lingkungan basa dengan kadar garam tinggi atau memerlukan garam untuk aktivitasnya karena disusun oleh asam amino yang bersifat asam, yaitu asam amino yang memiliki rantai samping gugus asam karboksilat (-COOH), misalnya asam glutamat dan asam aspartat (Edwards 1990 dalam Rejeki dkk. 2009: 2).

Aktivitas xilanase di bawah dan di atas nilai pH optimum menunjukkan aktivitas yang rendah. Hal tersebut disebabkan oleh perubahan struktur tiga dimensi enzim, sehingga xilan tidak dapat berikatan dengan sisi aktif xilanase (Pelczar & Chan 2008: 326). Hal tersebut menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Perubahan struktur tiga dimensi enzim dapat menyebabkan denaturasi, atau rusaknya struktur protein enzim (Sadikin 2002: 136--138). Aktivitas optimum xilanase pada pH alkali sangat dibutuhkan dalam aplikasi pemutihan pulp dan kertas.

Penelitian terdahulu melaporkan berbagai variasi pH optimum dari isolat berbeda. Wahyuntari dan Mangunwardoyo (2011: 210) memproduksi xilanase dari *Bacillus licheniformis* I-5 optimum pada pH 7. Li dkk. (2010: 72) melaporkan xilanase dari *Streptomyces rameus* L2001 optimum pada pH 7. Khandeparker dkk. (2011: 817) melaporkan xilanase dari *Bacillus subtilis* cho40 optimum pada pH 6.

4.4.2 Suhu optimum

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.4.2 dan Lampiran 20.



Gambar 4.4.2 Hasil pengamatan penentuan suhu optimum aktivitas xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A, pH 8, substrat *xylan beechwood*

Berdasarkan hasil pengamatan, aktivitas xilanase optimum pada suhu 70 °C dengan nilai aktivitas sebesar 0,799 U/ml. Xilanase yang dihasilkan oleh *Acinetobacter baumannii* M-13.2A tergolong termoenzim. Nam dkk. (2004: 1592) menyatakan bahwa enzim yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 45--80 °C tergolong termofilik atau termoenzim. Suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik karena meningkatkan energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat sehingga mempermudah keduanya untuk bereaksi (Sadikin 2002: 138). Kemampuan aktivitas enzim termofilik pada suhu tinggi disebabkan oleh banyaknya ikatan disulfida pada struktur protein enzim. Ikatan disulfida (-S-S- atau sistin) merupakan ikatan kovalen yang sangat kuat sehingga dibutuhkan suhu yang sangat tinggi untuk mengurai ikatannya. Ikatan disulfida akan menstabilkan struktur sekunder dan struktur tersier protein enzim sehingga protein termoenzim tetap stabil pada suhu tinggi dan tidak kehilangan kemampuan katalisnya (Murray dkk. 2003: 49--51). Laju reaksi enzimatik berjalan cepat karena selain struktur enzim stabil pada suhu tinggi, gerak energi

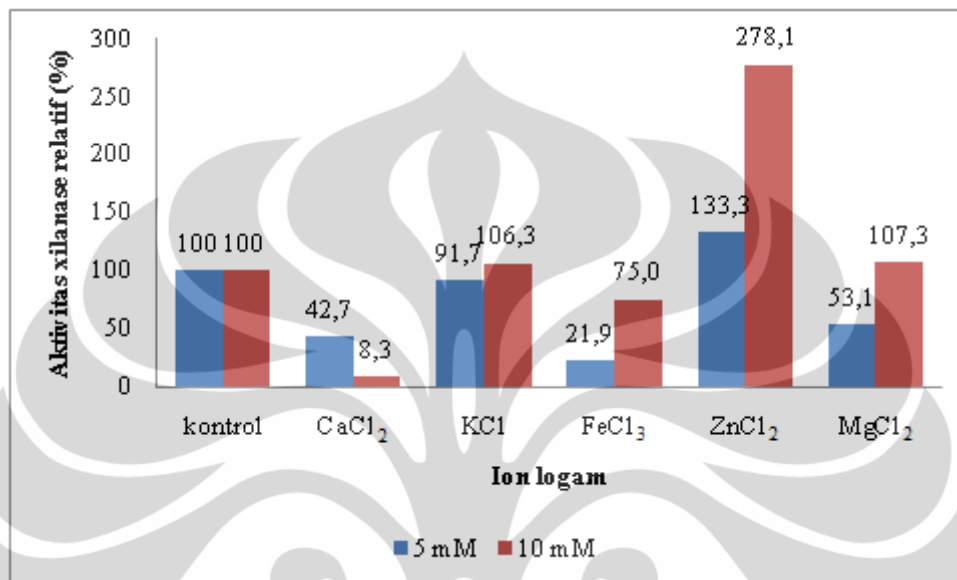
termodinamik akan memicu tumbukan antara situs aktif enzim dengan substrat, sehingga aktivitas enzim meningkat. Sebaliknya pada enzim yang optimum pada suhu rendah, terjadi pelipatan asam amino sistein pada sisi aktif enzim akibat denaturasi protein pada saat suhu tinggi (Kulkarni dkk. 1999: 446).

Aktivitas xilanase pada suhu 80 °C menunjukkan penurunan aktivitas sampai 0,09 U/ml. Hal tersebut disebabkan karena rusaknya struktur lipatan protein atau denaturasi pada suhu tinggi. Denaturasi protein menyebabkan susunan tiga dimensi dari rantai polipeptida enzim terganggu akibat putusnya ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan ikatan elektrostatik pada enzim (Murray dkk. 2003: 49--50). Molekul tersebut terbuka menjadi struktur acak sehingga kehilangan aktivitas biologisnya, tanpa membentuk kerusakan pada kerangka kovalen (Leningher 1995: 147--152).

Wu dkk. (2006: 1214) melaporkan xilanase dari *Geobacillus* sp. MT-1 dari laut dalam samudera pasifik optimum pada suhu 70 °C. Wahyuntari dan Mangunwardoyo (2011: 210) memproduksi xilanase dari *Bacillus licheniformis* I-5 optimum pada suhu 50 °C. Xilanase dari *Cereus pterogenus* optimum pada suhu 80 °C (Mathithan dkk. 2010: 482). *Bacillus* sp. NCIM 59 menghasilkan xilanase optimum pada suhu 70 °C (Kulkarni & Rao 1996: 171). Xilanase dari *Bacillus halodurans* S7 optimum pada suhu 70 °C (Mamo dkk. 2006: 1495). Khandeparker dkk. (2011: 817) melaporkan *Bacillus subtilis* cho 40 menghasilkan xilanase yang optimum pada suhu 60 °C.

4.4.3 Pengaruh ion logam terhadap aktivitas xilanase

Hasil pengamatan pengaruh ion logam terhadap aktivitas xilanase akibat penambahan larutan berbagai ion logam dengan konsentrasi 5 dan 10 mM dapat dilihat pada Gambar 4.4.3 dan Lampiran 21.



Gambar 4.4.3 Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas xilanase

Berdasarkan hasil pengamatan, penambahan ion Zn^{2+} 5 mM dan 10 mM dapat meningkatkan aktivitas hingga 133,3 % dan 278,1 %, sehingga disebut sebagai aktivator. Sebagai aktivator, ion logam meningkatkan aktivitas reaksi enzimatik dengan cara katalisis asam basa, katalisis kovalen, pendekatan reaktan dan induksi dalam enzim atau substrat (Murray dkk. 2003: 101). Ion Zn^{2+} bertindak sebagai aktivator dilaporkan oleh Meng dkk. (2009: 5), xilanase yang diproduksi oleh *Demequina* sp. JK4 dari perairan laut dalam ditingkatkan aktivitasnya oleh ion Zn^{2+} hingga 102,8%. Xilanase dari *Aspergillus sulphureus* yang diekspresikan pada *Pichia pastoris* juga ditingkatkan aktivitasnya oleh ion Zn^{2+} (Li dkk. 2010:1330). Ion Zn^{2+} bersifat sebagai inhibitor pada sebagian xilanase, akan tetapi pada penelitian ini ion Zn^{2+} bersifat sebagai aktivator karena dapat meningkatkan aktivitas xilanase. Xilanase yang dihambat aktivitasnya oleh ion Zn^{2+} diantaranya xilanase dari *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu dkk. 2006: 1210) dan *Bacillus pumilus* strain GESF-1 (Menon dkk. 2010: 1003). Penambahan ion

Mg²⁺ 5 mM menurunkan aktivitas xilanase hingga 53,1%, akan tetapi penambahan ion Mg²⁺ 10 mM meningkatkan aktivitas xilanase hingga 107,3 %. Xilanase dari *Bacillus pumilus* strain GESF-1 juga ditingkatkan aktivitasnya oleh ion Mg²⁺ (Menon dkk. 2010: 1003). Xilanase dari *Streptomyces rameus* L2001 juga ditingkatkan aktivitasnya oleh penambahan ion Mg²⁺ hingga 209% (Li dkk. 2010: 74). Ion Mg²⁺ tidak memperlihatkan pengaruh terhadap aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus halodurans* S7 (Mamo dkk. 2006: 1495).

Penambahan 5 mM dan 10 mM ion Fe³⁺ menurunkan aktivitas hingga 21,9--75%. Penambahan 5 mM dan 10 mM ion Ca²⁺ menurunkan aktivitas hingga 42,7 dan 8,3 %. Ion logam yang menyebabkan turunnya aktivitas enzim disebut sebagai inhibitor. Penghambatan aktivitas enzim akibat penambahan ion logam diduga karena ion logam tersebut memengaruhi sisi aktif enzim xilanase sehingga struktur tiga dimensi enzim tidak sesuai dengan substrat. Hal tersebut menyebabkan substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim, sehingga reaksi berjalan lambat. Pendapat lain juga menyatakan bahwa penghambatan terjadi karena ion logam tersebut bersifat sebagai kontaminan dan meningkatkan ikatan antara enzim-substrat dengan ikatan elektrostatik yang kuat (Ghosh dkk.1993: 707). Menon dkk. (2010: 1002) melaporkan ion Fe³⁺ menunjukkan pengaruh sebagai inhibitor pada xilanase dari *Bacillus pumilus* strain GESF-1. Ion Ca²⁺ juga menunjukkan pengaruh sebagai inhibitor pada xilanase dari *Demequina* sp. JK4 diisolasi dari perairan laut dalam (Meng dkk. 2009: 5).

Ion K⁺ tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas xilanase yang dihasilkan karena aktifitas relatifnya berkisar antara aktifitas relatif kontrol tanpa penambahan ion logam, yaitu 91,7 % --106,3 %. Hal tersebut diduga akibat pengikatan ion logam tidak terjadi pada sisi aktif enzim tetapi pada daerah yang tidak terlibat dalam efisiensi hidrolisis substrat (Irawadi 1999: 5). Hal tersebut juga ditunjukkan oleh xilanase dari *Demequina* sp. JK4 (Meng dkk. 2009: 5) dan xilanase dari *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu, dkk. 2006: 1210) yang diisolasi dari perairan laut dalam. Li dkk. (2010: 74) juga melaporkan bahwa ion K⁺ tidak memengaruhi aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh *Streptomyces rameus* L2001. Ion K⁺ juga tidak memengaruhi aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus halodurans* S7 (Mamo dkk. 2006: 1495).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

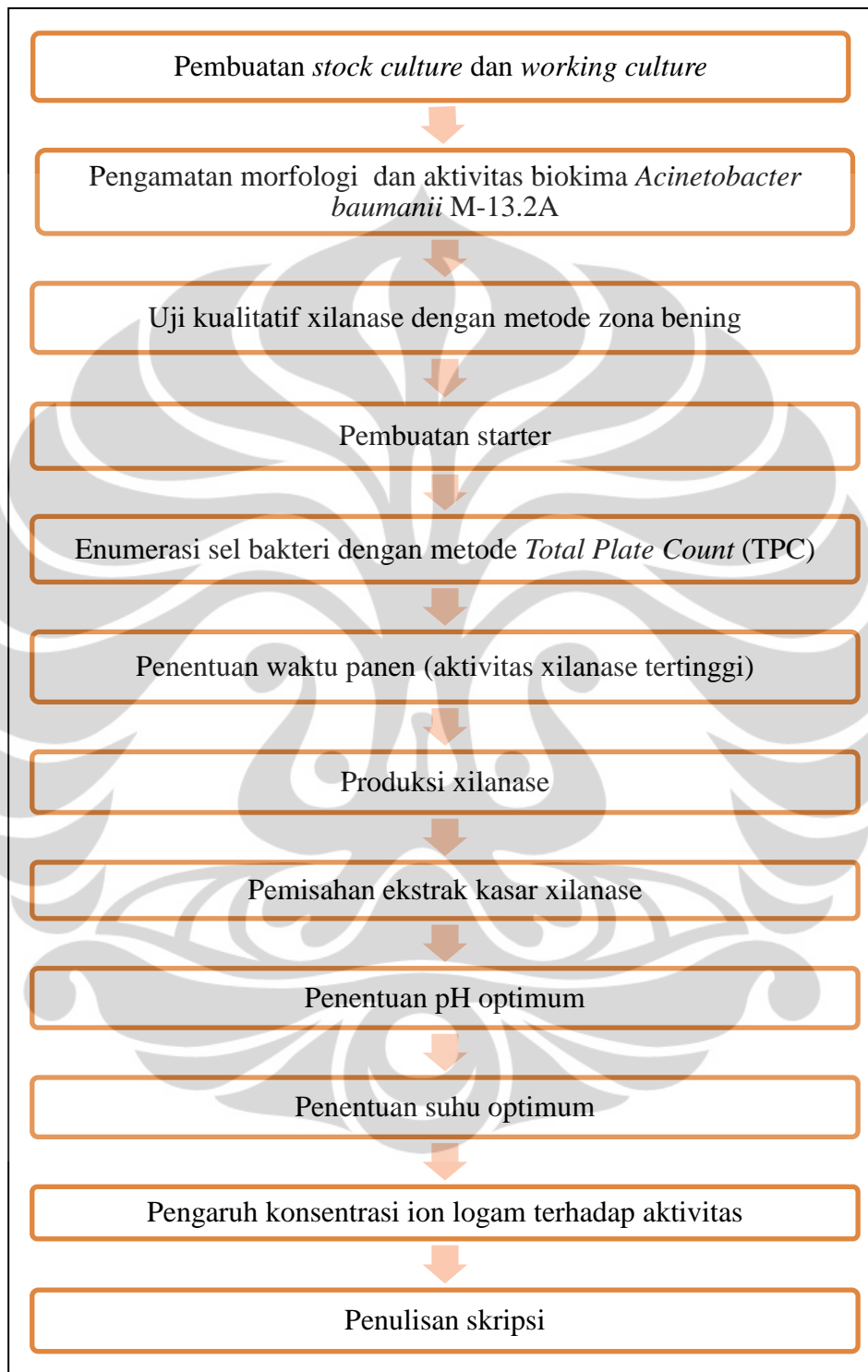
5.1 Kesimpulan

1. Produksi xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A membutuhkan waktu selama dua hari dengan aktivitas tertinggi 5,17 U/ml.
2. Karakterisasi xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A optimum pada pH 8 dan suhu 70 °C. Penambahan ion Zn^{2+} dan Mg^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase, sedangkan penambahan ion Fe^{3+} dan Ca^{2+} menurunkan aktivitas xilanase. Penambahan ion K^+ tidak berpengaruh terhadap aktivitas xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A.

5.2 Saran

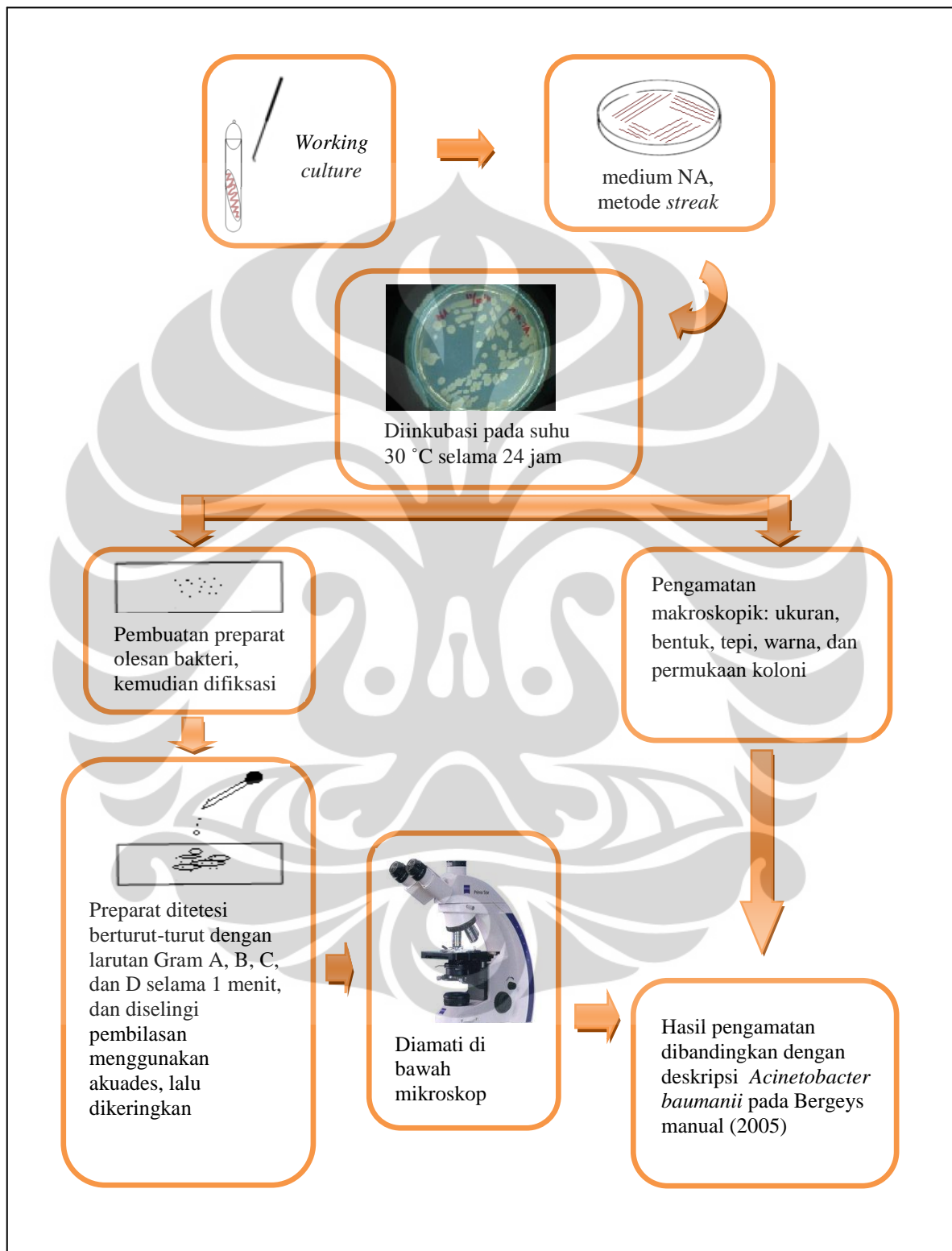
1. Perlu dilakukan penelitian tentang stabilitas pH dan suhu xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dan karakterisasi yang lebih lengkap terhadap aktivitas xilanase hasil purifikasi.
2. Perlu dilakukan purifikasi xilanase yang dihasilkan dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A.

Lampiran 1.
Skema Alur Kerja Penelitian



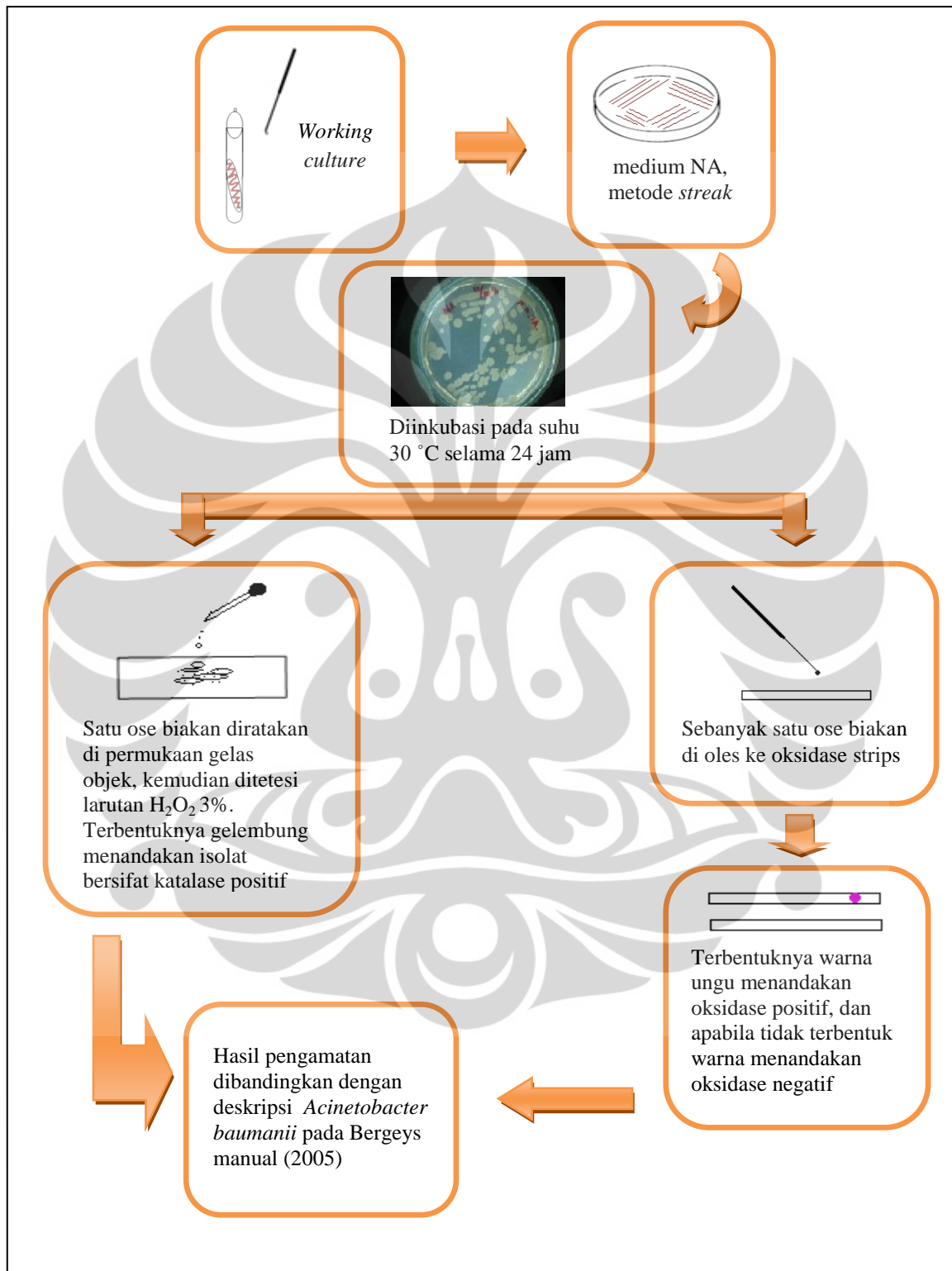
Lampiran 2.

Skema Cara Kerja Pengamatan Mikroskopik dan Makroskopik Bakteri



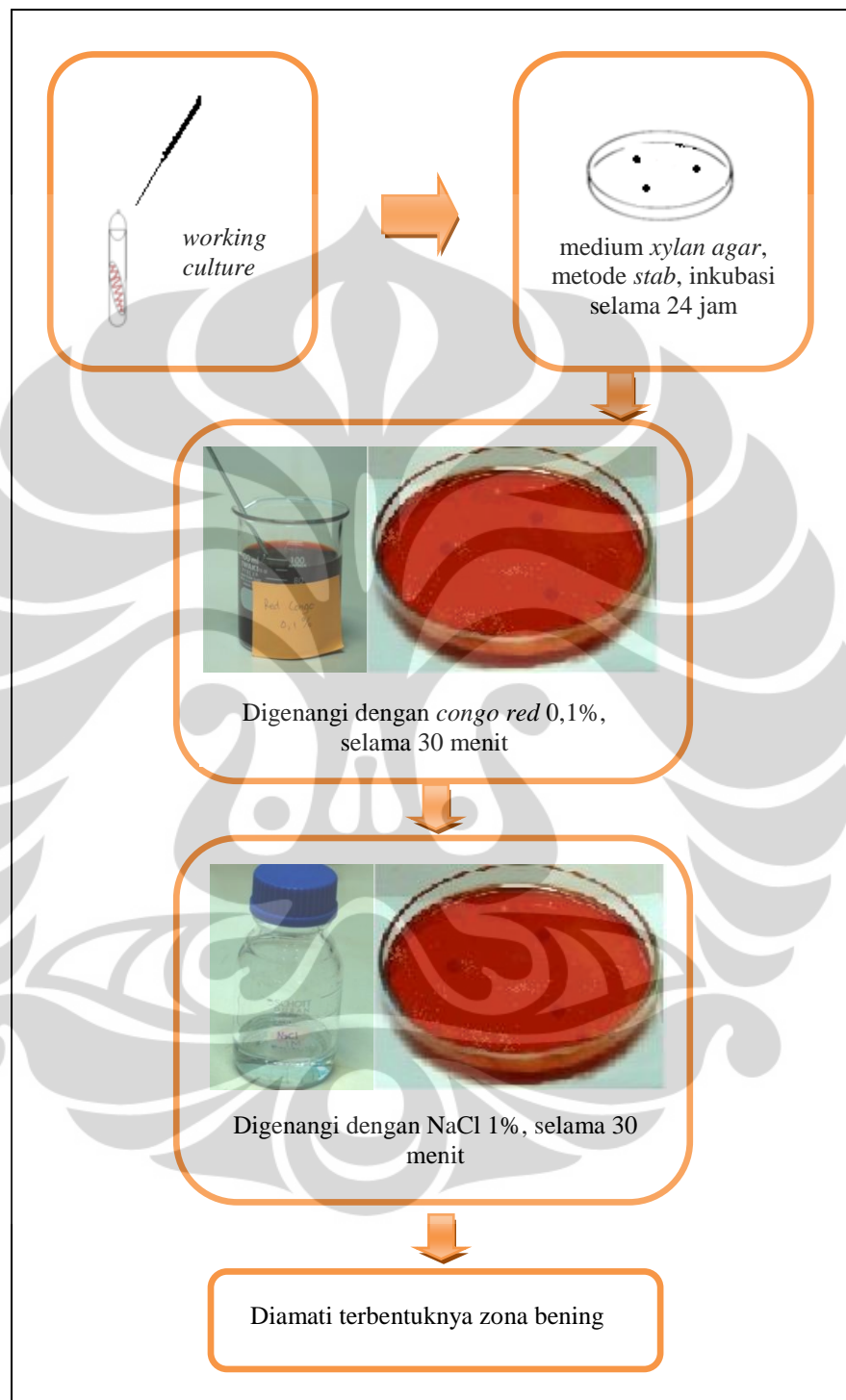
Lampiran 3.

Skema Cara Kerja Pengamatan Aktivitas Biokimia Bakteri



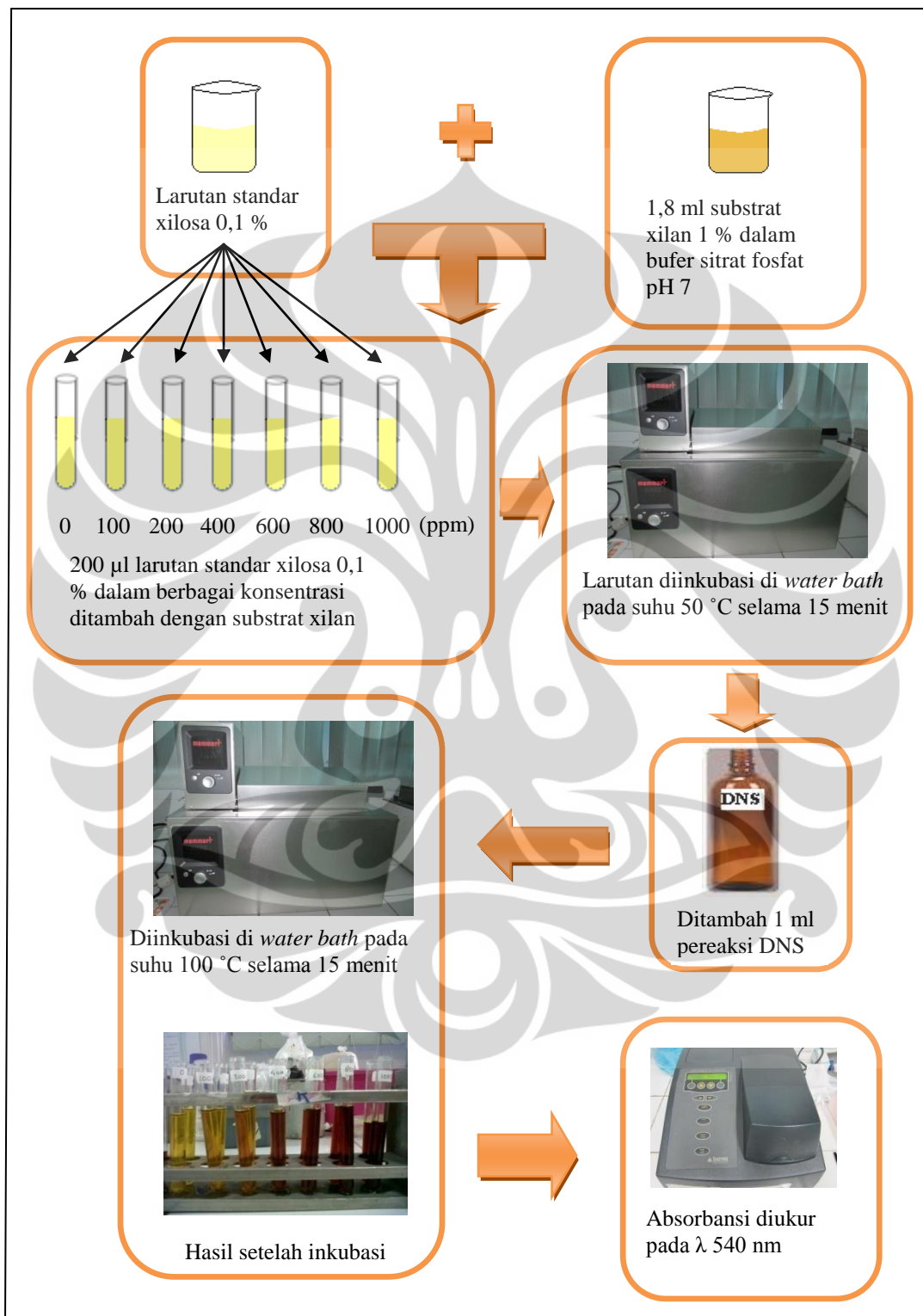
Lampiran 4.

Skema cara kerja uji kualitatif xilanas dengan metode zona bening



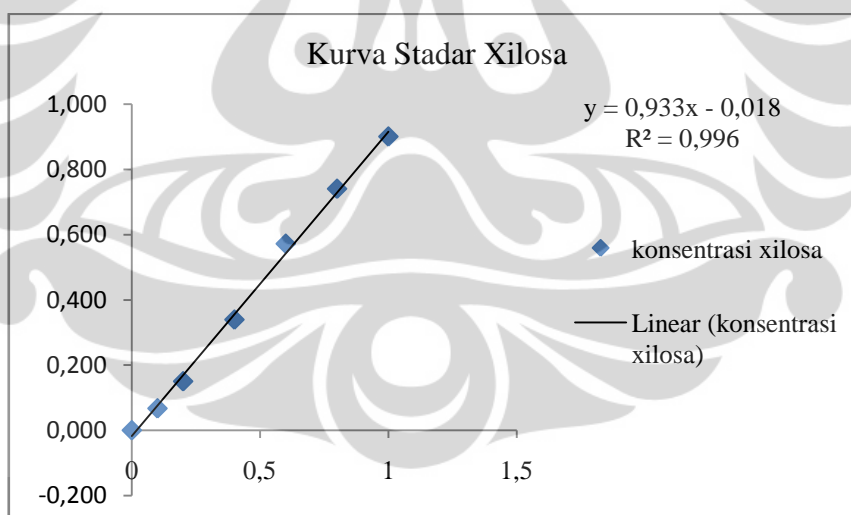
Lampiran 5.

Skema cara kerja pembuatan kurva standar xilosa



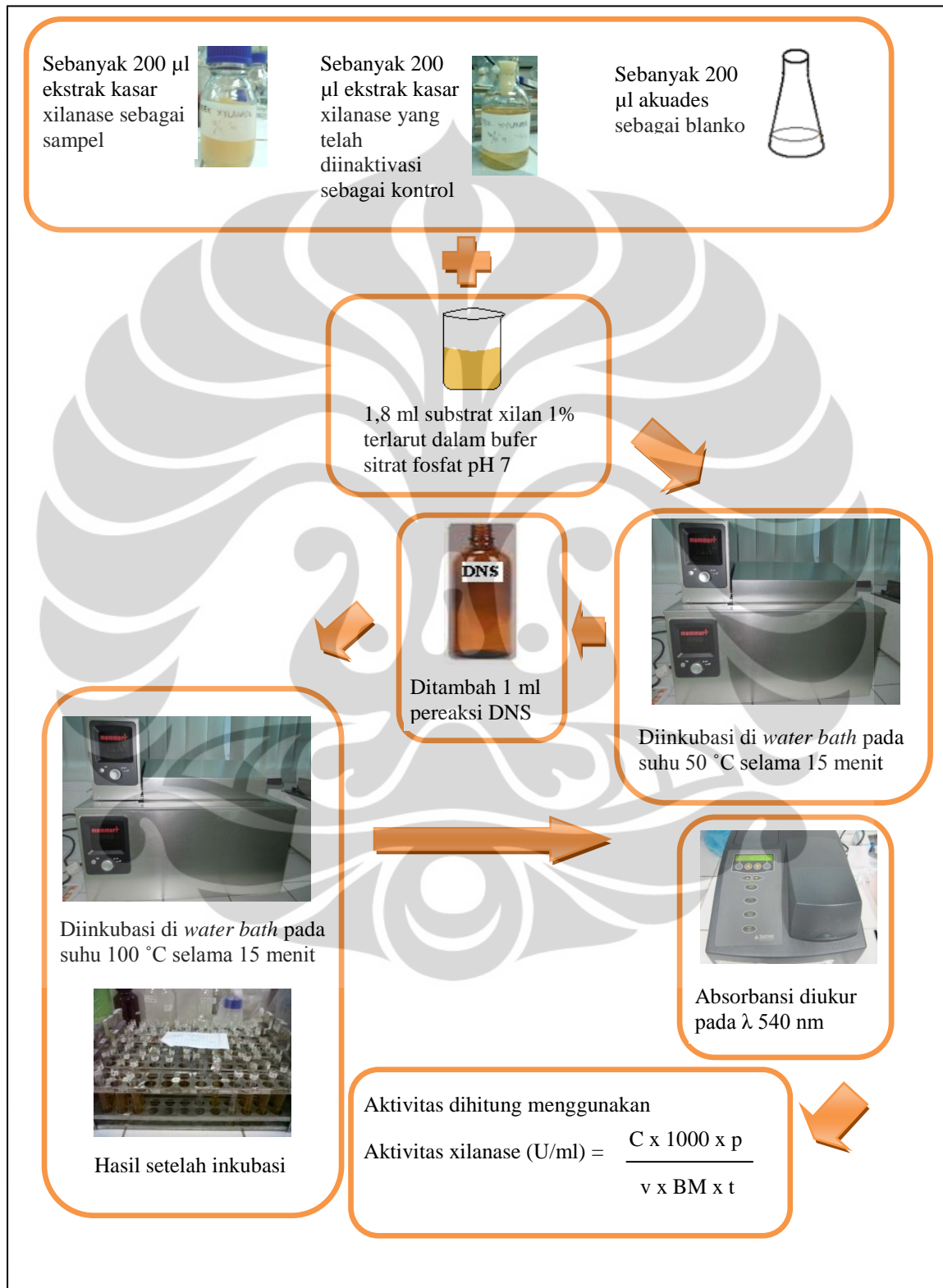
Lampiran 6.
Kurva standar xilosa

Konsentrasi xilosa (mg/ml)	ppm	Absorbansi λ 540 nm	Rerata absorbansi λ 540 nm
0,0	0	1. 0,000	0,000
		2. 0,000	
0,1	100	1. 0,058	0,067
		2. 0,076	
0,2	200	1. 0,118	0,150
		2. 0,182	
0,4	400	1. 0,340	0,339
		2. 0,338	
0,6	600	1. 0,605	0,572
		2. 0,538	
0,8	800	1. 0,757	0,740
		2. 0,723	
1,0	1000	1. 0,916	0,900
		2. 0,884	



lampiran 7.

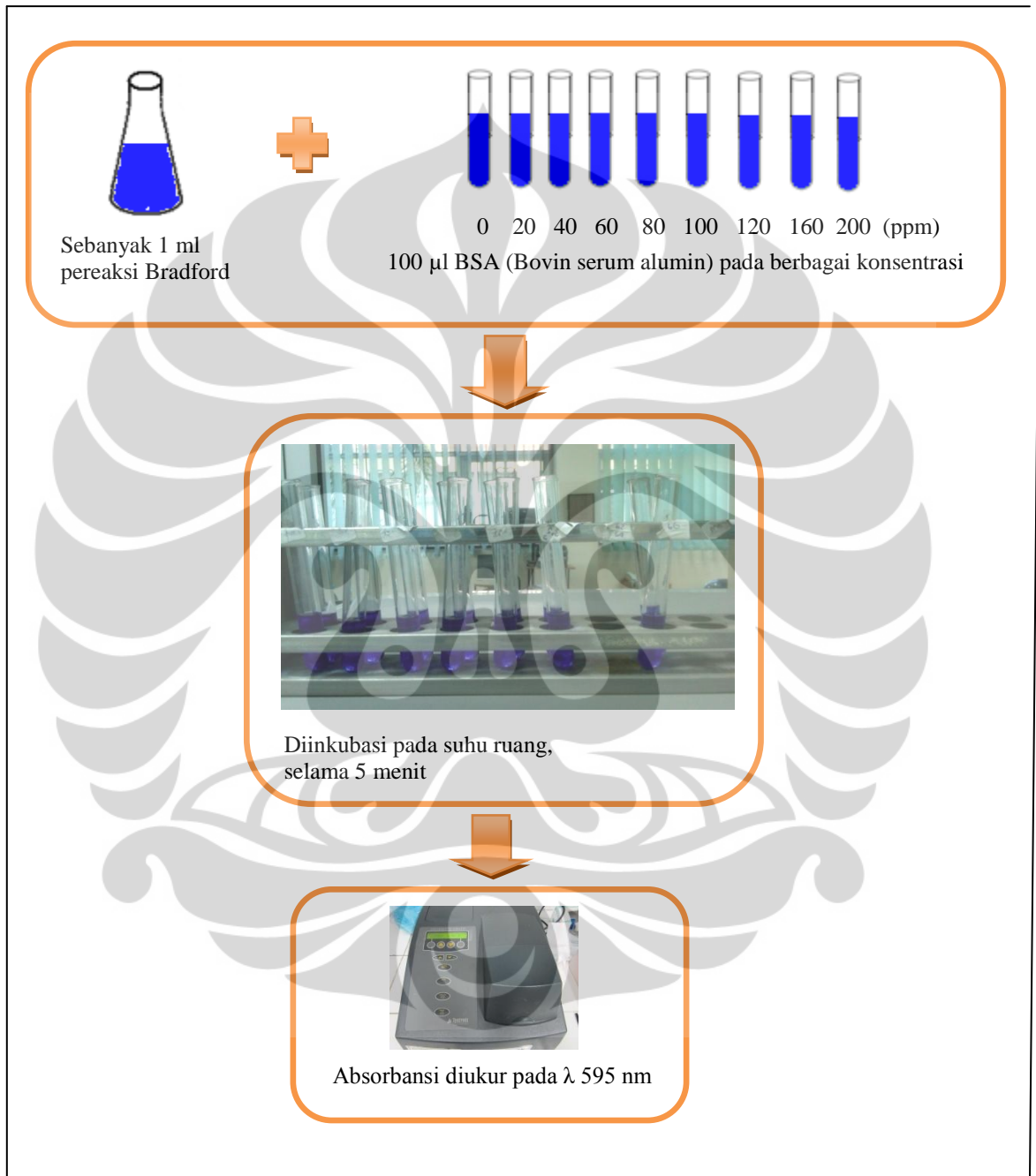
Skema cara kerja uji kuantitatif xilanase (Biely 2003: 10)



Universitas Indonesia

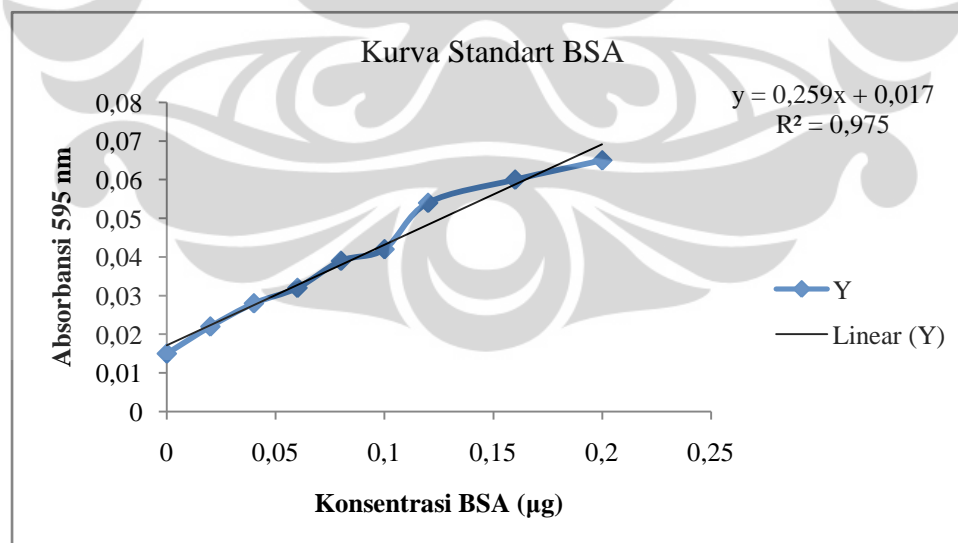
Lampiran 8.

Skema cara kerja pembuatan kurva standar BSA



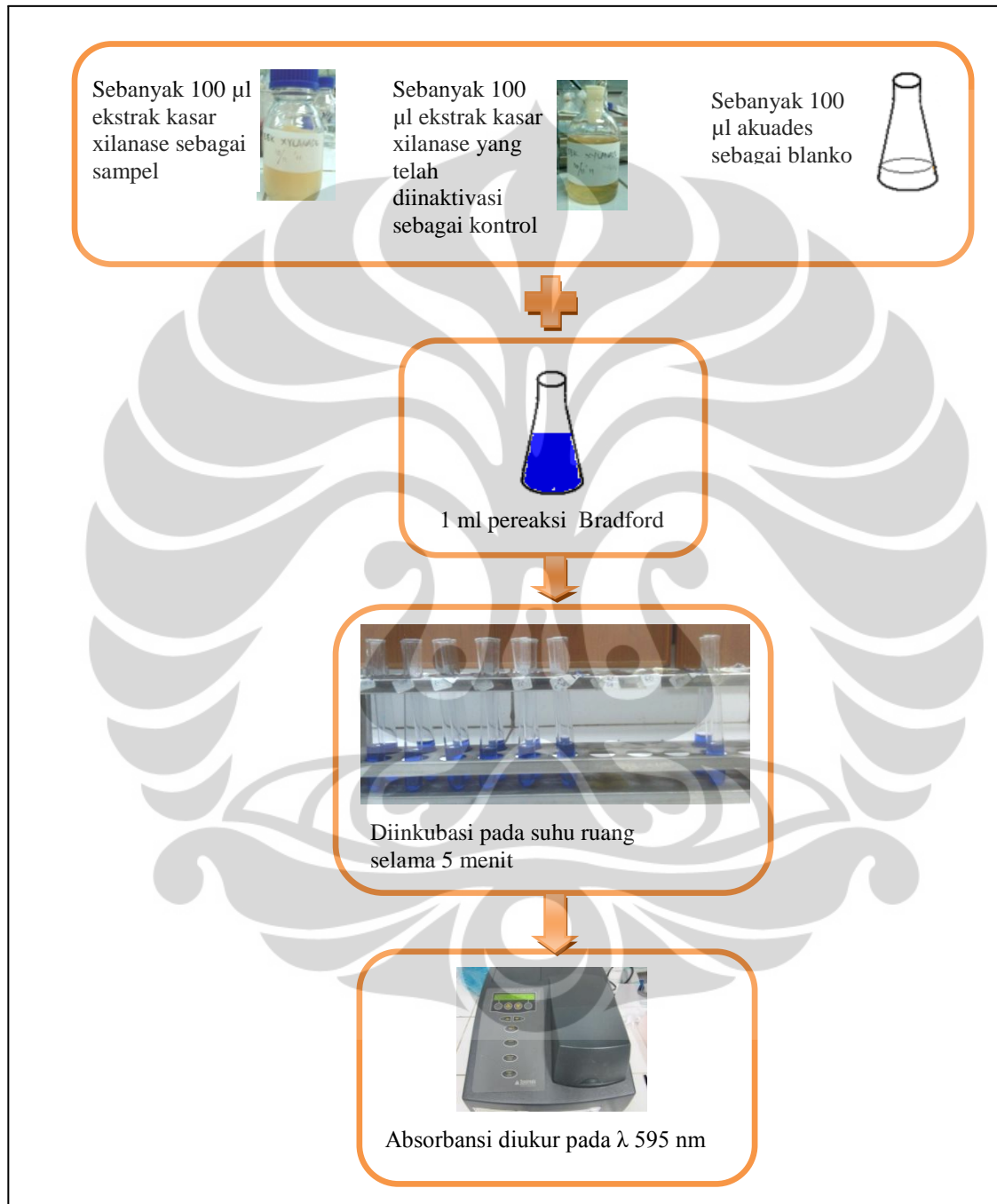
Lampiran 9.
Kurva Standar BSA

Konsentrasi BSA (mg/ml)	ppm	Absorbansi λ 540 nm	Rerata absorbansi λ 540 nm
0,0	0	1. 0,013	0,015
		2. 0,017	
0,02	20	1. 0,021	0,022
		2. 0,023	
0,04	40	1. 0,018	0,028
		2. 0,038	
0,06	60	1. 0,030	0,032
		2. 0,034	
0,08	80	1. 0,042	0,039
		2. 0,036	
0,1	100	1. 0,043	0,042
		2. 0,041	
0,12	120	1. 0,054	0,054
		2. 0,054	
0,16	160	1. 0,068	0,060
		2. 0,052	
2,00	200	1. 0,063	0,065
		2. 0,067	

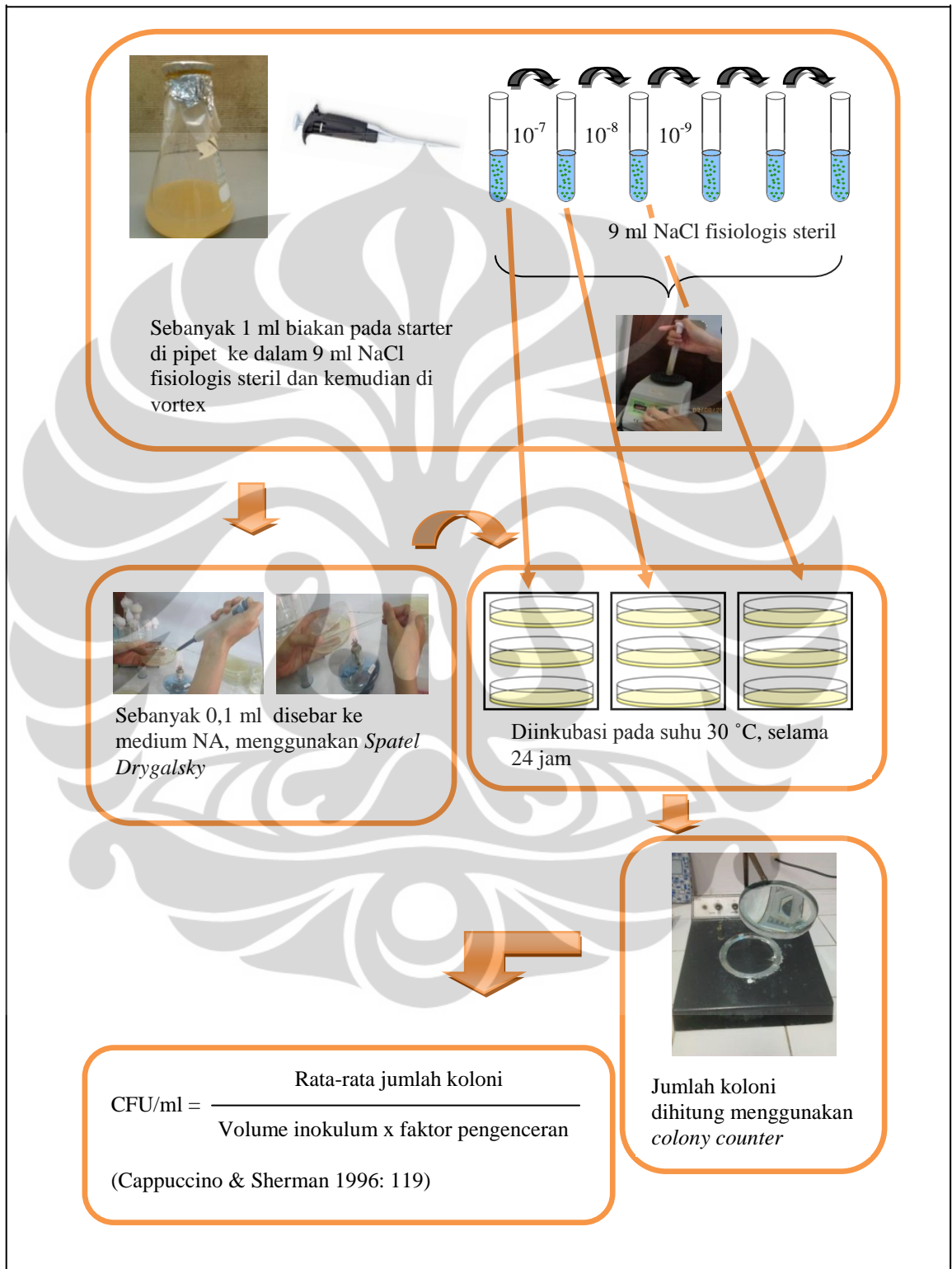


Lampiran 10.

Skema cara kerja pengukuran kadar protein (Bradford 1976)

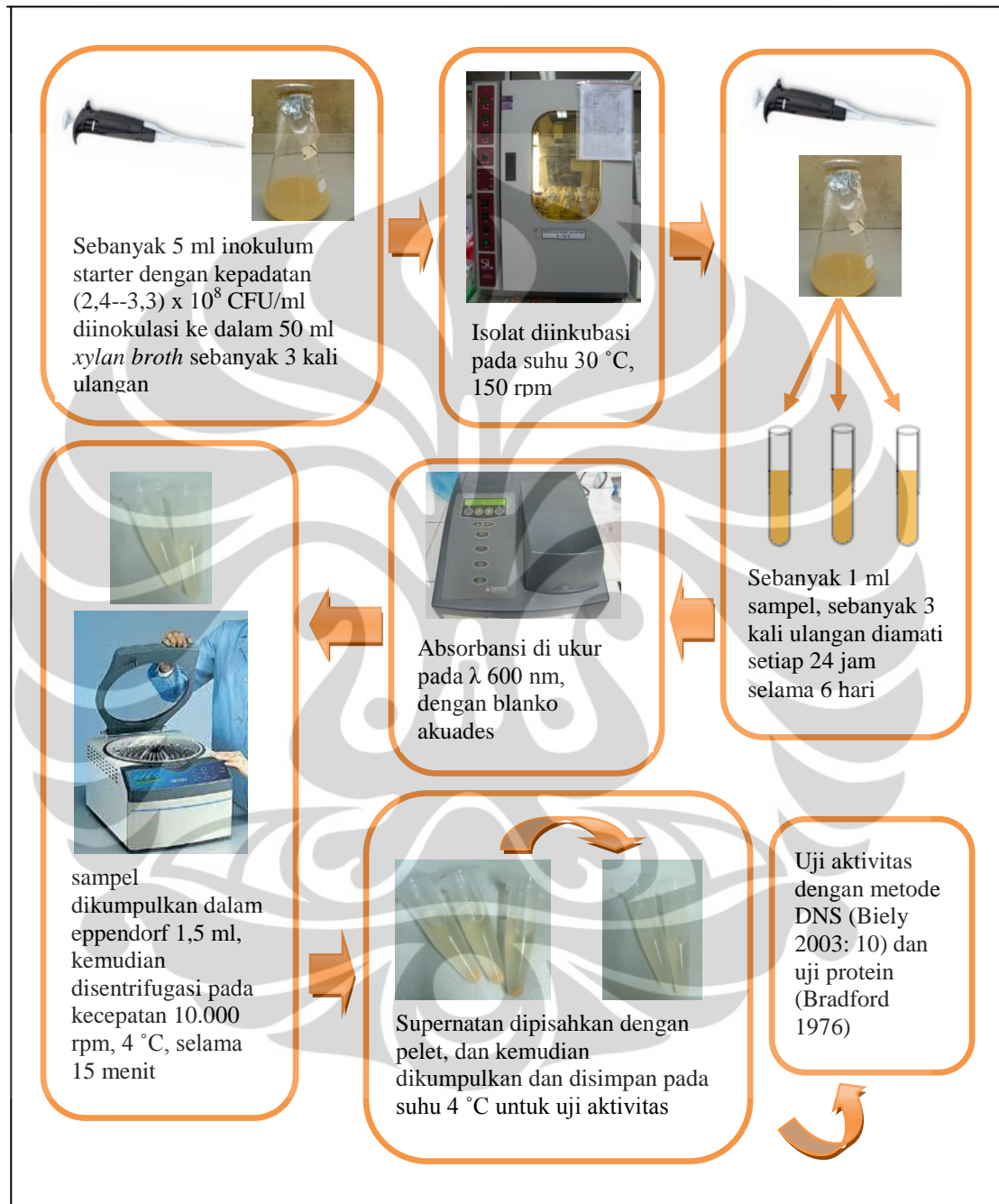


Lampiran 11.
Skema cara kerja perhitungan sel bakteri

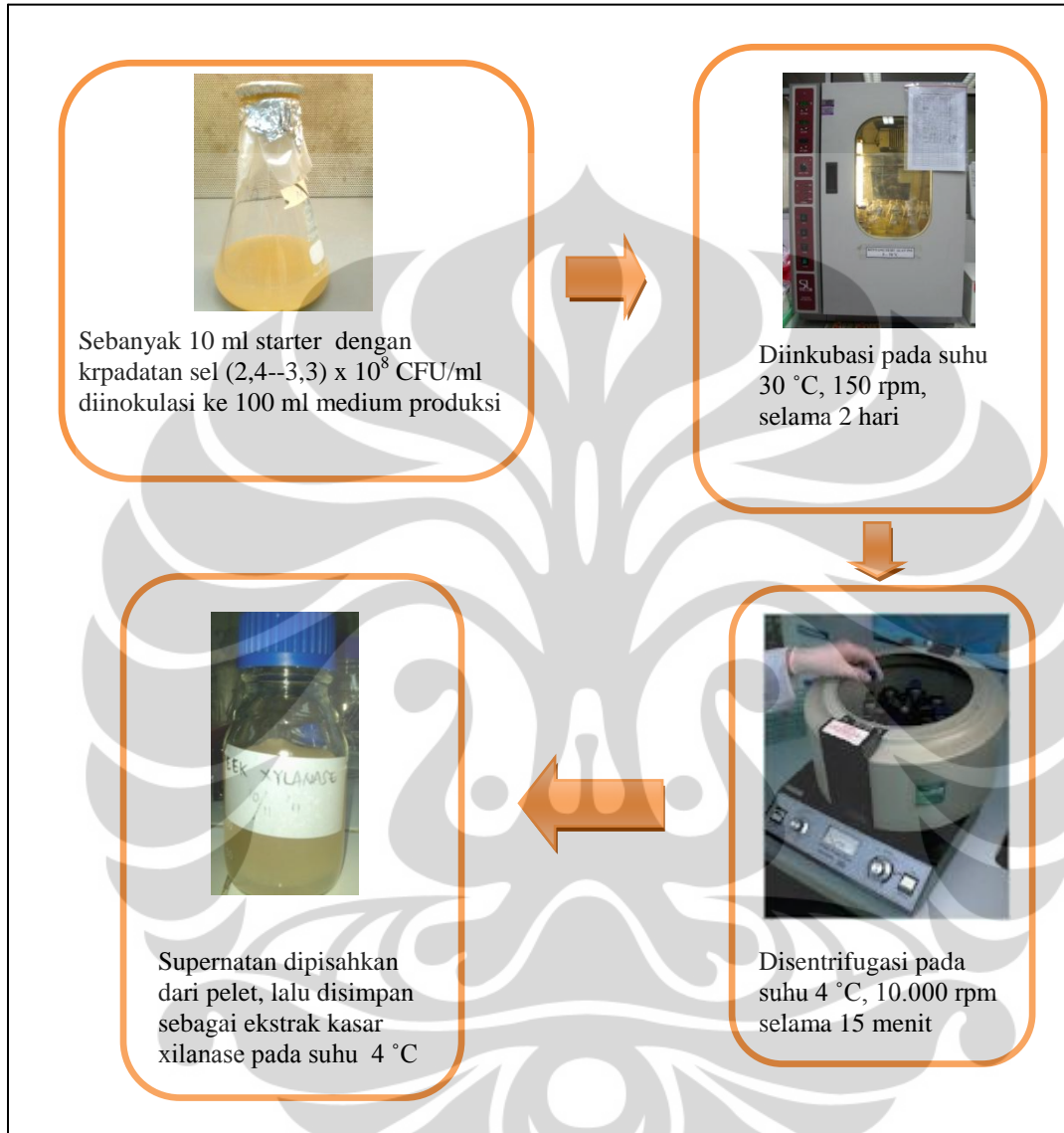


Lampiran 12.

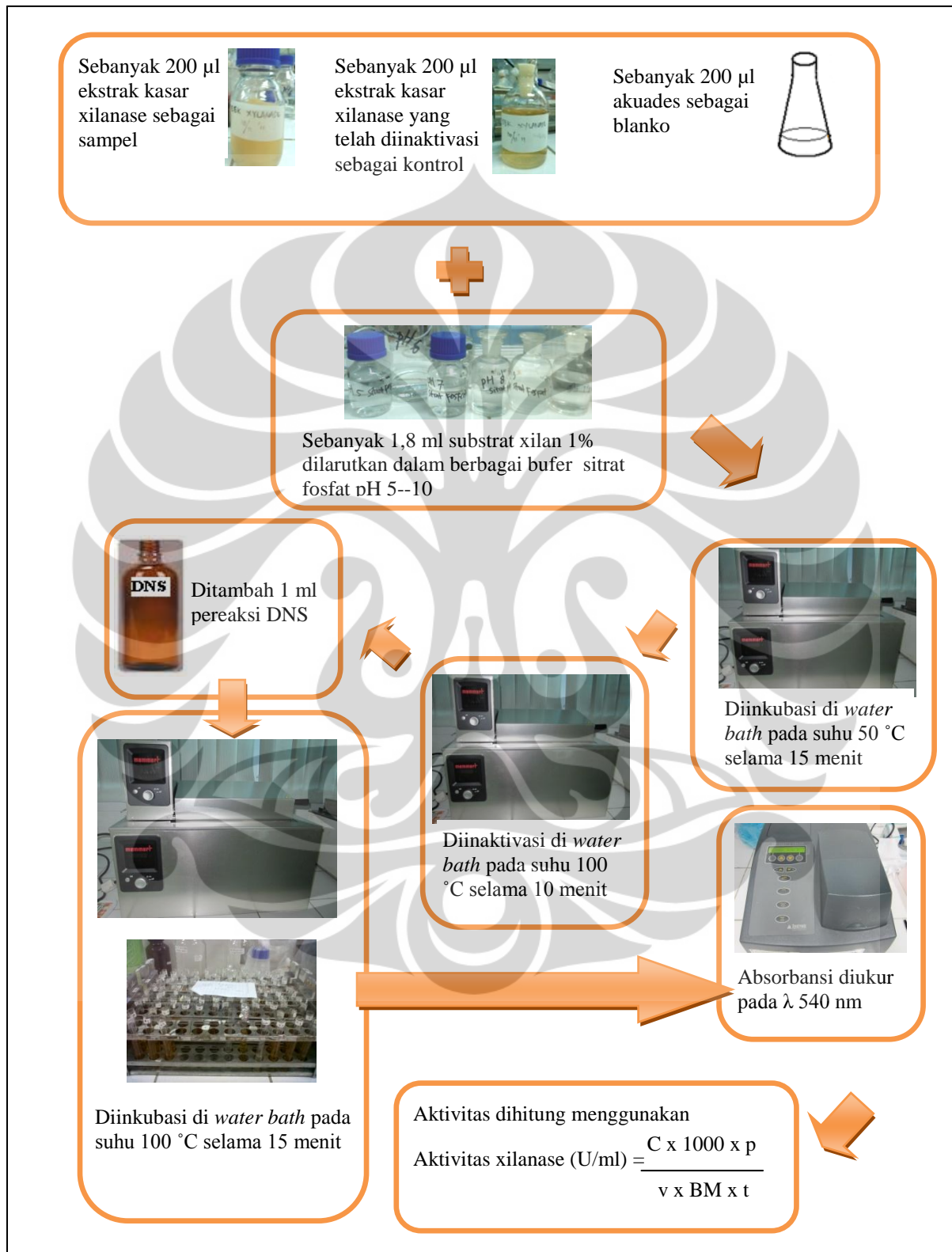
Skema cara kerja penentuan waktu panen xilanase



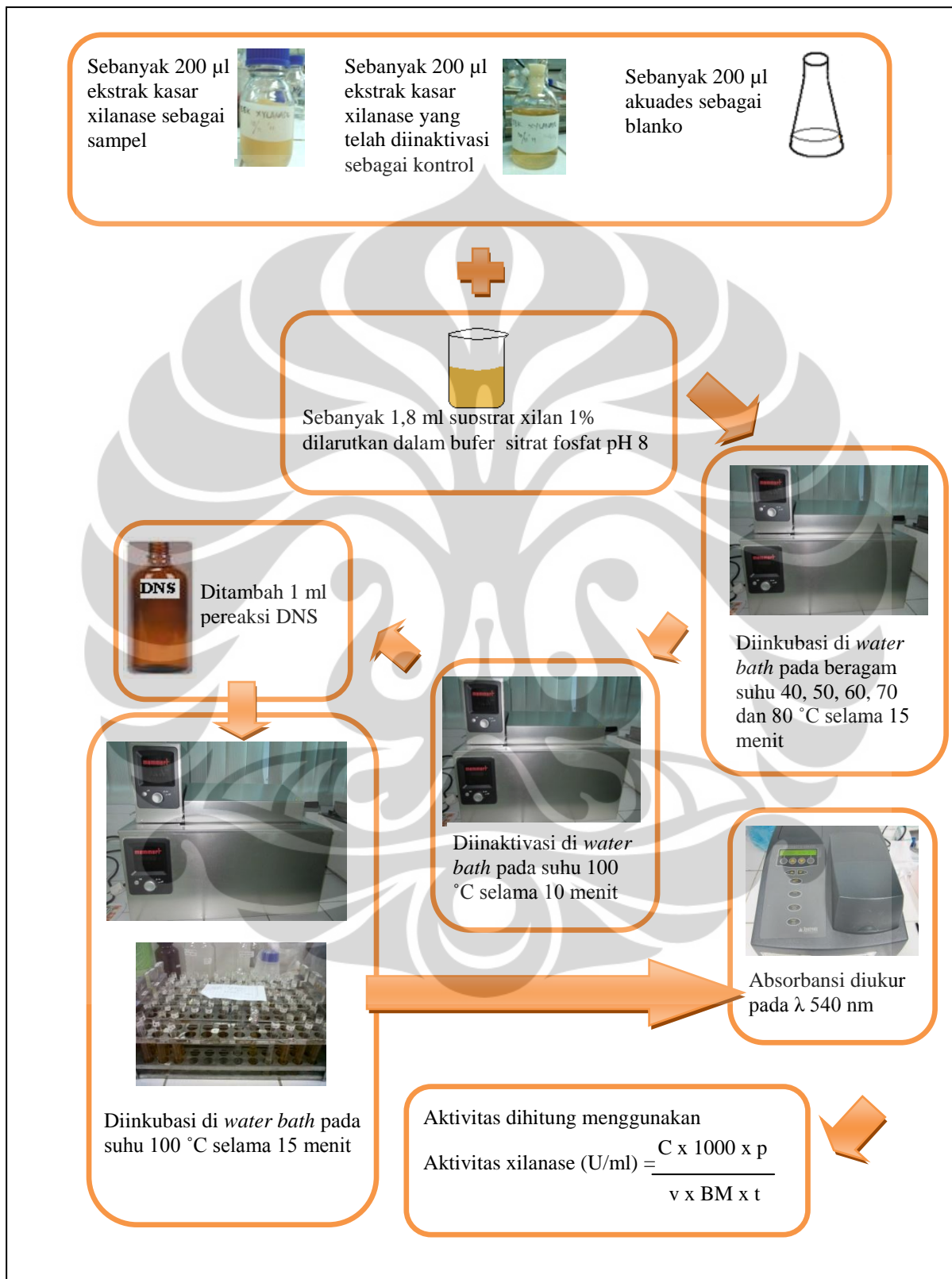
Lampiran 13.
Skema cara kerja produksi xilanase



Lampiran 14.
Skema cara kerja karakterisasi pH

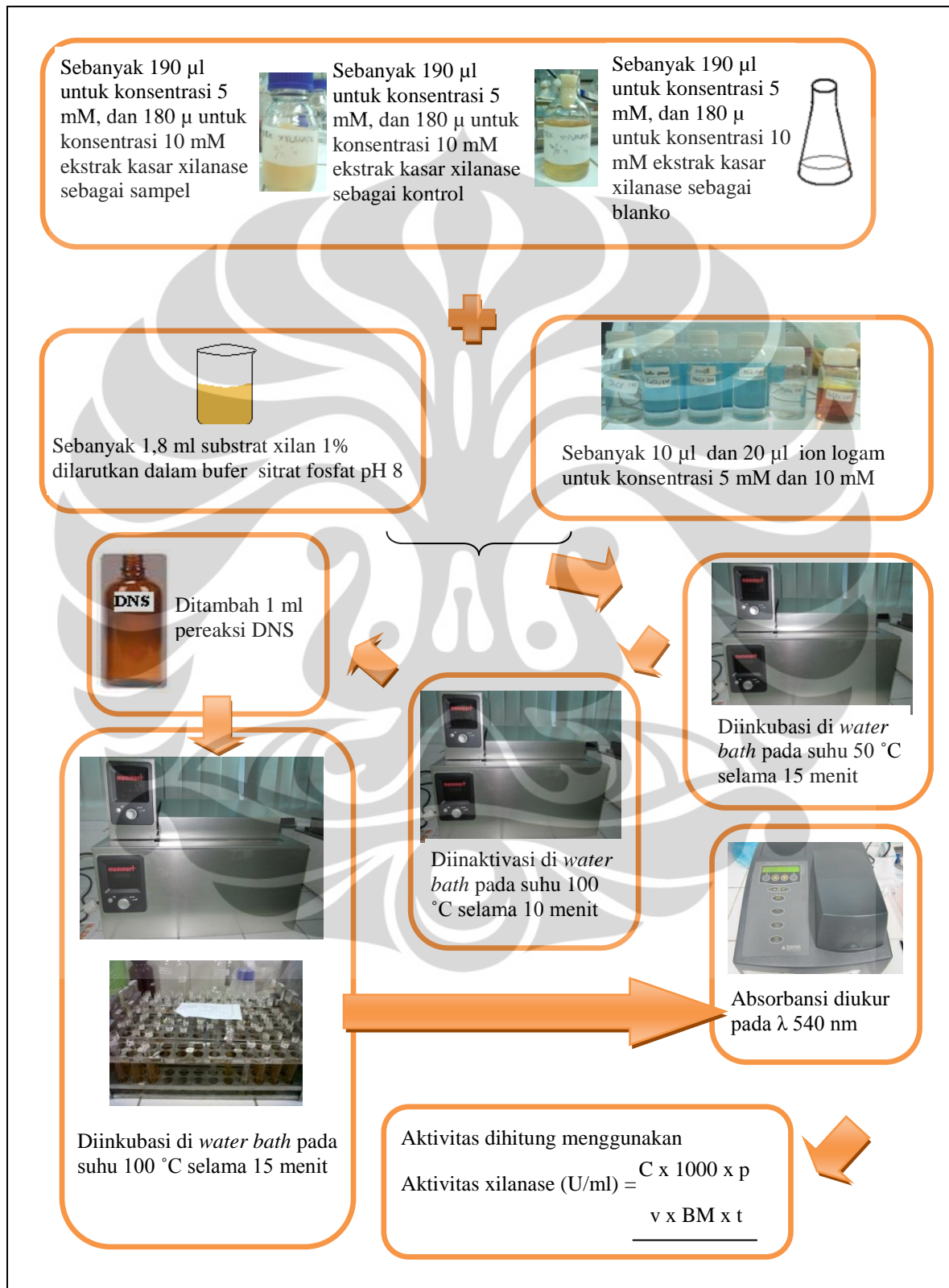


Lampiran 15.
Skema cara kerja karakterisasi suhu



Lampiran 16.

Skema cara kerja pengaruh ion logam



Universitas Indonesia

Lampiran 17.

Perhitungan penentuan waktu panen (aktivitas xilanase tertinggi) xilanase
dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

Hari	Retata Sampel	Rerata Kontrol	Rerata Blanko	Konsentrasi xilosa	Vol (ml)	Waktu (menit)	BM xilosa	Aktivitas enzim (U/ml)
0	0,4100	0,3880	0,356	0,0429	0,2	15	150,13	0,6663
1	0,4305	0,3820	0,356	0,0713	0,2	15	150,13	1,1078
2	0,7675	0,4750	0,356	0,3328	0,2	15	150,13	5,1724
3	0,5535	0,4150	0,356	0,1677	0,2	15	150,13	2,6070
4	0,4525	0,4035	0,356	0,0718	0,2	15	150,13	1,1161
5	0,4450	0,4115	0,356	0,0552	0,2	15	150,13	0,8579

*Faktor pengenceran 1 : 6 = 7 kali

Lampiran 18.

Hasil pengamatan uji protein dengan metode Bradford (1976)
dan aktivitas spesifik

Hari	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0,29	2,24
1	0,27	4,04
2	0,05	103,04
3	0,14	18,5
4	0,11	9,79
5	0,13	5,84

Lampiran 19.
 Hasil Perhitungan Penentuan pH Optimum Xilanase
 dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

pH	Retata Sampel	Rerata Kontrol	Rerata Blanko	Konsentrasi xilosa	Vol (ml)	Waktu (menit)	BM xilosa	Aktivitas enzim (U/ml)
5	0,2010	0,2000	0,1045	0,0204	0,2	15	150,13	0,3165
6	0,3430	0,3070	0,1020	0,0578	0,2	15	150,13	0,8995
7	0,4160	0,3680	0,0075	0,0707	0,2	15	150,13	1,0994
8	0,6520	0,5770	0,5790	0,0996	0,2	15	150,13	1,5492
9	0,9180	0,8990	0,7290	0,0396	0,2	15	150,13	0,6163
10	1,1080	1,1070	1,8580	0,0204	0,2	15	150,13	0,3165

*Faktor pengenceran 1 : 6 = 7 kali

Lampiran 20.
 Hasil Perhitungan Penentuan Suhu Optimum Xilanase
 dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

Suhu	Retata Sampel	Rerata Kontrol	Rerata Blanko	Konsentrasi xilosa	Vol (ml)	Waktu (menit)	BM xilosa	Aktivitas enzim (U/ml)
40	0,2575	0,2455	0,1980	0,0321	0,2	15	150,13	0,4997
50	0,2975	0,2800	0,2340	0,0380	0,2	15	150,13	0,5913
60	0,2470	0,2330	0,203	0,0342	0,2	15	150,13	0,5330
70	0,2440	0,2140	0,2020	0,5144	0,2	15	150,13	0,7995
80	0,2680	0,2800	0,2540	0,0064	0,2	15	150,13	0,0999

*Faktor pengenceran 1 : 6 = 7 kali

Lampiran 21.

Hasil Perhitungan Pengaruh Penambahan Ion Logam Terhadap Aktivitas Xilanase
dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A

Ion logam	Konsentrasi Ion Logam (mM)	Rerata Sampel	Rerata Kontrol	Rerata Blanko	Aktivitas Xilanase (U/ml)	Aktivitas Relatif (%)
Kontrol	-	0,244	0,214	0,202	0,799	100
NaCl	5	0,321	0,323	0,276	0,266	33,3
	10	0,330	0,312	0,273	0,674	84,4
CaCl ₂	5	0,401	0,399	0,322	0,341	42,7
	10	0,420	0,439	0,368	0,066	8,3
KCl	5	0,349	0,323	0,266	0,732	91,7
	10	0,370	0,341	0,289	0,849	106,3
FeCl ₃	5	0,302	0,310	0,260	0,174	21,9
	10	0,300	0,281	0,240	0,599	75
ZnCl ₂	5	0,423	0,377	0,340	1,066	133,3
	10	0,540	0,421	0,366	2,224	278,1
MgCl ₂	5	0,306	0,299	0,263	0,424	53,1
	10	0,380	0,344	0,300	0,857	107,3

*Faktor pengenceran 1 : 6 = 7 kali

DAFTAR REFERENSI

- Annamalai, N., R. Thavasi, S. Jayalakshmi & T. Balasubramanian. 2009. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian Journal of Biotechnology*. **8**: 291--297.
- Araki, T., S. Tani, K. Maeda, S. Hashikawa, H. Nakagawa & T. Morishita. 1999. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **63**(11): 2017--2019.
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan & G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*. **56**: 326--338.
- Benson. 2001. *Microbiological applications lab manual*. 8th ed. The McGraw Hill Companies, Inc., New York: xi + 478 hlm.
- Bickar, D. 2004. Total Protein assay. Biochemistry Laboratory, Smith Collage: 4 hlm. www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html, 20 Juni 2012. pk. 02.43.
- Biely, P. 2003. *Hand book of food enzymology*. Chapter 71. Xylanolytic enzyme. Marcel Dekker, Inc. New York: 37 hlm.
- Bollag, D.M. & S.J. Edelman. 1991. *Protein methods*. 1st ed. Wiley Liss, Inc, New York: xi + 230 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.
- Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdom of life. *The Royal Society*. **271**: 1251--1262.
- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 1996. *Microbiology: A laboratory manual*. Addison-Wesley Publishing, Reading: xiii + 466 hlm.
- Collins, T., C. Gerday & G. Feller. 2005. Xylanase, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbial Review*. **29**: 3--23.

- Constantiniu, S., A. Romaniuc, L.S. Iancu, R. Filimon & I. Tarasi. 2004. ultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* sp. strains isolated from hospital units. *The Journal of Prevelentive Medicine*. **12**(4): 35--42.
- Cunha, B.A. 2011. *Acinetobacter*. 22 Juli: 1 hlm.
<http://emedicine.medscape.com/article/236891-overview#showall>, 3 Maret 2012, pk. 11.05.
- Emami, K., E. Topakas, T. Nagy, J. Henshaw, K.A. Jackson, K.E. Nelson, E.F. Mongodin, J.W. Murray, R.J. Lewis & H.J. Gilbert. 2008. Regulation of the xylan-degrading apparatus of *Cellvibrio japonicus* by a novel two-component system. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**: 1086--1096.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo, & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 79 hlm.
- Garrity, G.M., D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Staley (eds.). 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol 2. Proteobacteria. Baltimore USA: xix + 1106 hlm.
- Ghosh, M., A. Das, A.K. Mishra & G. Nanda. 1993. *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**: 703-709.
- Giridhar, P.V. & T.S. Chandra. 2010. Production of novel halo-alkali-thermostable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. *Process Biochemistry*. **45**: 1730--1737.
- Gwartney, A. 2011. *Acinetobacter baumannii*. 15 Juni: 1 hlm.
http://www.microbeworld.org/index.php?option=com_jlibrary&view=article&id=6475, 19 Juni 2012, pk. 01.53.
- Haryati, T., P.A. Marbun & T. Purwadaria. 2010. Preservasi xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan teknik imobilisasi pada pollard dan penambahan kation. *JITV*. **15**(1): 63--71.

- Hung, K.S., S.M. Liu, W.S. Tzou, F.P. Lin, C.L. Pan, T.Y. Fang, K.H. Sun & S.J. Tang. 2011. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Process Biochemistry*. **46**(6): 1257--1263.
- Irawadi, T.T. 1999. Kajian Hidrolisis enzimatis limbah lignoselulose dari Industri Pertanian. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 3(1): 20--5.
- Jeffries, T.W. 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Environmental Biotechnology*. **7**: 337--342.
- Jiang, Z., Q. Cong, Q. Yan, N. Kumar & X. Du. 2010. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. *Food Chemistry*. **120**: 457--462.
- Kandel, J. & L. McKane. 1986. *Microbiology: essentials and applications*. Mcgraw Hill International Editions, Singapore: xvi + 777 hlm.
- Khandeparker, R., P. Verma & D. Deobagkar. 2011. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. *New Biotechnology* **6**(28): 814--821.
- Kulkarni, N. & M. Rao. 1996. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Biotechnology*. (51): 167--173.
- Kulkarni, N., M. Lakshmikumaran & M. Rao. 1999. Xylanase II from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* with a distinctly different structure from other xylanases: Evolutionary relationship to alkaliphilic xylanases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **263**: 640--645.
- Kumala, S., W. Mangunwardoyo & D. Dethrian. 2006. Uji aktivitas enzim xilanase ekstraselular dan intraselular bakteri endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **4**(2): 51--54.
- Lehninger, A.L. 1995. *Biochemistry the molecular basis of cell structure and function*. 2nd ed. Worth Publishers. Inc., New York: 1104 hlm.
- Lehninger, L.A., D.L. Nelson & M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman: 1119 hlm.

- Latifa, A. 2012. Produksi enzim selulase dari isolate bakteri SGS1609 menggunakan medium yang mengandung limbah pengolahan rumput laut (limbah agar). Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Al Azhar Indonesia. Jakarta: xvi + 95 hlm.
- Li, X., Y. She, B. Sun, H. Song, Y. Zhu, Y. Lv & H. song. 2010. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biochemical Engineering*. **52**: 71--78.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl & J. Parker. 2012. *Brock: Biology of microorganism*. 13th ed. Pearson Education, Inc., United States of America: xv + 1040 hlm.
- Mamo, G., R.H. Kaul & B. Mattiasson. 2006. A thermostable alkaline active endo- β -1-4 xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology* (39): 1492--1498.
- Mathithan, J.V., G.N. Kumar, P. Muthuraman & K. Srikumar. 2010. Purification and characterization of thermophilic xylanase isolated from the xerophytic *Cereus pterogenus* sp.. *The Protein Journal*. **7**(29): 481--486.
- Meng, X., Z. Shao, Y. Hong, L. Lin, C. Li & Z. Liu. 2009. A novel pH-stable, bifunctional xylanase isolated from a deep-sea microorganism, *Demequina* sp. JK4. *Journal of microbiology and biotechnology*. **19**(10): 1077--1084.
- McNeil, B. & L.M. Harvey (eds.). 2008. *Practical fermentation technology*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xiii + 388 hlm.
- Menon, G., K. Mody, J. Keshri & B. Jha. 2010. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **6**(15): 998--1005.
- Muawanah, A. 2006. Produksi enzim xilanase termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada substrat bagasse tebu. Program Studi Ilmu Pangan Institut Pertanian Bogor. Bogor: xiii + 90 hlm.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes & V.W. Rodwell. 2003. *Biokimia harper*. Terj. Harper's biochemistry. Penerbit buku kedokteran EGC, Jakarta: 1x + 891 hlm.

- Nam, E.S. 2004. B-galactosidase gene of *Thermus thermophilus* KNOUC11 isolated from hot springs of a volcanic area in New Zealand identification of the bacteria cloning and expression of the gene in *Escherchia coli*. *Asian-Aus Journal Animal Science* **17** : 1591-1598.
- Nester, E.W., B.J. Maccarthy, C.E. Roberts & N.N. Pearsall. 1973. *Microbiology, molecules, microbes and man*. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York: x + 719 hlm.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. 2008. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Terj. Dari Elements of microbiology, oleh Hadioetomo, R.S. Penerbit UI-Press, Jakarta: vii + 443 hlm.
- Raven, P.H. & G.B. Johnson. 2002. *Biology*. 6th ed. McGraw Hill Company, Inc., New York: xxix + 1238 hlm.
- Rejeki, D.S., M. Asy'ari & Wuryanti. 2009. *Pengaruh ion Zn²⁺ terhadap aktivitas protease ekstraseluler bakteri halofilik isolat Bittern tambak garam Madura*. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP, Semarang: 1--7.
- Richana, N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio*. **5**(1): 29--36.
- Richana, N., T.T. Irawadi, A. Nur, I. Sailah & K. Syamsu. 2006. Seleksi dan formulasi media pertumbuhan bakteri penghasil xilanase. *Jurnal Pascapanen*. **3**(1): 41--49.
- Richana, N., T.T. Irawadi, M.A. Nur, I. Sailah, K. Syamsu & Y. Arkenan. 2007. Ekstraksi xilan dari tongkol jagung. *Jurnal Pascapanen*. **4**(1): 38--43.
- Richana, N., T.T. Irawadi, A. Nur & K. Syamsu. 2008. Isolasi identifikasi bakteri penghasil xilanase serta karakterisasi enzimnya. *Jurnal AgroBiogen*. **4**(1): 24--34.
- Ruangklek, V., R.C. Sriprang, N. Ratanaphan, P. Tirawongsaraj, D. Chantasigh, S. Tanapongpipaat, K. Pootanakit & L. Eurwilaichitr. 2007. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinan endo 1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* (41): 19--25.

- Sadikin, M. 2002. *Biokimia enzim*. Widya Medika. Jakarta: x + 379 hlm.
- Saleem, M., M.R. Tabassum, R. Yasmin & M. Imran. 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. *International Biodeterioration and Biodegradation* (63): 1191--1124.
- Setyawati, I. 2006. Produksi dan karakterisasi xilanase mikroba yang diisolasi dari tongkol jagung. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor: vii + 79 hlm.
- Seyiz, I. & N. Aksoz. 2005. Xylanase production from *Trichoderma harziadum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. *Food Technology. Biotechnol.* **43**(1): 37--40.
- Shields, P. & L. Cathcart. 2010. Oxidase Test Protocol. American Society for Microbiology: 1 hlm.
<http://www.microbelibrary.org/index.php/library/laboratory-test/3229-oxidase-test-protocol>, 19 Juni 2012. pk. 10.29.
- Sidharta, B.R. 2000. *Pengantar mikrobiologi kelautan*. Andi Offset, Yogyakarta: xi + 122 hlm.
- Stanbury, P.F., A. Whitaker, & S.J. Hall. 2003. *Principles of fermentation technology*. Elsevier Science, Ltd., England: xviii + 351 hlm.
- Stryer, L. 1975. *Biochemistry*. W.H. Freeman and company, San Fransisco: 877 hlm.
- Sumo, U. 2007. *Penuntun praktikum biokimia untuk mahasiswa S-1 Biologi FMIPA UI*. Departemen Kimia FMIPA UI, Depok: iv + 50 hlm.
- Toha, A.H.A. 2001. *Biokimia: metabolisme biomolekul*. Alfabeta, Bandung: xiii + 149 hlm.
- Venugopal, V. 2009. *Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean*. Taylor & Francis Group, LLC. Inc.,: xii + 509 hlm.

- Volk, W.A. & M.F. Wheeler. 1995. *Mikrobiologi dasar*. Terj. Dari Basic Microbiology, oleh Adisoemarto, S. Penerbit Erlangga, Jakarta: xii + 396 hlm.
- Wahyuntari, B. & W. Mangunwardoyo. 2011. Xilanase pemutih pulp dan kertas ramah lingkungan: karakterisasi dan stabilisasi xilanase *Bacillus licheniformis* I-5. *Jurnal Rekayasa Lingkungan*. **3**(7): 205--215.
- Wikanta, T. 2010. *Pemanfaatan organisme laut untuk mendukung industri pangan dan farmasi*. Laporan akhir riset program insentif peningkatan kemampuan peneliti dan rekayasa, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Jakarta: vi + 38.
- Wong, D.W.S. & J.R. Whitaker. 2003. *Hand book of food enzymology*. Chapter 27. Catalase. Marcel Dekker, Inc. New York: 37 hlm.
- Wu, S., B. Liu & X. Zhang. 2006. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **6**(72): 1210--1216.
- Yosylina. 2004. Penapisan aktivitas selulase khamir dari moluska (family ampulariidae dan potamididae) asal hutan mangrove cagar alam muara angke dan pulau rambut, Jakarta utara. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia: x + 53 hlm.
- Zhang, Y.H.P., M.E. Himmel & J.R. Mielenz. 2006. Outlook for Cellulase Improvement Screening and Selection Strategies. *Biotech Adv* **24**: 452--481.

telah membantu penulis selama kuliah di Biologi FMIPA-UI yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

9. My Mio soul, atas petualangan kita *wink ;)

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Juni 2012,
Penulis

