



**EKSPLORASI KALDU USUS AYAM POTONG DAN AIR CUCIAN BERAS  
SEBAGAI MEDIUM PERTUMBUHAN (*Bacillus* sp.)  
PENGHASIL ENZIM XILANASE**

**SKRIPSI**

Oleh :

**Ach. Haris Efendy  
NIM 101810301021**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**EKSPLORASI KALDU USUS AYAM POTONG DAN AIR CUCIAN BERAS  
SEBAGAI MEDIUM PERTUMBUHAN (*Bacillus* sp.)  
PENGHASIL ENZIM XILANASE**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

oleh

**Ach. Haris Efendy  
NIM 101810301021**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Isti Kumaiyah dan Ayahanda Abd. Muhith Waluyo, terimakasih atas motivasi dan dukungan baik moral dan materil yang selalu ikhlas diberikan;
2. guru-guru di TK Nahdlatuttulab Kaligoro, MI Miftahul Huda Kaligoro, MTsN Srono, SMAN 1 Cluring, serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember;
3. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.  
(terjemahan Qu'an Surah Al – *Insyirah* ayat 6) <sup>\*)</sup>

Jangan patah semangat walau apapun yang terjadi,  
jika kita menyerah maka habislah sudah. <sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: CV. Pustaka Agung Harapan

<sup>\*\*)</sup> Chirathivat, Pachara. 2011. *“Top Seceret: Wai Roon Pun Lan”*. Thailand: GMM Tai Hub (GTH)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ach. Haris Efendy

NIM : 101810301021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Eksplorasi Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras Sebagai Medium Pertumbuhan (*Bacillus sp.*) Penghasil Enzim Xilanase” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Desember 2015

Yang menyatakan,

Ach. Haris Efendy

NIM 101810301021

**SKRIPSI**

**EKSPLORASI KALDU USUS AYAM POTONG DAN AIR CUCIAN BERAS  
SEBAGAI MEDIUM PERTUMBUHAN (*Bacillus* sp.)  
PENGHASIL ENZIM XILANASE**

Oleh

**Ach. Haris Efendy  
NIM 101810301021**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Eksplorasi Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras Sebagai Medium Pertumbuhan (*Bacillus sp.*) Penghasil Enzim Xilanase” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua (DPU),

Sekretaris (DPA),

Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si  
NIP. 197104301998031003

Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si  
NIP. 197012251997022001

Penguji I,

Penguji II,

drh. Wuryanti Handayani, M.Si  
NIP. 196008221985032002

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D  
NIP. 195910091986021001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D  
NIP. 196101081986021001

## RINGKASAN

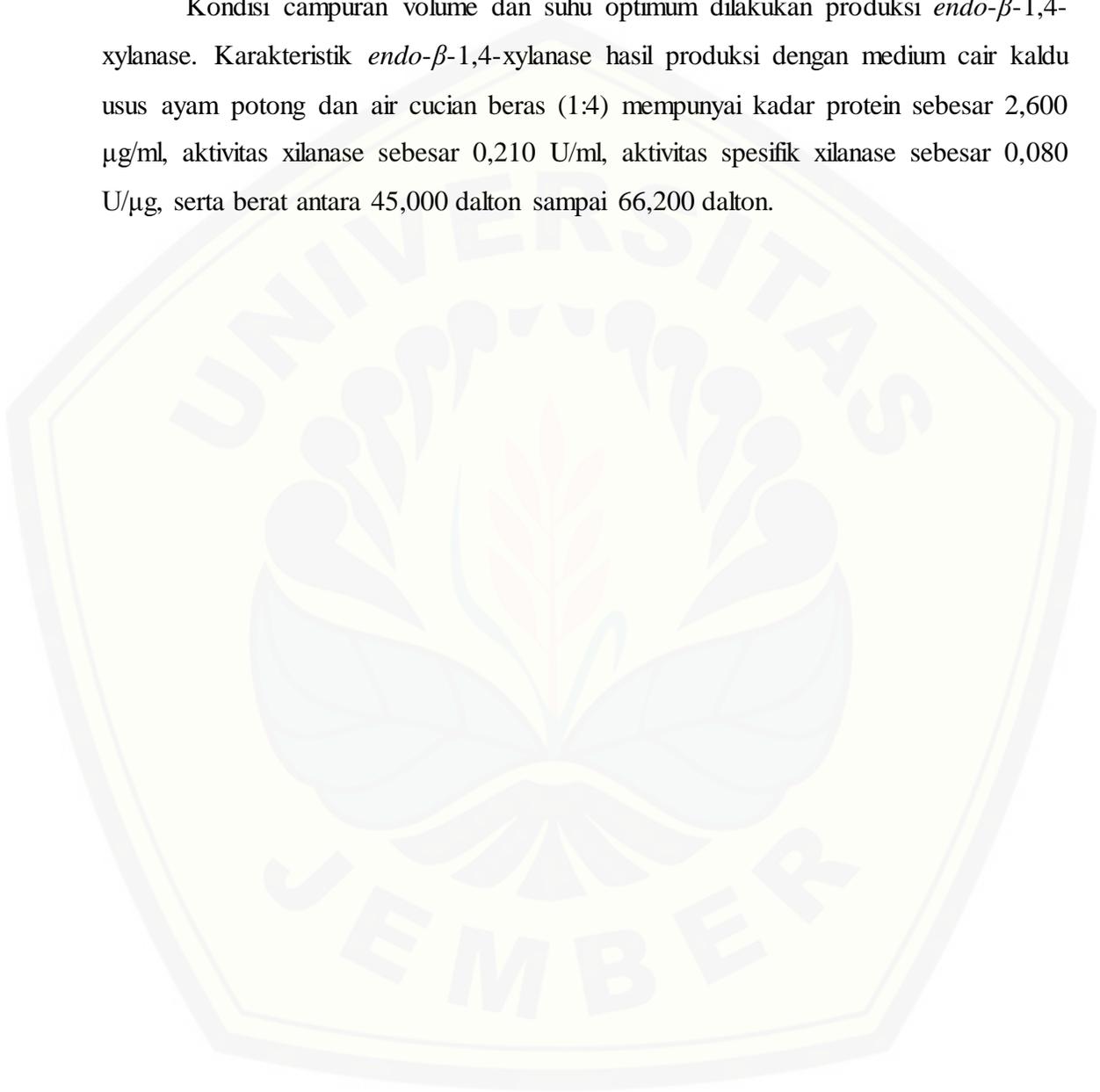
**Eksplorasi Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras Sebagai Medium Pertumbuhan (*Bacillus sp.*) Penghasil Enzim Xilanase;** Ach. Haris Efendy, 101810301021; 2015; 84 Halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

*Endo-β-1,4-xylanase* (EC. 3.2.1.8) merupakan enzim hidrolitik yang dapat memotong ikatan 1,4 pada rantai polisakarida xilan. Hasil hidrolisis xilan adalah xilooligosakarida, xilosa, dan arabinosa. Enzim *endo-β-1,4-xilanase* dapat ditemukan pada jamur dan bakteri. Salah satu bakteri yang menghasilkan xilanase adalah *Bacillus sp.* Penumbuhan *Bacillus sp.* umum menggunakan medium Luria Bertani (LB). Medium luria bertani relatif mahal sehingga tidak menguntungkan digunakan sebagai medium biakan pada skala produksi komersial. Maka dari itu dilakukan eksplorasi medium cair dari kaldu usus ayam potong dan air cucian beras sebagai medium tumbuh *Bacillus sp.* Optimasi medium dilakukan dengan variasi volume campuran kedua medium dan suhu pertumbuhan dengan menentukan nilai *optical density* (OD<sub>600</sub>) secara spektroskopis. Kondisi optimum digunakan untuk produksi *endo-β-1,4-xylanase* dan dianalisa keberadaanya dengan penentuan kadar protein, aktivitas enzim, dan berat molekul enzim.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peremajaan isolat bakteri asal sistem abdomen rayap tanah termasuk jenis bakteri gram positif. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium cair kaldu usus ayam potong dan air cucian beras pada berbagai variasi volume campuran. Kandungan karbon organik dan nitrogen total dikuantifikasi pada kedua medium cair tersebut. Medium cair kaldu usus ayam potong diketahui memiliki kadar nitrogen total 0,185 % dan karbon organik total 0,156 %, sedangkan medium air cucian beras memiliki kadar nitrogen total 0,080 % dan karbon organik total 0,784 %. Penumbuhan *Bacillus sp* pada semua variasi medium cair

menunjukkan bahwa volume campuran optimum (kaldu usus ayam : air cucian beras) adalah (1:4) dengan suhu inkubasi 37 °C selama 20 jam.

Kondisi campuran volume dan suhu optimum dilakukan produksi *endo-β-1,4-xylanase*. Karakteristik *endo-β-1,4-xylanase* hasil produksi dengan medium cair kaldu usus ayam potong dan air cucian beras (1:4) mempunyai kadar protein sebesar 2,600 µg/ml, aktivitas xilanase sebesar 0,210 U/ml, aktivitas spesifik xilanase sebesar 0,080 U/µg, serta berat antara 45,000 dalton sampai 66,200 dalton.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Eksplorasi Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras Sebagai Medium Pertumbuhan (*Bacillus sp.*) Penghasil Enzim Xilanase”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember;
3. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si, selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si, selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan materil dalam penulisan skripsi ini;
4. drh. Wuryanti Handayani, M.Si, selaku dosen penguji I dan Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D, selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga guna menguji serta menyempurnakan skripsi ini;
5. Drs. Sudarko, Ph.D, selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menempuh studi di Universitas Jember;
6. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dan dosen Jurusan Kimia khususnya yang telah banyak memberikan ilmu dan pengetahuan;
7. Prof. Bambang Sugiharto dan Prof. Tri Agus Siswoyo selaku pimpinan laboratorium *Centre for Development of Advance Sciences and Technology*

(CDAST) terimakasih atas bantuan, semangat, dan telah menerima penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST Universitas Jember;

8. Seluruh guru dari sekolah dasar sampai perguruan tinggi;
9. Orang tua, ibunda Isti Kumaiyah dan ayahanda Abd. Muhith Waluyo yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil serta pengorbanannya selama membesarkan dan membimbing penulis selama ini;
10. Teman – teman kimia angkatan 2010 terimakasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang diberikan;
11. Teman – teman Komunitas Peduli Pariwisata Kabupaten Banyuwangi (KOPIWANGI) yang telah memberikan semangat dan do'a;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca.

Jember, 22 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Bacillus sp</i> .....	5
2.2 Pengukuran Pertumbuhan <i>Bacillus sp</i> .....	7
2.3 Ayam Potong (Broiler).....	9
2.4 Air Cucian Beras.....	10
2.5 Metode Kjeldahl.....	11
2.6 Spektrofotometri.....	12

2.7 Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dan Prospeknya.....	15
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan.....	19
3.3 Diagram Alir Penelitian.....	20
3.4 Persiapan Medium.....	21
3.4.1 Pembuatan Medium Luria Bertani Padat.....	21
3.4.2 Pembuatan Medium Luria Bertani Cair.....	21
3.4.3 Pembuatan Medium Air Cucian Beras.....	21
3.4.4 Pembuatan Medium Kaldu Usus Ayam Potong.....	22
3.5 Persiapan Reagent.....	22
3.5.1 Pembuatan Reagent Bradford.....	22
3.5.2 Pembuatan Reagent Miller.....	22
3.6 Peremajaan Bakteri Pensekresi	
<i>Endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase</i> .....	23
3.7 Identifikasi <i>Bacillus</i> sp.....	23
3.7.1 Mengamati Keceragaman Bakteri.....	23
3.7.2 Uji Kekentalan (KOH 4%).....	23
3.7.3 Uji Gram Bakteri.....	23
3.8 Penentuan Kandungan Nitrogen dan Karbon Medium	
<b>Kaldu Usus Ayam dan Air Cucian Beras</b> .....	<b>24</b>
3.8.1 Penentuan Kandungan Nitrogen Total Metode	
Kjeldahl.....	24
3.8.2 Penentuan Kandungan Karbon Organik Total	
Metode <i>Walkley and Black</i> .....	26
3.9 Pengukuran Pertumbuhan Bakteri.....	26

<b>3.10 Penentuan Kadar Protein <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i></b> .....	27
3.10.1 Kurva Standar Bovine Serum Albumin.....	27
3.10.2 Penentuan Kadar Protein <i>endo-β-1,4-D-xilanase</i> .....	27
<b>3.11 Penentuan Aktivitas <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i></b> .....	28
3.11.1 Kurva Standar Xilosa.....	28
3.11.2 Pengujian Aktivitas <i>endo-β-1,4-D-xilanase</i> .....	28
<b>3.12 Penentuan Berat Molekul <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i></b> .....	29
3.12.1 Persiapan Alat SDS-PAGE.....	29
3.12.2 Pembuatan Gel.....	29
3.12.3 Persiapan Sampel SDS-PAGE.....	30
3.12.4 Running SDS-PAGE.....	30
3.12.5 Staining dan Destaining SDS-PAGE.....	31
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	32
<b>4.1 Kandungan Nitrogen dan Karbon Medium Buatan Kaldu</b>	
<b>Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras</b> .....	32
4.1.1 Kandungan Karbon Organik Total Medium Cair Kaldu	
Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras.....	33
4.1.2 Kandungan Nitrogen Total Kaldu Usus Ayam Potong	
dan Air Cucian Beras.....	34
4.1.3 Perbandingan Kandungan Karbon Organik dan	
Nitrogen Total Medium Cair.....	35
<b>4.2 Pertumbuhan <i>Bacillus sp.</i></b> .....	36
<b>4.3 Verifikasi Isolat <i>Bacillus sp.</i></b> .....	37
4.3.1 Pewarnaan Gram Bakteri.....	37
4.3.2 Uji KOH 4%.....	39
<b>4.4 Pertumbuhan Bakteri pada Medium Cair Kaldu Usus</b>	
<b>Ayam Potong dan Air Cucian Beras</b> .....	40
4.4.1 Perbandingan Volume Medium KB.....	41

4.4.2 Suhu Pertumbuhan Medium KB.....	43
<b>4.5 Karakter Enzim <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i>.....</b>	<b>44</b>
4.5.1 Kadar Protein Enzim <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i> .....	45
4.5.2 Aktivitas Enzim <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i> .....	45
4.5.3 Berat Molekul Enzim <i>Endo-β-1,4-D-Xilanase</i> .....	45
<b>BAB 5. PENUTUP</b>	
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Penutup.....</b>	<b>49</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>57</b>

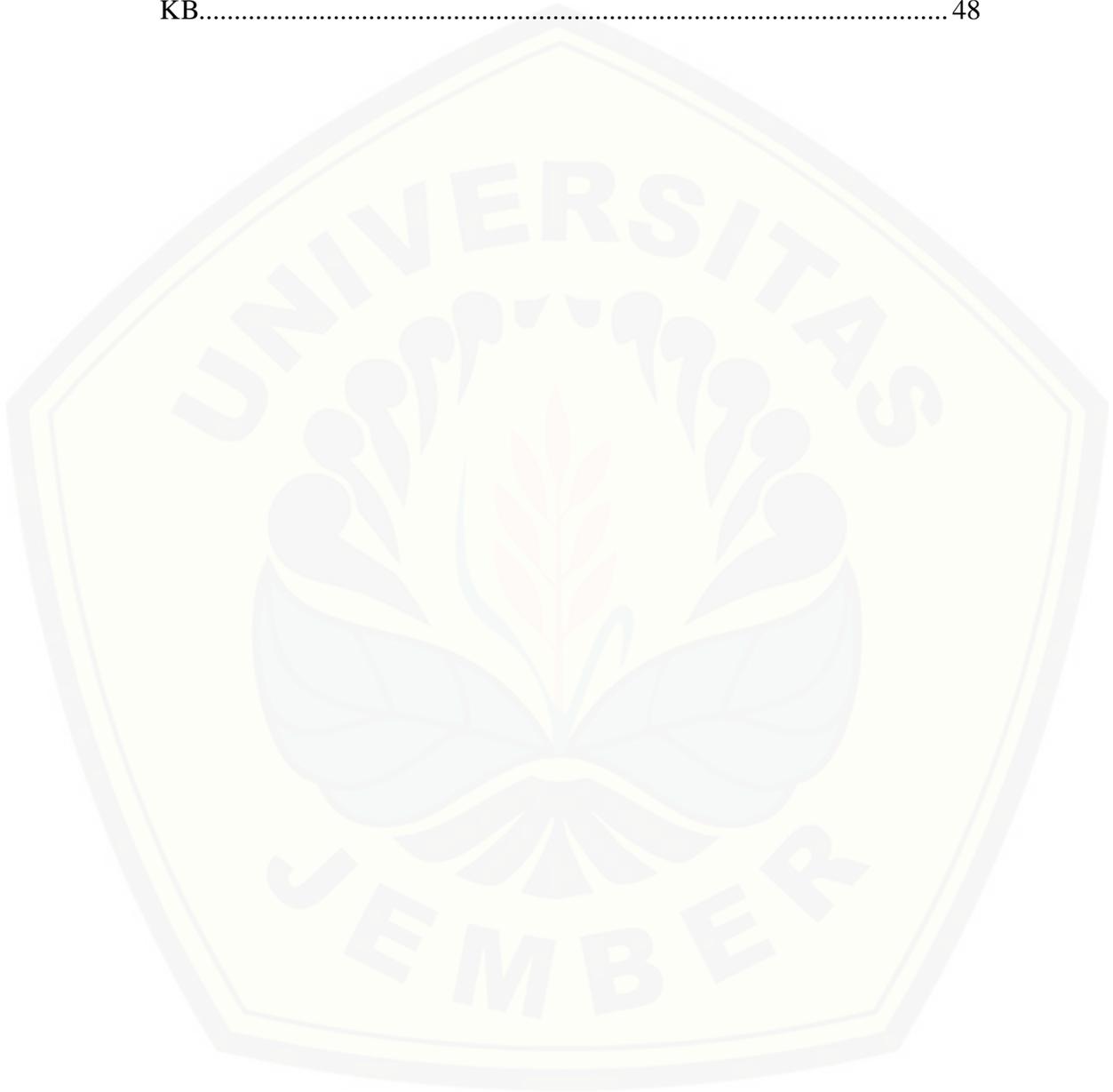
**DAFTAR TABEL**

2.1 Beberapa jenis <i>Bacillus sp</i> dan suhu optimum pertumbuhannya .....	6
2.2 Produksi daging ayam pedaging Provinsi Jawa Timur.....	9
4.1 Kandungan karbon organik total medium tumbuh <i>Bacillus sp</i> .....	33
4.2 Kandungan nitrogen total medium tumbuh <i>Bacillus sp</i> .....	35
4.3 Perbandingan karbon organik dan nitrogen total medium cair buatan (KB).....	35
4.4 Hasil identifikasi isolat <i>Bacillus sp</i> dengan KOH 4%.....	40
4.5 Kadar protein dan aktivitas enzim <i>endo-β-1,4-xilanase</i> .....	47

DAFTAR GAMBAR

2.1 Strain <i>Bacillus licheniformis</i> .....	6
2.2 Kurva pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.3 Vilus pada jejenum dan ileum.....	10
2.4 Gerakan gelombang cahaya elektromagnetik.....	13
2.5 Spektrum elektromagnetik.....	14
2.6 Struktur senyawa xilan dan hasil hidrolisis xilanase menjadi xilola dan xilobiosa.....	16
2.7 Pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan pada medium mengandung <i>inducer</i> xilan.....	17
3.1 Diagram alir penelitian.....	20
4.1 Hasil peremajaan isolat <i>Bacillus</i> sp pada medium LB padat dan medium LB cair.....	36
4.2 Sel bakteri gram positif, polimer peptidoglikan, dan struktur molekul monomer peptidoglikan.....	37
4.3 Hasil pewarnaan perbesaran 40 dan 400 kali mikroskop cahaya.....	38
4.4 Struktur melintang dinding sel bakteri gram negatif dan bakteri gram positif.....	39
4.5 Profil pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp pada variasi volume medium KB pada suhu 37 °C.....	42
4.6 Profil pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp pada medium KB (1:4) dan medium LB pada suhu 37 °C.....	42
4.7 Profil pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. pada medium KB (1:4) pada suhu 27 °C, 37 °C, dan 47 °C.....	43
4.8 Profil pertumbuhan isolat bakteri <i>Bacillus</i> sp. pada medium KB (1:4) dibandingkan dengan medium LB pada suhu 37 °C.....	44
4.9 Reaksi DNS dengan xilosa membentuk ANS.....	46

4.10 Hasil SDS-PAGE kaldu usus ayam potong, air cucian beras,  
medium KB (1:4), medium LB cair, marker protein, *crude enzyme*  
dari medium LB, *crude enzyme* dari medium  
KB.....48



**DAFTAR LAMPIRAN**

LAMPIRAN A. PEMBUATAN LARUTAN DAN REAGENT.....	57
A.1 Pembuatan Larutan KOH 4%.....	57
A.2 Pembuatan NaOH 0,1 N.....	57
A.3 Standarisasi NaOH 0,1 N.....	58
A.4 Pembuatan HCl 0,1 N dari larutan induk 12 N.....	58
A.5 Standarisai HCl 0,1 Normal.....	59
A.6 Pembuatan Asam Borat 4%.....	59
A.7 Pembuatan NaOH 40%.....	59
A.8 Pembuatan Larutan Kalium Dikromat 0,4 N.....	60
A.9 Pembuatan Larutan Besi Amonium Sulfat 0,2 N.....	60
A.10 Pembuatan Reagent DNS.....	61
LAMPIRAN B. KURVA REGRESI HASIL PENELITIAN.....	62
B.1 Kurva Standar BSA ( <i>bovine serum albumin</i> ) pada 595 nm.....	62
B.2 Kurva Standar Xilosa pada 550 nm.....	63
LAMPIRAN C. DATA DAN HASIL PENGAMATAN.....	64
C.1 Kadar Nitrogen Total Medium Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras dengan Metode Kjedahl.....	64
C.2 Kadar Karbon Organik Total Medium Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras dengan Metode <i>Walkley and Black</i> .....	67
C.3 Profil Pertumbuhan Optimum <i>Bacillus sp.</i> pada Variasi Volume Medium Kaldu Usus Ayam Potong dan Air Cucian Beras (KB).....	69
C.4 Pengukuran Pertumbuhan Optimum <i>Bacillus sp.</i> pada Variasi Suhu Inkubasi.....	76
C.4.1 Medium Kaldu Usus Ayam Potong dan Air	

Cucian Beras.....	76
C.4.2 Medium Luria Bertani.....	79
C.5 Penentuan Kadar Protein Enzim dengan Metode <i>Bradford</i> .....	82
C.5.1 Kadar Protein Enzim Xilanase Hasil Isolasi Medium KB (1:4).....	82
C.5.2 Kadar Protein Enzim Xilanase Hasil Isolasi Medium LB.....	82
C.6 Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik <i>Crude</i> <i>Enzym</i> Xilanase dengan Metode Miller.....	83
C.6.1 Aktivitas <i>Crude Enzym</i> Xilanase Hasil Isolasi dari Medium KB (1:4).....	83
C.6.2 Aktivitas <i>Crude Enzym</i> Xilanase Hasil Isolasi dari Medium LB.....	84

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Endo-β-1,4-xylanase* (EC. 3.2.1.8) merupakan enzim hidrolitik yang dapat memotong ikatan 1,4 pada rantai polisakarida xilan (Collins, *et al.*, 2005). Xilan merupakan senyawa hemiselulosa polimer dari xilosa dengan ikatan β-1,4 sebanyak 150 sampai 200 monomer (Irawadi *et al.*, 2007). Hasil hidrolisis xilan adalah xilooligosakarida, xilosa, dan arabinosa (Ratnadewi *et al.*, 2008). Enzim ini bermanfaat sebagai agen pra pemutihan kertas dan mengurangi penggunaan senyawa klorin pada industri kertas karena dapat menghilangkan senyawa hemiselulosa (Guimarães *et al.*, 2006; Polizeli *et al.*, 2005). *Endo-β-1,4-xilanase* juga mengubah xilosa pada roti menjadi arabinoxilooligosakarida yang bermanfaat bagi kesehatan (Polizeli *et al.*, 2005). Selain itu, Yang *et al.*, (2008), menyatakan pemberian *endo-β-1,4-xilanase* secara signifikan dapat menurunkan *feed intake* (FI) namun menambah berat badan ayam broiler.

Enzim *endo-β-1,4-xilanase* dapat ditemukan pada jamur (Bergquis *et al.*, 2004; Polizeli *et al.*, 2005) dan bakteri (Nakamura *et al.*, 1993). Salah satu bakteri yang menghasilkan xilanase adalah *Bacillus* sp.. Penelitian tentang xilanase dari *Bacillus* sp. telah banyak dilakukan, misalnya dari *Bacillus Strain* 41M-1 (Nakamura *et al.*, 1993), *Bacillus pumilus* RXAIII-5 (Richana *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* GN154 (Kuancha & Apiraksakorn, 2012), *Bacillus brevis* (Goswami *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis* XP10 (Tork *et al.*, 2013), *Bacillus pumulus* VLK-1 (Kumar *et al.*, 2013), serta xilanase dari *Bacillus aerophilus* KGJ2 (Gowdhaman *et al.*, 2014). Sehingga *Bacillus* sp. adalah bakteri yang potensial sebagai penghasil *endo-β-1,4-xilanase*.

*Bacillus* sp. termasuk bakteri gram positif, beberapa bersifat anaerob fakultatif. Bakteri ini ditemukan pada limbah batang tebu (Younis *et al.*, 2010),

ampas tebu, sekam padi, dan tongkol jagung (Irfan *et al.*, 2012), dan *Bacillus* sp. dari sistem abdomen rayap tanah (Efendi, 2007). *Bacillus* sp. juga termasuk dalam bakteri isotermik yang mampu hidup pada suhu lingkungan 30 sampai 60 °C (Warth, 1978). Jenis *Bacillus subtilis* memiliki suhu pertumbuhan optimum pada 30 sampai 37 °C (Korsten & Cook, 1996) dan *Bacillus pumilus* VLK-1 optimum pada suhu 30 °C (Kumar *et al.*, 2013). Abbasi *et al.*, (2013), melaporkan bahwa lama inkubasi *Bacillus* sp. adalah 24 jam pada suhu 37 °C. Jenis *Bacillus subtilis* memiliki pertumbuhan optimum pada jam ke 16 pada suhu 45 °C (Yuneta & Putra, 2010). Disamping pH dan suhu, kondisi pertumbuhan yang harus diperhatikan adalah medium tumbuh dari *Bacillus* sp..

Bakteri tumbuh apabila terdapat nutrisi dengan jumlah dan komposisi yang tepat sesuai kebutuhannya. Nutrisi yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri seperti *Bacillus* sp. terdiri atas mineral, air, sumber karbon, dan sumber nitrogen. Medium yang bisa digunakan adalah Medium Luria Bertani (LB). Meskipun medium ini tidak spesifik untuk *Bacillus* sp., namun memungkinkan pertumbuhan yang cepat dan baik bagi banyak spesies (Sezonov *et al.*, 2007). Medium ini dibuat dengan mencampurkan 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, 5 g NaCl, dan 1 liter akuades (Adams & Harbor, 2007; Sangeeta *et al.*, 2011). *Yeast extract* dan tripton berfungsi sebagai sumber nitrogen dan sumber karbon, sedangkan NaCl adalah sumber mineral sekaligus menjaga keseimbangan fisikokimia sel bakteri yang tumbuh (Hidayat & Sutarma, 1999).

Medium luria bertani relatif mahal sehingga tidak menguntungkan digunakan sebagai medium biakan pada skala produksi komersial. Hal ini dikarenakan harga bahan baku medium luria bertani yakni *trypton* dan *yeast extract* yang relatif mahal (Amresco, 2015; BioBasic, 2014). Maka dari itu diperlukan eksplorasi agar didapatkan medium yang murah dan mudah diperoleh. Medium yang dipilih harus berwujud cair karena mudah dalam proses penanganannya. Kemungkinan medium yang bisa digunakan adalah kaldu usus ayam potong dan air cucian beras (KB). Air cucian

beras berfungsi sebagai sumber karbon dan usus ayam potong (dalam bentuk kaldu) sebagai sumber nitrogen.

Pemanfaatan air cucian beras dan usus ayam potong dinilai belum maksimal. Ditinjau dari kandungan kimianya, air cucian beras mengandung vitamin, zat gizi, dan karbon (Kalsum, *et al.*, 2011). Kandungan karbon pada air cucian beras dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon dalam penumbuhan bakteri. Sedangkan usus ayam potong dipilih karena kaya akan protein (Dewi, *et al.*, 2013). Protein ini dapat menyumbangkan ketersediaan nitrogen dalam penumbuhan bakteri.

Penelitian ini dilakukan variasi volume campuran air cucian beras dengan kaldu usus ayam potong sebagai medium pertumbuhan *Bacillus* sp.. Berbagai variasi volume campuran tersebut diamati pertumbuhan *Bacillus* sp. dengan mengukur *optical density* (OD<sub>600</sub>). Sehingga diperoleh medium dengan pertumbuhan terbaik. Medium dengan pertumbuhan terbaik divariasi suhu pertumbuhannya untuk memperoleh suhu pertumbuhan terbaik. Hasil perbandingan volume dan suhu optimum digunakan sebagai medium produksi xilanase untuk selanjutnya dilakukan uji aktivitas, kadar protein, dan berat molekul enzim. Hasil penelitian dapat digunakan sebagai acuan dalam produksi xilanase skala industri. Sehingga dapat menurunkan biaya produksi xilanase skala komersial. Selain itu, meningkatkan pemanfaatan air cucian beras dan usus ayam potong.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana kandungan nitrogen dan karbon organik medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong?
- b. Apakah *Bacillus* sp. dapat ditumbuhkan pada medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong?
- c. Bagaimana perbandingan volume dan suhu medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong untuk pertumbuhan *Bacillus* sp. yang optimum?

- d. Bagaimana aktivitas, kadar protein, dan berat molekul *endo-β-1,4-xilanase* dari *Bacillus* sp. yang ditumbuhkan pada kondisi optimum tersebut?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain :

- a. Sampel beras diperoleh dari Koperasi Republik Indonesia (KPRI) Universitas Jember merk Dua Anak
- b. Usus ayam potong merupakan usus segar yang diperoleh dari Pasar Tanjung Kabupaten Jember.
- c. Isolat bakteri diperoleh dari simpanan *Bacillus* sp. di laboratorium *Centre for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini antara lain :

- a. Mengetahui kandungan nitrogen dan karbon organik medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong.
- b. Mengetahui pertumbuhan *Bacillus* sp. pada medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong.
- c. Mengetahui perbandingan volume dan suhu medium air cucian beras dan kaldu usus ayam potong untuk pertumbuhan *Bacillus* sp. yang optimum.
- d. Mengetahui aktivitas, kadar protein, dan berat molekul *endo-β-1,4-xilanase* dari *Bacillus* sp. yang ditumbuhkan pada kondisi optimum tersebut.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

- a. Memberikan informasi dalam pengembangan ilmu bioteknologi terutama dalam hal produksi xilanase skala komersial.
- b. Meningkatkan pemanfaatan kaldu air cucian beras dan usus ayam potong.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

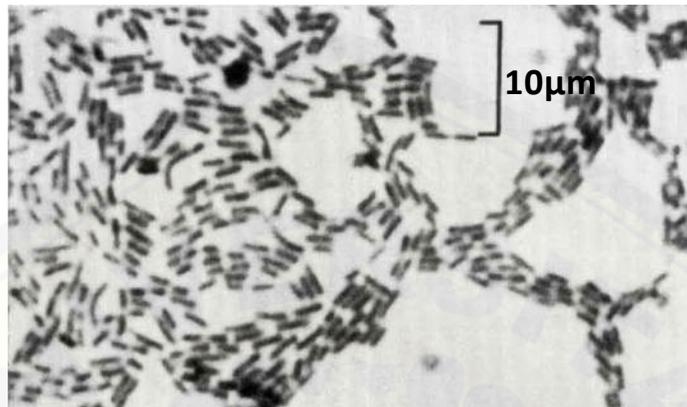
### 2.1 *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif dan beberapa spesies bersifat anaerob fakultatif (Hatmanti, 2000). Marga *Bacillus* sp. merupakan bakteri berbentuk batang dan dapat menghasilkan enzim penghidrolisis dan polisakarida kompleks. Bakteri ini juga memiliki banyak manfaat baik pada bidang kesehatan (sebagai antibiotik), industri, makanan, maupun bioteknologi. *Bacillus* sp. sangat potensial karena memiliki sifat tahan terhadap senyawa antiseptik dan memiliki kisaran pertumbuhan yang cukup luas (Hatmanti, 2000). Manfaat lain dari *Bacillus* sp. dalam bidang produksi enzim adalah penghasil enzim *endo-β-1,4-xilanase* (Richana, 2002; Richana, *et al.*, 2007). Enzim ini dapat menghidrolisis xilan atau hemiselulosa menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida.

Berdasarkan Shiddiqi (2011), klasifikasi *Bacillus* sp. sebagai berikut :

Divisi	: <i>Schizophyta</i>
Kelas	: <i>Schizomycetes</i>
Bangsa	: <i>Eubacteriales</i>
Suku	: <i>Bacillaceae</i>
Marga	: <i>Bacillus</i>
Jenis	: <i>Bacillus</i> sp.

Kemampuan *Bacillus* sp. yang dapat menghasilkan enzim dan hidup pada suhu tinggi ternyata dapat dimanfaatkan sebagai suplemen probiotik dalam pakan ternak, obat – obatan, dan suplemen diet manusia (Cutting, 2011). Selain itu, *Bacillus* sp. dapat menghasilkan enzim xilanase. Penelitian tentang xilanase dari *Bacillus* sp. telah dilakukan, misalnya dari *Bacillus Strain 41M-1* (Nakamura *et al.*, 1993), *Bacillus pumilus* RXAIII-5 (Richana *et al.*, 2007). Dan *Bacillus subtilis* GN154 (Kuancha & Apiraksakorn, 2012).



Gambar 2.1 Strain *Bacillus licheniformis* (Sumber: Bisset & Street, 1973).

*Bacillus* sp. dapat diperoleh dengan cara isolasi maupun pembiakan. Proses pembiakan dilakukan pada medium tumbuh dengan kondisi yang sesuai. Suhu pertumbuhan *Bacillus* sp. berkisar dari 30 sampai 60 °C tergantung dari jenisnya (Warth, 1978).

Tabel 2.1 Beberapa jenis *Bacillus* dan suhu optimum pertumbuhannya

Jenis <i>Bacillus</i>	Suhu Pertumbuhan Maksimum (°C)
<i>B. cereus</i> subsp. <i>Mycooides</i>	33
<i>B. cereus</i> T	39
<i>B. sphaericus</i>	38
<i>B. megaterium</i>	42
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Niger</i>	43
<i>B. subtilis</i> P	46
<i>B. subtilis</i> 168	46
<i>B. subtilis</i> B692	46
<i>B. licheniformis</i> B691	48
<i>B. licheniformis</i> DSM13	51
<i>B. brevis</i> B636	48
<i>B. licheniformis</i> 202	51

Sumber: (Warth, 1978).

Abbasi *et al.*, (2013), melaporkan bahwa lama inkubasi *Bacillus* sp. adalah 24 jam pada suhu 37 °C. Jenis *Bacillus subtilis* memiliki pertumbuhan optimum pada jam ke 16 pada suhu 45 °C (Yuneta & Putra, 2010). Selain faktor suhu dan lama inkubasi, bakteri juga perlu makanan sesuai dengan kebutuhannya. Sebagaimana bakteri pada umumnya, *Bacillus* sp. memerlukan sumber nitrogen, sumber karbon, mineral, dan air. Sediaan mineral dapat berupa:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  (Irfan *et al.*, 2012). Sebagai sumber nitrogen menggunakan *yeast extract* dan *trypton* seperti pada medium LB. Medium LB umum digunakan untuk pertumbuhan bakteri karena memungkinkan pertumbuhan yang cepat dan hasil pertumbuhan yang baik bagi banyak spesies (Sezonov *et al.*, 2007).

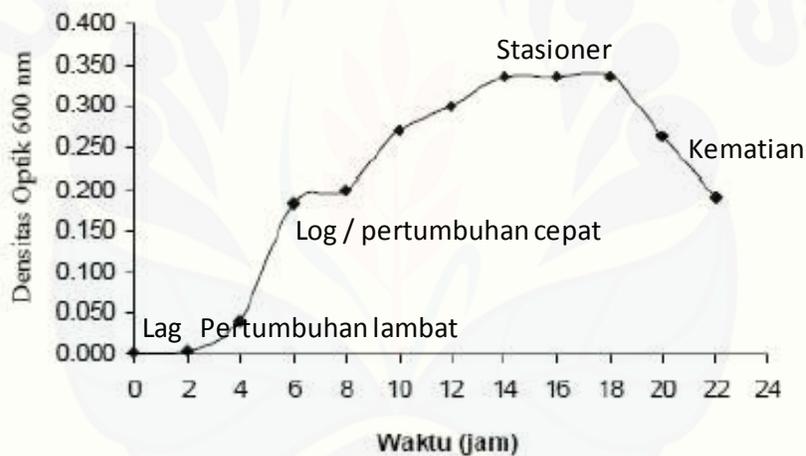
*Bacillus* sp. dalam penelitian ini diperoleh dari sistem abdomen rayap tanah yang telah diisolasi dan disimpan dalam stok gliserol (Efendi, 2007). Bakteri ini menghasilkan enzim ekstraseluler *endo-β-1,4-D-xilanase*. Masnia (2014), melaporkan pengujian enzim ini memiliki aktivitas spesifik 1,4 U/ml dengan proses fraksinasi 50% amonium sulfat. Enzim ini menghidrolisis xilan *oat* menghasilkan produk xilopentosa, xilotriosa, xilobiosa, dan xilotetraosa.

## 2.2 Pengukuran Pertumbuhan *Bacillus* sp.

Pertumbuhan bakteri dilakukan pada medium pertumbuhan dengan komposisi kimia yang sesuai. Pertumbuhan bakteri di laboratorium mikrobiologi pada umumnya menggunakan medium yang memiliki sumber nitrogen, sumber karbon, mineral, dan air. Medium yang umum digunakan adalah adalah Luria Bertani, karena memungkinkan pertumbuhan yang cepat dan hasil pertumbuhan yang baik bagi banyak spesies (Sezonov *et al.*, 2007). Medium ini dibuat dengan mencampurkan 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, 5 g  $\text{NaCl}$ , dan 1 liter akuades (Sangeeta *et al.*, 2011). *Yeast extract* dan tripton berfungsi sebagai sumber nitrogen dan sumber karbon, sedangkan  $\text{NaCl}$  adalah sumber mineral sekaligus menjaga keseimbangan fisikokimia sel bakteri yang tumbuh (Hidayat & Sutarma, 1999).

Tingkat pertumbuhan bakteri dapat diukur dengan mengetahui tingkat pertumbuhan sel. Sel yang tumbuh akan membuat cairan medium menjadi keruh dan pertumbuhan sel bakteri dilihat dari tingkat kekeruhannya atau *optical density* (OD). Sehingga pertumbuhan sel bakteri dapat diukur menggunakan alat spektrofotometer UV – Vis dengan panjang gelombang 600 sampai 700 nm (Darwis *et al.*, 2012). Hasil pengukuran tersebut akan diperoleh kurva pertumbuhan sel bakteri (absorbansi vs waktu) yang meliputi beberapa fase, antara lain: fase *lag*, eksponensial, stasioner, dan kematian (Monod, 1949).

Berikut ini kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* yang diukur pada panjang gelombang 600 nm dengan suhu inkubasi 45 °C:



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* (Yuneta & Putra, 2010)

Fase *lag* terjadi selama periode awal budidaya. Sel bakteri yang dimasukkan dalam medium tumbuh akan beradaptasi dengan lingkungan yang baru (Lin *et al.*, 2000). Setelah itu, bakteri akan tumbuh secara lambat karena bakteri indukan jumlahnya masih menghasilkan generasi yang sedikit. Fase berikutnya adalah fase log atau pertumbuhan cepat dimana jumlah anakan semakin. Sehingga proses metabolisme bakteri dikatakan maksimum pada fase ini (Kosim & Rosa, 2010). Fase berikutnya adalah fase stasioner dimana pada fase ini jumlah bakteri yang tumbuh hampir sama dengan jumlah bakteri yang mati, sebagai contoh pada *Bacillus subtilis*

mengalami fase stasioner pada jam ke 14 sampai 18 pertumbuhan pada suhu 45°C (Yuneta & Putra, 2010). Fase terakhir adalah kematian, disini jumlah nutrisi semakin berkurang serta adanya zat toksik hasil metabolisme mengakibatkan sel bakteri tidak dapat lagi tumbuh.

### 2.3 Ayam Potong (Broiler)

Ayam broiler merupakan jenis ayam pedaging yang memiliki pertumbuhan cukup cepat. Ayam broiler banyak dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia karena dagingnya yang empuk dan harga relatif murah dari pada ayam kampung. Selain itu, ayam ini dapat dipasarkan pada umur 5 sampai 6 minggu dengan berat badan 1,4 sampai 1,8 kg (Abun, 2007).

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik tahun 2014, produksi daging ayam pedaging mengalami peningkatan dari tahun 2007 sampai 2014. Berikut ini data produksi ayam pedaging (ton) dari tahun 2007 sampai 2014.

Tabel 2.2 Produksi daging ayam pedaging Provinsi Jawa Timur

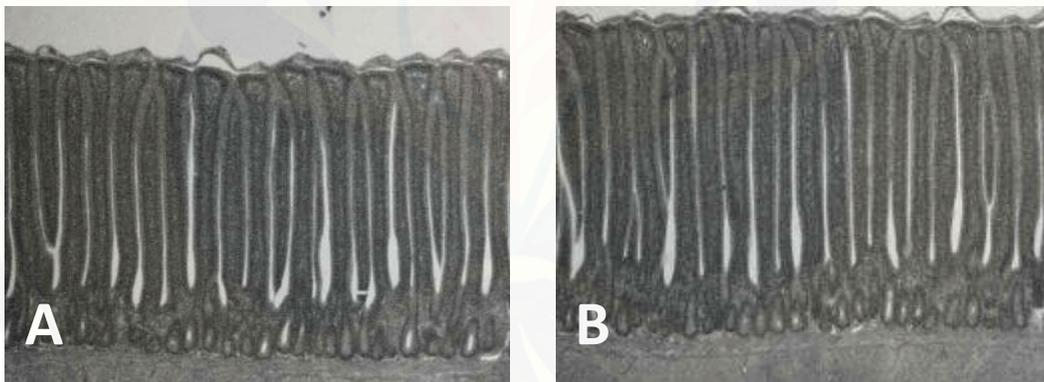
Tahun	Jumlah (ton)
2007	148855
2008	115193
2009	140110
2010	159671
2011	159822
2012	162845
2013	162892
2014	166149

Sumber : *Badan Pusat Statistik Republik Indonesia tahun 2014*

Peningkatan produksi daging ayam potong ini sebanding dengan meningkatnya limbah hasil penyembelihan. Ayam broiler umumnya dijual dalam bentuk daging ayam. Masyarakat cenderung memilih ayam broiler yang sudah dalam bentuk daging karena mudah dalam proses pengolahannya. Namun, proses penyembelihan ayam broiler di pasaran menghasilkan produk samping berupa limbah

cair dan padat. Limbah cair berupa darah ayam, air bekas cucian ayam, dan lemak. Sedangkan limbah padat berupa bulu ayam, kotoran ayam, dan usus (Erlita, 2011). Limbah seperti darah, air bekas cucian, lemak, bulu ayam, dan kotoran umumnya tidak dimanfaatkan lagi. Sedangkan bagian usus ayam biasanya dijual kembali ataupun sebagai pakan ternak.

Ditinjau dari segi morfologinya, terdapat beberapa bagian usus pada ayam broiler yakni *crop*, *proventriculus*, duodenum, jejunum, ileum, *caeca*, dan kloaka. Bagian yang mendominasi limbah usus ayam potong adalah duodenum, jejunum, dan ileum. Pada bagian jejunum dan ileum terdapat bagian yang mirip dengan sisir dan disebut sebagai villus. Celah kecil antara villus disebut dengan lumen dan dasar dari lumen disebut sebagai kript. Pada villus juga terdapat *brush-border membrane* (BBM) yang dapat berikatan dengan enzim seperti maltase dan sukrase (Yang *et al.*, 2008).



Gambar 2.3 a) Villus pada jejunum; b) Villus pada ileum (Sumber: Pelicano *et al.*, 2005)

#### 2.4 Air Cucian Beras

Masyarakat di Indonesia umumnya mengkonsumsi nasi sebagai makanan pokoknya. Nasi merupakan hasil olahan beras melalui proses pencucian dan perebusan. Proses pencucian ini menghasilkan limbah berupa air cucian beras. Limbah ini umumnya belum dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat.

Beberapa penelitian menggunakan air cucian beras telah dilakukan seperti menggunakan air cucian beras sebagai bioplastik (Agustri, 2012). Air cucian beras juga digunakan sebagai *Nata de Leri* (Hidayatullah, 2012). Selain itu, air cucian beras dapat digunakan sebagai pupuk pada budidaya jamur tiram putih (Kalsum, Fatimah, & Wasonowati, 2011).

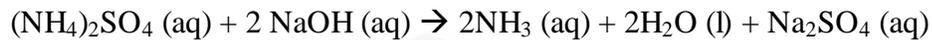
Ditinjau dari segi kandungan kimianya, air cucian beras mengandung senyawa karbohidrat dalam bentuk pati sebesar 85% (Bukhari, 2013). Selain itu, Air cucian beras juga mengandung vitamin B1, B12, serta unsur anorganik seperti nitrogen, kalium, dan fosfor (Kalsum *et al.*, 2011). Senyawa karbohidrat ini mengandung unsur karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Hal ini dikarenakan bakteri dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan yang mengandung senyawa organik (karbon dan nitrogen) (Agustiyani *et al.*, 2004). Sehingga, air cucian beras dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan bakteri.

## 2.5 Metode Kjeldahl

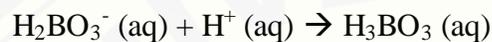
Bersarnya kadar nitrogen suatu sampel diukur menggunakan metode Kjeldahl. Usus ayam yang mengandung protein dipisahkan dari kandungan lemaknya dengan cara pemanasan. Kaldu usus didestruksi pada labu kjeldahl dengan ditambahkan  $H_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$ , serta  $CuSO_4$ . Asam sulfat berfungsi sebagai oksidator, natrium sulfat sebagai pemercepat reaksi agar tercapai titik didih, dan tembaga sulfat sebagai katalis. Setelah melalui proses destruksi, nitrogen pada kaldu usus ayam potong berubah menjadi amonium sulfat. Hal ini dikarenakan pada proses destruksi, nitrogen dalam usus dirubah menjadi amonia, karena adanya asam sulfat maka nitrogen ada dalam bentuk ion amonium, ion ini berikatan dengan ion sulfat membentuk amonium sulfat. Sedangkan untuk unsur organik dirubah menjadi gas  $CO_2$  dan  $H_2O$  (Egli, 2008).

Hasil destruksi didestilasi dengan penambahan natrium hidroksida (NaOH). Penambahan ini mengakibatkan suasana larutan menjadi basa dan ion amonium berubah menjadi gas amonia (Egli, 2008). Gas ini mengalir melalui tabung destilasi

dan ditangkap oleh labu penerima berisi larutan asam borat. Proses penerimaan ini berakibat pada berubahnya asam borat menjadi ion borat oleh kehadiran gas amonia.



Ion borat selanjutnya dititrasi dengan HCl sehingga merubah ion borat menjadi asam borat. Jumlah volume HCl ini dimasukkan dalam persamaan berikut ini untuk menentukan kadar nitrogen dalam usus ayam.



$$\% N = \frac{\text{mL HCl (sampel - blanko)} \times B}{\text{berat sampel (g)} \times 1000}$$

$$\text{dimana } B = \text{normalitas HCl} \times 14,008 \text{ (g/mol)} \times 100\%$$

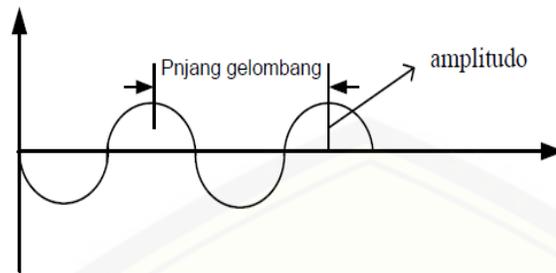
Dari persen kadar nitrogen ini dapat diketahui kadar proteinnya menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Kadar Protein} = \% N \times \text{Faktor konversi N}$$

## 2.6 Spektrofotometri

Spektroskopi merupakan ilmu yang mempelajari interaksi antara energi dengan materi. Teknik pengukuran besarnya interaksi ini disebut dengan spektrometri. Sedangkan spektrofotometri berarti ilmu yang mempelajari teknik pengukuran interaksi antara energi dengan materi. Instrumen yang digunakan untuk mengukur besarnya interaksi ini disebut dengan spektrometer (Triyati, 1985).

Suatu atom atau molekul dapat mengalami transisi ketinggian energi tertentu akibat adanya foton. Foton disini merupakan energi cahaya dan dapat dipertimbangkan sebagai bentuk cahaya elektromagnetik sebagai transfer gelombang. Bentuk sederhana dari cahaya elektromagnetik dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 2.4 Gerakan gelombang cahaya elektromagnetik (Sumber: Asnawati & Siswoyo, 2007)

Jarak antara kedua puncak yang saling berdekatan disebut dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ). Banyaknya gelombang yang melewati suatu materi persatuan waktu disebut dengan frekuensi ( $\nu$ ). Hubungan antara besarnya energi foton dengan panjang gelombang adalah berbanding terbalik. Sedangkan jarak yang ditempuh suatu foton selama satu periode sama dengan kecepatan cahaya dikalikan dengan waktu per detik:

$$\lambda = c/\nu \quad E = h.\nu \quad E = \frac{h.c}{\lambda}$$

dimana,

$c$  : kecepatan cahaya ( $3 \times 10^{10}$  cm/detik)

$\nu$  : frekuensi (detik<sup>-1</sup> atau herzt "Hz")

$\lambda$  : panjang gelombang (cm)

$h$  : tetapan Planck ( $6,624 \times 10^{-27}$  erg detik) "erg = energi cahaya"

Cahaya elektromagnetik memiliki panjang gelombang yang bervariasi dari beberapa Å (sinar  $\gamma$ , sinar x) hingga milimeter (gelombang mikro, radio). Berikut ini unit yang digunakan untuk menyatakan panjang gelombang.

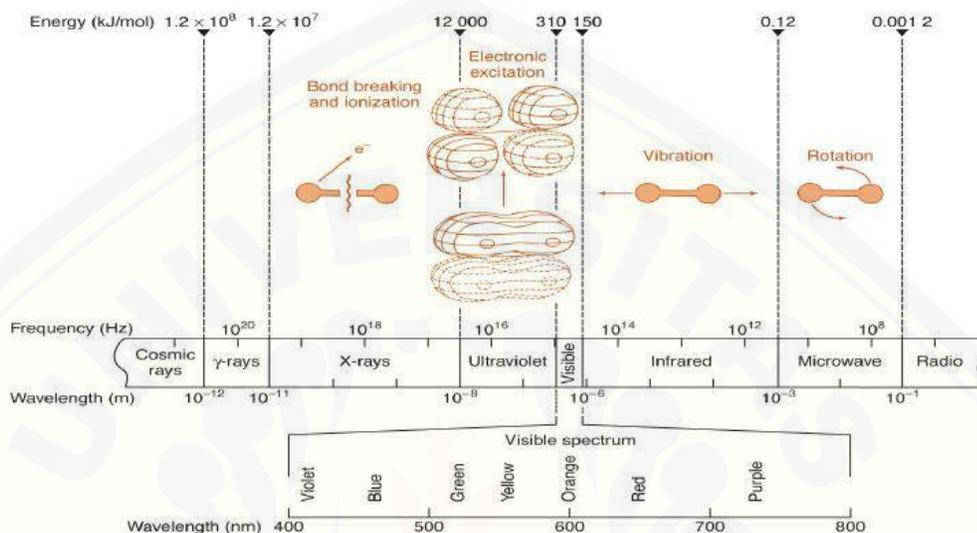
$$\text{Å} = \text{Angstrom} = 10^{-10} \text{ meter} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-4} \text{ mikrometer}$$

$$\text{nm} = \text{nanometer} = 10^{-9} \text{ meter} = 10 \text{ angstrom} = 10^{-3} \text{ mikrometer}$$

$$\mu\text{m} = \text{mikrometer} = 10^{-6} \text{ meter} = 10^4 \text{ angstrom}$$

Satuan nanometer (nm) dan angstrom digunakan dalam radiasi sinar ultra violet (UV) dan cahaya tampak (Visible). Sedangkan satuan mikrometer digunakan untuk daerah infra

merah (IR) (Kristianingrum, 2014). Berikut ini ditampilkan keseluruhan spektrum elektromagnetik:



Gambar 2.5 Spektrum elektromagnetik (Sumber: Kristianingrum, 2014)

Informasi mengenai sampel kimia dapat diketahui melalui interaksi radiasi elektromagnetik. Interaksi ini dapat berupa absorpsi, transmisi, refleksi, dan difraksi. Interaksi absorpsi dimana cahaya elektromagnetik akan terserap oleh sampel kimia yang artinya sampel tersebut dipromosikan dari tingkat energi rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi (tereksitasi). Cahaya yang tidak terabsorpsi akan diteruskan (ditransmisikan), besarnya cahaya transmisi ini dinyatakan dalam (%T) (Asnawati & Siswoyo, 2007).

Besarnya cahaya elektromagnetik yang terabsorpsi sangat sulit ditentukan secara langsung. Oleh karena itu, dihitung besarnya intensitas cahaya masuk dan cahaya yang ditransmisikan. Berkas cahaya yang dilewatkan pada sel transparan berisi larutan sampel, beberapa cahaya akan dipantulkan (refleksi) atau dihamburkan (difraksi). Hubungan antara intensitas sinar masuk ( $I_0$ ), intensitas sinar dipantulkan ( $I_r$ ), intensitas sinar diserap ( $I_a$ ), dan intensitas sinar diteruskan ( $I_t$ ) dapat dituliskan sebagai berikut:

$$I_o = I_r + I_a + I_t.$$

Sedangkan hubungan konsentrasi sampel kimia (c) dengan besarnya penyerapan dinyatakan dengan:

$$A = abc$$

$$A = -\log T$$

$$\%T = \frac{I_o}{I_t} \times 100\%$$

dimana :

$I_o$  = intensitas yang masuk sampel

$I_t$  = intensitas yang ditransmisikan

$I_a$  = intensitas yang diabsorpsi

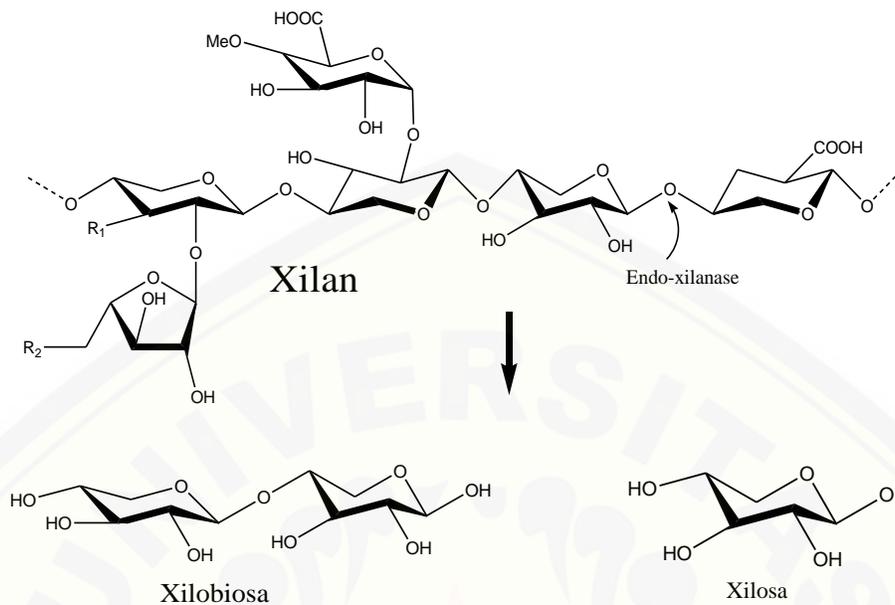
$a$  = tetapan absorpsi

$b$  = jarak tempuh optik

$c$  = konsentrasi spesies terlarut

### 2.7 Enzim *Endo-β-1,4-Xilanase* dan Prospeknya

*Endo-1,4-β-xylanase* (EC. 3.2.1.8) merupakan enzim hidrolitik yang dapat memotong ikatan 1,4 pada rantai xilan (Collins, *et al.*, 2005). Xilan merupakan senyawa hemiselulosa polimer xilosa dengan ikatan  $\beta$ -1,4 dengan jumlah monomer sebanyak 150 sampai 200 unit (Irawadi *et al.*, 2007). *Endo-β-1,4-xilanase* menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida, xilosa, dan arabinosa (Abdullah *et al.*, 2008). *Endo-β-1,4-xilanase* termasuk enzim ekstraseluler yang artinya berada di luar sel. Sehingga, proses isolasinya cukup mudah dari pada enzim intrasel.

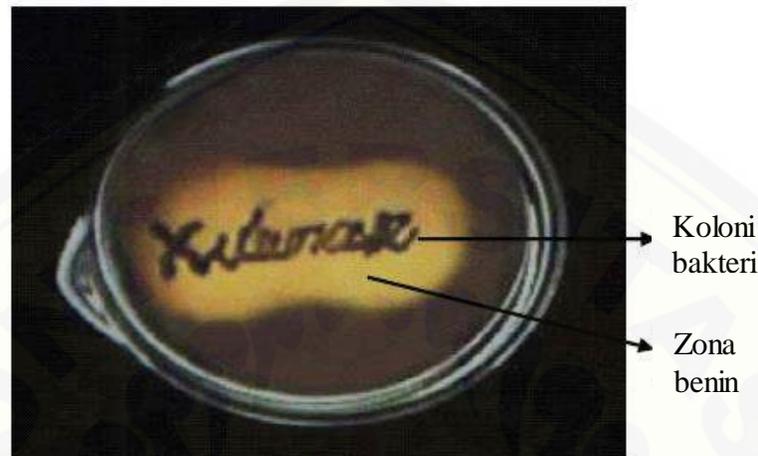


Gambar 2.6 Struktur senyawa xilan dan hasil hidrolisis xilanase menjadi xilosa dan xilobiosa (Sumber: Polizeli *et al.*, 2005).

Enzim *endo-β-1,4-xilanase* dapat ditemukan pada jamur (Bergquis *et al.*, 2004; Polizeli *et al.*, 2005) dan bakteri (Nakamura *et al.*, 1993). Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan xilanase adalah *Bacillus* sp. yang termasuk dalam bakteri gram positif, beberapa bersifat anaerob fakultatif. Bakteri ini ditemukan pada limbah batang tebu (Younis *et al.*, 2010), ampas tebu, sekam padi, dan tongkol jagung (Irfan *et al.*, 2012), dan *Bacillus* sp. dari sistem abdomen rayap tanah (Efendi, 2007). Penelitian mengenai isolasi xilanase dari *Bacillus* sp. juga telah banyak dilakukan, misalnya; jenis *Bacillus Strain* 41M-1 (Nakamura *et al.*, 1993), *Bacillus pumilus* RXAIII-5 (Richana *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* GN154 (Kuancha & Apiraksakorn, 2012), *Bacillus brevis* (Goswami *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis* XP10 (Tork *et al.*, 2013), *Bacillus pumulus* VLK-1 (Kumar *et al.*, 2013), serta xilanase dari *Bacillus aerophilus* KGJ2 (Gowdhaman *et al.*, 2014). Sehingga *Bacillus* sp. adalah bakteri yang potensial sebagai penghasil xilanase.

*Bacillus* sp. penghasil xilanase dapat ditumbuhkan pada medium yang mengandung 10 g tripton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, dalam 1 liter akuades

(Sangeeta *et al.*, 2011). Proses penumbuhan *Bacillus* sp. secara fisik akan menunjukkan adanya koloni bakteri yang dikelilingi dengan zona bening seperti gambar berikut ini:



Gambar 2.7 Pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan pada medium mengandung *inducer* xian (Sumber: Richana, 2002)

*Endo- $\beta$ -1,4-xilanase* memiliki banyak manfaat dalam kehidupan baik pada bidang industri, makanan, dan peternakan. Xilanase digunakan sebagai bahan pemutih kertas untuk meminimalkan penggunaan senyawa klorin (Thakur *et al.*, 2012). Bidang pangan, xilanase dapat digunakan untuk memperbaiki kualitas roti karena kemampuannya dalam menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida (Richana, 2002). Sedangkan pada bidang peternakan, xilanase dimanfaatkan sebagai suplemen pada pakan ternak dan dapat meningkatkan berat badan ayam broiler serta meningkatkan kandungan nutrisi pada daging ayam (Yang *et al.*, 2008). Kebutuhan xilanase dimasa mendatang akan terus meningkat. Sehingga diperlukan medium produksi xilanase skala besar dengan bahan baku yang murah dan mudah diperoleh.

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember, dan Laboratorium *Centre for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2015 sampai selesai.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas peralatan gelas, non gelas, dan alat instrumen.

Peralatan gelas mencakup; kawat *ose*, cawan petri, erlenmeyer 50 mL, erlenmeyer 100 mL, *beaker glass* 100 mL, gelas ukur 50 ml, Gelas ukur 25 mL, gelas ukur 100 mL, pipet *mhor* 10 mL, termometer, wadah gelas, tabung sentrifugasi, tabung rekasi, labu ukur 50 mL, labu ukur 25 mL, labu ukur 100 mL, labu kjeldahl, satu set alat kjeldahl, buret, anak stirer, dan pipet tetes.

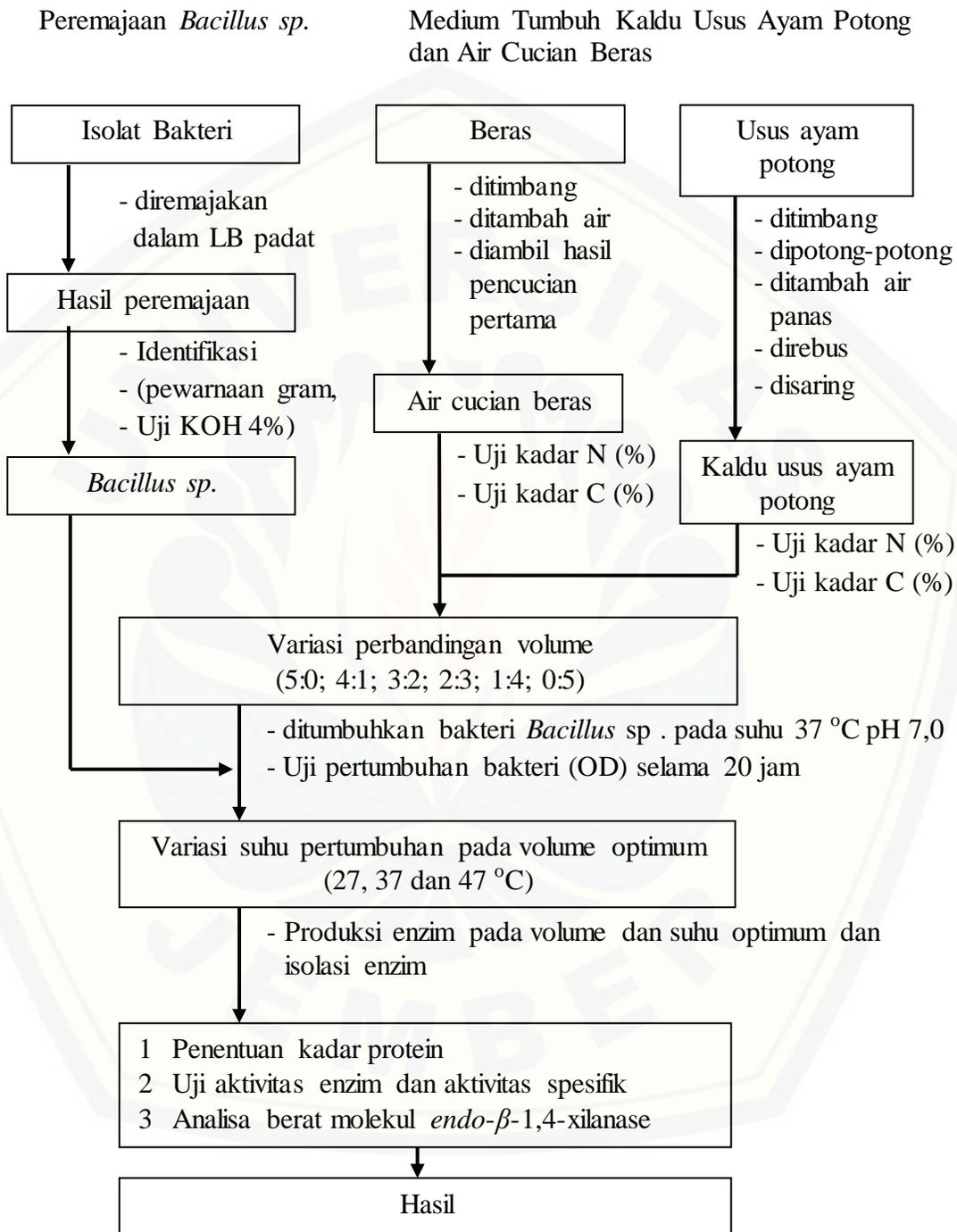
Peralatan non gelas mencakup; pipet mikro 200 – 1000  $\mu$ l, pipet mikro 10 – 100  $\mu$ l, wadah plastik, kain kasa, botol semprot, spatula, rak tabung reaksi, *ball* pipet, aluminium foil, sarung tangan, masker, penyaring, kertas saring, dan *mikrotube*.

Peralatan instrumen mencakup; penangas, stirer magnetik, neraca analitik, laminar *flow*, spektrofotometer UV-Vis beserta kuvetnya, seperangkat alat elektroforesis SDS – PAGE, seperangkat alat Kjeldahl, *shaker incubator*, lemari es, *hot plate*, *blender*, dan *autoclave*.

### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: bakteri *bacillus sp.* hasil isolasi dari sistem abdomen rayap tanah (CDAST Universitas Jember), usus ayam potong, air cucian beras, *yeast extract* (Bacto, Prancis), NaCl, *trypton* (Oxoid, Inggris), agar (Bacto), H<sub>2</sub>O, Etanol 97%, kristal violet, karbol fuhsin, xilan, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Merck), CuSO<sub>4</sub> (Merck), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), NaOH 40% (Merck), indikator metil merah dan metil biru, asam borat, HCl 0,1 N, KOH 4% (Riedel de Hein), substrat *oat-spelt xylan* 0,5%, reagen DNS (Na-K tartrat, NaOH, DNS, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), aquabides, akrilamida mix 30%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 2,5 mL, dan SDS 10%, ammonium persulfat 10%, TEMED, buffer sampel (2 mL SDS 10%, 5 mL gliserol 50%, 0,5 mL β-merkptoetanol, 1 mL BPB 1%, dan 0,9 mL H<sub>2</sub>O dicampur dalam 0,6 mL Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8), *buffer running* (25 mM Tris, 250 mM glisin, 0,1% SDS, H<sub>2</sub>O), larutan *staining* (1 g CBB R250, 450 mL CH<sub>3</sub>OH, 100 mL CH<sub>3</sub>COOH, akuades), larutan *destaining* (100 mL CH<sub>3</sub>OH, 100 mL CH<sub>3</sub>COOH, akuades), kapas, dan kasa steril.

3.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

### 3.4 Persiapan Medium

#### 3.4.1 Pembuatan Medium Luria Bertani padat

Sebanyak 0,5 gram *yeast extract* (Bacto, Prancis), 1 gram NaCl (merck), 1 gram *trypton* (Oxoid, Inggris) dan 1 gram agar (Bacto) dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan 100 ml akuades (Sangeeta, *et al.*, 2011). Erlenmeyer ditutup dengan kasa steril yang telah diisi kapas. Medium disterilkan dengan *autoclave* selama 30 menit. Setelah proses sterilisasi, medium dikeluarkan dan dibiarkan hingga suhu sekitar 40 °C (hangat). Selanjutnya proses penuangan pada cawan petri steril yang dilakukan dalam *laminar air flow*. Medium ditunggu hingga memadat dan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.4.2 Pembuatan Medium Luria Bertani Cair

Sebanyak 0,25 gram *yeast extract* (Bacto, Prancis), 0,5 gram NaCl (merck), dan 0,5 gram *trypton* (Oxoid, Inggris) dimasukkan dalam erlenmeyer 100 ml dan ditambahkan 50 ml akuades. Medium LB untuk produksi ditambahkan dengan xilan sebagai *inducer*. Erlenmeyer ditutup dengan kasa steril yang telah diisi kapas. Campuran disterilkan dengan dipanaskan pada *autoclave* selama 30 menit. Campuran dikeluarkan dan dibiarkan hingga suhu ruang untuk selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.4.3 Pembuatan Medium Air Cucian Beras

Beras kering sebanyak 4 kg dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1 : 1 (b/b). Beras diaduk selama 5 menit dan disaring menggunakan saringan teh. Air hasil penyaringan ditepatkan massanya hingga 4 kg (b/b) dan disimpan dalam botol stok. Campuran diatur pHnya hingga 7,0 menggunakan NaOH 0,05 N. Air cucian beras kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 30 menit. Larutan steril hasil *autoclave* dibiarkan dingin untuk disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.4.4 Pembuatan Medium Kaldu Usus Ayam Potong

Sebanyak 4 kg (berat basah) usus ayam potong yang sudah dicuci dan dipotong-potong ( $\pm 1$  cm) direndam dalam air panas selama 15 menit. Proses lainnya disiapkan panci berisi akuades dan dipanaskan dengan mengatur suhu air dalam panci pada (85-90 °C). Selanjutnya usus hasil perendaman diambil dengan penyaring dan dimasukkan dalam panci berisi air panas dengan perbandingan (1:2) b/b. Dipanaskan selama dua jam pada suhu (85-90 °C). Hasil pemanasan didiamkan sampai hangat dan dipisahkan fraksi air (kaldu) dengan corong pisah. Kaldu diambil secara hati – hati dan ditempatkan dalam botol sampel. Dilakukan pengaturan pH larutan menggunakan NaOH 0,05 N sampai pH 7,0. Kaldu usus ayam potong kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 30 menit. Kaldu steril hasil *autoclave* dibiarkan dingin untuk disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.5 Persiapan Reagen

#### 3.5.1 Pembuatan Reagen Bradford (Bollag *et al.*, 1996)

##### a. Larutan stok bradford

Sebanyak 350 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) dilarutkan dalam campuran (100 ml etanol 95% dan 200 ml asam fosfat 85%). Larutan dinamai sebagai stok bradford dan disimpan pada suhu ruang.

##### b. Larutan *working* bradford

Sebanyak 15 ml larutan stok bradford dimasukkan dalam labu ukur 250 ml dan ditambahkan dengan 15 ml asam fosfat 85% serta 7,5 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan disaring dengan kertas *whatman* untuk selanjutnya disimpan dalam botol gelap pada suhu ruang.

#### 3.5.2 Pembuatan Reagen Miller (Miller, 1959)

Sebanyak 60 ml akuades dimasukkan dalam beker gelas 250 ml yang sudah ditutup dengan aluminum foil. Selanjutnya, dimasukkan dalam beker gelas 1 gram

NaOH dan diaduk menggunakan stirer magnetik dan anak stirernya. Kemudian dilarutkan 18,2 gram K-Na-tartrat hingga melarut sempurna. Setelah melarut, ditambahkan 1 gram *dinitro salisilic acid* (DNS) sedikit demi sedikit. Dilanjutkan dengan penambahan 0,05 gram natrium sulfat, 0,2 gram fenol, dan ditambahkan akuades hingga 100 ml.

### 3.6 Peremajaan Bakteri Penssekresi *Endo-β-1,4-xilanase*

Isolat bakteri diremajakan dalam medium LB padat steril dengan diambil menggunakan jarum ose. Isolat yang telah ditanam pada medium, dikembangkan pada suhu 37 °C selama 16 jam pada oven khusus organisme.

### 3.7 Identifikasi *Bacillus sp.*

#### 3.7.1 Mengamati Keseragaman Bakteri

Isolat hasil peremajaan diperiksa keseragamannya dengan dilihat menggunakan mata telanjang. Koloni bakteri yang memiliki keseragaman, kemungkinan besar merupakan satu koloni bakteri dengan jenis yang sama.

#### 3.7.2 Uji Kekentalan (KOH 4%)

Sebanyak 1 gram KOH dilarutkan dalam 25 ml akuades. Larutan ditempatkan diatas kaca preparat steril sebanyak 2 sampai 3 tetes. Selanjutnya sebanyak 1 ose isolat bakteri dilarutkan dalam larutan KOH 4% dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah 10 menit, larutan uji diperiksa kekentalannya dengan jarum ose steril.

#### 3.7.3 Uji Gram Bakteri

Sebanyak 5 ml akuades dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup menggunakan kasa steril. Selanjutnya sebanyak 1 ose isolat bakteri dimasukkan dalam akuades dan dikocok menggunakan *vortex* hingga homogen (dilakukan dalam *laminar air flow*). Larutan kemudian diambil sebanyak 1 sampai 2 tetes pada kaca preparat steril dan dipanaskan diatas api bunsen. Hasil pemanasan ditetesi dengan larutan kristal violet sebanyak dua tetes dan didiamkan selama satu menit. Tepat satu

menit segera dicuci dengan akuades mengalir untuk selanjutnya ditetesi kembali dengan larutan iodin dan didiamkan selama satu menit. Proses pembilasan dilakukan kembali dan ditetesi dengan alkohol 95% didiamkan kurang dari 30 detik. Terakhir, ditetesi dengan kristal violet kembali dan dibilas dengan akuades untuk diamati dibawah mikroskop cahaya.

### **3.8 Penentuan Kandungan Nitrogen dan Karbon Medium Kaldu Usus Ayam dan Air Cucian Beras**

#### **3.8.1 Penentuan Kandungan Nitrogen Total Metode Kjeldahl (Egli, 2008)**

Pengukuran kadar nitrogen total ditentukan menggunakan metode Kjeldahl. Metode Kjeldahl ini digunakan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung, karena yang dianalisis dengan cara ini adalah kadar nitrogennya bukan kadar proteinnya. Sampel didestruksi pada labu kjeldahl dengan ditambahkan  $H_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$ , serta  $CuSO_4$ . Setelah melalui proses destruksi, nitrogen pada kaldu usus ayam potong berubah menjadi amonium sulfat. Hal ini dikarenakan pada proses destruksi, nitrogen dalam usus dirubah menjadi amonia, karena adanya asam sulfat maka nitrogen ada dalam bentuk ion amonium, ion ini berikatan dengan ion sulfat membentuk amonium sulfat. Sedangkan untuk unsur organik dirubah menjadi gas  $CO_2$  dan  $H_2O$  (Egli, 2008).

Hasil destruksi didestilasi dengan penambahan natrium hidroksida (NaOH). Penambahan ini mengakibatkan suasana larutan menjadi basa dan ion amonium berubah menjadi gas amonia (Egli, 2008). Destilat yang diperoleh kemudian ditampung dalam larutan asam borat. Selanjutnya ion-ion borat yang terbentuk dititrasi dengan menggunakan larutan HCl. Volume HCl yang dibutuhkan saat proses titrasi digunakan untuk mengetahui kandungan nitrogen total dalam sampel.

#### **a. Destruksi**

Sampel sebanyak 0,3 gram dimasukkan dalam labu destruksi dan ditambakan dengan 5 ml asam sulfat pekat. Campuran ditambah dengan katalisator berupa

campuran  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1,78 gram dan  $\text{CuSO}_4$  0,22 gram. Destruksi dilakukan sampai cairan berwarna hijau jernih ( $\pm 2$  jam), setelah proses destruksi selesai, sampel didiamkan sampai suhu kamar.

b. Destilasi

Destilasi dilakukan pada sampel hasil destruksi. Hasil destruksi dilarutkan dalam akuades sebanyak 30 mL dan ditambahkan NaOH 40% hingga terbentuk warna coklat (basa). Sampel didestruksi dengan penangas listrik selama 1 jam dan hasil destruksi ditangkap oleh larutan asam borat 4%.

Sebanyak 20 gram asam borat dimasukkan dalam labu ukur 250 ml dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Erlenmeyer 100 ml dan diisi 10 ml asam borat 4% dengan ditetesi indikator *brome cresole green – metil red* (BCG-MR) sebanyak tiga tetes. Sampel yang ditangkap oleh asam borat selanjutnya siap untuk dititrasi menggunakan HCl 0,1 N.

c. Titrasi

Larutan asam borat dititrasi dengan HCl 0,1 N dimana HCl berperan sebagai titran dan asam borat sebagai titrat. Dicatat volume titrasi dengan melihat perubahan warna asam borat yang semula biru menjadi orange. Besarnya kandungan nitrogen total dihitung menggunakan rumus:

$$\% N = \frac{(V_{\text{titrasi sampel}} - V_{\text{titrasi blanko}}) \times N \text{ HCl} \times 14,008 \text{ (g/mol)} \times 100\%}{\text{masa sampel (g)} \times 1000 \text{ (ml/L)}}$$

dimana,

N HCl : 0,097 N

massa sampel : 0,3 gram

$V_{\text{titrasi sampel}}$  : Volume HCl yang digunakan untuk titrasi sampel

$V_{\text{titrasi blanko}}$  : Volume HCl yang digunakan untuk titrasi blanko

### 3.8.2 Penentuan Kandungan Karbon Organik Total Metode *Walkley and Black* (Gelman *et al.*, 2011)

Sebanyak 0,5 gram sampel ditempatkan dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan 5 ml kalium dikromat. Selanjutnya ditambahkan dengan 10 ml asam sulfat pekat dan dibiarkan hingga campuran menjadi dingin (suhu ruang). campuran dingin selanjutnya ditambahkan akuades 100 ml dan ditetesi indikator feroin untuk selanjutnya dititrasi dengan besi amonium sulfat 0,2 N. Perhitungan besarnya karbon organik total pada sampel dihitung menggunakan rumus:

$$C \text{ organik (\%)} = \frac{(B - S) \times 0,0006}{m} \times 100$$

dimana,

B : Volume titrasi blanko

S : Volume titrasi sampel

m : Massa sampel (gram)

### 3.9 Pengukuran Pertumbuhan Bakteri

Tingkat pertumbuhan bakteri dapat diukur dengan mengetahui tingkat pertumbuhan sel. Sel yang tumbuh akan membuat cairan medium menjadi keruh dan pertumbuhan sel bakteri dilihat dari tingkat kekeruhannya atau *optical density* (OD). Pertumbuhan sel bakteri dapat diukur menggunakan alat spektrofotometer UV – Vis dengan panjang gelombang 600 nanometer (Darwis *et al.*, 2012). Pengukuran OD ini dilakukan sesaat setelah pemberian bakteri dengan rentang waktu 2 jam dan kontrol medium tanpa pemberian bakteri. Hasil pengukuran tersebut akan diperoleh kurva pertumbuhan sel bakteri (absorbansi *vs* waktu) yang meliputi beberapa fase, antara lain: fase *lag*, eksponensial, stasioner, dan kematian (Monod, 1949).

Sampel sebanyak 1 ml (1000  $\mu$ l) diambil dengan mikro pipet dan ditempatkan pada kuvet. Spektrofotometer UV-Vis diatur panjang gelombangnya sebesar 600 nm.

Sampel diambil sebanyak tiga kali dan ditentukan nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Matlock et al., 2011).

### 3.10 Penentuan Kadar Protein *Endo-β-1,4-xilanase*

Penentuan kadar protein menggunakan metode Bradford. Prinsip dasar metode ini adalah pengikatan zat warna *Commasie Brilliant Blue* (CBB) oleh molekul protein. Campuran ini diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm.

#### 3.10.1 Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Bollag et al., 1996)

Larutan BSA disiapkan dengan konsentrasi berbeda (2,5 – 20 µg dengan rentang 2,5 µg) dari larutan induk BSA 1 mg/ml . Sebanyak 100 µl dari masing – masing konsentrasi ditambahkan dengan 1000 µl reagen *working* Bradford dalam *mikro tube* ukuran 2 ml lalu dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 2 menit dan diukur dengan spektrofotometer *Ultra Violet-Visible* (UV-Vis)  $\lambda=595$  nm untuk dibuat grafik *linier* antara konsentrasi BSA (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y).

#### 3.10.2 Penentuan Kadar Protein *Endo-β-1,4-xilanase*

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford (Bollag et al., 1996). Sebanyak 10 µl sampel enzim ducampurkan dengan 1000 µl reagen *working* Bradford dan dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 2 menit untuk selanjutnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda=595$  nm.

Kadar protein dihitung menggunakan persamaan *linier* ( $y = mx + C$ ) yang diperoleh dari larutan standar BSA. Sumbu x merupakan konsentrasi (kadar protein) dan y adalah absorbansi sampel.

$$\text{Kadar Protein} = \frac{\text{Abs} \pm C \times fp}{m}$$

Keterangan:

- Abs : nilai Absorbansi pada  $\lambda_{595}$  nm  
C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA  
fp : faktor pengenceran  
m : nilai kemiringan (*gradient*) dari persamaan kurva standar

### 3.11 Penentuan Aktivitas *Endo- $\beta$ -1,4-xilanase*

#### 3.11.1 Kurva Standar Xilosa

Larutan standar xilosa disiapkan dengan konsentrasi yang berbeda (0,08 – 0,48 mg/ml dengan rentang 0,04 mg/ml) dari larutan induk xilosa (2 mg/ml). Sebanyak 250  $\mu$ l sampel xilosa ditambah dengan reagen DNS 750  $\mu$ l. Campuran difortex dan dipanaskan selama 15 menit pada air mendidih dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer  $\lambda=550$  nm.

#### 3.11.2 Pengujian Aktivitas *Endo- $\beta$ -1,4-xilanase*

Aktivitas *endo- $\beta$ -1,4-xilanase* ditentukan dengan mengukur gula pereduksi yang terbentuk menggunakan metode Miller (Miller, 1959). Sampel enzim (aktif dan nonaktif) sebanyak 125  $\mu$ l ditambahkan dengan substrat *xilan oat* 0,8% 125  $\mu$ l dan dinkubasi pada *waterbath* selama 60 menit pada suhu 40°C. Selanjtnya, campuran ditambahkan reagen DNS 750  $\mu$ l. Campuran difortex dan dipanaskan selama 15 menit pada air mendidih dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda=550$  nm.

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan oleh enzim. Satu unit *endo- $\beta$ -1,4-xilanase* didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang mampu menghasilkan 1  $\mu$ mol gula reduksi (ekivalen xilosa) dari xilan dalam 1 menit untuk setiap 1 ml enzim. Standar yang digunakan adalah xilosa yang diperlakukan sama dengan sampel.

Rumus uji aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut ini:

$$\text{aktivitas enzim (U / ml)} = \frac{([S] - [K]) \times \frac{V_{total}}{V_{sampel}} \times 1000 \times Fp}{\text{waktu (60 menit)} \times \text{BM xilosa}}$$

keterangan,

[S] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[K] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

Fp : faktor pengenceran

### 3.12 Penentuan Berat Molekul *Endo-β-1,4-xilanase*

Berat molekul enzim ditentukan dengan analisis SDS – PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*). Tahapan pengukuran meliputi persiapan alat SDS-PAGE, pembuatan gel, preparasi sampel, *running*, *satining*, dan *destaining* (Shapiro *et al.*, 1967).

#### 3.12.1 Persiapan alat SDS-PAGE

Seluruh perangkat elektroforesis dicuci bersih dan dikeringkan. Alat dirangkai dan ditentukan volume larutan pembuat gel serta ketebalan gel. Akuades ditambahkan dalam cetakan gel untuk mengetahui kebocoran lempeng kaca. Jika tidak terdapat kebocoran maka lempeng kaca siap digunakan untuk mencetak gel.

#### 3.12.2 Pembuatan gel

Gel pada SDS – PAGE ini terdiri atas gel bawah dan gel atas. Komposisi gel antara lain: aquabides 0,68 mL, akrilamida mix sebanyak 0,25 mL 30%, Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 0,5 mL, dan 0,01 mL SDS 10%. Apabila gel sudah siap digunakan dicetak maka ditambahkan ammonium persulfat 10% 0,01 mL dan TEMED 0,001 mL. Sedangkan komposisi gel bawah antara lain: aquabides 3,3 mL, akrilamida mix 30% sebanyak 4,0 mL, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 2,5 mL, dan SDS 10% sebanyak 0,1 mL.

Apabila gel sudah siap digunakan maka ditambahkan ammonium persulfat 10% 0,1 mL dan TEMED 0,004 mL.

Larutan gel bawah dimasukkan dalam cetakan kaca dan ditambahkan akuades untuk meratakan permukaan gel. Jika sudah terlihat memadat maka dicetak gel atas dan diletakkan sisir pada gel atas untuk membuat sumur (tempat injeksi sampel).

### 3.12.3 Preparasi sampel SDS – PAGE

Sebanyak 40  $\mu$ l sampel enzim ditambahkan dengan buffer sampel (2 mL SDS 10%, 5 mL gliserol 50%, 0,5 mL  $\beta$ -merkaptoetanol, 1 mL BPB 1%, 0,9 mL akuades dicampur dalam 0,6 Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8). Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit untuk mendenaturasi protein.

### 3.12.4 Running SDS – PAGE

Seluruh komponen elektroforesis dirangkai sesuai petunjuk. Buffer atas (*upper gel buffer*; 50 mL Tris-HCl 1,0 M [pH 6,8], 4 mL SDS 10%, aquades hingga 100 mL) dituang ke dalam kompartemen, begitu pula dengan buffer bawah (*lower gel buffer*; 75 mL Tris-HCl 2,0 M [pH 8,8], 4 mL SDS 10 %, aquades hingga 100 mL). Sampel kemudian diinjeksikan ke dalam masing-masing sumur yang telah dibuat. kompartemen diisi larutan buffer elektroda (*running buffer*; 3 g  $C_4H_{11}NO_3$ ; 14,4 g  $C_2H_5NO_2$ ; 1 g SDS, aquades hingga 1000 mL) hingga memenuhi kompartemen *upper dan lower*.. Kompartemen ditutup dan elektroda yang terdapat pada buffer atas dan bawah dihubungkan dengan kutub negatif (katoda) dan kutub positif (anoda) dari *power supply*. Voltase yang digunakan sebesar 40-100 V dengan arus listrik 5,0 A. Elektroforesis dihentikan apabila warna biru *tracking dye* (BPB) telah mencapai 0,5 cm dari bagian bawah gel bawah.

### 3.12.5 *Staining* dan *Destaining* SDS – PAGE

Setelah proses elektroforesis selesai, gel diambil dari cetakan kaca dan direndam dalam larutan *staining* yang terdiri atas (1 g CBB R250, 450 ml CH<sub>3</sub>OH, 100 ml CH<sub>3</sub>COOH, aquades hingga 100 ml). Wadah berisi larutan dan gel dikocok secara perlahan pada suhu ruang hingga pewarna larutan dapat berikatan dengan sampel protein pada gel.

Protein yang tidak berikatan dengan larutan pewarna selanjutnya dicuci dengan larutan pelepas atau *destaining* solution yang terdiri atas (100 ml CH<sub>3</sub>OH, 100 ml CH<sub>3</sub>COOH, akuades sampai 100 ml), selanjutnya akan nampak pita – pita protein

