

**KARAKTERISASI XILANASE *Streptomyces* sp. BO 3.2  
DAN PRODUKSI XILOOLIGOSAKARIDA  
DARI XILAN TANGKAI TEMBAKAU**

**MUHAMMAD NUR KHOLIS**



**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2014**



**PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN  
SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA\***

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 dan Produksi Xilooligosakarida dari Xilan Tangkai Tembakau adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2014

*Muhammad Nur Kholis*  
NIM P051120071

## RANGKUMAN

MUHAMMAD NUR KHOLIS. Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 dan Produksi Xilooligosakarida dari Xilan Tangkai Tembakau. Dibimbing oleh ANJA MERYANDINI dan YOPI.

Xilooligosakarida (XOS) merupakan oligosakarida yang terdiri atas unit xilosa, diproduksi dari xilan yang merupakan komponen utama hemiselulosa. XOS merupakan *dietary fiber* yang memiliki aktivitas prebiotik, memiliki kemampuan dalam meningkatkan fungsi usus besar, imunitas serta memiliki aktivitas antimikroba dan manfaat kesehatan lainnya. XOS dapat diproduksi menggunakan bahan lignoselulosa kaya akan xilan seperti tangkai tembakau. Tangkai tembakau merupakan salah satu limbah agroindustri lignoselulosa yang belum dimanfaatkan serta keberadaannya melimpah. Tangkai tembakau memiliki kandungan xilan sebesar 21.9% sehingga memiliki potensi biokonversi menjadi bahan lain dengan nilai ekonomi yang tinggi seperti substrat untuk produksi xilooligosakarida. Produksi XOS dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan mikroba yang mampu menghasilkan xilanase, hal ini mampu meminimalkan produk hidrolisis berupa monomer bila dibandingkan dengan oligomernya. Produksi XOS secara enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba yang memiliki aktivitas xilanolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 serta memproduksi XOS dari xilan tangkai tembakau.

Ekstraksi xilan tangkai tembakau diawali dengan proses delignifikasi dengan menggunakan larutan NaOCl 1% menunjukkan adanya penurunan kandungan lignin 5.33% dan kandungan selulosa sebesar 13.28%. Ekstraksi xilan tangkai tembakau dilakukan dengan menggunakan NaOH 15% menghasilkan rendemen xilan sebesar 15.53%. Hasil ekstraksi xilan tangkai tembakau digunakan sebagai media produksi xilanase oleh *Streptomyces* sp. BO 3.2 serta substrat untuk produksi xilooligosakarida. Produksi xilanase oleh *Streptomyces* sp. BO 3.2 pada media xilan tangkai tembakau 0.5% memiliki aktivitas tertinggi pada hari ke-5 sebesar 5.92 U/mL, waktu ini digunakan sebagai dasar untuk produksi xilanase selanjutnya. Karakterisasi xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 memiliki kondisi optimum pada pH 5.5 serta suhu 60 °C serta memiliki stabil pada suhu ruang selama 120 jam. *Streptomyces* sp. BO 3.2 mampu menghasilkan xilanase yang bekerja pada pH 5.5 dan 8 yang berukuran antara 55 kDa dan 72 kDa

Nilai derajat polimerasi (DP) pada produk hidrolisis menunjukkan nilai 2 dan 4, hal ini menunjukkan bahwa produk hidrolisis berupa xilooligosakarida. Analisis *thin layer chromatography* (TLC) dan *high performance liquid chromatography* (HPLC) menunjukkan bahwa produk gula yang didapatkan dari hidrolisis enzimatik xilan tangkai tembakau berupa tujuh jenis xilooligosakarida berdasarkan pada peak dan waktu retensi pada kromatogram.

Kata kunci : xilan tangkai tembakau, xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2, xilooligosakarida

## SUMMARY

MUHAMMAD NUR KHOLIS. Characterization Xylanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 and Xylooligosaccharides Production from Tobacco Stalk Xylan. Supervised by ANJA MERYANDINI dan YOPI.

Xylan is a major component of hemicellulose. It is a polysaccharide which contains from xylose unit. Breakdown partial of xylan could produce xylooligosaccharides (XOS) which is oligosaccharides composed of xylose units. XOS is a dietary fiber that has a prebiotic activity. It has ability in improving bowel function, immunity and antimicrobial activity and other health benefits. XOS can be produced using rich lignocellulosic materials such as tobacco stalks. Tobacco stalk is one of the lignocellulosic materials. Tobacco stalk has content 21.9 % xylan so that it has the potential of bioconversion into other materials with high economic value. XOS production can be done enzymatically by using microbes that are able to produce xylanase, has able to minimize hydrolysis products when compared with the monomeric than oligomers. Enzymatic production of XOS can be done by using microbes that have xylanolytic activity. This study aimed to characterize the xylanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 and XOS production from tobacco stalk xylan.

Tobacco stalk xylan extraction was begin delignification using 1% NaOCl solution, showed lignin content was decreased 5.33% and cellulose content 13.28%. Tobacco stalk xylan extraction used 15% NaOH solution gained xylan 15.53%. Tobacco stalk xylan used as a medium for xylanase production by *Streptomyces* sp. BO 3.2 as well as substrates for the production xylooligosaccharides. Xylanase produced on tobacco stalk xylan medium 0.5% had highest activity at day 5 was 5.92 U/mL, this time used for further xylanase eproduction. Characterization of xylanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 had optimum conditions at pH 5.5 and 60 °C and stable at room temperature for 120 hours. *Streptomyces* sp. BO 3.2 was able to produce multienzyme xylanase worked at pH 5.5 and 8 with estimated molecular weight between 55 kDa and 72 kDa.

Value of the degree of polymerization (DP) on the hydrolysis products showed a value of 2 and 4, it indicated that hydrolysis products was xylooligosaccharides. Analysis of *Thin layer chromatography* (TLC) and *High Performance liquid chromatography* (HPLC) showed that known sugar products derived from tobacco stalk xylan enzymatic hydrolysis were seven types of xylooligosaccarids based on peak and retention time on the chromatogram.

Key words : Tobacco stalk xylan, xylanase *Streptomyces* sp BO 3.2, xylooligosaccharides

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2014  
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB*

**KARAKTERISASI XILANASE *Streptomyces* sp. BO 3.2  
DAN PRODUKSI XILOOLIGOSAKARIDA  
DARI XILAN TANGKAI TEMBAKAU**

**MUHAMMAD NUR KHOLIS**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains  
pada  
Program Studi Bioteknologi

**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2014**

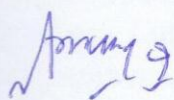
Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis : Dr Nisa Rachmania Mubarik



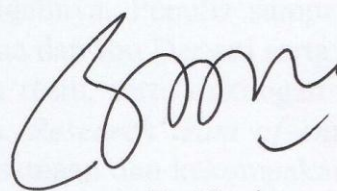
Judul Tesis : Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 dan Produksi  
Xilooligosakarida dari Xilan Tangkai Tembakau  
Nama : Muhammad Nur Kholis  
NIM : P051120071

Disetujui oleh

Komisi Pembimbing



Prof Dr Anja Meryandini, MS  
Ketua



Dr Yopi  
Anggota

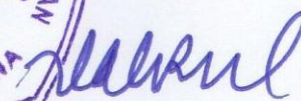
Diketahui oleh

Ketua Program Studi  
Bioteknologi



Prof Dr Suharsono, DEA

Dekan Sekolah Pascasarjana



Dr Ir Dahrul Syah, MSc Agr

Tanggal Ujian: 15 Agustus 2014

Tanggal Lulus:

01 SEP 2014



## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Azza Wa Jalla yang senantiasa melimpahkan kasih, rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 dan Xilooligosakarida dari Xilan Tangkai Tembakau. Penyusunan tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Bioteknologi Sekolah Pascasarjana IPB.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Prof Dr Anja Meryandini, MS sebagai ketua komisi pembimbing tesis serta Dr Yopi sebagai anggota komisi pembimbing tesis atas segala masukan dan bimbingannya. Penulis sampaikan terima kasih kepada orang tua terhebat Bapak Nirwana dan Ibu Daryati serta adik terkasih Mukti Lutviana, atas segala perhatian, doa restu, serta dukungan baik material maupun spiritual yang berarti bagi penulis. *Research team of enzyme* (Wida, Azizah, Ari, Ayun, Mbak Gading) atas kebersamaan dan kekompakannya selama ini. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan Bu Dewi, Mbak Lia, Pak Awan, Mbak Nanik serta staf dan rekan laboratorium Biokatalis dan Fermentasi LIPI dan laboratorium Bioteknologi Hewan PPSHB IPB atas ilmu dan pengalaman yang diberikan. Tak lupa Rekan-rekan Bioteknologi 2012 atas motivasi serta semangat yang diberikan serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penyusunan tesis ini masih jauh dari sempurna, masukan yang berupa saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga penyusunan tesis ini dapat bermanfaat serta memperkaya khasanah keilmuan yang ada.

Bogor, Agustus 2014

*Muhammad Nur Kholis*

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vi
1 PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	2
Manfaat Penelitian	2
2 METODE	3
Tempat dan Waktu Penelitian	3
Bahan	3
Alat	3
Prosedur Kerja	3
3 HASIL DAN PEMBAHASAN	7
Pretreatment Biomassa Tangkai Tanaman Tembakau	7
Pemilihan Isolat Potensial	8
Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Xilanase	11
Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Xilanase dan Stabilitas	12
Analisis SDS Page dan Zymogram Xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	14
Hidrolisis Enzimatik Xilan Tangkai Tembakau	16
4 SIMPULAN	19
Simpulan	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	24
RIWAYAT HIDUP	31

## DAFTAR TABEL

1 Analisis proksimat delignifikasi tangkai tembakau	7
2 Indeks potensial (IP) delapan isolat aktinomisetes	9
3 Aktivitas enzim xilanase pada tiga isolat aktinomisetes	10
4 Nilai derajat polimerasi hidrolisis xilan tangkai tembakau	17

## DAFTAR GAMBAR

1 Substrat tangkai tembakau	7
2 Zona bening isolat BO 2.1, BO 3.2, dan BF 3.1	9
3 Morfologi isolat BO 3.2	10
4 Kurva pertumbuhan dan aktivitas xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	11
5 Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	12
6 Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	13
7 Stabilitas enzim xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2 pada suhu 4 °C, 30 °C, dan 60 °C	13
8 Profil SDS PAGE xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	15
9 Profil zimogram xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	15
10 Gula reduksi produk hidrolisis xilan tangkai tembakau. Gula reduksi xilan <i>beechwood</i> 2%	16
11 <i>Thin layer chromatography</i> (TLC) produk hidrolisis enzimatik xilan tangkai tembakau	18
12 Kromatogram produk hidrolisis xilan tangkai tembakau 2% dengan xilanase <i>Streptomyces</i> sp. BO 3.2	19

## DAFTAR LAMPIRAN

1 Komposisi media	24
2 Neraca massa ekstraksi xilan tangkai tembakau	26
3 Hasil analisis isolat BO 3.2 berdasarkan gen 16S rRNA	28
4 Prosedur penentuan gula pereduksi metode DNS	29
5 Prosedur penentuan total gula metode Fenol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30



# 1 PENDAHULUAN

## Latar Belakang

Xilooligosakarida (XOS) merupakan oligosakarida yang terdiri atas unit xilosa, diproduksi dari xilan yang merupakan komponen utama hemiselulosa (Saha 2003; Alonso *et al.* 2003). XOS merupakan *dietary fiber* yang memiliki aktivitas prebiotik, memiliki kemampuan dalam meningkatkan fungsi usus besar, imunitas serta memiliki aktivitas antimikrob dan manfaat kesehatan lainnya (Carvalho *et al.* 2013). XOS dari sekam padi telah digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri probiotik, mampu meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium adolescentis* CECT 5781, *Bifidobacterium longum* CECT 4503, *Bifidobacterium infantis* CECT 4551, dan *Bifidobacterium breve*. CECT 4839 (Gullon *et al.* 2008). XOS tongkol jagung mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik *Bifidobacterium* spp. dan *Lactobacillus* spp (Chapla *et al.* 2012). XOS mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* dan *Salmonella enteritidis* (Fooks dan Gibson 2002).

XOS dapat diproduksi menggunakan bahan lignoselulosa kaya akan xilan seperti bagase (Brienzo *et al.* 2010; Jayapal *et al.* 2013), tongkol jagung (Chapla *et al.* 2012), tangkai kapas, tangkai bunga matahari, dan tangkai gandum (Akpinar *et al.* 2009). Produksi XOS umumnya menggunakan metode kimia, metode enzimatik atau kombinasi dari kedua metode tersebut. Produksi XOS dengan metode kimia dapat dilakukan dengan menggunakan larutan asam atau larutan alkali, namun dalam prosesnya akan lebih banyak menghasilkan monomer bila dibandingkan dengan oligomernya. Produksi XOS secara enzimatik dinilai lebih efektif karena akan meminimalkan adanya produk hidrolisis berupa monomer. Produksi XOS secara enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba yang memiliki aktivitas xilanolitik (Yang *et al.* 2011; Meryandini *et al.* 2008b).

Enzim xilanolitik terdiri atas 1,4- $\beta$ -endoxilase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glukuronidase, asetil xilan esterase, dan asam fenolat (asam ferulat dan asam koumarat) esterase (Collins *et al.* 2005). Beberapa bakteri penghasil xilanase adalah *Bacillus* sp. YC 335 mampu menghasilkan xilanase alkalofilik (Park *et al.* 1992) dan *Bacillus* sp.TAR-1 yang menghasilkan xilanase termotabil (Nakamura *et al.* 1994). Bakteri penghasil xilanase dapat diinokulasi dari jerami (Ruiz-Arribas *et al.* 1995) dan tanah (Meryandini *et al.* 2008b; Coman *et al.* 2013).

Tembakau (*Nicotiana* sp.) merupakan salah satu komoditas agroindustri yang sangat penting di Indonesia. Pertumbuhan produksi tembakau Indonesia dari tahun 2011-2012 adalah sebesar 5.68 % dan pada tahun 2012 mencapai 226.704 ton (Dirjenbun 2012). Pertumbuhan sektor agroindustri yang semakin meningkat dapat berpotensi meningkatkan limbah yang dihasilkan baik saat proses produksi bahan baku maupun proses pengolahannya. Melimpahnya limbah yang tidak termanfaatkan sangat erat kaitannya dengan potensi pencemaran lingkungan sehingga perlu dicari solusi dalam penanganan limbah tersebut. Tangkai tembakau merupakan salah satu limbah agroindustri yang belum termanfaatkan serta keberadaannya melimpah. Tangkai tembakau termasuk limbah lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa dan lignin) dengan kandungan xilan sebesar 21.9% (Akpinar *et al.* 2010) sehingga memiliki potensi biokonversi menjadi bahan lain

dengan nilai ekonomi yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk produksi xilooligosakarida dari xilan tangkai tembakau secara enzimatik menggunakan xilanase aktinomisetes.

### **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi limbah tangkai tanaman tembakau untuk produksi xilooligosakarida (XOS) menggunakan bakteri xilanolitik.

### **Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi bakteri xilanolitik dalam memproduksi xilooligosakarida (XOS) dengan memanfaatkan limbah tangkai tanaman tembakau.



## 2 METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biorekayasa Lingkungan Bidang Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong bulan November 2013 sampai dengan Maret 2014.

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah tangkai tanaman tembakau varietas genjah yang berasal dari Kecamatan Cepogo Kabupaten Boyolali Jawa Tengah, delapan isolat bakteri xilanolitik yang merupakan koleksi Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedik PPSHB Institut Pertanian Bogor (BF 3.1, BF 3.10, BF 4.1, BO 2.1, BO 3.2, BO 3.3, BO 4.1, dan YM 4.2), media pertumbuhan yang mengandung substrat *xilan beechwood* 0.5%, media dengan substrat xilan dari tangkai tembakau (Lampiran 1), pewarna merah kongo 0.5%, NaCl 2M, reagen dinitrosalisilat (DNS), bufer sitrat (pH 4.0-6.0), bufer fosfat (pH 6.0-8.0) dan bufer glisin-NaOH (pH 7.0-10.0). Bahan elektroforesis terdiri atas bufer TAE, *gene ruler* (Fermentas<sup>®</sup>), *loading dye* (Fermentas<sup>®</sup>), agarose, ethidium bromida, dan akuades. Bahan identifikasi 16S rRNA adalah PCR mix GoTaq, primer 9F (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3), primer 1510R (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3), dan ddH<sub>2</sub>O. Bahan SDS PAGE zimogram adalah Prestained Protein Ladder 180 kDa (Thermo Scientific<sup>®</sup>), sodium dedosil sulfat (SDS), poliakrilamida, bis akrilamida, N,N,N,N-tetra metil etilendiamina (TEMED), amonium persulfat, pewarna perak nitrat (AgNO<sub>3</sub>), glisin, NaCl, dan triton X.

### Alat

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah *hammer mill*, penyaring, *oven*, *autoclave*, *water bath*, *laminar air flow*, *shaker*, spektrofotometer UV-VIS, *magnetic styrer*, *vortex*, pipet ukur, *microtube* eppendorf, *PCR tube*, termometer, pH meter, cawan petri, gelas ukur, *corckborer*, tabung reaksi, labu erlenmeyer, alat sentrifugasi, set alat *thin layer chromatography* (TLC), set alat elektroforesis, dan set alat *high performance liquid chromatography* (HPLC).

### Prosedur Kerja

#### **Pretreatment Biomassa Tangkai Tanaman Tembakau (Modifikasi Richana *et al.* 2007)**

Tangkai tanaman tembakau dipotong dan digiling untuk mempermudah dalam proses ekstraksi. Tangkai tanaman tembakau yang kering digiling dengan *hammer mill* sehingga diperoleh bahan berupa tepung tangkai tanaman tembakau dengan ukuran yang lolos ayakan berukuran 80 mesh. Delignifikasi tangkai tanaman tembakau dilakukan dengan menggunakan larutan NaOCl 1% selama lima jam pada suhu ruang. Setelah lima jam sampel dibilas dengan air dan

disaring, selanjutnya filtrat dikeringkan dalam oven 50 °C selama 48 jam. Analisis proksimat dilakukan pada tepung tangkai tembakau sebelum dan sesudah delignifikasi. Ekstraksi xilan tangkai tembakau dilakukan dalam larutan NaOH 15% selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah 24 jam, dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan diukur pH-nya, kemudian dinetralkan dengan menggunakan HCl. Hasil netralisasi disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan putaran 2.683 x g. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi mengandung xilan. Xilan yang larut dalam air dapat dipisahkan dengan menambahkan etanol 95% dengan perbandingan 1 : 3. Xilan terlarut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2.683 x g untuk memperoleh xilan berupa endapan. Xilan dikeringkan dalam oven suhu 50 °C selama 48 jam kemudian dihaluskan dengan blender untuk didapatkan bubuk xilan ukuran 80 mesh.

### **Peremajaan Kultur Bakteri dan Pemilihan Isolat Potensial**

Peremajaan kultur bakteri dilakukan pada media agar-agar/padat xilan tangkai tembakau (Lampiran 1). Pemilihan isolat dilakukan berdasarkan uji kualitatif isolat dengan melihat zona bening yang terbentuk pada media yang mengandung xilan dari tanaman tembakau dengan menggunakan metode pewarnaan merah kongo (Theather dan Wood 1982).

$$\text{Indeks Potensial Xilanolitik} = \frac{\phi \text{ Koloni Bakteri} - \phi \text{ Zona Bening}}{\phi \text{ Koloni Bakteri}}$$

Uji secara kuantitatif dilakukan dengan melihat aktivitas enzim xilanase pada masing-masing isolat aktinomisetes.

### **Identifikasi Isolat Potensial Xilanolitik dengan Gen 16S rRNA (Modifikasi Nurkanto *et al.* 2008)**

Identifikasi dengan gen 16S rRNA dilakukan dengan metode PCR koloni. Sebanyak satu ose koloni dimasukkan pada larutan komposisi PCR (13 µL Go Taq, 1 µL primer 9°F (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3), 1 µL primer 1051R (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3), dan 10 µL ddH<sub>2</sub>O). Tahapan selanjutnya yaitu proses amplifikasi yang dilakukan pada mesin PCR yang terdiri atas 30 siklus. Hasil amplifikasi sebanyak 5 µL kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 1% dalam bufer TAE 1x pada 50 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis kemudian direndam dalam larutan EtBr selama 10 menit. Selanjutnya visualisasi band DNA dilihat dengan bantuan sinar ultra violet (UV). Sampel DNA dianalisis sekuensing untuk mengetahui jenis aktinomisetes yang digunakan. Analisis sekuensing gen 16S rRNA dilakukan di 1St Base Singapura. Hasil sekuensing gen 16S rRNA dianalisis dengan program bioinformatika yaitu *BLAST-Basic Local Alignment Search Tool* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

### **Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Xilanase**

Kultur berumur 4 hari diinokulasikan sebanyak satu *corckborer* ke dalam 100 mL media cair xilan tembakau 0.5% pada inkubator bergoyang (150 rpm)

pada suhu ruang selama tujuh hari. Sampel setiap hari diambil untuk mengetahui aktivitas enzim xilanase. Kultur diambil sebanyak 2 mL setiap hari kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan  $8.050 \times g$  suhu  $4^\circ\text{C}$  untuk mendapatkan enzim ekstrak kasar. Kurva pertumbuhan bakteri dihitung berdasarkan bobot kering biomassa sel. Endapan yang telah kering ditimbang dan diplotkan terhadap waktu inkubasi sehingga diperoleh kurva pertumbuhan bakteri.

Uji aktivitas diukur dengan mengukur pembentukan gula pereduksi hasil hidrolisis enzim xilanase berdasarkan metode DNS (Miller 1959). Gula reduksi diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Kadar xilosa yang terkandung dalam masing-masing sampel dan kontrol ditentukan berdasarkan kurva regresi linear standar xilosa.

Aktivitas enzim xilanase dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas xilanase (U/mL)} = \frac{(X_s - X_k) \times FP \times 1000}{T \times \text{BM xilosa}}$$

Keterangan :

$X_s$  : Kadar xilosa sampel

$T$  : Waktu inkubasi (menit)

$X_k$  : Kadar xilosa kontrol

$\text{BM}$  : Bobot molekul xilosa (150.13)

$\text{FP}$  : Faktor pengenceran

### **Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Xilanase serta Stabilitas Enzim**

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan enzim dengan substrat pada suhu ruang selama 15 menit pada bufer yang berbeda. Bufer yang digunakan adalah bufer sitrat (0.05 M, pH 3-4.5), bufer fosfat (0.05 mM, pH 5-6.5) dan bufer glisin-NaOH (0.05 M, pH 7-10). Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat selama 30 menit pada berbagai suhu ( $30-100^\circ\text{C}$  dengan selang  $10^\circ\text{C}$ ) pada pH optimum. Gula pereduksi yang terbentuk diukur dengan metode Miller (1959). Stabilitas enzim xilanase dilakukan melalui inkubasi enzim tanpa substrat pada suhu ruang, suhu  $4^\circ\text{C}$  dan suhu optimum. Aktivitas enzim diuji setiap jam pada pH dan suhu optimumnya pada jam ke-1 hingga jam ke-5.

### **SDS PAGE dan Zimogram Xilanase**

Penentuan berat molekul xilanase dengan metode SDS PAGE menggunakan perangkat elektroforesis Mini Protean System (Biorad<sup>®</sup>). SDS PAGE dilakukan metode Laemmli (1970) menggunakan konsentrasi gel 12.5% gel pemisah dengan menggunakan PageRuler Prestained Protein Ladder 180 kDa (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Visualisasi pita-pita protein dilakukan dengan menggunakan pewarna perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ).

Aktivitas xilanase pada gel ditentukan melalui analisis zimogram. Substrat *beechwood xylan* 0.5% (w/v) ditambahkan ke dalam campuran gel poliakrilamid 12%. Setelah elektroforesis, gel direnaturasi dengan merendamnya dalam 2.5% (w/v) Triton-X 100 selama satu jam. Gel kemudian diinkubasi di dalam 0.05 M pada pH dan suhu optimum enzim selama satu jam kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan 0.1% (w/v) merah kongo selama 30 menit dan dicuci dengan larutan NaCl 1 M selama 30-60 menit.

### **Hidrolisis Enzimatik Xilan Tangkai Tembakau**

Hidrolisis xilan tangkai tembakau dengan enzim xilanase dilakukan pada konsentrasi substrat 2% dan 8% (b/v) yang dilarutkan dalam enzim. Sampling produk hidrolisis dilakukan pada jam ke-1, 3, dan 6. Aktivitas enzim dihentikan pada suhu 100 °C selama 15 menit. Analisis produk hidrolisis berdasarkan pada nilai derajat polimerasi. Derajat polimerasi ditentukan berdasarkan perbandingan antara gula total dengan gula reduksi. Gula total dihitung dengan menggunakan metode Fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Apriyantono *et al.* 1989) dan gula reduksi dihitung dengan menggunakan metode DNS (Miller 1959). Derajat polimerasi dihitung berdasarkan perbandingan antara total gula dengan gula reduksi yang dihasilkan.

$$\text{Derajat Polimerasi} = \frac{\text{Gula total (mg/mL)}}{\text{Gula reduksi (mg/mL)}}$$

### **Analisis *Thin layer Chromatography* (TLC)**

Analisis TLC dilakukan pada produk hidrolisis. Larutan eluen yang digunakan terdiri atas campuran n-butanol, asam asetat, dan aquades (2:1:1 v/v/v). Sebanyak 1 µL sampel ditotolkan pada lempeng TLC. Lempeng TLC direndam ke dalam eluen dan ditutup rapat sampai 1.5 jam. Visualisasi spot dilakukan dengan menggunakan larutan DAP (0.2 g difenilamin, 0.2 mL anniline, 10 mL aseton, dan 1.5 mL asam fosfat). Kertas TLC dioven pada suhu 120 °C untuk melihat hasil visualisasi. Standar yang digunakan adalah glukosa, arabinosa, dan xilosa (10.000 ppm).

### **Analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)**

Larutan sampel yang akan digunakan untuk dianalisis komponen gulanya disaring dengan kertas saring milipore ukuran 0.20 µM filter. Sampel sebanyak 20 uL diinjeksikan ke dalam sistem HPLC (Agilent technology 1290 Infinity, United State). Kondisi kolom yang digunakan adalah kolom Zorbax SIL (silika) dilapisi 3-amino propisilen, suhu dipertahankan pada 30 °C dengan laju alir 1.4 mL/menit dan fase gerak yang digunakan merupakan campuran antara asetonitril dan akuabides dengan perbandingan 75:25 (v/v). Sampel dideteksi dengan menggunakan *refractive index detector* (RID).

### 3 HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pretreatment Biomassa Tangkai Tanaman Tembakau

Ekstraksi xilan tangkai tembakau diawali dengan proses delignifikasi. Delignifikasi merupakan proses penghilangan lignin dari komponen bahan lignoselulosa. Lignin merupakan komponen luar yang mengikat komponen selulosa dan hemiselulosa. Proses delignifikasi menyebabkan perubahan warna dan bobot pada serbuk tangkai tembakau. Warna serbuk tangkai tembakau menjadi lebih cerah bila dibandingkan dengan serbuk sebelum delignifikasi. Perubahan warna ini disebabkan pelarutan lignin oleh larutan NaOCl. Larutan NaOCl akan menyebabkan renggangnya ikatan karbon dalam struktur lignin (Lehninger 1982) dan membukanya struktur kristalin dalam bahan sehingga komponen polisakarida akan lebih mudah dihidrolisis dengan enzim (Richana *et al.* 2007). Analisis proksimat yang meliputi air, abu, protein dan serat (AOAC 1995) dilakukan sebelum dan sesudah proses delignifikasi.

Tabel 1 Analisis proksimat delignifikasi tangkai tembakau

Analisis Proksimat	Sebelum delignifikasi (%)	Setelah delignifikasi (%)
Kadar Air	10.11	9.92
Abu	6.89	3.76
Lemak	1.50	0.90
Protein	9.16	6.07
Serat Kasar	32.93	42.15
- Lignin	23.48	18.15
- Selulosa	51.55	42.27
- Hemiselulosa	10.62	12.32



Gambar 1 Substrat tangkai tembakau. A : Biomassa tangkai tembakau 80 mesh, B : Xilan tangkai tembakau hasil ekstraksi.

Analisis proksimat tangkai tembakau sebelum dan sesudah delignifikasi menunjukkan adanya penurunan kandungan lignin 5.33% (Tabel 1) dan kandungan selulosa sebesar 13.28%. Penurunan kandungan lignin dan selulosa disebabkan komponen tersebut ikut terlarut dalam proses delignifikasi. Kandungan hemiselulosa meningkat dari 10.62% menjadi 12.32% setelah proses

delignifikasi disebabkan berkurangnya komponen selulosa dalam prosentasenya serta sifat hemiselulosa yang tidak ikut terlarut dalam proses delignifikasi. Pencucian dengan menggunakan akuades berfungsi untuk menghilangkan sisa natrium hipoklorit serta komponen lignin yang terlarut selama proses tersebut.

Ekstraksi xilan tangkai tembakau dilakukan dengan menggunakan NaOH 15% (Richana *et al.* 2007) hal ini didasarkan pada sifat xilan yang larut dalam larutan alkali dengan konsentrasi 2-15%. Larutan NaOH berfungsi dalam melemahkan ikatan antara selulosa dan hemiselulosa sehingga akan mempermudah ekstraksi xilan tersebut (Tahezadeh dan Karimi 2007).

Berdasarkan analisis neraca massa (Lampiran 2), proses ekstraksi xilan dari tepung tangkai tembakau sebanyak 1000 g menghasilkan xilan 155.34 g (Tabel 2). Hasil ekstraksi xilan tangkai tembakau berupa xilan ukuran 80 mesh ditunjukkan pada Gambar 1A. Ekstraksi xilan tangkai tembakau menghasilkan rendemen sebesar 15.53% (Gambar 1B). Akpinar *et al.* (2010) melakukan ekstraksi xilan tangkai tembakau dengan menggunakan larutan KOH-NaBH<sub>4</sub> menghasilkan rendemen xilan sebesar 21.39%. Perbedaan rendemen xilan yang dihasilkan disebabkan adanya perbedaan metode ekstraksi yang digunakan. Selain itu dimungkinkan perbedaan jenis varietas tangkai tembakau yang digunakan akan membawa pengaruh terhadap rendemen xilan yang dihasilkan karena setiap tanaman memiliki kandungan xilan yang berbeda.

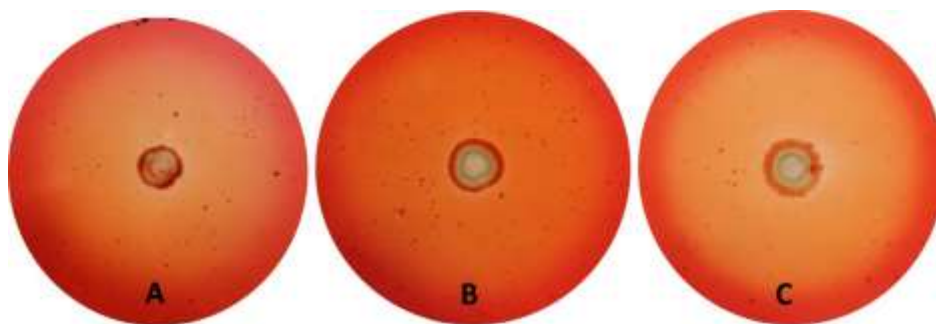
### **Pemilihan Isolat Potensial**

Pemilihan isolat dilakukan berdasarkan uji kualitatif isolat dengan melihat zona bening yang terbentuk pada media yang mengandung xilan dari tanaman tembakau. Metode ini digunakan sebagai langkah awal dalam penapisan 8 isolat berdasarkan munculnya zona bening sekitar koloni pada media xilan tangkai tembakau (Gambar 2). Pembentukan zona bening menunjukkan xilan yang terkandung dalam media dihidrolisis oleh xilanase menjadi komponen yang lebih sederhana baik dalam bentuk xilosa ataupun xilooligosakarida. Zona bening sekitar media xilan akan lebih terlihat jika digunakan pewarna berupa merah kongo. Zona bening yang tidak ikut terwarnai menunjukkan bahwa xilanase mendegradasi sempurna komponen xilan menjadi gula yang lebih sederhana. Zona bening muncul disebabkan karena adanya pemutusan ikatan  $\beta$  1-4 pada xilan menjadi komponen xilosa dan xilooligosakarida sehingga merah kongo tidak dapat diikat kuat pada media karena merah kongo memiliki interaksi yang kuat dengan polisakarida yang mengandung rantai ikatan 1,4- $\beta$ -D-glukopiranosil (Teather dan Wood 1982).

Indeks potensial ditentukan berdasarkan perbandingan antara lebar zona bening terhadap lebar koloni isolat. Indeks potensial isolat BO 3.2, BO 2.1 dan BF 3.1 memiliki indeks potensial paling tinggi bila dibandingkan dengan 5 isolat aktinomisetes yang lain (Tabel 2). Indeks potensial tersebut menunjukkan kemampuan dari isolat dalam mendegradasi substrat berupa xilan tangkai tembakau. Zona bening yang muncul pada isolat BO 3.2 dan isolat BF 3.1 terlihat lebih bening bila dibandingkan dengan isolat BO 2.1 (Gambar 2). Kemungkinan hal ini disebabkan pada isolat BO 3.2 dan isolat BF 3.1 memiliki kelengkapan xilanase ekstraselular yang dapat menghidrolisis sempurna komponen polisakarida menjadi komponen gula sederhananya sehingga merah kongo tidak mampu terikat pada media tersebut, akibatnya warna terlihat lebih bening.

Tabel 2 Indeks potensial (IP) 8 isolat aktinomisetes

No.	Isolat	Xilan tangkai tembakau		
		$\phi$ Koloni bakteri	$\phi$ Zona bening	Indeks potensial xilanolitik
1	BF 3.1	0.9	4.1	3.56
2	BF 3.10	1.0	3.5	2.53
3	BF 4.1	0.9	1.1	0.22
4	BO 2.1	0.9	4.5	3.96
5	BO 3.2	0.7	4.6	5.57
6	BO 3.3	0.5	-	-
7	BO 4.1	0.9	1.1	0.22
8	YM 4.2	-	-	-



Gambar 2 Zona bening isolat BO 3.2, BO 2.1, dan BF 3.1. A: isolat BO 3.2, B: isolat BO 2.1, C: isolat BF 3.1.

Terhadap isolat BO 3.2, BO 2.1, dan BF 3.1 kemudian dilakukan uji kuantitatif dengan melihat aktivitas xilanase masing-masing isolat berdasarkan uji gula reduksi (Miller 1959). Uji kuantitatif lebih dapat menggambarkan potensi isolat terhadap aktivitas xilanase bila dibandingkan dengan uji kualitatif (merah kongo), karena dapat melihat aktivitas xilanase berdasarkan gula reduksi yang dihasilkan selama proses hidrolisis substrat xilan. Uji aktivitas enzim xilanase masing-masing isolat dilakukan pada hari ke-4, 5, dan 6. Nilai aktivitas enzim xilanase tertinggi didapatkan pada waktu uji hari ke-5 (Tabel 3). Isolat BO 3.2 memiliki aktivitas enzim xilanase paling tinggi bila dibandingkan dengan isolat BO 2.1 dan BF 3.1. Hal ini menunjukkan isolat BO 3.2 memiliki potensi yang lebih tinggi untuk digunakan dalam proses hidrolisis xilan tangkai tembakau bila dibandingkan dengan isolat BO 2.1 dan BF 3.1. Berdasarkan pembentukan zona bening dan aktivitas xilanase, isolat BO 3.2 ditentukan sebagai isolat potensial yang akan digunakan dalam produksi enzim xilanase untuk hidrolisis xilan tangkai tembakau.

Tabel 3 Aktivitas enzim xilanase pada 3 isolat aktinomisetes

No.	Sampel isolat	Hari	U/mL
1	BO 2.1	4	0.922
		5	0.901
		6	0.854
2	BO 3.2	4	1.222
		5	1.346
		6	1.346
3	BF 3.1	4	1.056
		5	1.025
		6	1.097



Gambar 3 Morfologi isolat BO 3.2

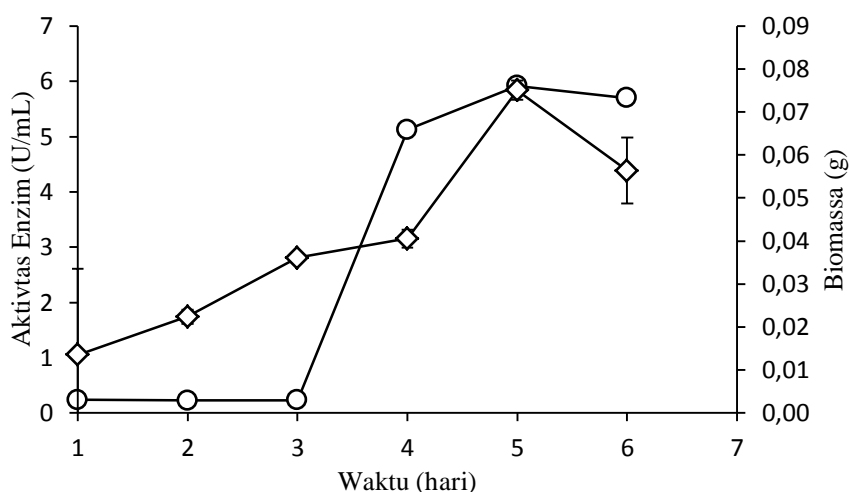
Isolat BO 3.2 (Gambar 3) merupakan salah satu isolat dari 8 isolat aktinomisetes yang lebih berpotensi bila dibandingkan ke-7 isolat lainnya dalam hal aktivitas xilanase pada media pertumbuhan xilan tangkai tembakau. Morfologi isolat BO 3.2 berwarna putih kecoklatan, dan bertambah coklat kehitaman seiring dengan pertumbuhannya. Warna koloni berasal dari miselia yaitu miselia aerial dan miselia substrat, kedua miselia ini mampu menghasilkan pigmen yang menyebabkan perbedaan warna pada masing-masing koloni (Madigan *et al.* 2000). Isolat BO 3.2 memiliki bau yang khas seperti tanah. Kebanyakan aktinomisetes mengeluarkan bau yang khas seperti tanah. Bau khas seperti tanah tersebut disebabkan aktinomisetes menghasilkan senyawa geosmin (Gerber dan Lechevalier 1965). Senyawa geosmin dapat dijadikan sebagai parameter kualitas sumber air tanah dan biasanya dalam proses pemanfaatan air tersebut, senyawa ini akan dihilangkan baik secara kimiawi maupun alami.

Berdasarkan *alignment* (pensejajaran) dengan gen 16S rRNA dari hasil sekuensing isolat BO 3.2 diperoleh pasangan basa sepanjang 1433 bp. Analisis blastN menunjukkan isolat BO 3.2 memiliki kedekatan dengan *Streptomyces* sp. dengan dengan indeks similaritas sebesar 97%. Berikut beberapa *Streptomyces* yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi xilan, *Streptomyces* sp. SKK1-8 (Meryandini *et al.* 2006), *Streptomyces* sp. 234P-16 (Meryandini *et al.* 2008b), *Streptomyces* sp. 7b (Bajaj dan Singh. 2010), *Streptomyces* sp. SWU10 (Deesukon *et al.* 2013), dan *Streptomyces* sp. CS24 (Mander *et al.* 2014).



### Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Xilanase

Produksi enzim oleh mikroba ditentukan oleh substrat yang digunakan karena enzim memiliki spesifitas tinggi terhadap substratnya. Media yang mengandung xilan tangkai tembakau akan menginduksi mikroba untuk memproduksi xilanase. Menurut Beg *et al.* (2001) sintesis xilanase akan diinduksi oleh media yang mengandung residu xilan atau xilan murni, xilosa, xilooligosakarida, dan residu lignoselulosa. Aktivitas xilanase *Streptomyces* sp BO 3.2 meningkat seiring dengan penambahan biomassa sel. Xilanase mulai diproduksi pada saat sel mengalami fase logaritmik, dimana substrat akan mulai dimanfaatkan oleh mikrob untuk memproduksi xilanase.



Gambar 4 Kurva pertumbuhan (—◇—) dan aktivitas xilanase (—○—) *Streptomyces* sp. BO 3.2. Pertumbuhan dilakukan pada media cair xilan tangkai tembakau 0.5% dengan agitasi 150 rpm dan suhu ruang.

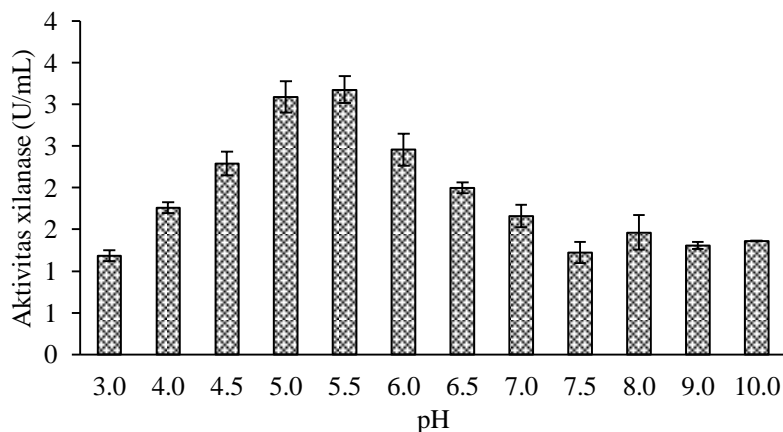
Waktu produksi enzim ditentukan berdasarkan pertumbuhan dan aktivitas xilanase harian pada hari ke-1 sampai hari ke-6 (Gambar 4). Pada *Streptomyces* sp. BO 3.2, hari ke-1 sampai hari ke-3 terlihat peningkatan biomassa yang rendah, hal tersebut menunjukkan pertumbuhan sel relatif lambat karena mikroba berada pada fase adaptasi, mikroba menyesuaikan diri terhadap lingkungan serta tahap awal dalam sintesis enzim sesuai dengan media yang tersedia. Pada fase ini mikroba memanfaatkan terlebih dahulu nutrisi berupa *yeast* yang terdapat pada media kemudian baru memanfaatkan sumber karbon lain berupa xilan tangkai tembakau untuk pertumbuhannya. Hari ke-4 sampai hari ke-5 terjadi peningkatan biomassa sel yang tinggi, karena pada saat tersebut mikrob berada pada fase log atau eksponensial yaitu mengalami peningkatan jumlah sel. Aktivitas enzim pada hari ke-3 sampai hari ke-5 menunjukkan adanya peningkatan aktivitas yang tinggi, enzim akan mendegradasi substrat menjadi komponen yang lebih sederhana yang dapat dimanfaatkan oleh mikroba sehingga pertumbuhan sel akan maksimal. Aktivitas xilanase menurun pada hari ke-6 karena sel berada pada fase stationer dan kematian, kondisi ini terjadi karena substrat, dalam hal ini xilan tangkai tembakau sudah habis dimanfaatkan oleh mikroba serta adanya senyawa penghambat bagi pertumbuhan mikroba. Kurva tumbuh *Streptomyces* sp. BO 3.2

menunjukkan pada hari ke-5 langsung mengalami fase kematian tanpa adanya fase stasioner, hal ini juga ditemukan pada *Streptomyces clavuligerus* mengalami fase kematian tanpa adanya fase stasioner pada jam ke-60 (Moirera *et al.* 2001). Manteca *et al.* (2008) menyebutkan pada *Streptomyces coelicolor* mengalami fase kematian pada jam ke-150 tanpa adanya fase stasioner yang mengiringinya.

Aktivitas xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.1 sebesar 5.92 U/mL merupakan aktivitas xilanase tertinggi pada waktu produksi hari ke-5. Waktu hari ke-5 digunakan sebagai dasar untuk produksi enzim xilanase selanjutnya. Aktivitas enzim xilanase tersebut jauh lebih tinggi dari penelitian Meryandini *et al.* (2008b) pada *Streptomyces* 234P-16 sebesar 0.27 U/mL dengan waktu inkubasi yang sama. Namun aktivitas xilanase tersebut masih lebih rendah bila dibandingkan dengan *Streptomyces* sp. CD3 (Sharma dan Bajaj 2005). Perbedaan ini disebabkan karena media dan jenis mikroba yang digunakan. Xilan tangkai tembakau termasuk dalam homoxilan, komponen penyusunnya hanya terdiri atas rantai utama tanpa adanya rantai samping (Sunna dan Antranikian 1997) sehingga lebih mudah dimanfaatkan oleh mikroba jika dibandingkan dengan substrat heteroxilan yang memiliki rantai samping. Setiap mikroba memiliki perbedaan jenis enzim yang disekresikan, mikroba yang memiliki jenis endoenzim dan eksoenzim memiliki kemampuan dalam mendegradasi substrat lebih tinggi bila dibandingkan mikroba yang hanya memiliki satu jenis enzim baik berupa endoenzim atau eksoenzim.

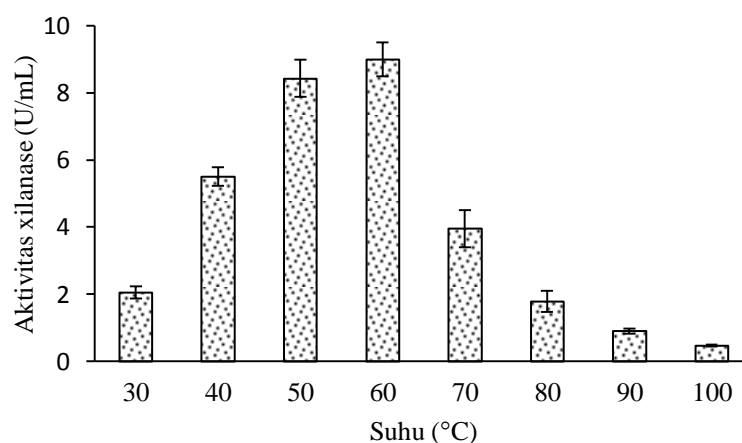
### Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Xilanase

Enzim xilanase bekerja optimum pada rentang pH dan suhu tertentu. pH dan suhu optimum akan membantu kerja enzim secara maksimal. Nilai pH menunjukkan konsentrasi ion hidrogen terlarut ( $H^+$ ) dalam larutan tertentu. Peningkatan atau penurunan pH menunjukkan perubahan konsentrasi ion dalam larutan. Ion akan mengubah struktur enzim dan substrat baik karena pembentukan ikatan tambahan atau kerusakan ikatan yang sudah ada. Hal ini akan mengubah sisi aktif enzim sehingga akan berpengaruh pada aktivitas enzim tersebut.

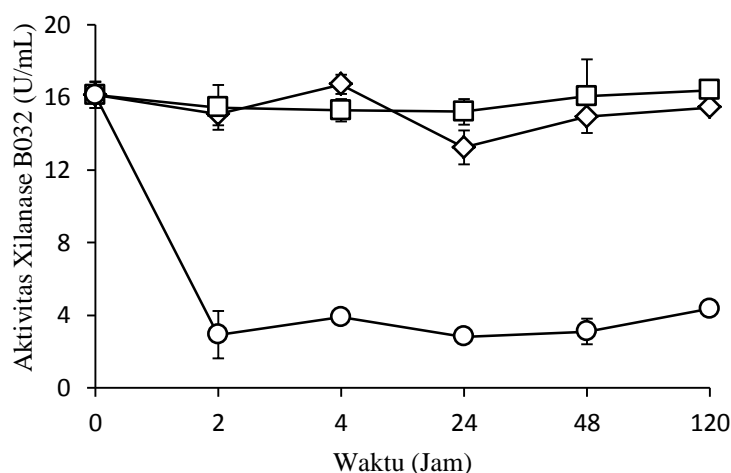


Gambar 5 Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 diuji dengan menggunakan xilan *beechwood* 0.5% pada suhu ruang

Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 bekerja pada rentang pH yang luas yaitu pada pH 3 sampai pH 10 (Gambar 5). Aktivitas xilanase mengalami kenaikan pada pH 3 sampai pH 5.5, kemudian mengalami penurunan aktivitas sampai pada pH 7.5 dan mengalami kenaikan aktivitas kembali pada pH 8. Rentang pH yang luas ini, dimungkinkan karena *Streptomyces* sp. BO 3.2 memiliki lebih dari satu jenis enzim. Meryandini *et al.* (2006) menyebutkan *Streptomyces* sp.SKK1-8 memiliki aktivitas xilanase yang cukup tinggi pada pH yang berbeda yaitu pH 3, 6, 7.2 dan 8.5. Pada *Stenotrophomonas maltophilia* mampu menghasilkan xilanase yang memiliki pH optimum 7 dan 9 (Raj *et al.* 2013) dan xilanase *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604 juga memiliki dua pH optimum yang berbeda yaitu pada pH 5 dan 9 (Roy *et al.* 2013).



Gambar 6 Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 diuji dengan menggunakan xilan *beechwood* 0.5% pH 5.5



Gambar 7 Stabilitas xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 pada suhu 4 °C (—◇—), 30 °C (—□—), dan 60 °C (—○—)

Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase menunjukkan kenaikan aktivitas xilanase dari suhu 30 °C sampai pada suhu 60 °C kemudian aktivitas menurun dengan bertambahnya suhu dan pada suhu 100 °C xilanase hampir kehilangan aktivitasnya (0.3 U/mL). Penurunan aktivitas xilanase disebabkan karena berubahnya struktur tiga dimensi protein enzim yang menyebabkan aktivitas katalitiknya menurun. Selain itu protein enzim mengalami denaturasi karena suhu tinggi yang berakibat pada hilangnya aktivitas xilanase.

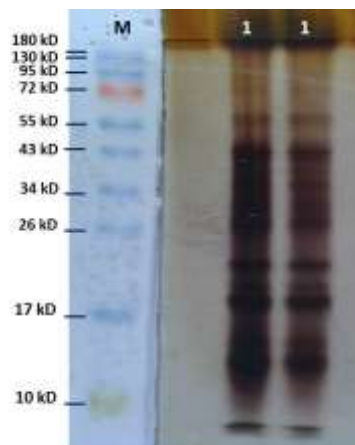
Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 memiliki suhu optimum 60 °C dengan aktivitas enzim sebesar 8.59 U/mL. Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 memiliki kondisi optimum pada pH 5.5 dan suhu 60 °C, ini termasuk pada karakteristik enzim yang bekerja pada pH rendah dan pada suhu tinggi (thermostabil). Xilanase aktinomisetes memiliki rentang optimum pH 5-12 dan pada suhu 40 °C-80 °C (Thomas *et al.* 2013). *Streptomyces* sp. KT23 dan *Streptomyces exfoliates* memiliki pH optimum pada pH 5.5 dan rentang suhu optimum 50-60 °C (Tchapun *et al.* 2012; Aly *et al.* 2012).

Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 stabil pada suhu 4 °C dan suhu ruang (30 °C) sampai pada hari ke-6 dengan aktivitas sebesar 93% dan 96% dari aktivitas awalnya, sedangkan xilanase tidak stabil pada suhu optimumnya (60 °C) karena hampir kehilangan aktivitasnya menjadi 18% pada jam ke-2 (Gambar 7). Bajaj *et al.* (2010) menyebutkan xilanase *Streptomyces* sp. SU 9 stabil pada suhu 60 °C selama 30 menit namun pada suhu 70 °C hampir kehilangan aktivitas xilanase (20% aktifitas residunya). Xilanase *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 mampu mempertahankan aktivitasnya (100%) pada suhu 30 °C selama 4 jam, namun pada suhu 60 °C pada satu jam waktu inkubasi hanya mampu mempertahankan aktivitasnya sebesar 18% (Kamble dan Jadhav 2012). Kestabilan enzim berhubungan pada kemampuan enzim dalam mempertahankan aktivitas katalitiknya. Stabilitas enzim dapat dijadikan acuan pada aplikasi pemanfaatan enzim tersebut, seperti penentuan waktu hidrolisis substrat oleh enzim untuk menghasilkan suatu produk tertentu.

### **Analisis SDS PAGE dan Zimogram Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2**

Profil protein yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. BO 3.2 dapat dilihat berdasarkan analisis SDS PAGE. Hasil analisa SDS PAGE menunjukkan terdapat 10 protein dengan ukuran bervariasi antara 10-72 kDa (Gambar 8).

Banyaknya protein hasil SDS-PAGE disebabkan xilanase yang digunakan masih berupa *crude enzyme*, sehingga masih terdapat adanya protein lain yang berasal sisa media produksi berupa ekstrak khamir. Rahayu *et al.* (2008) menyebutkan bahwa SDS-PAGE pada xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. AQ-1, pada enzim ekstrak kasar didapatkan banyak protein, namun pada enzim yang telah dimurnikan dengan ultrafiltrasi hanya terdapat tiga jenis protein yang muncul. Hal ini juga dapat ditemukan protein xilanase *Marasmius* sp., pada enzim ekstrak kasar terdapat banyak protein berbagai ukuran antara 14.4 -116 kDa, namun pada xilanase hasil pemurnian hanya terdapat satu jenis protein berukuran ~45 kDa (Ratanachomsri *et al.* 2006).



Gambar 8 Profil SDS PAGE *Streptomyces* sp. BO 3.2. M : Prestained Protein Ladder, 1 : sampel SDS PAGE



Gambar 9 Profil zimogram xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2. M : Prestained Protein Ladder, 2 : sampel xilanase pH 5.5, 3 : sampel xilanase pH 8

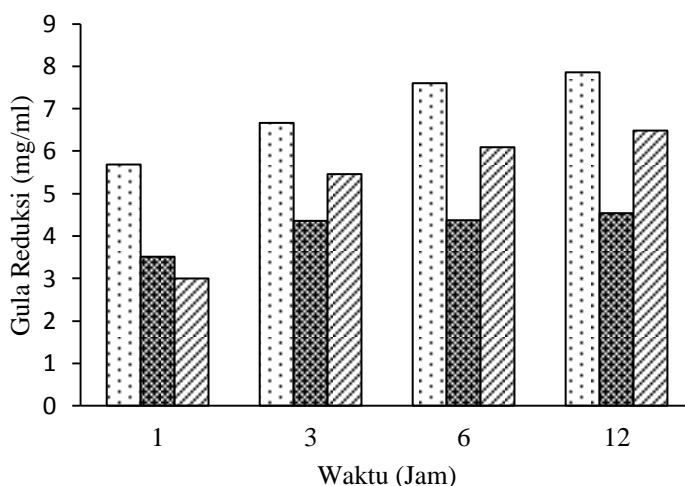
Analisis zimogram dilakukan untuk mengetahui ukuran protein xilanase yang bekerja dalam mendegradasi substrat berupa xilan *beechwood* berdasarkan zona bening yang terbentuk. Profil zimogram xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 menunjukkan adanya satu zona bening yang muncul pada pH yang berbeda yaitu pada pH 5.5 dan 8 dengan ukuran antara 55 kDa dan 72 kDa (Gambar 9). Hal ini menunjukkan adanya satu jenis enzim yang bekerja dalam mendegradasi xilan. Lafond *et al.* (2010) menyebutkan bahwa xilanase *Penicillium funiculosum* memiliki ukuran berat molekul sebesar 62 kDa. *Cellulomonas flavigena* memiliki ukuran xilanase sebesar 56 kDa (Martinez-Trujillo *et al.* 2003) sedangkan pada *Bacillus pumillus* PS213 memiliki xilanase berukuran 55 kDa (Degrassi *et al.* 1998).

### Hidrolisis Enzimatik Xilan Tangkai Tembakau

Hidrolisis enzimatik xilan tangkai tembakau menggunakan enzim xilanase yang diproduksi pada waktu optimumnya dalam media cair xilan tangkai

tembakau. Analisis kualitatif dilakukan melalui separasi produk hidrolisis pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) sedangkan analisis kuantitatif berdasarkan nilai derajat polimerasi (DP). Nilai DP menunjukkan seberapa panjang rantai suatu polimer dipecah-pecah menjadi monomer-monomernya.

Produk hidrolisis xilan secara enzimatik oleh xilanase dapat dilihat berdasarkan peningkatan gula reduksi dan penurunan derajat polimerasi (Meryandini *et al.* 2008a). Nilai gula reduksi pada hidrolisis xilan tangkai tembakau menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi (Gambar 10), karena xilanase memotong substrat xilan menjadi komponen penyusunnya berupa D-xilosa baik dalam bentuk monomer ataupun oligomernya. Semakin tinggi nilai gula reduksi menunjukkan semakin banyak polimer xilan yang dipotong menjadi rantai penyusunnya yang lebih pendek. Peningkatan gula reduksi akan berakibat pada menurunnya nilai derajat polimerasi (DP).



Gambar 10 Gula reduksi produk hidrolisis xilan tangkai tembakau. Gula reduksi xilan *beechwood* 2% (▤), gula reduksi xilan tangkai tembakau 2% (▨), gula reduksi xilan tangkai tembakau 8% (▧).

Produk hidrolisis xilan *beechwood* memiliki kandungan gula reduksi yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan produk hidrolisis xilan tangkai tembakau, hal ini disebabkan oleh xilan *beechwood* memiliki tingkat kemurnian xilan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan xilan tangkai tembakau, mengingat xilan tangkai tembakau tidak melalui proses pemurnian dalam proses ekstraksinya. Produk hidrolisis xilan tangkai tembakau konsentrasi 8% memiliki kandungan gula reduksi paling tinggi bila dibandingkan dengan produk hidrolisis xilan tangkai tembakau konsentrasi 2%, karena pada konsentrasi 8% enzim bekerja optimal dalam mendegradasi xilan yang lebih banyak sedangkan pada konsentrasi 2%, enzim masih kekurangan substrat untuk dihidrolisis.

Nilai DP menunjukkan perbandingan antara jumlah total gula dengan gula reduksi yang muncul pada hidrolisis xilan oleh xilanase. Nilai DP menunjukkan seberapa panjang rantai polimer dapat dipecah-pecah menjadi monomer-

monomernya, dalam hal ini rantai xilan dapat terurai menjadi xilosa atau xilooligosakarida oleh xilanase. Nilai derajat polimerasi hidrolisis xilan *beechwood* 2% dan xilan tangkai tembakau 2% dan 8% ditunjukkan pada Tabel 2. Nilai DP sebesar 2 menunjukkan produk hidrolisis rata-rata berupa xilooligosakarida yang tersusun atas dua monomernya. Semakin besar nilai DP menunjukkan produk hidrolisis berupa xilooligosakarida memiliki kompoen monomer yang lebih panjang. Xilooligosakarida merupakan oligomer dari xilosa. Secara umum xilooligosakarida terbentuk dari unit xilosa yang saling berikatan pada ikatan  $\beta$ -(1-4) (Aachary dan Prapulla 2009). Jumlah xilosa dapat mencapai total 10 unit tergantung pada jenis xilooligosakarida baik itu xilobiosa, xilotriosa dan seterusnya. Aplikasi pada makanan digunakan xilooligosakarida berupa xilobiosa (DP=2) (Vazques *et al.* 2005).

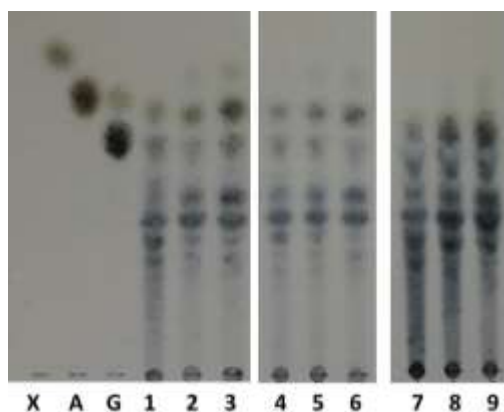
Tabel 4 Nilai derajat polimerasi hidrolisis xilan tangkai tembakau

Substrat	Jam ke-	Derajat polimerasi
Xilan <i>beechwood</i> 2%	1	2.6
	3	2.2
	6	1.9
Xilan tangkai tembakau 2%	1	2.6
	3	2.2
	6	2.1
Xilan tangkai tembakau 8%	1	10.1
	3	4.6
	6	4.5

Konsentrasi substrat akan mempengaruhi produk hidrolisis berupa nilai DP. Nilai DP pada hidrolisis xilan tangkai tembakau semakin tinggi seiring dengan peningkatan konsentrasi xilan (Tabel 4). Hidrolisis xilan tangkai tembakau 8% memiliki nilai DP lebih tinggi bila dibandingkan dengan nilai DP pada hidrolisis xilan tangkai tembakau 2%. Hal ini disebabkan pada konsentrasi 8% bertemunya substrat dengan enzim kurang optimal pengaruh dari pekatnya substrat yang digunakan. Penambahan enzim diperlukan untuk meningkatkan proses hidrolisis sehingga xilan dapat dihidrolisis menjadi xilooligosakarida dengan monomer yang lebih sedikit. Tingkat homogenitas substrat enzim pada hidrolisis yang rendah mengakibatkan xilanase tidak dapat bereaksi secara maksimal, terlihat pada produk hidrolisis xilan tangkai tembakau 8% berupa nilai DP lebih tinggi bila dibandingkan dengan konsentrasi substrat xilan tangkai tembakau 2%.

Analisis *thin layer chromatography* (TLC) dilakukan pada hidrolisis xilan tangkai tembakau untuk mengetahui jenis produk hidrolisis secara kualitatif. Analisis TLC berdasarkan pada pemisahan perbedaan interaksi struktur yang berbeda. Teknik ini merupakan cara pemisahan komponen senyawa kimia di antara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Penelitian ini menggunakan silica gel sebagai fase diamnya, sedangkan pada fase geraknya menggunakan eluen terdiri atas n-butanol, asam asetat, akuades. Pemisahan produk hidrolisis dimaksudkan untuk mengetahui jenis dari oligosakarida yang dihasilkan selama

proses hidrolisis enzimatis berdasarkan standar yang digunakan (Gambar 11). Hasil TLC menunjukkan terdapat produk hidrolisis berupa xilooligosakarida yang letak spotnya berada di bawah standar xilosa. Jenis xilooligosakarida dimungkinkan dalam bentuk xilobiosa, xilotriosa ataupun dalam bentuk xilooligosakarida lainnya. Hal ini sesuai dengan analisis produk hidrolisis berdasarkan nilai DP yang menunjukkan produk berupa xilooligosakarida.



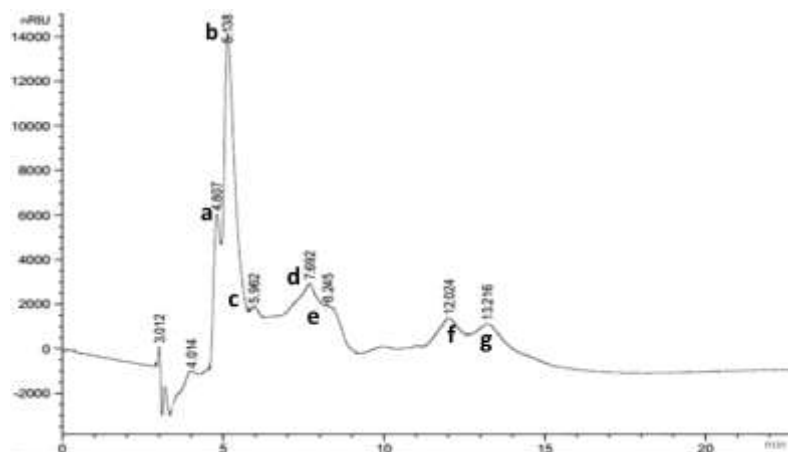
Gambar 11 *Thin layer chromatography* (TLC) produk hidrolisis enzimatis xilan tangkai tembakau

Keterangan :

- |                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| X: standar xilosa                     | 4: xilan tangkai tembakau 2% jam ke-1 |
| A: standar arabinosa                  | 5: xilan tangkai tembakau 2% jam ke-3 |
| G: standar glukosa dan sellobiosa,    | 6: xilan tangkai tembakau 2% jam ke-6 |
| 1: <i>xilan beechwood</i> 2% jam ke-1 | 7: xilan tangkai tembakau 8% jam ke-1 |
| 2: <i>xilan beechwood</i> 2% jam ke-3 | 8: xilan tangkai tembakau 8% jam ke-3 |
| 3: <i>xilan beechwood</i> 2% jam ke-6 | 9: xilan tangkai tembakau 8% jam ke-6 |

Hidrolisis xilan *beechwood* dengan xilan tangkai tembakau menunjukkan produk hidrolisis yang relatif sama. Konsentrasi xilan tangkai tembakau (2% dan 8%) yang digunakan pada proses hidrolisis menunjukkan produk hidrolisis berupa xilooligosakarida dengan jenis yang relatif sama. Berdasarkan tebal tipisnya spot hasil TLC produk hidrolisis menunjukkan pada konsentrasi xilan tangkai tembakau 8% lebih tebal jika dibandingkan dengan konsentrasi 2% xilan tangkai tembakau. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi produk hidrolisis lebih tinggi karena xilanase banyak menghidrolisis substrat menjadi produk xilooligosakarida. Berdasarkan analisis TLC tersebut dapat diketahui produk hidrolisis berupa glukosa dan arabinosa tidak muncul karena struktur xilan tangkai tembakau termasuk dalam homoxilan, struktur yang terdiri atas rantai utama berupa polimer xilosa tanpa adanya rantai samping baik berupa glukosa ataupun arabinose (Sunna dan Antranikian 1997).





Gambar 12 Kromatogram produk hidrolisis xilan tangkai tembakau 2% dengan xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2. *Retention time* standar, Xilosa : 4.436, Glukosa : 5.571, Arabinosa : 4.666, Selobiosa : 5.312.

Analisis *high performance liquid chromatography* (HPLC) produk hidrolisis xilan tangkai tembakau dengan xilanase *Streptomyces* sp BO 3.2 terdapat tujuh jenis xilooligosakarida yang muncul berdasarkan puncak dan waktu retensi pada kromatogram. Berdasarkan standar yang digunakan tidak didapatkan adanya produk hidrolisis berupa xilosa, arabinose, glukosa dan selobiosa. Tidak adanya xilosa pada produk hidrolisis menunjukkan bahwa kerja enzim 1,4- $\beta$ -endoxilanase lebih dominan bila dibandingkan dengan kerja enzim 1,4- $\beta$ -eksoxilanase. Enzim 1,4- $\beta$ -endoxilanase menghidrolisis secara acak rantai xilan dari bagian dalam menghasilkan xilooligosakarida sedangkan enzim 1,4- $\beta$ -edoxilanase menghidrolisa 1,4- $\beta$ -D-xilooligosakarida dan xilobiosa secara berturut-turut dari ujung nonreduksi menghasilkan D-xilosa (Subramaniyan dan Prema 2002). Tidak adanya enzim eksoxilanase yang disekresikan akan menghasilkan produk hidrolisis berupa oligosakarida bukan berupa monosakarida sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi XOS

## 4 SIMPULAN

Ekstraksi xilan tangkai tembakau secara alkali mampu menghasilkan rendemen xilan sebesar 15.53%. Xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2. memiliki kondisi optimum pada pH 5.5 dan suhu 60 °C serta memiliki kestabilan pada suhu ruang selama 120 jam. *Streptomyces* sp. BO 3.2 mampu menghasilkan xilanase yang bekerja pada pH 5.5 dan 8 yang berukuran antara 55 kDa dan 72 kDa. Berdasarkan analisis TLC dan HPLC, hidrolisis xilan tangkai tembakau oleh xilanase *Streptomyces* sp. BO 3.2 dapat menghasilkan produk hidrolisis berupa xilooligosakarida.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aachary AA, Prapulla SG. 2009. Short Communication : Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Biores Technol.* 100(2):991–995.doi:10.1016/j.biortech.2008.06.050.
- Akpinar O, Erdogan K, Bakir U, Yilmaz L. 2010. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *Food Sci Technol.* 43(1):119–125.doi:10.1016/j.lwt.2009.06.025.
- Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. 2009. Enzymatic production of Xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food Bioprocess.* 87 (2):145–151.doi:10.1016/j.fbp.2008.09.002.
- Alonso JL Domínguez H, , Garrote G, Parajó JC, Vázquez MJ. 2003. Xylooligosaccharides: properties and production technologies. *Electr J Environ Agr Food Chem.* 2(1):230-232.
- Aly MM, Tork S, Al Garni SM, Nawar L. 2012. Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exofoliate* LP10 isolated from oil-contaminated soil. *Afr J Microbiol Res.* 6(6):1125-1137.doi:10.5897/AJM.R11.1123.
- [AOAC] Association of Analytical Communities. 1984. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. Volume IIA. Washington (US) : AOAC Int.
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budiyo S. 1989. *Analisis Pangan*. Bogor (ID):IPB Press.
- Bajaj BK, Razdan K, Sharma A. 2010. Thermoactive alkali-stable xylanase production from a newly isolated *Streptomyces* sp. SU 9. *Ind J Chem Technol.* 17(5):375-380.
- Bajaj BK, Singh NP. 2010. Production of xylanase from an alkalitolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *Appl Biochim Biotechnol.* 162(6):1804-1818.doi:10.1007/s12010-010-8960-x.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Application: A Review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(3-4):326-338.doi:10.1007/s002530100704.
- Brienzo M, Carvalho W, Milagres AM F. 2010. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse Using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Biochem Biotech.* 162 (4):1195-205.doi:10.1007/s12010-009-8892-5.
- Carvalho AFA, Neto PO, Silva DF, Patore GM. 2013. Review : Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 51(1):75–85.doi:10.1016/j.foodres.2012.11.021.
- Chapla D, Pandit P, Shah, A. 2012. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Biores Technol.* 115:215-221.doi:10.1016/j.biortech.2011.10.083.

- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 29(1):3-23.doi:10.1016/j.femsre.2004.06.005.
- Coman G, Georgescu L, Gabriela B. 2013. *Streptomyces* p12-137 endoxylanases characteristics evaluation in order to obtain xylo-oligosaccharides. *Rom Biotech Lett.* 18(2):8086-8096.
- Degrassi G, Okeke BC, Bruschi CV, Venturi V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. *Appl Environ Microbiol.* 64(2):789–792.
- Deesukon W, Nishimura Y, Sakamoto T, Sukhumsirichart W. 2013. Purification, characterization of GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase from thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 and overexpression in *Pichia pastoris* KM71H. *Mol Biotechnol.* 54(1):37-46.doi:10.1007/s12033-012-9541-8.
- Dirjenbun. 2012. Produksi Tembakau Indonesia Setiap Propinsi (ID) : Dirjen Perkebunan Departemen Pertanian RI.
- Fooks LJ, Gibson GR. 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 39(1):67-75.doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00907.x.
- Gerber NN, Lechevalier HA. 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol.* 13(6):935–938.
- Gullon P, Moura P, Esteves MP, Girio FM, Dominguez H, Parajo JC. 2008. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. *J Agric and Food Chem.* 56(16):7482-7487.doi:10.1021/jf800715b
- Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh KP. 2013. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrl Crops Prod.* 42(1):14–24.doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.019.
- Kamble RD, Jadhav AR. 2012. Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645. *Asian Pacific J Tropical Biomed.* 2(3):1790–1797.doi:10.1016/S2221-1691(12)60496-1.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage on Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.doi:10.1038/227680a0.
- Lafond M, Tazuin A, Desseaux V, Bonnin E, Ajandouz E, Giardina T. 2011. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum* : biochemical studies and xylooligosaccharide production. *Microb Cell Fact.* 10(20):1-8. doi:10.1186/1475-2859-10-20.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid ke-1. Thenawijaya M, penerjemah. Jakarta (ID) : Erlangga. Terjemahan dari : *Principle of Biochemistry*.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed. Ke-9. Upper Saddle River (US) : Prentice Hall.
- Mander P, Yun HC, Pradep GC, Yun SC, Joon HH, Seung SC, Jin CY. 2014. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. *Proces Biochem.* 49 (3):451–456.doi: 10.1016/j.procbio.2013.12.011.

- Martinez-Trujillo A, Pérez-Avalos O, Ponce-Noyola T. 2003. Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme and Microb Technol.* 32(3-4):401–406. doi:10.1016/S0141-0229(02)00313-7.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yague P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 74(12):3877–3886. doi:10.1128/AEM.02715-07.
- Meryandini A, Hendarwin T, Saprudin D, Lestari Y. 2006. Characterization of Xylanase *Streptomyces* spp. SKK1-8. *Hayati* 13(4):151-155.
- Meryandini A, Sunarti TC, Naomi A, Mutia F. 2008a. Using *Streptomyces* xylanase to produce xylooligosaccharide from corncob. *Biotropia.* 15(2):119-128. doi:10.11598/btb.2008.15.2.71.
- Meryandini A, Widyastuti N, Lestari Y. 2008b. Pemurnian dan karakterisasi xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8. *Makara Sains.* 12(2):55-60.
- Meryandini A, Saprudin D, Prihandono PA, Akhdiya A, Hendarwin T. 2007. Characterization of *Streptomyces* sp. 45i-3 xylanase. *Biotropia.* 14(2): 32-34. doi:10.11598/btb.2007.14.2.16.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31(3):426–428. doi:10.1021/acb01474030.
- Moreira KA, Cavalcanti MTH, Duarte HS, Tambourgi EB, de Melo EHM, Silva VL, Porto ALF, Filho JL. 2001. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. *Brazilian J Microbiol.* 32(3):215-220. doi:10.1590/S1517-83822001000300010.
- Nakamura S, Nakai R, Wakaba-yashi K, Ishigoro Y, Aono R, Horikoshi K. 1994. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci Biotech Biochem* 58(1):78-81.
- Nurkanto A, Julistiono H, Agusta A, Sjamsuridzal W. Screening antimicrobial activity of actinomycetes isolated from Raja Ampat, West Papua, Indonesia. *Makara J. Sci.* 16(1):21-26. doi:10.7454/mss.v16i1.1276.
- Park YS, Yum DY, Bai BH, Yu JH. 1992. Xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. YC-335. *Biosci Biotech Biochem.* 56(8):1355-1356. doi:10.1271/bbb.56.135.
- Rahayu P, Setyahadi S, Harmita. 2008. Production and purification of xylanase from Indonesian isolate *Bacillus* sp. AQ-1 grown on bunch palm oil. *Microbiology Indonesia.* 3(1):23-26.
- Raj A, Kumar S, Singh SK. 2013. A Highly Thermostable Xylanase from *Stenotrophomonas maltophilia*: purification and partial characterization. *Enzyme Resch.* :1-8. doi:10.1155/2013/429305.
- Ratanachomsri U, Sriprang RR, Sornlek W, Buaban B, Champreda V, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L. 2006. Thermostable xylanase from *Marasmius* sp. : purification and characterization. *J Biochim Mol Biol.* 39(1): 105-110.
- Richana N, Tedja Irawadi TT, Nur MA, Sailah I, Syamsu K dan Arkenan Y. 2007. Ekstraksi xilan dari tongkol jagung. *J. Pascapanen.* 4(1):38-43.

- Roy S, Dutta T, Tuhin Subhra Sarkar TS, Ghosh S. 2013. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. *SpringerPlus*. 2(382):1-10.doi:10.1186/2193-1801-2-382.
- Ruiz-Arribas, A, Fernandez-Abalos JM, Sanches P, Gardu AL, Santamaria RI. 1995. Over production, purification, and biochemical characterization of xylanase I (xys 1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol*. 61(6): 2414-2419.
- Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J Indust Microbiol Biotech*. 30(5): 279–291.doi:10.1007/s10295-003-0049-x.
- Sharma P, Bajaj BK. 2005. Productin and Partial Chareacterization of Alkali Xilanase from an *Streptomyces* sp CD3. *J Sci Ind Res*. 64(9):688-696.
- Sharma A, Pujari R, Patel P. 2009. Characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from *Enterobacter* isolates. *Indian J Biotechnol*. 8(1):110-114.
- Subramaniyan S, Prema P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Crit Rev Biotechnol*. 22(1): 33-46.doi:10.1080/07388550290789450.
- Sunna A, G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotech*. 17(1):36-67.doi:10.3109/07388559709146606
- Taherzadeh MJ, Karimi K. 2007. Process for etahanol from lignocellulosic materials: acid based hydrolysis process. *Bioresources*. 2(3):474-499.
- Teather RM, Wood PJ. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytics bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*. 43(4):777-780.
- Techapun C, Sinsuwongwat S, Watanabe M, Sasaki K, Posaran N. 2012. Production of cellulose-free xylanase by a thermotolerant *Streptomyces* sp grown on agricultural waste and media optimization using mixture design and Plackett-Burman experimental design methods. *Biotech Lett*. 24(17):1437-1442.doi:10.1023/A:1019827321162.
- Thomas J, Joseph A, Arumgam M, Padey A. 2013. Production, purification, characterization and over-expression of xylanase from actinomycetes. *India J Exp Biol*. 51(11):875-884.
- Vazquez MJ, Garrote G, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC. 2005. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Biores Technol*. 96(8):889–896.doi:10.1016/j.biortech.2004.08.013.
- Yang H, Wang K, Song X, Xu F. 2011. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Biores Technol*. 102(14):7171–7176.doi:10.1016/j.biortech.2011.03.110.

## Lampiran 1 Komposisi media

## 1. Komposisi media agar-agar xilan

Bahan	Jumlah (g/100mL)
Ekstrak Khamir	1
Sukrosa	10.3
<i>Brichwood xylan</i>	0.5
Agar-agar	1.6

Sumber : Ruiz-Arribas *et al.* 1995

## 2. Komposisi media cair untuk produksi xilanase

Bahan	Jumlah (g/100mL)
Xilan tangkai tembakau	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
KNO <sub>3</sub>	0.075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.002
CaCl <sub>2</sub>	0.004
Ekstrak khamir	0.2
Glukosa	0.1

Sumber : Meryandini *et.al.* (2007) dengan modifikasi

## Lampiran 2 Neraca massa ekstraksi xilan tangkai tembakau

## 1. Preparasi Sampel

## - Pencacahan - Pengeringan



Tangkai Tembakau



Pencacahan



Pengeringan

- *Hammer Mill*

Tangkai kering

*Hammer mill*

Hasil penggilingan

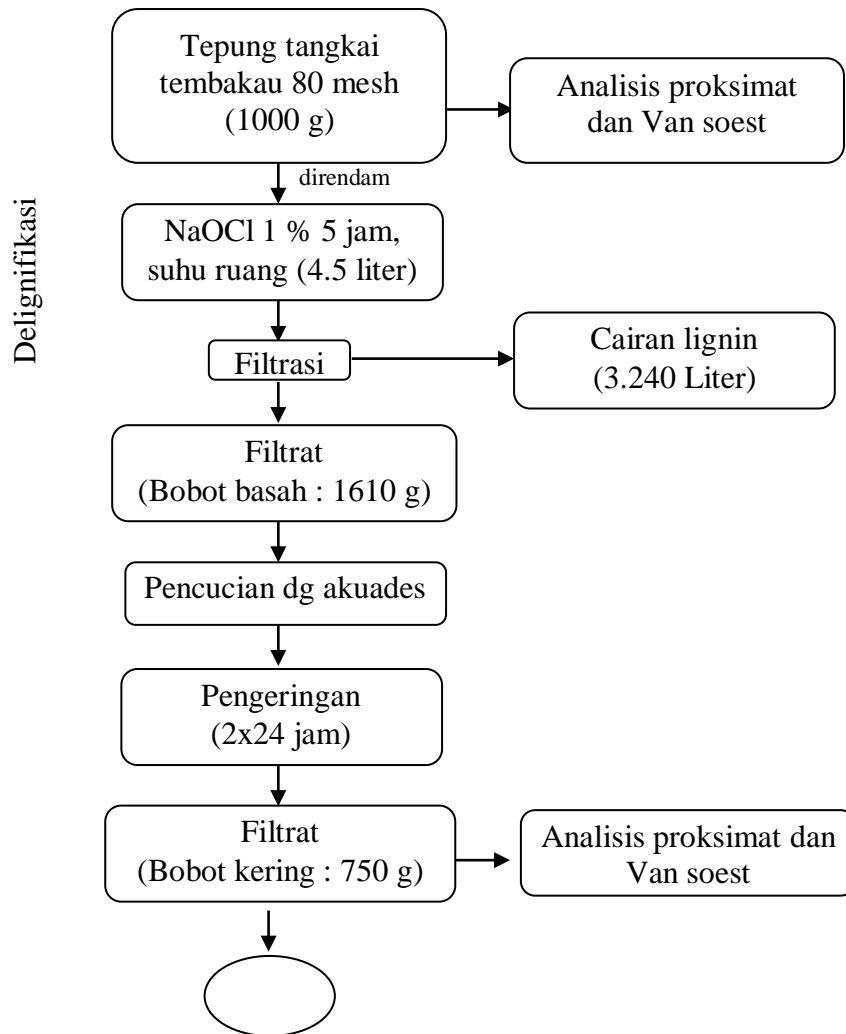
## - Penyaringan (80 mesh)

Hasil penggilingan  
6000 g

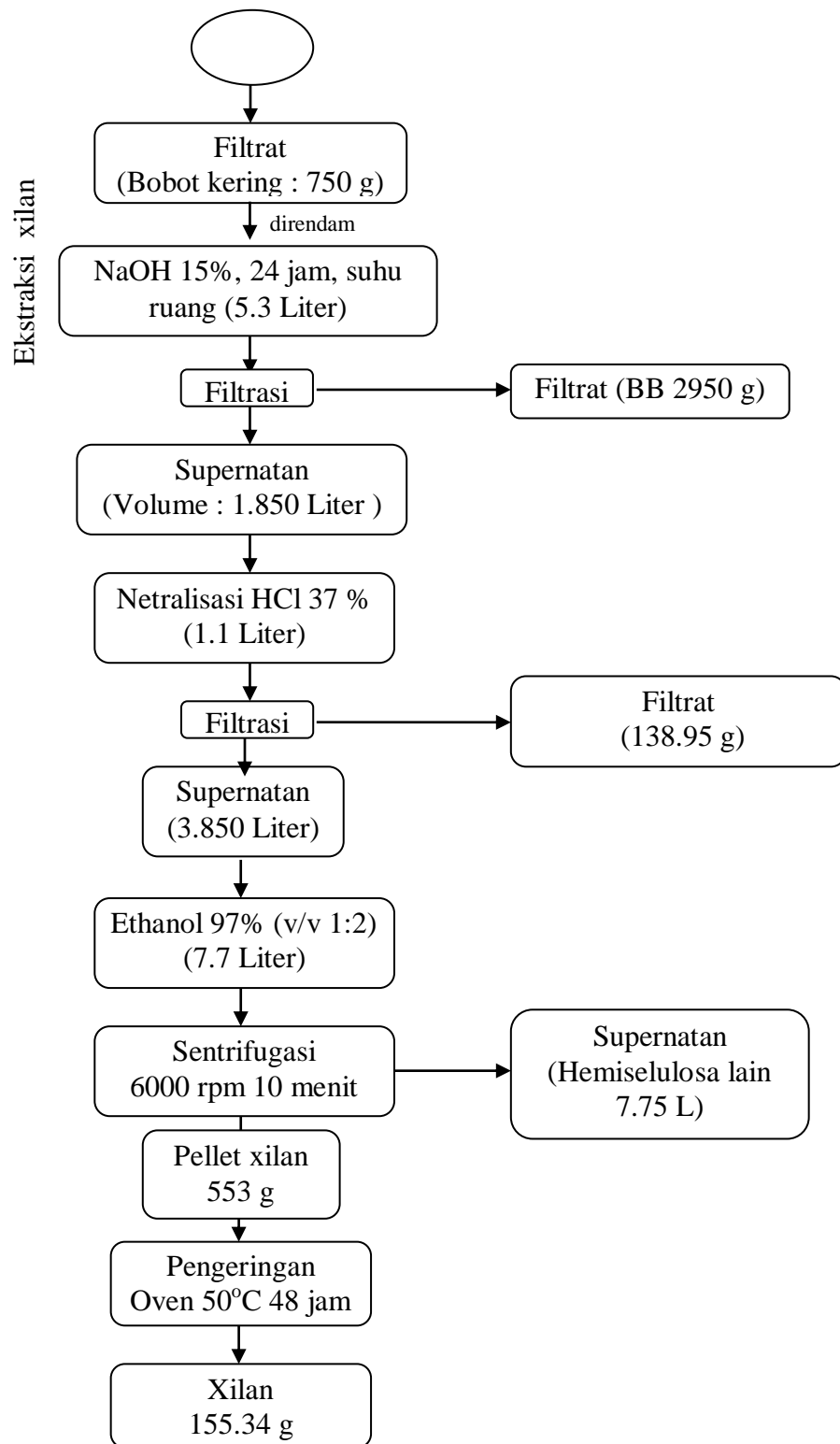
penyaringan

Tepung tangkai tembakau  
80 mesh 2900 g

## 2. Ekstraksi xilan tangkai tembakau







## Lampiran 3 Hasil analisa isolat BO 3.2 berdasarkan gen 16S rRNA.

## Sekuen Isolat BO 3.2

GGGGGGGGGGCTTACCATGCAGTCGTACGATGGATAACACCTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGT  
 GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAC  
 ACTCTCGCAGGCATCTGTGAGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGT  
 TGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACTGGG  
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA  
 TGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAA  
 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA  
 GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGG  
 CTTAACCTCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGA  
 GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGC  
 TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGGTGGGA  
 ACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTA  
 CGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCCGGCGGAGCATGTGGCTTAA  
 TTCGACGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTTGACATACACCCGAAAACCTTAAAGATAGTGGC  
 CCCCCTTGTGGTTCGGGTGTACAAGTGGGTGCATGGCTTGTCTCCACCTCTTGTGTGTCGTGAGATGTTT  
 GGGTTAAATCCCGCAACGAAGCCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTTGGGGA  
 CTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATG  
 TCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA  
 AAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGAATCGCAG  
 ATCAGCATTGCTGCAGGGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACGCACCCGCAAACCTAGTCGAGAAAGAAATTC  
 ACATAGTCGGAGCTATGGCTAAAGTCCCGCAGGGGCAGGACAA

## Hasil BlastN sekuens 16S rRNA Isolat BO 3.2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. YRA145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2250	2250	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 407829884 JX430827.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. YRA012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2248	2248	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 407829873 JX430816.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. ACTY514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2246	2246	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 407829899 JX430842.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. m16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2244	2244	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 481063217 JX430815.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. THG-LS215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2242	2242	95%	0.0	97%	<a href="#">gi 597590798 KJ182963.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. YRA013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2242	2242	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 407829872 JX430815.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. 3x 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2239	2239	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 164653889 EU380154.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces murinus strain MDMT-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2235	2235	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 594139373 KF973308.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone A1-449 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2235	2235	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 511195016 KC554772.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone A1-47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2235	2235	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 511194923 KC554724.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. UNPA229 gene for 16S rRNA, partial sequence</a>	2230	2230	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 374857930 AB696874.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. MI264-NF2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	2230	2230	94%	0.0	96%	<a href="#">gi 374346082 AB695175.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. LS462 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2230	2230	94%	0.0	97%	<a href="#">gi 346655375 JN521239.1</a>

## Lampiran 4 Prosedur penentuan gula pereduksi metode DNS (Miller 1959)

1. Komposisi reagen *Dinitrosalisilic acid* (DNS)

Bahan	Jumlah (g/1000 mL)
NaOH PADAT	10
KNa tartat	182
Asam dinitrosalisilat	10
Aquades steril	Ditera sampai volume akhir 1000 mL

## 2. Pembuatan kurva standar xilosa

Larutan stok xilosa dibuat dengan cara melarutkan 0.01 g xilosa dalam 10 mL aquades sehingga konsentrasinya menjadi 1 mg/mL. Larutan stok xilosa diambil 0.0 mL, 0.02 mL, 0.04 mL, 0.06 mL, 0.08 mL, 0.1 mL, 0.15 mL, 0.2 mL, dan 0.25 mL, masing-masing ditambahkan aquades hingga volume mencapai 1 mL. Setiap tabung ditambahkan larutan DNS sebanyak 1.5 mL, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 15 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan garis linier sebagai kurva standar gula pereduksi.

## 3. Pengujian aktivitas xilanase metode DNS

Perlakuan sampel dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 0.5 mL substrat xilan *beechwood* 0.5% dengan 0.5 mL enzim diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah dingin ditambahkan larutan DNS sebanyak 1.5 mL. Pada perlakuan kontrol sebanyak 0.5 mL substrat ditambah 1.5 mL larutan DNS dan 0.5 mL enzim. Sampel dan kontrol dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 15 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan linier kurva standar xilosa untuk menentukan aktivitas enzim xilanase.

Lampiran 5 Pembuatan kurva standar total gula metode Fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
(Apriyantono *et al.* 1989)

1. Pembuatan Kurva Standar Total Gula

Larutan stok xilosa dibuat dengan cara melarutkan 0.01 g xilosa dalam 10 ml aquades sehingga konsentrasinya menjadi 1 mg/mL. Larutan stok xilosa diambil 0.0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL, 0.7 mL, 0.8 mL, dan 0.9 mL, masing-masing ditambahkan aquades hingga volume mencapai 1 mL. Setiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% dan 1.25 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 40 °C. Kemudian larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm, nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar untuk mengetahui total gula.

2. Penentuan Total Gula

Sampel sebanyak 1 mL ditempatkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL larutan fenol 5% dan ditambahkan 2.5 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dibiarkan selama 20 menit pada suhu 40 °C, setelah dingin kemudian dihomogenisasi dengan vortek dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar untuk mengetahui total gula.

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan dari pasangan Nirwana dan Daryati pada tanggal 5 September 1987 di Boyolali Jawa Tengah. Penulis merupakan anak pertama dari dua saudara. Tahun 2006 penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA MTA Surakarta, kemudian pada tahun 2007 penulis melanjutkan pendidikan strata satu di Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan menyelesaikan studinya pada bulan Agustus 2011. Pernah bekerja di salah satu perusahaan swasta (PT. Indogen Intertama), kemudian pada tahun 2012 penulis melanjutkan pendidikan strata dua (S2) di program studi Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor melalui program Beasiswa Unggulan Dikti 2012. Bagian dari tesis ini telah dikirimkan ke jurnal bereputasi internasional *Makara* dengan judul “Xilooligosaccharides Production from Tobacco Stalk Xylan Using Xylanase from *Streptomyces* sp. BO 3.2”.