

**PENGARUH LAMA INKUBASI DAN KONSENTRASI
SUBSTRAT BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*)
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE YANG DIPRODUKSI
OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh :
UMDATUL KHASANAH
NIM. 12620059



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**PENGARUH LAMA INKUBASI DAN KONSENTRASI
SUBSTRAT BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*)
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE YANG DIPRODUKSI
OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

**Diajukan Kepada :
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh :
UMDATUL KHASANAH
NIM. 12620059**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**PENGARUH LAMA INKUBASI DAN KONSENTRASI
SUBSTRAT BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*)
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE YANG DIPRODUKSI
OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh :

UMDATUL KHASANAH

NIM. 12620059

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :

Tanggal : 06 Januari 2017

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Ir. Hj. Liliek Harianie, A.R., M.P
NIP. 19620901 199803 2 001

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

**PENGARUH LAMA INKUBASI DAN KONSENTRASI
SUBSTRAT BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*)
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE YANG DIPRODUKSI
OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

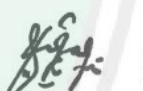
Oleh :

UMDATUL KHASANAH

NIM. 12620059

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 06 Januari 2017

Penguji Utama : **Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si** ()
NIP. 19650509 199903 2 002

Ketua Penguji : **Anik Maunatin, M.P** ()
NIPT. 2014 0201 2412

Sekretaris Penguji : **Ir. Hj. Liliek Harianie A.R., M.P** ()
NIP. 19620901 199803 2 001

Anggota Penguji : **Dr. H. Ahmad Barizi, M.A** ()
NIP. 19731212 199803 1 001

**Mengetahui dan Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi**



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Umdatul Khasanah
NIM : 12620059
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Skripsi : Pengaruh Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu
(*Saccharum officinarum*) Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang
Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 06 Januari 2016

Yang membuat pernyataan,



Umdatul Khasanah

NIM.12620059

MOTTO

و كن مستفيدا كل يوم زيادة # من العلم واسبح في بحور الفوائد

“Jadilah kamu orang yang berfaedah dalam menambah ilmu setiap harinya, dan berenanglah dalam lautan faedah” (Dalam Kitab Ta’limul Muta’allim)

makna

Hendaknya setiap hari engkau selalu mengambil faedah dari bertambahnya ilmu pengetahuan yang diketahui dan berenanglah di lautan faedah ilmu (seperti mencari mutiara di lautan), niscaya engkau berada dalam lautan kebajikan.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim....

Karya sederhana ini penulis persembahkan kepada:

Kedua orang tua Abah H.Achayat dan Ibu Hj.Nur Fatimah dan keluarga yang sangat penulis sayangi, yang telah mencurahkan kasih sayang, doa, kesabaran, dan keikhlasannya dalam mendidik dan memotivasi penulis.

Aalimul mu'allim Abah K.H. Makkinuddin Qomari beserta keluarga yang penulis harapkan barokah dan keridhoannya.

Teruntuk "beliau" yang akan menjadi bagian terdepan, teristimewa dan prioritas dalam masa depan penulis.

Keluarga besar Jurusan Biologi khususnya Koloni Biologi 2012 sahabat seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi, terima kasih atas seluruh dukungan dan motivasi, serta pengalaman-pengalaman berharganya. Serta seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tugas akhir ini. Semoga tali silaturahmi diantara kita tetap selalu terjaga.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warohmatullahi Wabarokatuh

Alhamdulillah Robbil 'Alamin, tak henti-hentinya rasa puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT, Sang Pencipta dan penguasa alam semesta yang senantiasa melimpahkan hidayah dan karunia cahaya ilmu yang membuka segala pintu kehidupan. Sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW, rasul pembuka dan penunjuk jalan kebenaran yang selalu diharapkan syafa'atnya.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih dengan mengharap keridhoan penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Hj. Liliek Harianie A.R., M.P dan Dr. H. Ahmad Barizi, M.A, selaku dosen pembimbing dengan kesabaran dan keikhlasan senantiasa memberikan bimbingan, arahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si dan Anik Maunatin, M.P selaku dosen penguji dan konsultan yang memberikan kritik dan saran dalam pengerjaan dan penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini dengan baik.
6. Seluruh dosen, laboran dan staf administrasi Jurusan Biologi atas semua ilmu, bimbingan, dukungan moral dan materi yang diberikan.
7. Abah H. Achiyat dan Ibunda Hj. Nur Fatimah dan keluarga yang selalu memberikan doa, motivasi, dukungan dan semangat, yang senantiasa penulis harapkan keridhoan dan keberkahannya.

8. Abah K.H. Makinuddin Qomari beserta Ibu Nyai Hj. Wachidah Ismail dan keluarga, yang selalu penulis harapkan fatwa-fatwa, keberkahan dan keridhoannya.
9. Mu'allim/ah dan asatidz/ah yang selalu meberikan motivasi dan arahan kepada penulis, dan selalu diharapkan keberkahannya.
10. Keluarga besar Biologi 2012, keluarga besar UIN Maliki Malang yang berjuang bersama dalam menyelesaikan studi di Kampus UIN Malang dan seluruh sahabat penyemangat di balik pengerjaan karya ini.

Tiada kata yang patut penulis ucapkan selain *Jazakumullahu Ahsanal Jazaa'*, semoga amal baik beliau sekalian mendapat ridho dan balasan dengan sepantas-pantasnya. Penulis berharap semoga karya sederhana ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya. *Amiiin Ya Robbal Alaminn.*

Malang, 06 Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PENYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT	xvii
مخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Hipotesa.....	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
1.6 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.2 Bagas Tebu (<i>Saccharum officinarum</i>)	16
2.3 Xilan.....	20
2.4 Xilanase	21
2.4.1 Definisi	21
2.4.2 Struktur Kimia Xilanase	22

2.4.3 Biosintesis Xilanase	23
2.4.4 Pemanfaatan Enzim Xilanase	24
2.4.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Xilanase	27
2.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase.....	31
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian	33
3.2 Waktu dan Tempat	34
3.3 Variabel Penelitian.....	34
3.3.1 Variabel Bebas	34
3.3.2 Variabel Terikat	35
3.3.3 Variabel Kontrol	35
3.4 Alat dan Bahan	35
3.4.1 Alat	35
3.4.2 Bahan.....	35
3.5 Prosedur Kerja	36
3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan	36
3.5.2 Pembuatan Media NA dan NB	36
3.5.3 Peremajaan Isolat <i>Bacillus subtilis</i>	36
3.5.4 Identifikasi Isolat <i>Bacillus subtilis</i>	37
3.5.5 Persiapan Bahan Baku Bagas Tebu.....	37
3.5.6 Delignifikasi Bahan Baku Bagas Tebu	37
3.5.7 Hidrolisis Hemiselulosa Metode Asidifikasi	38
3.5.8 Pembuatan Media Produksi	39
3.5.9 Produksi Enzim Xilanase.....	39
3.5.10 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase Metode DNS.....	39
3.5.11 Pembuatan Kurva Standar Xilosa Metode DNS	41
3.6 Analisa Data	42

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

- 4.1 Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas
Tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase... ..43
- 4.2 Kajian Pemanfaatan Limbah dalam Perspektif Islam55

BAB V PENUTUP

- 5.1 Kesimpulan.....57
- 5.2 Saran.....57

DAFTAR PUSTAKA.....58**LAMPIRAN67**

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Hemiselulosa Limbah Lignoselulosik	19
Tabel 3.1 Rancangan Percobaan.....	34
Tabel 4.1 Hasil ANOVA Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (<i>Saccharum officinarum</i>) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh <i>Bacillus subtilis</i>	43
Tabel 4.2 Uji DMRT Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (<i>Saccharum officinarum</i>) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh <i>Bacillus subtilis</i>	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Bacillus subtilis</i> dengan Pewarnaan Gram.	11
Gambar 2.2 Bagas Tebu	18
Gambar 2.3 Struktur Xilan	20
Gambar 2.4 Struktur Kimia Xilanase.....	22
Gambar 4.1 Reaksi Asam Dinitrosalisilat dengan Xilosa.....	48
Gambar 4.2 Histogram Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh <i>Bacillus subtilis</i>	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Rancangan Penelitian	67
Lampiran 2. Delignifikasi Bagas Tebu	68
Lampiran 3. Hidrolisis Hemiselulosa Bagas Tebu Metode Asidifikasi.....	69
Lampiran 4. Kurva Standar Xilosa	70
Lampiran 5. Data Absorbansi Sampel	71
Lampiran 6. Data Absorbansi Kontrol.....	72
Lampiran 7. Data Absorbansi Terkoreksi (Nilai y)	73
Lampiran 8. Data Konsentrasi Xilosa Produk (ppm)	74
Lampiran 9. Data Aktivitas Enzim Xilanase.....	75
Lampiran 10. Metode Perhitungan Aktivitas Enzim	76
Lampiran 11. Uji Normalitas Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Xilanase.....	77
Lampiran 12. Analisa Hasil Pengaruh Interaksi Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Xilanase.....	78
Lampiran 13. Pembuatan Media dan Reagen.....	80
Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian.....	84

ABSTRAK

Khasanah, Umdatul. 2017. **Pengaruh Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis***. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dosen Pembimbing: Ir. Hj. Liliek Harianie, AR. M.P. Dosen Pembimbing Agama: Dr. H. Ahmad Barizi, M.A

Kata Kunci: Lama Inkubasi, Konsentrasi Substrat Bagas Tebu, Enzim Xilanase, *Bacillus subtilis*

Bagas tebu merupakan limbah lignoselulosik yang mengandung hemiselulosa penyusun dinding sel tumbuhan. Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa. *Bacillus subtilis* merupakan salah satu mikroorganisme penghasil xilanase yang bersifat termostabil dan *non-selulase activity*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor perlakuan dan 3 kali ulangan. Faktor pertama yaitu variasi lama inkubasi yang terdiri dari 4 taraf yaitu 10, 12, 14 dan 16 jam. Faktor kedua yaitu variasi konsentrasi substrat yang terdiri atas 4 taraf yaitu 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA), dan jika terdapat pengaruh nyata terhadap parameter maka dilakukan uji lanjut dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. Aktivitas enzim xilanase tertinggi didapatkan pada perlakuan lama inkubasi 14 jam dengan konsentrasi substrat 2,5% (L_3A_4) dengan nilai aktivitas enzim xilanase sebesar 5,43 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim xilanase terendah didapatkan pada perlakuan lama inkubasi 10 jam dengan konsentrasi substrat 1% (L_1A_1) dengan nilai aktivitas enzim xilanase sebesar 2,67 U/ml.

ABSTRACT

Khasanah, Umdatul. 2017. **The Effect of Incubation Period and Concentration Substrate of Sugarcane Bagasse (*Saccharum officinarum*) on Xylanase Production by *Bacillus subtilis*.** Thesis. Biology Department of Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor Lectures : Ir. Hj. Liliek Harianie, AR. M.P. Islamic Advisor Lectures : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A

Keywords: Incubation period, Concentration Substrate of Sugarcane Bagasse, Xylanase Enzyme, *Bacillus subtilis*

Sugarcane is lignocellulosic waste containing hemicelluloses, plant cell wall composers. Xylanase is an extracellular enzyme thus able to hydrolyze xylane (hemicelluloses) to produce xyloses. *Bacillus subtilis* is one of microorganisms which are able to produce thermo-stable xylanases and non-cellulose activity. The purpose of this research was to examine the effect of incubation period and concentration substrate of sugarcane bagasse on xylanase activity thus produced by *Bacillus subtilis*.

This research is experimentally uses a Completely Randomized Design (CRD) factorial design with two factor treatments and 3 times repetition. The first factor with variation of incubation period which consists of 4 levels those are 10, 12, 14 and 16 hours. The second factor with variation of substrate concentration which consists of 4 levels those are, 1%, 1,5%, 2% and 2,5%. The data were analyzed using Analysis Of Variance (ANOVA), and if significantly effected the parameter, than it would be continued by Duncan Multiple Range Test (DMRT).

The result showed that the combination of incubation period variation and substrate concentration of sugarcane bagasse affected the enzyme xylanases activity thus produced by *Bacillus subtilis*. The highest enzyme xylanases activity obtained from 14 h incubation period with 2,5% substrate concentration (L_3A_4) and value of enzyme xylanase activity 5,43 U/ml. While the lowest enzyme xylanase activity obtained from 10 h incubation period treatment with 1% substrate concentration (L_1A_1) and value of enzyme xylanase activity 2,67 U/ml.

مخلص البحث

الحسنة، عمدة. 2017. تأسير مدّة الحضانة وتركيز الركيزة من حثالة قصب السكر (*Saccharum officinarum*)

علي نشاط إنزيم سيلاناسي التي تنتجها العصوية الرقيقة (*Bacillus subtilis*). البحث الجامعي. القسم علم الحياة كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانامالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج. المشرف: الحاجة ليليك حاربياني، الماجستير. المشرف الديني: الدكتور الحاج أحمد باريز، الماجستير.

الكلمة الرئيسية: مدّة الحضانة، تركيز الركيزة من حثالة قصب السكر، الإنزيم سيلاناسي، العصوية الرقيقة (*Bacillus subtilis*).

حثالة قصب السكر هي النفايات الزراعية كانت العنصر الرئيسي هيميسيلولاسي المكونة في جدار الخلية النباتية. سيلاناسي هو مجموعة من الإنزيمات تخرج الخلية ليتحلل سيلان (هيميسيلولاسي) فصارت "سيلوسا". العصوية الرقيقة (*Bacillus subtilis*) هيواحدة منالكائنات الحية الدقيقة كانت قادرة علىإنتاج سيلاناسي هو بالحرارة وغير سلولاز النشاط. وقدأجريت هذه الدراسة لتحديد تأثير مجموعة فيتركيز الركيزةمن حثالة قصب السكر ومدّة الحضانة علىإنتاج سيلاناسي بواسطة العصوية الرقيقة (*Bacillus subtilis*).

وأما هذه الدراسة من الدراسة التجريبية معصميا لبحث العشوائية الكاملة مضروب بأسلوب عاملان 3 المكررات. اما العامل الاول هو مدّة الحضانة تتكوّن من أربعة مستويات، أي 10، 12، 14 و 16 ساعة. وأما العامل الثاني هو اختلاف تركيز الركيزة التي تتكوّن من أربعة مستويات وهي 1%، 1,5%، 2%، 2,5%. و أما البيانات المحصولة باستخدام تحليل ANOVA، واذا هذه الإجراءات تؤثر على مقدار فتلتحق باختبار دوإنجان اختبار متعددة على خشبة المشرحوالة وأظهرت النتائج من هذه الدراسة أن مدّة الحضانة وتركيز الركيزة من حثالة قصب السكر تؤثر على نشاط إنزيم سيلاناسي التي تنتجها العصوية الرقيقة. الحصول أعلى النشاط إنزيم سيلاناسي في معاملة L_3A_4 يعني 5,43 U/ml. وأما أدنى النشاط إنزيم سيلاناسي في معاملة L_1A_1 يعني 2,67 U/ml.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Limbah tebu merupakan salah satu limbah ligo selulosa yang banyak ditemukan dalam jumlah banyak dan berpeluang menyebabkan pencemaran lingkungan jika tidak diolah dengan tepat. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2016), produksi tanaman tebu cenderung mengalami peningkatan setiap tahunnya. Pada tahun 2013 produksi tanaman tebu di Indonesia mencapai 2.553.50 ton, dan pada tahun 2014 mengalami peningkatan sebanyak 2.575.40 ton. Pemanfaatan limbah bagas tebu di Indonesia selama ini digunakan sebagai pakan ternak, bahan bakar di pabrik gula, media pertumbuhan jamur dan bahan baku pembuatan kertas. Pengolahan ampas tebu dengan tepat akan menghasilkan produk dengan nilai guna dan nilai jual yang lebih tinggi. Faisal (2008) menambahkan bahwa dalam produksi gula di pabrik dihasilkan bagas tebu sebanyak 90% pada setiap batang tebu yang diproses.

Umumnya limbah dianggap tidak memiliki nilai ekonomi dan beberapa memerlukan biaya yang relatif lebih mahal dalam penanganannya. Namun jika dikaji lebih dalam limbah lignoselulosa berpotensi besar dalam pengembangan bidang industri. Al-Quran sebagai wahyu *Ilahi* menjadi inspirasi dan landasan berpikir bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh-Nya tidak ada yang bernilai sia-sia. Sebagaimana disebutkan dalam QS. Ali Imron [3] ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya:

“(yaitu) orang-orang yang senantiasa mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi, (seraya berkata): ‘Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan segala sesuatu ini dengan sia-sia’, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”.

Dalam *Tafsir Al-Aisar* dijelaskan bahwa lafadz “*maa kholaqta hadza baathila*” mempunyai makna bahwa Allah SWT tidak menciptakan segala sesuatu di langit dan bumi tanpa ada manfaatnya jika dikelola dengan baik dan benar (Al-Jazairi, 2007). Secara tegas disampaikan bahwa segala ciptaan Allah tidak ada yang sia-sia, termasuk di dalamnya yaitu ampas tebu. Pemanfaatan bagas tebu sebagai substrat mikroorganisme dapat dijadikan solusi alternatif pengurangan limbah pencemar lingkungan serta meningkatkan produksi enzim maupun metabolit sekunder sehingga menjadi lebih bermanfaat.

Selain mengkaji sumberdaya tumbuhan, kajian Islam juga menganjurkan untuk mengkaji makhluk hidup lain seperti halnya mikroorganisme. Tertulis dalam QS. Yunus [10] ayat 61 yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۚ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya:

“Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al-Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu sekalipun sebesar dzarrah di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (di Lauh Mahfuzh)”.

Berdasarkan penjelasan dalam *Tafsir Al-Jalalain*, makna kata “dzarrah” berarti segala sesuatu dengan ukuran terkecil yang berada di bumi dan di langit. Dalam bidang kajian Biologi, kata “dzarrah” diartikan sebagai mikroorganisme yang dapat berupa khamir, kapang, bakteri dan mikroalga. Organisme tersebut berukuran mikroskopis sehingga tidak dapat dilihat secara kasat mata. Namun potensi yang dimilikinya dalam memproduksi enzim yang bermanfaat bagi kehidupan menjadikannya penting untuk dikaji lebih dalam. Eksplorasi produksi enzim dengan memanfaatkan peran mikroorganisme banyak diminati terkait dengan peningkatan angka kebutuhan enzim. Penggunaan bakteri sebagai penghasil enzim xilanase mempunyai beberapa keuntungan diantaranya biaya produksi relatif murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, mempunyai kecepatan pertumbuhan yang tinggi serta mudah dikendalikan.

Pemanfaatan enzim semakin berkembang pada berbagai macam industri pangan maupun industri non-pangan. Menurut Wahyudi, dkk., (2010), salah satu jenis enzim yang mempunyai nilai komersial tinggi dalam bidang industri yaitu enzim xilanase. Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilooligosakarida dan xilosa (Beg, *et al.*, 2001). Penelitian sebelumnya melaporkan produksi enzim xilanase oleh berbagai jenis mikroorganisme dari golongan khamir, kapang maupun bakteri,

diantaranya *Candida fukuyamaensis* dan *Candida boidinii* (Faisal, 2008), *Thermomyces lanuginosus* (Muawanah, 2006), *Trichoderma viride* (Purwanti, 2015), *Saccharomyces cerevisiae* (Sari, dkk., 2013), *Aspergillus niger* (Budiman dan Sigit, 2010), *Bacillus* sp. (Nakamura, *et al.*, 1994) dan *Bacillus stearotheophilus* (Trismillah dan Deden, 2009), dan *Bacillus circulans* (Septiningrum dan Chandra, 2011). Enzim xilanase paling komersial diproduksi oleh genus *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, dan *Talaromyces* (Li, *et al.*, 2000). *Bacillus* merupakan genus bakteri termoalkalofilik yang mampu menghasilkan xilanase yang stabil pada suhu tinggi, pH alkali dan mempunyai tingkat pertumbuhan yang tinggi (Sapre, *et al.* 2005).

Beberapa faktor yang mempengaruhi produksi enzim oleh mikroorganisme diantaranya media produksi, suhu, aerasi, agitasi, pH, lama inkubasi dan strain mikroba yang digunakan. Dalam industri skala besar media produksi menjadi faktor utama penentu produksi enzim. Media yang digunakan bersifat murah, mudah diperoleh serta dapat menghasilkan enzim dalam waktu yang singkat namun sesuai dengan yang diharapkan (Trismillah dan Deden, 2009). Penggunaan xilan murni dalam produksi xilanase skala industri dinilai kurang ekonomis. Secara alami xilan dapat ditemukan pada tanaman-tanaman tahunan dan limbah-limbah pertanian lignoselulosik seperti tongkol jagung 36% (Resita, 2006), bagas tebu 27,97%, dedak padi 16,94% dan serabut kelapa sawit 24% (Faisal, 2008) , jerami padi 22% dan kulit biji kapas 10,2% (Septiningrum dan Apriana, 2011). Menurut Annamalai, dkk., (2009) xilan termasuk jenis hemiselulosa yang merupakan komponen terbesar penyusun struktur dinding sel sebesar 20-40%

berat kering tanaman. Faisal (2008) menambahkan hasil analisa komposisi bagas tebu terdiri atas selulosa 37,65%, hemiselulosa 27,97%, lignin 22,09%, SiO₂, 01%, abu 3,82% dan sari 1,81%. Baarri dan Fawaid (2013) menyebutkan bahwa hasil analisa kandungan hemiselulosa pada bagas tebu sebesar 15-20% dari berat tanaman. Kandungan hemiselulosa yang cukup tinggi pada bagas tebu berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan substrat kasar mikroorganisme penghasil xilanase sebagai salah satu upaya untuk menghasilkan enzim xilanase.

Bacillus subtilis merupakan jenis bakteri termotabil yang mampu memproduksi enzim xilanase pada suhu 30-60°C (Bansal, *et al.*, 2012). *Bacillus subtilis* bersifat *non-patogen* dan *non-toxic* yang banyak digunakan dalam bidang industri sebagai sumber penghasil enzim (Olempska, 2004). *Bacillus subtilis* mempunyai fase pertumbuhan eksponensial dengan kisaran yang lebih lama dan hasil aktivitas enzim xilanase yang lebih tinggi dibanding dengan *Bacillus stearothermophilus* (Trismillah dan Deden, 2009) dan *Bacillus sp. NTU-06* (Wang, *et al.*, 2010). Xilanase yang diproduksi oleh bakteri umumnya memiliki pH optimum lebih besar dan bersifat termotabil dibandingkan xilanase yang diproduksi oleh kapang. Selain itu beberapa xilanase dari kapang juga dilaporkan memiliki aktivitas tinggi, tetapi juga diikuti dengan adanya aktivitas selulase (Subramaniyan dan Prema, 2002).

Beberapa hasil penelitian yang mengkaji potensi *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim xilanase pada konsentrasi dan lama inkubasi yang berbeda-beda. diantaranya sebagai berikut. Saleem, *et al.*, (2002) menjelaskan bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi enzim xilanase pada media bagas tebu 2%

dengan nilai aktivitas enzim sebesar 4.0 U/ml selama 14 jam inkubasi pada suhu 50°C. Sugumaran, *et al.*, (2013) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* menghasilkan xilanase tertinggi pada substrat bagas singkong pH alkali 8 dan suhu 60°C. Irfan, *et al.* (2015) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi xilanase tertinggi pada pH 8, dengan konsentrasi substrat 2% dan konsentrasi inokulum 2% pada suhu 50°C selama 48 jam inkubasi. Kemampuannya dalam menghasilkan xilanase yang stabil pada pH alkali dan suhu tinggi ini menjadikan *Bacillus subtilis* sangat berpotensi untuk dimanfaatkan dalam aplikasi industri.

Irfan *et al.*, (2015) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media produksi bagas tebu 2% mampu menghasilkan xilanase sebesar 47.33 ± 1.17 U/ml pada suhu inkubasi 37°C selama 48 jam dengan agitasi 140 rpm. Trismillah dan Deden (2003) menambahkan bahwa produksi enzim dapat ditingkatkan dengan penambahan substrat tertentu sebagai sumber karbon dalam media produksi dapat meningkatkan mikroorganisme untuk mensekresikan metabolit selnya. Poedjiadi dan Supriyanti (2006) menjelaskan bahwa apabila konsentrasi substrat ditingkatkan, maka semakin banyak pula substrat yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim tersebut. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim-substrat semakin besar pula sehingga terjadi peningkatan laju reaksi. Namun pada batas tertentu, seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat sehingga penambahan konsentrasi tidak akan meningkatkan laju reaksi.

Selain faktor media produksi, lama inkubasi termasuk salah satu faktor penting dalam menentukan waktu panen xilanase dengan kualitas yang baik. Pada umumnya enzim diproduksi oleh mikroorganisme pada fase eksponensial hingga stasioner awal dalam fase pertumbuhannya. Gandjar (2006) menjelaskan bahwa setiap mikroba mempunyai masa pertumbuhan yang beragam yang dapat mempengaruhi aktivitas metabolismenya. Sulistyaningtyas, dkk., (2013) menambahkan bahwa enzim secara efektif diproduksi pada fase eksponensial karena pada fase ini pertumbuhan biomassa mikroba mengalami peningkatan dan pada fase ini pula mikroba sangat efektif dalam mensintesis enzim untuk kelangsungan hidupnya. Menurut Bansal, *et al.*, (2012) *Bacillus subtilis* mempunyai fase logaritmik dimulai setelah 2 jam inkubasi hingga 72 jam pada suhu 37°C dan pH alkali 8.

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, dapat diketahui bahwa enzim xilanase yang diproduksi oleh mikroorganisme mempunyai karakteristik yang berbeda-beda pada konsentrasi substrat dan lama inkubasi sebagai rentan waktu optimal mikroba dalam mensekresikan xilanase, yang mana kedua hal tersebut dapat mempengaruhi produksi enzim yang dihasilkannya. Produksi xilanase oleh mikroorganisme dapat diketahui dengan mengukur kuantitas enzim, jumlah pertumbuhan sel bakteri, dan aktivitas enzim yang dihasilkan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat bagas tebu dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh bakteri *Bacillus subtilis* sehingga dapat dimaksimalkan untuk menghasilkan enzim xilanase dan dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang industri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.

1.4 Hipotesa

Adapun hipotesa dalam penelitian ini adalah terdapat pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.

1.5 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1.5.1 Manfaat Akademis

1. Setelah dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat menjadi tambahan pengetahuan dan wawasan ilmiah mengenai adanya pengaruh lama

inkubasi dan konsentrasi bagas tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

1.5.2 Manfaat Praktis

1. Sebagai sumber informasi untuk penelitian selanjutnya dalam mengembangkan *Bacillus subtilis* sebagai agen penghasil enzim xilanase
2. Sebagai tambahan informasi konsentrasi substrat dan lama inkubasi yang optimal dalam memproduksi enzim xilanase oleh *Bacillus subtilis* pada media produksi bagas tebu
3. Secara umum dalam lapangan diharapkan dapat menjadi informasi dasar dalam pengembangan limbah lignoselulosik khususnya bagas tebu (*Saccharum officinarum*) agar dapat mengurangi pencemaran lingkungan
4. Sebagai solusi alternatif dalam mengelola limbah lignoselulosik berupa bagas tebu sehingga dapat meningkatkan nilai ekonomis

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* yang merupakan kultur koleksi dari Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya yang diisolasi dari tanah pertanian
2. Bagas tebu berasal dari limbah pabrik gula Kebonagung di Malang
3. Parameter yang dianalisa adalah aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* yang ditunjukkan dengan pengukuran nilai aktivitas enzim yang dihasilkan

4. Variasi lama inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10; 12; 14 dan 16 jam
5. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1%; 1,5%; 2% dan 2,5%

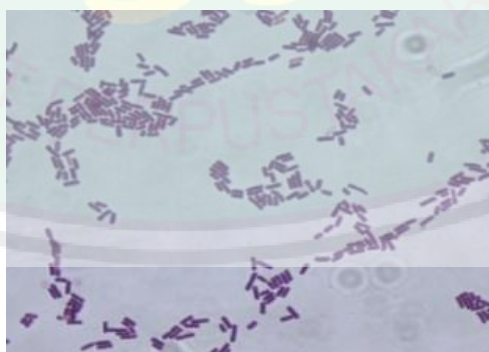


BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk basil (batang) dan bersifat aerob. *Bacillus subtilis* banyak ditemukan di alam seperti pada tanah, air, dan beberapa dapat ditemukan sebagai flora normal pada usus manusia. Karakteristik unik dari bakteri ini adalah kemampuannya dalam membentuk endospora pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri termofilik, asidofilik, alkalifilik, halotoleran dan halofilik, yang mampu tumbuh pada suhu, pH dan salinitas yang ekstrim (Turnbull, 1996 dalam Amelia, 2012). *Bacillus subtilis* bersifat *non-patogen* dan *non-toxic* sehingga aman untuk digunakan dalam pengembangan riset pengetahuan dan beberapa digunakan sebagai probiotik (Cartwright, 2009).



Gambar 2.1 Morfologi *Bacillus subtilis* dengan Pewarnaan Gram

Bacillus subtilis dan *Bacillus licheniformis* banyak digunakan dalam mikrobiologi industri dikarenakan (1) laju pertumbuhannya yang cepat pada proses fermentasi, (2) kemampuannya dalam mensekresikan protein (enzim) ke

medium ekstraselular, dan (3) status keamanannya yang GRAS (*generally regarded as safe*). Pada umumnya *Bacillus alkalifilik* mampu memproduksi berbagai macam enzim diantaranya protease, amilase, xilanase dan selulase (Schallmey, *et al.*, 2004).

Pengembangan kajian potensi *Bacillus subtilis* tidak disebutkan dengan jelas dalam Al-Quran, tetapi *Bacillus subtilis* termasuk dalam salah satu jenis mikroorganism yang dapat dimanfaatkan untuk pemenuhan kebutuhan manusia di bumi. Menjadi suatu kewajiban bagi manusia sebagai *khalifah* di bumi untuk memberikan kontribusi dengan senantiasa melakukan pengkajian terhadap segala sesuatu yang diciptakan oleh-Nya. Disebutkan dalam QS. Yunus [10] ayat 61 yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۚ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya:

“Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al-Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu sekalipun sebesar dzarrah di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (di Lauh Mahfuzh)”.

Makna yang terkandung dalam ayat di atas yaitu adanya anjuran untuk membaca petunjuk-petunjuk dalam Al-Qur'an untuk melakukan suatu pekerjaan. Kalimat “*wa laa ta'maluuna min 'amalin illa kunna 'alaikum syuhuudan idz tufiidhuna fihi*” mengandung makna bahwa segala pekerjaan (meneliti) yang kita

lakukan hendaknya dapat dipersaksikan dan dapat dipertanggungjawabkan. Dalam *Tafsir Ibnu Katsir* dijelaskan bahwa Allah SWT memberitahukan bahwa segala pekerjaan (meneliti) yang dilakukan oleh umat manusia tidak luput dari pengawasan dan perhatian-Nya (Abdulah, 2004). Oleh karena itu hendaknya, manusia selalu merasakan pengawasan dan perhatian dalam semua amal perbuatannya, dilakukan dengan keikhlasan dan sungguh-sungguh dengan meniatkannya semata-mata karena beribadah kepada Allah, karena sesungguhnya Dia maha melihat.

Makna “*dzarrah*” dalam ayat tersebut yakni sesuatu dengan ukuran terkecil yang terdapat di bumi dan di langit yang bidang kajian Ilmu Biologi dapat diartikan sebagai mikroorganisme. Dalam *Tafsir Al-Maraghi* dijelaskan bahwa makna “*dzarrah*” dapat diartikan sebagai hewan kecil dan segala sesuatu yang menyerupainya seperti debu dan cahaya sinar matahari. Sedangkan menurut Al-Jazairi (2007) dalam *Tafsir Al-Aisar* menjelaskan bahwa Allah SWT menyerukan pada makhluk-Nya akan keluasan ilmu pengetahuan yang tidak ada satupun luput dari penjagaan dan pengawasannya, walaupun sekecil “*dzarrah*”, segala sesuatu yang berukuran seperti semut kecil atau lebih kecil, baik di langit maupun di bumi. Dan dijelaskan pada kata selanjutnya yaitu “*kitaabim mubiin*” yang bermakna wahyu Al-Qur’an, yakni Allah SWT telah memberikan petunjuk-petunjuk tersebut dalam Al-Qur’an tentang anjuran melakukan penelitian terkait mikroorganisme itu sendiri. Qurthubi (2009) menambahkan bahwa mikroorganisme dapat menjadi suatu bahan perumpamaan karena Allah SWT agar dapat menghargai segala sesuatu sesuai dengan manfaatnya sekalipun ia

berukuran amat kecil. Bagi kaum yang beriman kepada-Nya ia akan melakukan suatu kebajikan dan mempunyai sudut pandang yang luas untuk menjadikannya suatu perintah, anjuran, petunjuk dan inspirasi mengelola dan mengembangkannya untuk suatu amal kebaikan.

Bakteri *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim xilanase yang bebas selulase. Menurut Bansal, *et al.*, (2012), hal ini dikarenakan komponen lignoselulosa yang dapat didegradasi hanya hemiselulosa saja sedangkan selulosa tidak terurai. Xilanase bebas selulase dapat diketahui dari hasil uji aktivitas selulase yang negatif. Dengan demikian enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dapat dimanfaatkan walaupun tanpa pemurnian.

Produksi enzim xilanase oleh *Bacillus subtilis* pernah dilakukan sebelumnya oleh Irfan, *et al.*, (2015) dan dilaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim xilanase pada substrat bagas tebu dengan konsentrasi 2% pada suhu 35°C dengan pH 8 setelah 48 jam inkubasi. Saleem, *et al.*, (2012) juga melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi xilanase sebesar 4.0 UI/ml pada substrat bagas tebu, 3.5 IU/ml pada substrat jerami gandum dan jerami padi dengan konsentrasi substrat sebesar 2% dengan lama fermentasi 14 jam pada suhu 50°C.

Hasil penelitian Irfan, *et al.*, (2012) menjelaskan pula bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi enzim xilanase pada media dengan substrat bagas tebu, jerami gandum, sekam padi, tepung kedelai, tongkol jagung dan kulit gandum dengan konsentrasi 2%. Aktivitas xilanolitik tertinggi terdapat pada media dengan substrat ampas tebu sebesar $439,5 \pm 2.84$ IU/ml dengan kondisi

fermentasi suhu 37°C selama 48 jam dengan agitasi 140 rpm. Bansal, *et al.*, (2012) menambahkan dalam hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan xilanase tertinggi pada pH 6.5 suhu 37°C pada substrat xilan alami berupa tongkol jagung, jerami, dedak gandum, bagass tebu, sari tomat dengan konsentrasi 2%, daripada xilan sintesis dengan konsentrasi 0,5%.

Produksi enzim yang merupakan metabolit primer bagi pertumbuhan mikroorganisme dapat diketahui melalui pengukuran pertambahan total massa sel dalam suatu media kultur. Jika pada setiap selang waktu tertentu dilakukan pengukuran terhadap jumlah bakteri, maka dapat diperoleh grafik hubungan antara jumlah bakteri dan waktu yang disebut sebagai kurva pertumbuhan. Vanadianingrum (2008) menyebutkan bahwa selama fase pertumbuhan, pertambahan massa mikroorganisme berbanding lurus dengan pertambahan komponen seluler seperti DNA, RNA dan protein. Kurva pertumbuhan dapat menggambarkan fase-fase pertumbuhan suatu jenis mikroorganisme yang dalam proses fermentasi dapat digunakan untuk mengetahui waktu panen paling baik. Prima (2012) kurva pertumbuhan dapat digunakan untuk menentukan waktu optimum dalam produksi enzim xilanase.

Bacillus subtilis mempunyai fase logaritmik yang relatif lebih lama dibanding spesies genus *Bacillus* yang lainnya. Hasil penelitian Annamalai, *et al.*, (2009) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari perairan air laut memiliki kisaran fase logaritmik mulai jam ke-2 setelah diinkubasi pada suhu 50°C hingga jam ke-36. Hasil penelitian Ardiansyah (2009) menyebutkan bahwa

Bacillus subtilis yang ditumbuhkan pada media NB dengan penambahan xilan jerami padi menunjukkan fase logaritmiknya dimulai pada jam ke-4 hingga jam ke-14. Yuneta (2010) menambahkan bahwa *Bacillus subtilis* berada dalam fase logaritmik pada jam ke-5 hingga jam ke-13 waktu inkubasi. Hasil berbeda ditunjukkan pada hasil penelitian Bansal, *et al.*, (2012) menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan pada media tersubstitusi bagas tebu memiliki fase logaritmik mulai 2 jam setelah inkubasi hingga 48 jam dan kemudian memasuki fase stasioner. Vanadianingrum (2008) menjelaskan bahwa selama fase eksponensial terjadi metabolisme sel paling tinggi, sintesis material sel sangat cepat dengan jumlah yang relatif konstan hingga nutrisi dalam media berkurang hingga mencapai titik stasioner.

Puspita (2010) menjelaskan bahwa fase-fase pada pola pertumbuhan mikroorganisme dapat menunjukkan hasil metabolit yang dihasilkan. Pertumbuhan sel maksimal pada fase log, sehingga diduga pada fase ini dihasilkan sel bakteri *Bacillus subtilis* dalam jumlah relatif lebih besar, yang berkorelasi terhadap tingginya xilanase yang dihasilkan.

2.2 Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*)

Perkebunan tebu di Indonesia menempati luas area ± 321 ribu hektar. Pada tahun 2014 produksi tebu mencapai 257.540 ton. Limbah hasil penggilingan tebu yang disebut dengan ampas tebu (bagas) akan meningkat seiring dengan peningkatan produksi tebu. Bagas tebu merupakan hasil samping dari proses ekstraksi cairan sari tebu berwujud padat. Dalam setiap tebu yang diproses rata-

rata didapatkan 35-40% ampas tebu. Selama ini hampir di setiap pabrik gula di Indonesia menggunakan ampas tebu yang dihasilkan sebagai bahan bakar boiler sebanyak 50%, sedangkan 50% sisanya ditimbun sebagai limbah buangan.

Penimbunan bagas dalam waktu tertentu dapat menimbulkan permasalahan yang menyebabkan terganggunya sistem keseimbangan alam dan kerusakan lingkungan. Dijelaskan dalam QS. Ar-Rum [30] ayat 41 yang berbunyi:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ
يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

Artinya:

“Telah Nampak kerusakan di darat dan di laut yang disebabkan oleh karena perbuatan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka agar mereka kembali (ke jalan yang benar)”.

Makna “fasaada” dalam ayat tersebut yakni kerusakan. Dalam *Tafsir Al-Misbah* dijelaskan bahwa, kata “*al-fasaad*” mengandung arti segala sesuatu yang keluar dari titik keseimbangan, baik dalam jumlah sedikit ataupun banyak. Dalam konteks ilmu biologi, kata keseimbangan dapat dikorelasikan dengan keseimbangan lingkungan. Keseimbangan lingkungan dapat diartikan sebagai suatu keadaan dimana interaksi antara faktor biotik dan abiotik serta seluruh komponen penyusun kehidupan saling bersimbiosis hingga terciptanya keadaan homeostasis (seimbang). Dalam hal ini, penimbunan limbah bagas tebu yang tidak diolah dengan tepat dan baik dapat menjadi permasalahan yang menyebabkan keluarnya dari titik keseimbangan lingkungan serta berkurangnya kemanfaatan. Hal ini dikarenakan sifat bagas tebu yang mudah terbakar, mengotori lingkungan sekitar dan menyita lahan luas untuk masa penimbunan dan penyimpanannya.

Menurut Shihab (2003), beberapa dampak ketidakseimbangan lingkungan diantaranya membahayakan kehidupan biota, sumberdaya, dan kenyamanan ekosistem daratan. Daratan semakin kering dan tandus, sehingga keseimbangan lingkungan menjadi lebih terganggu. Inilah yang menjadi pengantar kontemporer dalam memahami ayat ini sebagai inspirasi dan isyarat tentang adanya kerusakan lingkungan, sehingga perlu dilakukan pengkajian solusi tepat guna.

Bagas tebu dengan biomassa berlignoselulosa yang merupakan material alam yang membutuhkan waktu cukup lama dalam degradasi dan konversi dibandingkan material berbahan dasar pati (Binoto, dkk., 2009). Pada proses penggilingan tebu, terdapat lima kali proses penggilingan dari batang tebu sampai dihasilkan bagas tebu. Komposisi kimia bagas tebu diantaranya karbon (C) 23,7%, hidrogen (H) 2%, oksigen (O) 20%, air (H₂O) 50% dan gula 3%. Bagas tebu mengandung kadar air sekitar 46-52%, kadar serat 43-52% dan padatan terlarut sekitar 2-6% (Andriyanti, 2012).



Gambar 2.2 Bagas Tebu

Bagas tebu merupakan bahan berlignoselulosa yang umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin. Adanya senyawa pengikat lignin menyebabkan bahan-

bahan lignoselulosa sulit untuk diuraikan secara alami (Orchidea, dkk., 2010). Kandungan polisakarida dalam bagas tebu mencapai lebih dari 70% yang terdiri atas selulosa 50-55%, hemiselulosa 15-20% dan lignin 20-30% (Baarri dan Fawaid, 2013). Beberapa jenis limbah lignoselulosik dengan kandungan hemiselulosa disajikan dalam tabel 2.1 sebagai berikut.

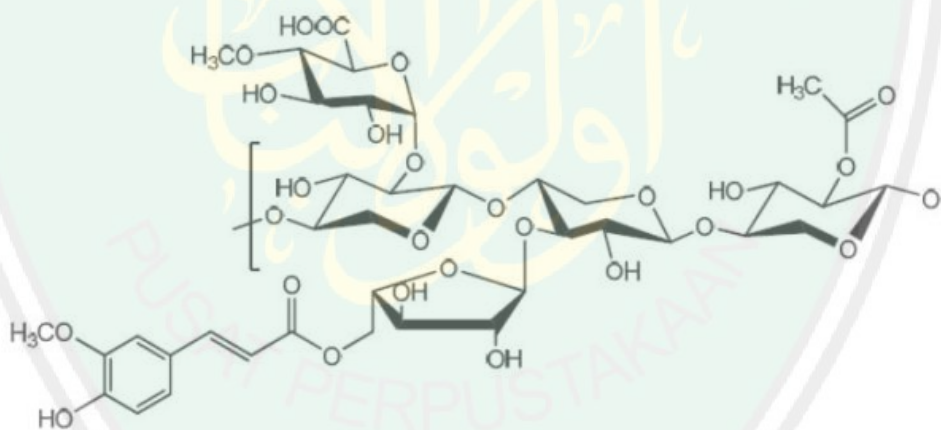
Tabel 2.1 Kandungan Hemiselulosa Limbah Lignoselulosik

Jenis Limbah	Hemiselulosa (%)
Tongkol jagung	36% (Resita, 2006)
Bagas tebu	27,97% (Faisal, 2008)
Serabut kelapa sawit	24% (Faisal, 2008)
Jerami padi	22% (Septiningrum dan Apriana, 2011)
Dedak padi	16,94% (Faisal, 2008)
Kulit biji kapas	10,2% (Septiningrum dan Apriana, 2011)

Hemiselulosa merupakan karbohidrat dengan berat molekul lebih rendah daripada selulosa dan tersusun atas satuan-satuan gula pentosa dan heksosa. Hemiselulosa yang terdapat pada limbah pertanian umumnya mengandung hetero-1-4- β -D-xilan (arabino-4-O-metilglukoronoxilan) dan hetero-1-4- β -D-manan (galaktoglukomanan dan glukomanan) (Muawanah, 2006). Bagas tebu mengandung xilan sebesar 35% yang berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber karbon dalam media fermentasi untuk penghasil enzim ekstraseluler, yaitu enzim xilanase. Penggunaan sumber karbon dari bagas tebu pada media untuk memproduksi enzim xilanase berkontribusi dalam menurunkan biaya produksi enzim (Fitriani, dkk., 2013).

2.3 Xilan

Xilan merupakan komponen terbesar penyusun hemiselulosa dinding sel tanaman dan termasuk dalam jenis polisakarida paling berlimpah kedua setelah selulosa yang menyusun struktur dinding sel tumbuhan (Nareswari, 2007). Di dalam dinding sel, xilan berada diantara lignin dan kumpulan serat selulosa. Kandungan xilan dapat mencapai sekitar 30-35% dari total berat kering tumbuhan (Beg, *et al.*, 2001). Xilan mempunyai struktur yang tersusun atas kerangka dasar residu 1,4-D-xilopiranosil (gula pereduksi dengan lima atom karbon) dengan rantai samping yang tersubstitusi dengan gugus asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan α -arabinofuranosil (Habibi dan Vignon, 2005 dalam Kurrataa'yun, 2014).



Gambar 2.3 Struktur Xilan (Guo, dkk., 2011)

Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa. Xilan akan dihidrolisis menjadi xilosa dengan bantuan enzim xilanase. Xilosa termasuk dalam kelompok gula pentosa. Polimer xilosa adalah komponen paling banyak terdapat dalam hemiselulosa tanaman. Hemiselulosa xilan merupakan xilosa yang berikatan β -1,4 dengan jumlah monomer 150-200 unit. Komponen monomer hemiselulosa dapat diklasifikasikan dalam beberapa kelompok, diantaranya (Wenzl, 1990):

1. Xilan, yaitu hemiselulosa dengan monomer penyusun terdiri atas β -D-xilanopiranososa
2. Glukomanan, yaitu hemiselulosa dengan monomer penyusun terdiri atas β -D-glukopiranososa dan β -D-manopiranososa
3. Arabinoglaktan, yaitu hemiselulosa dengan monomer penyusun terdiri dari β -D-galaktopiranososa dan L-arabinosa

2.4 Enzim Xilanase

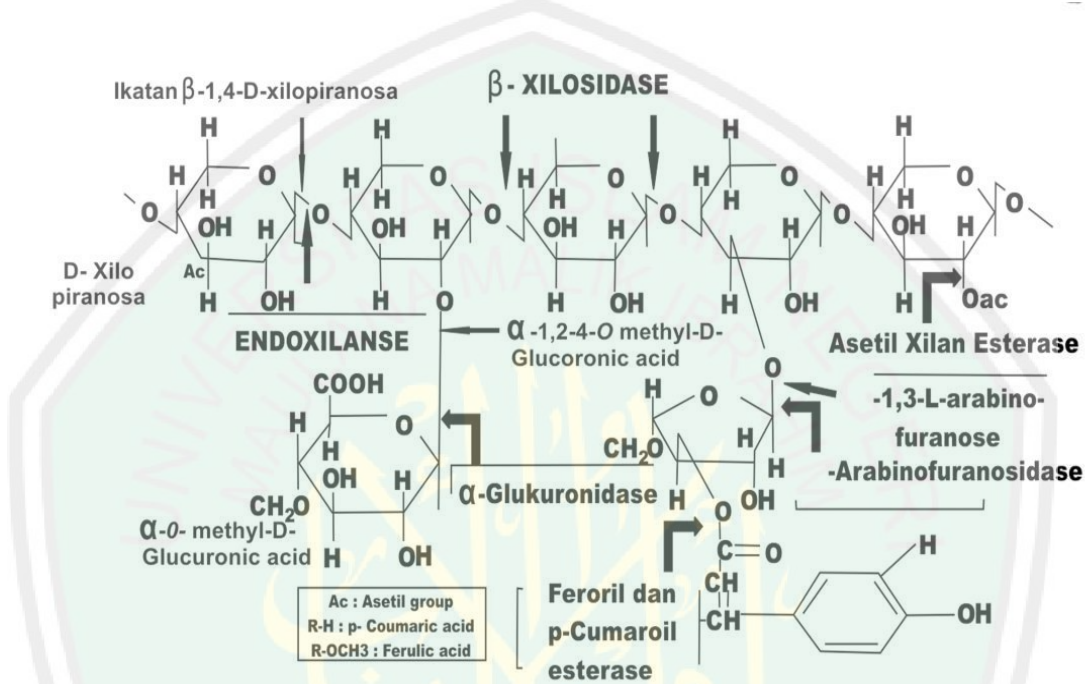
2.4.1 Definisi

Xilanase merupakan protein khas dengan berat molekul antara 15.000 – 30.000 Dalton yang berperan sebagai katalis hayati dalam berbagai reaksi biokimia (Muawanah, 2006). Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang berperan dalam menghidrolisis xilan. Xilanase disekresikan dalam media yang mengandung xilan murni atau residu xilan. Induksi xilanase dapat dipicu oleh komponen lignoselulosa seperti dedak gandum, dedak padi, tongkol jagung dan bagas tebu. Sistem enzim xilanolitik terdiri atas β -1,4-endoxilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glukoronidase, asetil xilan esterase, dan asam fenolat esterase (Beg, *et al.*, 2001).

Berdasarkan substrat yang dihidrolisis, xilanase dapat diklasifikasikan menjadi β -xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase. β -xilosidase mampu menghidrolisis rantai pendek xilo-oligosakarida menjadi xilosa. Eksoxilanase mampu menghidrolisis rantai polimer xilan pada ujung reduksi sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai

pendek. Dan endoxilanas memiliki kemampuan memutus ikatan β -1,4 pada deretan rantai xilan secara teratur (Richana, 2002).

2.4.2 Struktur Kimia Xilanase



Gambar 2.4 Struktur Kimia Xilanase (Beg, *et al.*, 2001)

Reaksi hidrolisis xilan oleh enzim xilanase terjadi pada situs aktif xilanase. Xilanase memiliki situs aktif yang terdiri dari situs pengikatan substrat dan golongan katalitik. Golongan katalitik terdiri dari residu asam amino yang menyusun situs pengikatan substrat. Asam amino penyusun situs katalitik xilanase adalah dua molekul glutamat, dan dapat pula ditemukan terdiri dari satu molekul glutamat dan satu molekul aspartat (Biely, 2003 dalam Prima, 2012).

2.4.3 Biosintesis Xilanase

Xilanase dapat dihasilkan secara konstitutif maupun inducibel. Secara konstitutif jika xilanase diproduksi oleh mikroorganisme dalam jumlah sedikit dan konstan tanpa memperdulikan komposisi media produksi. Secara inducibel jika xilanase diproduksi oleh mikroorganisme dalam kondisi tertentu apabila terdapat inducer dalam media produksi. Hasil hidrolisis xilan, seperti xilo-oligosakarida dan xilosa masuk ke dalam sel mikroorganisme dan menginduksi sintesis xilanase inducibel dalam jumlah besar (Kulkarno dkk., 1999 dalam Prima, 2012).

Produksi enzim xilanase oleh bakteri dapat dilakukan melalui proses fermentasi pada media cair. Fermentasi media cair memiliki beberapa keuntungan diantaranya komposisi dan konsentrasi medium yang dapat diatur dengan mudah, penyebaran nutrisi lebih merata (Richana, 2007). Annamalai, dkk., (2009) melaporkan bahwa penggunaan substrat cair dalam proses fermentasi oleh *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari perairan marine dapat menghasilkan xilanase.

Enzim xilanase sebagian besar merupakan enzim ekstraseluler sehingga proses pemisahannya dari sel mikroba lebih mudah jika dibandingkan dengan enzim intraseluler dan dapat dilakukan tanpa proses pemecahan dinding sel. Pelepasan enzim dari dinding sel atau sisa polimer substrat umumnya dilakukan dengan cara menambahkan senyawa kimia yang bersifat detergen, seperti Triton-x 100, sodium sulfat dan Tween ke dalam pelarut yang digunakan untuk mengekstrak enzim. Penggunaan pelarut untuk mengekstrak enzim hanya digunakan pada media fermentasi media padat, sedangkan pada fermentasi cair tidak diperlukan (Muawanah, 2006).

2.4.4 Pemanfaatan Enzim Xilanase

Enzim xilanase merupakan produk bioteknologi yang mempunyai manfaat yang luas baik dalam industri pangan maupun non-pangan. Beberapa manfaat enzim xilanase sebagai berikut.

1. Pembuatan Gula Xilosa

Dalam pembuatan gula xilosa, xilanase dimanfaatkan sebagai enzim penghidrolisis xilan menjadi gula xilosa. Gula xilosa banyak digunakan sebagai pemanis dalam produksi permen karet, dan campuran formula pasta gigi yang berfungsi memperkuat gigi. Kristal xilosa dapat dikonversi menjadi xilitol ($C_5H_{12}O_5$) yang dimanfaatkan sebagai pemanis alami yang bersifat non-kariogenik, yaitu dapat melindungi gigi dari kerusakan seperti karies gigi dikarenakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Selain itu xilitol mempunyai nilai indeks glikemik yang rendah, sehingga dapat dijadikan sebagai gula alternatif bagi penderita diabetes mellitus (Faisal, 2008). Selain itu gula xilosa dilaporkan dapat mengurangi infeksi pada telinga, sinusitis dan osteoporosis (Kontiokari, et al, 1995 dalam Faisal, 2008).

2. Produksi Xilo-oligosakarida

Produksi xilooligosakarida dari xilan dilakukan dengan hidrolisis secara enzimatik oleh mikroorganisme tertentu. Xilooligosakarida adalah oligomer-oligomer gula dari unit xilosa dengan derajat polimerisasi 2 hingga 20. Produk hidrolisis xilan ini telah banyak dikembangkan sebagai zat pemanis pada makanan maupun minuman, sebagai komponen prebiotik penstimulasi metabolisme *Bifidobacteria* sebagai flora normal sistem pencernaan manusia dan *dietary fiber*

(Yang, *et al.*, 2005). Hasil penelitian Naomi (2006) ketiga isolat *Streptomyces* sp. mampu tumbuh dan menghasilkan xilanase ekstraseluler pada media xilan tongkol jagung. Xilanase yang dihasilkan ketiga isolat *Streptomyces* sp. mampu menghidrolisis xilan menjadi fraksi-fraksi penyusun xilan diantaranya xilooligosakarida rantai pendek dan rantai panjang.

3. Biokonversi Limbah Pertanian

Salah satu sasaran dalam pengembangan bioteknologi yaitu pemanfaatan mikroba dalam biokonversi limbah. Limbah pertanian selama ini umumnya digunakan sebagai bahan pakan ternak dan bahan bakar tradisional. Hal ini dinilai kurang tepat karena penggunaan limbah pertanian mengandung serat hemiselulosa yang mempunyai nilai cerna yang rendah pada hewan ternak dan jika digunakan sebagai bahan bakar tradisional dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Limbah pertanian yang mengandung komponen utama lignoselulosa diharapkan dapat digunakan sebagai sumber karbon mikroorganisme penghasil xilanase. Saleem, *et al.*, (2002) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu mengkonversi dedak gandum, dedak padi dan bagas tebu menjadi xilosa dengan memproduksi enzim xilanase pada media. Susilowati, dkk., (2012) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa sekam padi dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon pada media produksi xilanase oleh bakteri *Pseudomonas* sp. yang diisolasi dari sumber air panas Sonai Sulawesi Tenggara.

4. Pemutih dalam Industri Kertas dan Textil

Penggunaan xilanase dalam industri kertas dan textile sebagai bahan pemutih merupakan suatu alternatif teknologi yang ramah lingkungan. Xilanase

dapat memberikan dampak positif terhadap kelestarian lingkungan dengan menggantikan atau mengurangi jumlah khlor yang selama ini banyak digunakan sebagai pemutih. Pada proses bleaching, xilanase digunakan untuk menghilangkan hemiselulosa yang menyebabkan warna cokelat. Penggunaan khlor sebagai bahan pemutih menghasilkan limbah yang mengandung khlor organik berupa dioksin dan furan yang berbahaya dan beracun bagi manusia dan lingkungan sekitar (Richana, 2002). Dalam proses pembuatan kertas diperlukan xilanase yang bersifat termostabil dan tahan pada pH basa (Nareswari, 2007).

Dalam proses pemutih kertas, xilanase berfungsi sebagai fasilitator proses pemutihan, yang berarti enzim tersebut tidak memutihkan tetapi mempermudah proses pemutihan dengan memodifikasi struktur serat sehingga bahan kimia pemutih lebih mudah masuk. Xilanase memecahkan ikatan xylose-xylose dalam rantai xilan sehingga menyebabkan terputusnya ikatan antara sisa lignin dengan karbohidrat. Dengan demikian, ikatan kompleks lignin-karbohidrat yaitu ikatan-ikatan xilan pada sisi lignin menjadi mudah untuk dihilangkan pada tahapan pemutihan selanjutnya (Tjahjono dan Sudarmin, 2008).

5. Pemanfaatan Xilanase pada Makanan Ternak

Nutrisi pakan merupakan salah satu unsur penting dalam menunjang kesehatan, pertumbuhan dan reproduksi ternak. pemenuhan kebutuhan pakan ternak umumnya memanfaatkan rumput ataupun hijauan yang mengandung serat kasar yang relatif lebih banyak. Faktor penting yang harus dipenuhi bahan pakan adalah nutrisi yang dapat dicerna dalam saluran pencernaan hewan ternak. Richana (2002) menjelaskan bahwa pemanfaatan xilanase dari *Trichoderma*

logibrachiatum sebagai campuran pakan ayam boiler dapat mengurangi viskositas pencernaan sehingga meningkatkan berat badan dan efisiensi konversi pakan.

6. Industri Makanan dan Minuman

Xilanase dapat digunakan sebagai bahan penjernih jus, ekstraksi kopi, minyak nabati, pati dan flavor. Kombinasi xilanase dengan selulase atau pektinase dapat digunakan untuk penjernihan jus dan likuifikasi buah dan sayuran (Setyawati, 2006).

7. Peningkatan Kualitas Roti

Jika xilanase ditambahkan dalam adonan roti dapat menghasilkan kenaikan volume roti. Jika digunakan untuk meningkatkan kualitas roti maka perlu dilakukan kombinasi penambahan amylase dan xilanase (Setyawati, 2006).

2.4.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Xilanase

Penyediaan kondisi fisik untuk mendukung pertumbuhan optimum kultur mikroba sangat diperlukan. Hal ini dikarenakan respon yang berbeda dari mikroba terhadap kondisi fisik di lingkungannya yang akan mempengaruhi metabolismenya. Kombinasi nutrisi dan lingkungan fisik yang sesuai dapat meningkatkan keberhasilan kultur berbagai tipe mikroba (Pelczar dan Chan, 1986). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi produksi xilanase diantaranya:

1. Substrat

Pemilihan jenis dan konsentrasi substrat dalam media merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan produksi xilanase. Dalam produksi xilanase, substrat tidak hanya sebagai sumber karbon dan sumber energi tetapi juga sebagai prekursor dan penginduksi bagi mikroorganisme dalam

mensintesis protein enzim xilanase (Oktarina, 2008). Jenis substrat yang digunakan dalam komposisi media fermentasi dapat sederhana atau kompleks bergantung pada jenis mikroba yang digunakan. Substrat sebagai senyawa penginduksi dapat berupa substrat murni (xilan xilooligosakarida) atau juga dapat berupa bahan berlignoselulosa alami yang memiliki kandungan hemiselulosa (Muawanah, 2006). Enzim memiliki spesivitas sangat tinggi terhadap substratnya. Penggunaan substrat yang berbeda dalam media dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba sehingga menyebabkan perbedaan produksi enzim (Agustine, 2005).

2. Suhu

Suhu dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang berakibat pada proses produksi enzim. Hal ini dikarenakan enzim merupakan serangkaian asam amino yang konformasinya berkaitan erat dengan suhu lingkungannya. Aktivitas tertinggi enzim akan dicapai apabila direaksikan pada suhu optimum. Reaksi enzimatik yang terjadi di bawah suhu optimum akan menyebabkan kakunya struktur protein, sehingga digesti substrat tidak optimal dan menyebabkan aktivitas menurun. Dan jika direaksikan di atas suhu optimum dapat menyebabkan rusaknya struktur lipatan protein oleh akibat denaturasi dan menyebabkan aktivitas enzim mengalami penurunan (Prima, 2012). Menurut Gessesse dan Mamo (1997) suhu optimum dalam produksi xilanase setara dengan suhu optimum pertumbuhan mikroba.

3. Derajat Keasaman (pH)

Kondisi pH sangat menentukan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Pada kondisi keasaman di bawah atau di atas pH optimum dapat mempengaruhi enzim yang dihasilkan. Interaksi ionik yang terjadi dalam struktur enzim akan mempengaruhi stabilitasnya dan menyebabkan enzim memungkinkan untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya (Nelson dan Cox, 2005). Hal ini dikarenakan enzim merupakan molekul protein yang mempunyai sifat mudah terdenaturasi oleh pH dan dapat menyebabkan sisi aktif enzim tidak dapat bereaksi dengan substrat (Susilowati, dkk., 2012).

4. Waktu Inkubasi

Waktu inkubasi optimum dalam produksi enzim pada setiap mikroorganisme berbeda-beda. Pada umumnya produksi enzim tertinggi dihasilkan pada fase logaritmik/eksponensial pada kurva pertumbuhan mikroba (Brock, *et al.*, 2004). Pertumbuhan mikroorganisme sangat berpengaruh terhadap produksi enzim. Pertumbuhan mikroorganisme yang semakin cepat menyebabkan peningkatan produksi enzim. Sedangkan penurunan produksi enzim disebabkan oleh karena pertumbuhan sel yang mengalami penurunan setelah melewati fase stasioner. Selain itu sel mikroba yang mati akan mengalami lisis dan akan melepaskan protease endogenous yang akan menghidrolisis enzim (Agustine, 2005).

Produksi xilanase dapat mengalami penurunan karena adanya akumulasi gula terlarut pada media kultur. Akumulasi pentose bersama dengan turunnya aktivitas xilanase selama pertumbuhan pada konsentrasi media xilan yang semakin

meningkat menunjukkan bahwa gula-gula mempengaruhi regulasi enzim (Oktarina, 2008).

5. Kadar Air Media Fermentasi

Keberadaan air pada media merupakan hal yang sangat penting dan berpengaruh terhadap aktivitas dan produksi xilanase. Mikroba penghasil enzim dapat tumbuh dan mensintesis xilanase pada media dengan kadar air yang optimum. Secara umum bakteri dan yeast dapat tumbuh dengan baik pada kadar air yang lebih tinggi daripada kapang (Muawanah, 2006).

6. Aerasi

Aerasi berfungsi untuk mempertahankan kondisi aerobik dan mengatur temperatur substrat agar tetap konstan. Kondisi aerobik dapat dikontrol dengan mengatur tingkat oksigen yang dibutuhkan untuk mensintesis jumlah produk, jumlah panas metabolik yang harus dihilangkan dari bahan, ketebalan lapisan substrat, tingkat CO₂ dan metabolit-metabolit lain yang mudah menguap harus dihilangkan dan tingkat ruang udara yang tersedia dalam substrat (Richana, 2000).

Aerasi pada proses fermentasi biasanya dilakukan dengan agitasi pada *shaker incubator*. Hal ini akan mempermudah proses difusi oksigen ke dalam medium sehingga kontak antara media dan inokulum semakin banyak dan homogeni. Jika difusi oksigen dalam medium berlangsung dengan baik, kadar oksigen terlarut dalam medium akan cukup mendukung pertumbuhan sel mikroba secara aerobik (Pangesti, dkk., 2012). Menurut Richana (2007), agitasi bakteri alkalo-termofilik yang optimum untuk menghasilkan xilanase berkisar 150-200 rpm.

7. Penambahan Senyawa Nitrogen

Penambahan senyawa nutrisi merupakan faktor penting dalam produksi enzim xilanase. Penambahan nutrisi dikarenakan keberadaan nitrogen dan nutrient esensial lain (asam amino dan vitamin) dalam bahan lignoselulosa sangat rendah. Sumber nitrogen dapat berasal dari nitrogen organik maupun anorganik. Garam ammonium sulfat merupakan nitrogen anorganik yang umum digunakan dalam produksi xilanase. Sedangkan nitrogen organik yang umum digunakan dapat berupa pepton, *yeast extract*, dan limbah pertanian yang mengandung nitrogen. Hasil penelitian Haltrich *et al*, (1994) dalam Muawanah (2006) menjelaskan bahwa bahwa produksi enzim xilanase oleh *Streptomyces commune* dengan menggunakan *yeast extract* dengan konsentrasi dinaikkan dari 45 menjadi 90 g/l pada media cair menghasilkan xilanase dua kali lipat dari sebelumnya.

2.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase

Penentuan besarnya produksi enzim xilanase yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat diketahui dengan menentukan besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan. Metode kuantitatif yang umumnya digunakan dalam uji aktivitas enzim xilanase adalah pengukuran kadar gula tereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisa enzim terhadap substrat. Menurut Muawanah (2006) terdapat dua metode yang dapat digunakan dalam uji kuantitatif kadar gula tereduksi diantaranya yaitu metode *dinitrosalicylic acid* (DNS) (Miller, 1959) dan metode Somogy-Nelson (Somogy, 1952). Metode Somogy-Nelson memiliki beberapa kekurangan dalam perlakuan analisis dalam jangka waktu yang lebih lama dan

rumit dengan tingkat bahaya racun yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode DNS. Namun demikian, metode DNS memiliki tingkat kepekaan terhadap warna yang lebih rendah dibandingkan Somogy-Nelson, terutama jika konsentrasi gula dalam sampel yang rendah. Tingkat kepekaan tinggi dalam metode ini dapat diperoleh jika hasil yang diperoleh menggambarkan hubungan linier antara gula pereduksi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi tertentu.

Hasil penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa metode DNS lebih bersifat *reproducible* dalam menganalisa kadar gula dalam suatu sampel. Jeffries (1998) dalam Muawanah (2006) menjelaskan pula bahwa hasil perbandingan kromatografi kedua metode tersebut berbeda nyata. Metode DNS memberikan aktivitas spesifik yang tinggi, sedangkan metode Somogy-Nelson memberikan hasil yang rendah. Hal ini dapat disebabkan senyawa arsenomolibdat dalam reagen Somogy-Nelson hanya bereaksi dengan xilosa namun kurang reaktif terhadap xilooligosakarida dan xilosa, Sedangkan dalam metode DNS, reagen yang digunakan lebih bersifat reaktif terhadap xilooligosakarida dan xilosa.

Prinsip uji aktivitas xilanase dengan metode 2,4-dinitrosalicylic acid (DNS) didasarkan pada kadar xilosa yang dihasilkan dari substrat xilan pada reaksi enzimatis yang dapat dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C. Reagen DNS yang terdiri atas K-Na Tartrat akan bereaksi dengan xilosa hasil reaksi enzimatis dan membentuk kompleks berwarna orange hingga kecokelatan (Kumala, dkk, 2006).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian deskriptif kualitatif yang bersifat eksperimental laboratorik, yaitu untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (Notoatmojo, 2002). Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor perlakuan dan 3 kali ulangan.

- a. Faktor perlakuan pertama adalah lama inkubasi (L) yang terdiri dari:

$L_1 = 10$ jam

$L_2 = 12$ jam

$L_3 = 14$ jam

$L_4 = 16$ jam

- b. Faktor kedua adalah konsentrasi substrat bagas tebu (A) yang terdiri dari:

$A_1 = 1\%$

$A_2 = 1,5\%$

$A_3 = 2\%$

$A_4 = 2,5\%$

Berdasarkan kedua faktor tersebut maka dalam penelitian ini terdapat 16 kombinasi perlakuan seperti pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan

A L	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
L ₁	L ₁ A ₁	L ₁ A ₂	L ₁ A ₃	L ₁ A ₄
L ₂	L ₂ A ₁	L ₂ A ₂	L ₂ A ₃	L ₂ A ₄
L ₃	L ₃ A ₁	L ₃ A ₂	L ₃ A ₃	L ₃ A ₄
L ₄	L ₄ A ₁	L ₄ A ₂	L ₄ A ₃	L ₄ A ₄

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 - Agustus 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari 3 macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama inkubasi (10; 12; 14 dan 16 jam) dan konsentrasi substrat bagas tebu (1%; 1,5%; 2% dan 2,5%)

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang merupakan variabel yang diukur yaitu produksi xilanase oleh *Bacillus subtilis* dengan menghitung aktivitas enzim yang dihasilkan

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini meliputi pH, suhu inkubasi, inokulum *Bacillus subtilis*, konsentrasi nutrisi

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: oven, blender, ayakan 60 Mesh, neraca analitik, inkubator, *shaker incubator*, tabung reaksi, cawan petri, labu Erlenmeyer, *beaker glass*, *magnetic stirrer*, jarum ose, sentrifuge, mikrotube, tabungreaksi, *Laminar Air Flow* (LAF), autoklaf, Bunsen burner, mikropipet dan tip, Mikroskop, *deck glass*, *object glass*, batang pengaduk, kuvet, spektrofotometer, vortex, kertas saring, waterbath, kertas pH, pH meter, corong gelas, lemari pendingin, dan korek api.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: isolat *Bacillus subtilis* yang merupakan kultur koleksi dari Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, bagas tebu yang didapatkan dari pabrik gula Kebonagung Malang, NA, NB, NaOH 6%, *yeast extract*, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , xilan, sucrose, alkohol 70%, aquades, pereaksi

DNS, KNa-Tartat 40%, buffer phosphat (pH 7.0), spiritus, alumunium foil, *plastic wrap*, kertas label, kapas steril, karet dan tissue.

3.5 Prosedur Kerja

Prosedur dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan

Semua alat dicuci bersih dan dikeringkan dalam oven. Peralatan gelas dibungkus kertas sampul dan alumunium foil. Semua alat yang telah dibungkus dimasukkan dalam plastik dan disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media NA dan NB

Sebanyak 20 g NA powder dilarutkan dalam 1 liter aquades dan dihomogenkan di atas *hotplate stirrer*. Dan sebanyak 8 g NB powder dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dihomogenkan di atas *hotplate stirrer*. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Prima, 2012).

3.5.3 Peremajaan Isolat *Bacillus subtilis*

Sebanyak 1 ose isolat bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasikan dalam 20 ml media NB dan diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan inokulasi dengan metode streak pada media NA miring sebagai *stock culture* dan pada cawan petri berisi media NA sebagai kultur kerja (*working culture*) (Irfan, *et al.*, 2015).

3.5.4 Identifikasi Isolat *Bacillus subtilis*

Identifikasi *Bacillus subtilis* dilakukan dengan pengamatan morfologi baik secara makroskopis maupun mikroskopis dan uji aktivitas biokimia. Pengamatan morfologi bakteri secara makroskopis meliputi bentuk koloni, permukaan koloni dan warna koloni, dilakukan menurut metode Gandjar *et al.*, (1992). Sedangkan pengamatan morfologi secara mikroskopis dilakukan dengan uji pewarnaan gram dan uji endospora, sedangkan uji aktivitas biokimia dilakukan dengan pengujian katalase menurut metode Fardiaz (1987).

3.5.5 Persiapan Bahan Baku Bagas Tebu

Sebanyak 1 kg bagas tebu dicuci bersih dan direndam dengan air selama 15 menit. Bagas tebu dikeringanginkan dengan cara diangin-anginkan dan dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Bagas tebu dihaluskan dengan diblender dan disaring dengan ayakan 60 Mesh hingga diperoleh serbuk halus yang digunakan sebagai bahan baku substrat pembuatan enzim (Septiningrum dan Chandra, 2011).

3.5.6 Delignifikasi Bahan Baku Bagas Tebu

Tahap delignifikasi dilakukan untuk menghasilkan bagas tebu dengan kadar lignin yang lebih rendah dengan memutuskan ikatan kovalen antar komponen lignoselulosa yang meliputi lignin, selulosa dan hemiselulosa. Proses delignifikasi dilakukan dengan cara merendam bubuk bagas tebu sebanyak 200 g dimasukkan dalam Erlenmeyer 1 L dan ditambahkan larutan NaOH 6% dengan perbandingan (1:5) selama 12 jam pada suhu ruang. Selanjutnya sampel dibilas dengan aquades hingga didapatkan pH netral 7.0 dan disaring dengan menggunakan kertas saring.

Substrat padatan dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C selama 6 jam (Gunam dkk, 2011).

3.5.7 Hidrolisis Hemiselulosa Metode Asidifikasi

Padatan kering bagas tebu hasil delignifikasi direndam dalam larutan NaOH 10% selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan filtrat yang didapatkan ditampung dan diukur pH untuk selanjutnya diasamkan dengan HCl 6N hingga berwarna cokelat susu dengan pH 4,5-5,0. Warna cokelat diduga berasal dari reaksi kimia antara gula dan asam amino pada substrat yang dikenal dengan reaksi *browning*. Dalam reaksi tersebut gugus amino dari protein akan bereaksi dengan gugus aldehida gula pereduksi sehingga menyebabkan munculnya warna cokelat susu. Kemudian filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit untuk memisahkan endapan (xilan) dan cairan (supernatan). Xilan yang didapatkan selanjutnya didispersikan dalam etanol dengan perbandingan etanol dan filtrat yaitu 2:1. Dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Selanjutnya dilakukan uji identifikasi xilan secara kualitatif dengan menambahkan iodium. Suatu bahan mengandung xilan akan berwarna biru jika direaksikan dengan iodium (I_2). Xilan termasuk dalam polisakarida yang mempunyai rantai melingkar (heliks) jika direaksikan dengan iodium akan membentuk rantai poliiodida yang menyebabkan munculnya warna biru (Anggraini, 2003).

3.5.8 Pembuatan Media Produksi

Media produksi merupakan media pertumbuhan yang ditambah dengan xilan sebagai sumber nutrisi karbon. Komposisi media cair alkali untuk satu liter adalah 0,5 g *yeast extract*; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,16 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (Irfan, 2012 dengan modifikasi). Penggunaan bagas tebu sebagai sumber karbon dengan variasi konsentrasi 1%; 1,5%; 2% dan 2,5%.

3.5.9 Produksi Enzim Xilanase

Sebanyak 1 ml inokulum diambil dan diinokulasikan dalam 10 ml media produksi yang mengandung substrat bagas tebu dengan variasi konsentrasi 1%; 1,5%; 2% dan 2,5% dan diatur pH medium 6.5 dengan NaOH 0,1 N. Selanjutnya kultur diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 140 rpm. Pengukuran aktivitas enzim xilanase dilakukan pada lama inkubasi 10, 12, 14 dan 16 jam (Fawzya, *et al.*, 2013). Enzim kasar diperoleh dari supernatant hasil sentrifugasi kultur dengan kecepatan 6.000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Enzim xilanase kasar (*crude*) selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode DNS (Rahayu, 2008).

3.5.10 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase Metode DNS

Pengukuran aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan metode Miller (1959) yang telah dimodifikasi. Aktivitas enzim xilanase dapat diketahui dengan mengukur kadar gula pereduksinya. Pengukuran aktivitas xilanase dilakukan dengan menambahkan 0,5 ml xilan 1% dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml ekstrak enzim xilanase kasar dan dilarutkan dalam 1 ml 0,2 M buffer phosphate (pH 7.0) dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 30 menit. Selanjutnya diambil 1

ml total substrat-enzim dan diencerkan dengan 9 ml akuades. Sebanyak 1 ml sampel hasil pengenceran ditambahkan 1,5 ml reagen DNS untuk menghentikan reaksi dan dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu 100°C selama 10 menit dan selanjutnya ditambahkan 1 ml KNa-Tartrat 40% dan didinginkan dengan air mengalir. Kemudian ditambahkan 6,5 ml aquades hingga volume 10 ml. Selanjutnya dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Sampel merupakan reaksi antara campuran substrat xilan 0,5% dengan ekstrak kasar enzim dengan perlakuan inkubasi, yang kemudian ditambahkan reagen DNS. Kontrol merupakan campuran antara substrat dan enzim tanpa diinkubasi yang kemudian ditambahkan reagen DNS. Dan blanko merupakan campuran antara substrat, reagen DNS dan akuades, tanpa ditambahkan ekstrak kasar enzim (Purwanti, 2016).

Aktivitas enzim xilanase dinyatakan dalam satuan internasional U/ml. Satu unit merupakan jumlah total enzim yang dibutuhkan untuk menghidolisis xilan menjadi 1 μ mol gula pereduksi (xilosa) per menit pada kondisi pengujian tertentu (Prima, 2012). Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh berdasarkan konsentrasi xilosa standar, dan kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Mukminin, 2014):

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{C_{\text{xilosa}}}{BM_{\text{xilosa}} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan:

C_{xilosa} : Konsentrasi xilosa produk (ppm)

BM_{xilosa} : Berat Molekul xilosa (150.1 mg/mmol)

- t : Waktu inkubasi reaksi enzim (menit)
- H : Volume enzim-substrat (ml)
- E : Volume enzim yang ditambahkan (ml)

3.5.11 Pembuatan Kurva Standar Xilosa Metode DNS

Larutan standar xilosa 5000 ppm dibuat dengan menimbang 0,5 g xilosa, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat deret larutan standar xilosa berikutnya dengan variasi konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Larutan induk xilosa 5000 ppm dipipet sebanyak 0 : 20 : 40 : 60 : 80 : 100 ml, selanjutnya masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas (Purwanti, 2015). Sebanyak 1 ml masing-masing larutan standar xilosa ditambahkan 1 ml pereaksi DNS dan dihomogenkan. Tabung kemudian ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit hingga berwarna merah-kecokelatan. Ditambahkan 1 ml larutan KNa Tartat 40%. Tabung didinginkan dengan air mengalir dan ditambahkan aquades hingga volume menjadi 10 ml dan dihomogenkan. Kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 550 nm (Setyawati, 2006).

3.6 Analisa Data

Data hasil pengujian pengaruh pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi substrat terhadap produksi xilanase dianalisa dengan secara statistik dengan menggunakan *Two-Way ANOVA*. Apabila terdapat perlakuan kombinasi yang berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* (uji lanjutan beda nyata terkecil atau *Least Signifikan Different*) untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar perlakuan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions (SPSS) for Microsoft Windows release 1.6* dan $p < 0.05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikasinya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

Berdasarkan hasil *Analysis of Varian* (ANOVA) yang disajikan pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa kombinasi lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.

Tabel 4.1 Hasil ANOVA Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

Sumber	df	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel 5%}
Corrected Model	15	22,762	1,518	127,196	1,97
Intercept	1	599,918	599,918	5,028	4,15
Konsentrasi Substrat	3	11,220	3,740	313,479	2,90
Lama Inkubasi	3	6,962	2,321	194,508	2,90
Konsentrasi Substrat*Lama Inkubasi	9	4,581	0,509	42,664*	2,19
Error	32	0,382	0,012		
Total	48	623,063			
Corrected Total	47	23,145			

Keterangan: (*) $F_{hitung} > F_{tabel}$ 5% menunjukkan adanya pengaruh nyata

Hasil analisa statistik pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa nilai F_{hitung} (42,664) > $F_{tabel5\%}$ (2,19) yang berarti bahwa terdapat pengaruh kombinasi lama inkubasi dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. Untuk mengetahui perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) yang memberikan pengaruh tertinggi terhadap aktivitas enzim xilanase, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Duncan atau DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) dengan taraf signifikansi 5%. Hasil uji Duncan untuk perbedaan antar perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada beberapa perlakuan dan tidak berbeda nyata pada beberapa perlakuan tertentu sebagaimana disajikan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Uji DMRT Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

No	Perlakuan	Aktivitas Enzim (U/ml)
1	L ₁ A ₁	2,67 ^a
2	L ₂ A ₁	2,84 ^{ab}
3	L ₃ A ₁	2,90 ^b
4	L ₄ A ₁	3,15 ^{cd}
5	L ₁ A ₂	2,82 ^{ab}
6	L ₂ A ₂	3,32 ^{cde}
7	L ₃ A ₂	3,36 ^{de}
8	L ₄ A ₂	3,75 ^f
9	L ₁ A ₃	3,12 ^c
10	L ₂ A ₃	3,43 ^{cde}
11	L ₃ A ₃	4,12 ^g
12	L ₄ A ₃	4,34 ^h
13	L ₁ A ₄	3,42 ^e
14	L ₂ A ₄	3,79 ^f
15	L ₃ A ₄	5,43 ⁱ
16	L ₄ A ₄	4,10 ^g

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan pengaruh antar perlakuan terhadap aktivitas enzim. Sedangkan notasi yang sama menunjukkan bahwa antar perlakuan terdapat pengaruh yang sama, artinya dua atau lebih perlakuan dengan notasi yang sama memberikan pengaruh yang sama besarnya terhadap aktivitas enzim. Aktivitas enzim xilanase tertinggi oleh *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada perlakuan

interaksi lama inkubasi 14 jam dan konsentrasi substrat 2,5% dengan nilai aktivitas enzim xilanase terbesar 5,43 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim xilanase terendah ditunjukkan pada interaksi perlakuan lama inkubasi 10 jam dan konsentrasi substrat 1% dengan nilai aktivitas enzim sebesar 2,67 U/ml. Semakin tinggi konsentrasi substrat dan semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas enzim yang dihasilkan semakin besar, namun pada batas tertentu penambahan konsentrasi substrat dan lama inkubasi tidak dapat meningkatkan aktivitas enzim yang dihasilkan. Menurut Bansal, *et al.*, (2012), *Bacillus subtilis* mempunyai fase logatirmik/eksponensial dimulai setelah 2 jam inubasi hingga 72 jam (bergantung pada adaptabilitas tiap strain) pada suhu 37°C pH 8, dan didapatkan aktivitas xilanase paling tinggi sebesar 5,9 U/ml.

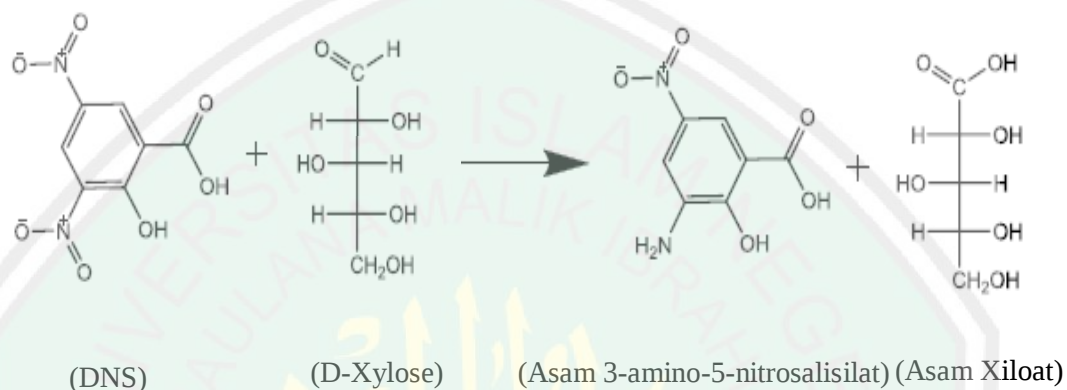
Fermentasi *Bacillus subtilis* pada substrat xilan bagas tebu untuk memproduksi xilanase dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi media cair pada suhu 37°C dengan agitasi 140 rpm selama 10, 12, 14 dan 16 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan 6.000 rpm selama 20 menit. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar enzim xilanase. Menurut Richana, dkk., (2007) proses pemisahan enzim dengan sentrifugasi harus dilakukan pada suhu rendah. Tingkat sentifugasi yang cukup tinggi dalam kurun waktu tertentu dapat menghasilkan energi panas yang dapat merusak struktur protein enzim selama pemisahan. Selanjutnya ekstrak kasar disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C agar struktur dimensi enzim tetap stabil selama proses penyimpanan. Agitasi dalam hal ini berfungsi untuk mempertahankan kondisi aerobik untuk desorpsi CO₂ dan menghilangkan sebagian panas yang

dihasilkan sehingga temperatur dapat dipertahankan pada temperatur optimal untuk produksi enzim xilanase.

Menurut Lehninger (1993) beberapa parameter yang dapat diukur pada saat penentuan waktu panen diantaranya kerapatan (*optical density*) dan aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan. Aktivitas enzim dapat didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan satu mikromol gula reduksi (xilosa) pada setiap menitnya. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode DNS yang didasarkan pada total kadar gula xilosa sebagai hasil hidrolisis xilan oleh enzim xilanase, yang direaksikan selama 30 menit. Kusmiati dan Agustini (2010) menjelaskan bahwa reaksi yang terjadi antara pereaksi DNS dan gula reduksi, dalam hal ini yaitu xilosa. DNS merupakan serangkaian reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Reaksi ini dapat berlangsung pada suhu tinggi 90-100°C dan suasana basa.

Menurut Sastrohamidjojo (2005), reaksi DNS merupakan serangkaian reaksi redoks pada gugus aldehyd gula yang teroksidasi menjadi gugus karboksil. DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Jika dalam suatu sampel mengandung gula reduksi, maka larutan DNS yang mulanya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi dan menimbulkan warna orange hingga kecokelatan. Semakin perkat warna kuning yang dihasilkan, maka semakin banyak pula gula reduksi yang dihasilkan. Serangkaian reaksi kimia tersebut dapat terjadi dalam suasana pH basa. Oleh sebab itu dalam reagen DNS

ditambahkan larutan NaOH yang bertujuan untuk memberikan suasana basa. Selain itu, ditambahkan pula KNa-Tartrat yang berfungsi untuk menstabilkan warna yang terbentuk pada saat reaksi.

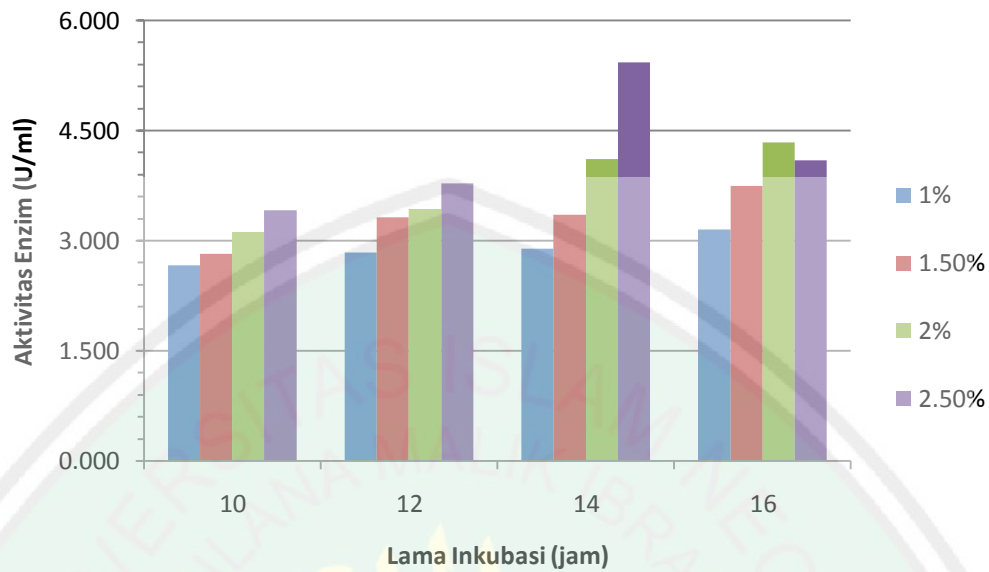


Gambar 4.1 Reaksi Asam Dinitrosalisilat dengan Xilosa

Hasil pengukuran produksi enzim tertinggi ditunjukkan dengan tingginya nilai aktivitas enzim dicapai pada jam ke-14 dengan konsentrasi substrat 2,5 sebesar 5,43 U/ml. Dan aktivitas enzim terendah pada lama inkubasi jam ke 10 dengan konsentrasi substrat 1% sebesar 2,67 U/ml. Perhitungan aktivitas enzim xilanase didapatkan dari konversi absorbansi gula pereduksi (xilosa) dengan kurva standar xilosa. Nilai aktivitas enzim xilanase pada konsentrasi substrat 1%; 1,5%; 2% dan 2,5% mengalami peningkatan dari jam ke 10 hingga jam ke 14, dan kemudian turun pada jam ke 16. Pada awal fermentasi produksi enzim masih sangat rendah dikarenakan mikroorganisme mengalami proses adaptasi dengan kondisi pada media produksi. Adanya substrat tertentu dalam media fermentasi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresikan metabolit yang dihasilkannya. Namun, pada suatu keadaan tertentu dimana lama inkubasi tidak

dapat meningkatkan produksi enzim, sebagaimana ditunjukkan pada lama fermentasi 16 jam, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4.4. Menurut Windari (2014), penurunan tersebut dapat diakibatkan oleh adanya enzim protease endogenous, yang secara alami diproduksi pula oleh *Bacillus subtilis*, dan dapat menghidrolisis enzim-enzim lainnya.

Pemilihan substrat merupakan suatu tahap penting dalam proses produksi enzim. Hal ini dikarenakan substrat maupun produk hasil hidrolisis enzim dapat berperan sebagai induser utama bagi mikroorganisme dalam mensekresikan enzim. Hasil penelitian Saleem, *et al.*, (2002), *Bacillus subtilis* mampu memproduksi xilanase ada media yang mengandung bagas tebu 2% sebesar 4,0 U/ml yang diinkubasi selama 14 jam pada suhu 50°C. Kuancha dan Jirawan (2012) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu memproduksi enzim xilanase dengan aktivitas sebesar 1,86 U/ml pada konsentrasi substrat tongkol jagung 1,5%, suhu 30°C selama 18 jam dengan kecepatan aerasi 200 rpm. Rahmani, *et al.*, (2014) menambahkan bahwa *Bacillus safensis* P20 mampu memproduksi enzim tertinggi pada konsentrasi substrat 1,5% selama 120 jam sebesar 3,93 U/ml pada bagas tebu; 1,8 U/ml pada substrat tongkol jagung dan 1,7 U/ml pada dedak gandum. Hasil penelitian Trismillah dan Deden (2009) menjelaskan bahwa *Bacillus stearothermophilus* yang digunakan dalam produksi xilanase mampu menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,75 U/ml selama 12 jam inkubasi pada media tempurung kelapa dengan konsentrasi 0,5%.



Gambar 4.2 Histogram Pengaruh Kombinasi Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

Susilowati, dkk (2012) menyebutkan bahwa waktu optimum produksi enzim xilanase terjadi pada fase eksponensial (log) akhir. McNeil dan Harvey (2008), menambahkan bahwa aktivitas tertinggi tersebut dapat dicapai pada akhir dari fase eksponensial dan fase awal stasioner yang disebut sebagai fase deselerasi. Pada fase tersebut jumlah populasi bakteri sangat tinggi, namun ketersediaan oksigen dan nutrisi dalam media mulai berkurang, sehingga sel bakteri bersifat kurang aktif dalam berreproduksi dan menyebabkan terjadinya perlambatan pertumbuhan sel. Hal ini yang menginduksi *Bacillus subtilis* untuk mensintesis xilanase dalam jumlah banyak untuk menghidrolisis xilan pada medium fermentasi menjadi xilosa dan xilooligosakarida dalam bentuk gula yang lebih sederhana yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidupnya. Hal ini menunjukkan tingkat kemampuan *Bacillus subtilis* dalam memanfaatkan nutrisi di sekitarnya untuk

aktivitas metabolisme selnya, dalam hal ini yaitu memproduksi enzim xilanase yang ditunjukkan dengan tingginya aktivitas enzim yang dihasilkan.

Jika dihubungkan dengan tingkat konsentrasi substrat, aktivitas xilanase yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat. Namun, peningkatan aktivitas enzim ini bersifat terbatas pada konsentrasi batas maksimum. Hal ini dikarenakan hampir keseluruhan sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Menurut teori persamaan Michaelis dan Menten dalam Poedjiadi dan Supriyanti (2006), menjelaskan bahwa kompleks enzim dan substrat dapat diperoleh melalui adanya kontak enzim dan substrat pada sisi aktif enzim. Jika konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya mampu mengikat substrat dalam jumlah yang sedikit pula. Sedangkan jika konsentrasi substrat ditingkatkan, maka semakin banyak pula ikatan yang terbentuk antara sisi aktif enzim dan substrat. Namun pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat sehingga menyebabkan terjadinya suatu keadaan dimana penambahan konsentrasi substrat tidak dapat menyebabkan peningkatan jumlah ikatan sisi aktif enzim dan substrat, dan dapat disebut dengan keadaan stagnan/konstan. Windari (2014) menambahkan bahwa pada reaksi enzimatis hidrolisis xilan yang berperan sebagai sisi aktif enzim xilanase yaitu ion karboksilat asam aspartat dan gugus karboksil asam glutamate. Ion karboksilat asam aspartat akan menyerang atom C pada posisi 1 polimer xilan. Selanjutnya pasangan elektron bebas dari atom O ikatan glikosidik polimer xilan akan menyerang atom H pada gugus karboksil asam glutamate, sehingga terbentuk

kompleks enzim-substrat, kemudia terjadi pemutusan ikatan enzim substrat membentuk monomer gula pereduksi karena adanya hidrolisis dari H₂O.

Perlakuan dengan konsentrasi substrat bagas tebu 1%; 1,5%; 2% dan 2,5% cenderung mengalami peningkatan aktivitas enzim xilanase pada variasi lama inkubasi 10, 12 dan 14 jam. Penurunan aktivitas pada konsentrasi substrat 2,5% pada lama inkubasi 16 jam terjadi karena adanya peningkatan kepekatan media fermentasi yang dapat menghambat interaksi enzim-substrat. Selain itu adanya pengalihan fungsi produk hasil hidolisa (xilosa), dimana akumulasi xilosa dalam media fermentasi dapat menjadi inhibitor kerja enzim. Menurut Mountfort dan Asher (1989) dalam Naomi (2006) akumulasi pentose bersama dengan adanya penurunan aktivitas xilanase selama proses fermentasi pada konsentrasi media xilan yang lebih tinggi menunjukkan bahwa konsentrasi produk gula yang dihasilkan dapat mempengaruhi regulasi sintesis enzim. Purwadaria, *et al.*, (2003) menambahkan bahwa konsentrasi substrat yang tinggi dapat menyebabkan penurunan laju transfer O₂ yang dibutuhkan mikroorganisme untuk melangsungkan proses metabolisme selnya.

Menurut Madigan, dkk., (2012), organisme pembentuk spora umumnya memproduksi enzim pada fase eksponensial hingga pasca eksponensial. Diduga jika mikroorganisme telah berada pada fase tersebut, maka pada saat itu pula dihasilkan aktivitas enzim tertinggi. Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim xilanase untuk menghidrolisis xilan substrat bagas tebu menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Suhartono (1992) menambahkan bahwa bakteri akan mensintesis enzim

ekstraseluler dalam jumlah terbesar secara normal terjadi pada saat sebelum terjadi sporulasi, yaitu berkisar antara fase akhir eksponensial dan awal stasioner. Hal tersebut diduga bahwa pada masa transisi tersebut diikuti penurunan sumber karbon dalam media, sehingga sintesis enzim xilanase mengalami peningkatan.

Penggunaan bagas tebu dalam media produksi berfungsi sebagai substrat sekaligus induser *Bacillus subtilis* untuk memproduksi enzim xilanase. Menurut Berg, *et al.*, (2000), induser adalah substansi dengan berat molekul rendah yang dapat berupa substrat, yang dibutuhkan untuk menginduksi gen-gen pengkode sintesis xilosa. Enzim yang bersifat inducibel diproduksi oleh gen-gen inducible yang mempunyai kecepatan transkripsi yang rendah, sehingga dengan adanya induser dalam media dapat berperan sebagai substansi pemicu transkripsi dan akan meningkatkan laju sintesis enzim. Sesuai dengan Teori Jacob Monod (1961) yang menjelaskan bahwa enzim disintesa oleh ribosom yang diatur oleh gen-gen pengendali pada kromosom (DNA). Gen-gen pengendali terdiri dari gen regulator yang menghasilkan protein repressor, gen promoter dan gen operator yang mengatur fungsi dari gen-gen struktural sintesa enzim. Induser akan berikatan dengan protein repressor, sehingga repressor menjadi inaktif dan menginduksi gen struktural untuk mensintesis xilanase dalam jumlah besar.

Aplikasi enzim pada beberapa industri menghendaki enzim-enzim yang dalam beraktivitas tahan terhadap suhu tinggi (termostabil). Hal ini berkaitan dengan keuntungan yang akan diperoleh jika proses produksi dilakukan pada suhu tinggi dapat menurunkan resiko kontaminasi, meningkatkan kecepatan reaksi

sehingga menghemat waktu, tenaga dan biaya, serta menurunkan viskositas larutan fermentasi sehingga memudahkan proses produksi (Soeka, *et al.*, 2011).

Adanya perbedaan nilai aktivitas enzim xilanase pada tiap perlakuan menunjukkan bahwa bakteri merupakan mikroorganisme yang mempunyai kemampuan yang sangat bervariasi dalam memproduksi metabolitnya. Allah SWT telah memberikan kemampuan yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup pada setiap makhluk-Nya termasuk bakteri penghasil enzim xilanase sesuai dengan kebutuhannya. Sebagaimana dalam Surat Al-A'laa (87) ayat 3 yang berbunyi:

وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ﴿٣﴾

Artinya:

“Dan Dia (Allah) yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukurannya masing-masing. Begitu halnya dengan enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*. Setiap mikroorganisme penghasil xilanase mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan enzim dan kemampuannya dalam mendegradasi xilan. Enzim xilanase yang dihasilkan dapat dimanfaatkan dalam metabolisme selnya atau dapat member manfaat pada kehidupan makhluk lainnya. Hasil penelitian Naomi (2006) menjelaskan bahwa setiap mikroorganisme penghasil enzim mempunyai kurva produksi yang berbeda-beda sehingga menyebabkan perbedaan aktivitas xilanase yang dihasilkan.

4.5 Kajian Pemanfaatan Limbah dalam Perspektif Islam

Disebutkan dalam Al-Qur'an Surat Al-Qashash (28) ayat 77, yang berbunyi:

وَابْتَغِ فِيمَا آتَاكَ اللَّهُ الدَّارَ الْآخِرَةَ وَلَا تَنْسَ نَصِيبَكَ مِنَ الدُّنْيَا وَأَحْسِنَ كَمَا
أَحْسَنَ اللَّهُ إِلَيْكَ وَلَا تَبْغِ الْفَسَادَ فِي الْأَرْضِ إِنَّ اللَّهَ لَا يُحِبُّ الْمُفْسِدِينَ ﴿٧٧﴾

Artinya:

“Dan carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (kebahagiaan) negeri akhirat, dan janganlah kamu melupakan bahagianmu dari (kenikmatan) duniawi dan berbuat baiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik kepadamu, dan janganlah kamu berbuat kerusakan di (muka) bumi. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berbuat kerusakan”.

Makna kata *”wabtaghi fii ma aataaaka Allahu dzaral akhiroh”* yaitu perintah untuk mengeksplorasi anugerah yang Allah ciptakan di bumi untuk kemaslahatan akhirat. Diikuti kalimat selanjutnya yaitu *“wa laa tansa nashibaka minaddunya”* yang berarti dalam eksplorasi maupun kajian tersebut tidak melupakan kebijakan-kebijakan di bumi sebagaimana mestinya. Dalam Al-Qaradhawi (2002) memaknai kalimat tersebut sebagai tidak ada sesuatu apapun yang rusak, tercemar ataupun kehilangan keseimbangannya sebagaimana penciptaan pada awalnya. Pemanfaatan limbah bagas tebu dapat dijadikan bentuk kepedulian terhadap kelestarian dan keseimbangan alam dengan mengolahnya kembali seperti halnya dijadikan sebagai substrat pada media pertumbuhan dan menghasilkan produk dengan nilai guna yang lebih baik.

Kalimat *“wa la tabghil fasaada fil ‘ardi”* juga mengandung makna adanya larangan untuk berbuat kerusakan di bumi. Dalam hal ini Allah melarang segala perbuatan ataupun tindakan yang dapat menimbulkan kerusakan dan dapat

membahayakan kelestariaannya. Dalam *Tafsir Al-Misbah* (Shihab, 2009) menjelaskan kalimat tersebut bahwa larangan tersebut tidak untuk melupakan adanya dunia (bumi) untuk semata-mata karena nilai akhirat. Namun, menjadikan segala sesuatu di bumi sebagai shirat untuk mencapai anugerah-anugerah yang diberikan Allah SWT.

Bagas tebu merupakan jenis limbah lignoselulosik yang umumnya dianggap tidak mempunyai manfaat dan dapat menimbulkan kerusakan lingkungan. Pembuangan dan penimbunan bagas tebu dalam jangka panjang dapat menyebabkan terganggunya keseimbangan ekosistem. Pengolahan limbah bagas tebu dengan tepat dapat menjadi solusi alternatif dalam mengurangi tingkat kerusakan dan memberikan nilai tambah. Dalam penelitian ini bagas tebu yang telah mengalami serangkaian *pre-treatment* digunakan sebagai substrat bakteri *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan produk enzim xilanase yang mempunyai nilai guna dan nilai jual yang tinggi. *Bacillus subtilis* dapat menghasilkan enzim termotabil yang mempunyai potensi dan manfaat dalam kehidupan di bumi. Salah satu enzim yang dapat dimanfaatkan yaitu enzim xilanase yang dapat dimanfaatkan pada berbagai industri diantaranya industri detergen, industri textile, industri makanan dan industri kertas. Untuk memaksimalkan potensi yang ia miliki perlu dilakukan kajian-kajian untuk mengeksplorasi tingkat produktivitas yang dimilikinya.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi substrat bagas tebu (*Saccharum officinarum*) terhadap aktivitas enzim xilanase. Aktivitas enzim xilanase tertinggi diperoleh pada perlakuan lama inkubasi 14 jam dan konsentrasi substrat 2,5 % sebesar 5,43 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim xilanase terendah diperoleh pada perlakuan lama inkubasi 10 jam dan konsentrasi substrat 1% sebesar 2,67 U/ml.

5.2 Saran

1. Bagi peneliti selanjutnya, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai stabilitas dan karakterisasi enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*.
2. Perlu dilakukan purifikasi xilan bagas tebu agar didapatkan hasil yang lebih maksimal.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menambahkan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi tingkat aktivitas enzim xilanase, diantaranya suhu, pH, konsentrasi enzim, jumlah inokulum, aktivator dan inhibitor.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Muhammad bin Abdurrahman bin Ishaq Alu Syaikh. 2004. *Ibnu Katsir Jilid 7*. Jakarta: Pustaka Imam Syafi'i
- Agustina, D., Cut, Y., dan Risa, N. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*) Asin Berkitosan. *Biospecies*. Vol: 6. No: 1. Hal: 15-19
- Agustine, W. 2005. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan dan Produksi Xylanase Isolat AQ. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jahir. 2007. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar Jilid 3*. Jakarta: Darus Sunnah Press
- Al-Qaradhawi, Yusuf. 2002. *Musykilat al-Fakr*. (terj. Maimun Syam, dkk). Yogyakarta: Mitra Pustaka
- Amelia, Aam. 2012. Pengaruh Variase Konsentrasi Enzim dan Substrat Terhadap Sakarifikasi Limbah Pengolahan Kertas Menggunakan Enzim Selulase dari *Bacillus sp.* BPPT CC RK2. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Program Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Andriyanti, W. 2012. Pembuatan dan Karakterisasi Polimer Superabsorben dari Ampas Tebu. *Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Teknologi Akselerator dan Aplikasinya*. Vol: 13. Hal: 1-7
- Anggraini, F. 2003. Kajian Ekstraksi dan Hidrolisis Xilan dari Tongkol Jagung (*Zea Mays L.*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., dan Balasubramanian, T. 2009. Thermostable and Alkaline Tolerant Xylanase Production by *Bacillus subtilis* Isolated From Marine Environment. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol: 8. Hal: 291-297
- Baarri, Al. A.N dan Fawaid, M.T. 2013. Profil Produksi Alkohol dari Fermentasi Whey dan Ampas Tebu. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol: 2. No: 1 Hal: 48-51
- Bansal, N., Raman, S., Chetna, J., dan Sanjeev, K.S. 2012. Production of Xylanase-Cellulase Complex by *Bacillus subtilis* NS7 for Biodegradation of Agro-Waste Residues. *Peer-Reviewed Article Lignocellulose*. Vol: 1. No: 3. Hal: 196-209

- Beg, Q.K., M. Kapoor., L. Mahajan., dan G.S. Hondal. 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications : A Review. *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol: 56. Hal: 326-338
- Berg, J.M., J.L. Tymoczko dan L.Stryer. 2000. *Biochemistry 5th Edition*. Freeman and Company. (Online): www.whfreeman.com/biochem5, diakses pada 21 Desember 2016 puku 11.04 WIB
- Bindu, B., Jitender, S., Saurabh, S.D dan Ramesh, C.K. 2007. Enhanced Production of Cellulose-Free thermostable Xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and Its Potential Application in Paper Industry. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol: 41 Hal: 733-739
- Binoto, N.L., Rolan, S., dan Ikhsan, D. 2009. Hidrolisis Ampas Tebu Secara Enzimatis Menggunakan *Trichoderma reesei*. *Jurnal Teknik Kimia*. Vol: 4. No: 1
- Badan Pusat Statistik. 2016. *Produksi Perkebunan Besar Menurut Jenis Tanaman di Indonesia 1995-2014*. (Online): <http://www.bps.go.id/linkTabelStatis/view/id/1666>, diakses pada tanggal 19 Februari 2016 pukul 12.06 WIB
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, J. 2004. *Biology of Microorganism 7th Edition*. New Jersey: Prentice Hall
- Budiman, A dan Sigit, S. 2010. Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi. *Jurnal Teknik Kimia*. Vol: 11. No: 1. Hal: 1-11
- Cartwright, Peter. 2009. Probiotic News: *Bacillus subtilis* – Identification and Safety. *Protexin Health Care*. No: 2
- Chaturvedi, S., Kohli, K.U., Rajni, S., dan Khurana, S.M.P. 2015. Statistical Optimization of Medium Composition for Xylanase Production by Solid State Fermentation Using Agroresidues. *American Journal of Microbiology Research*. Vol: 3. No: 2. Hal: 85-92
- Faisal, Ahmad. 2008 Produksi Xilitol oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reductase dari Hidrolisat Ampas Tebu. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia Depok
- Fardiaz, S. 1987. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas LSI
- Fawzya, Y.N., Rani, E.P., Wibowo, M., Ifah, M., dan Gintung, P. 2013. Produksi dan Karakterisasi Xilanase dari Isolat Bakteri M-13.2A Asal Air Laut Manado . *JPB Kelautan dan Perikanan*. Vol: 8. No: 1. Hal: 55-64

- Fitriani, Syaiful, B., dan Nurhaeni. 2013. Produksi Bioetanol Tongkol Jagung (*Zea mays*) dari Hasil Proses Delignifikasi. *Online Journal of Natural Science*. Vol: 2. No: 3. Hal: 66-74
- Gandjar, I. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: IKAPI
- Gessesse, A dan Mamo, G. 1997. Purification and Characterization of An Alkaline Xylanase from Alkalophilic *Micrococcus* sp. AR-135. *Jurnal Industry Microbiology and Biotechnology*. Vol: 20. Hal: 210-214
- Gunam, I.B.W., Aryanta, WR dan Dharma, I. B.S. 2011. Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakarifikasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase Kasar dari *Aspergillus niger*. *Jurnal LIPI Teknologi Indonesia*. No: 34. Hal: 24-32
- Guo, X., Wang, S.W., Yan, Z., dan Zhongynag, L. 2011. Catalytic Pyrolysis of Xilan-Based Hemicellulose Over Zeolites. *Recent Research in Energy and Environment*. Hal: 137-142
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia
- Harris, Annie D. dan C. Ramalingam. 2010. Xylanases and Its Appllication ini Food Industry: A Review. *Journal of Experimental Sciences*. Vol: 1. No: 7. Hal: 1-11
- Irfan, M., Muhammad, N., Quratulain, S., dan Shahjahan, B. 2012. Effect of Medium Composition on Xylanase Production by *Bacillus subtilis* using Various Agricultural Wastes. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environment Science*. Vol: 12. No: 5. Hal: 561-565
- Irfan, M, Umar, A., Muhammad, N., Rubina, N, dan Quratulain, S. 2015 Optimization of Process Parameters for Xylanase Production by *Bacillus* sp. in Submerged Fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. Hal: 1-9
- Kaur, A., Chirag, C., Anshul, J., dan Neeta, R.S. 2015. Bioprocessing, Biochemical Characterisation and Optimization of Solid State Fermentation of A New Thermostable Xylanase Producing Strain Belonging to *Bacillus* Genus. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol: 7. No: 1. Hal: 266-276
- Kuancha, C. dan Jirawan, A. 2012. Cultural Condition Improvement for Xylanase Production by *Bacillus subtilis* GN 156. *KKU Research Journal*. Vol: 17. No:6. Hal: 933-938

- Kumala, S., W. Mangunwardoyo, dan D. Dethrian. 2006. uji Aktivitas Enzim Xilanase Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri Endofitik Tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. *Jurnal Ilmu Kerfarmasian Indonesia*. Vol: 4. No: 2. Hal: 51-54
- Kurrataa'yun. 2014. Pencirian Xilanase dari Xilanolitik XJ18 yang Menghasilkan Xilobiosa dari Xilan Tongkol Jagung. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor
- Kusmiati dan Agustini, N.W.S. 2010. Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma* sp. dan *Aspergillus niger*. *Seminar Nasional Biologi*
- Lehninger, A.L. 2010. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*. Penerjemah Maggy Thenawidjaya Jakarta: Erlangga
- Li, K., Azadi, P. Collins, R., Tolan, J., Kim, J.S. dan Eriksson, K.E.L. 2000. Relationships Between Activities of Xylanases and Xylan Structures. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol: 27. Hal: 89-94
- Madigan, M.T, Martiko, J. M. Parker, J. 2012. *Book Biology of Microorganism 10th Edition*. New Jersey: Lentis Hall
- Mc Neil, B. dan L.M. Harvey. 2008. *Practical Fermentation Technology*. England: John Wiley and Sons, Ltd
- Miller, L.G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent of Determination of Reducing Sugar. *Anal chem*. No: 31. Hal: 426-428
- Muawanah, A. 2006. Produksi Enzim Xilanase Thermostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Substrat Bagasse Tebu. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Program Studi Ilmu Pangan Institut Pertanian Bogor
- Mukminin, A. 2014. Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Biologi UIN Malang
- Nakamura, S., Wakabayashi, S.K., Nakai, R, Aono, R., dan Horikoshi, K. 1994. Purification and Some Properties of An Alkaline Xylanase From An Alkalophilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. *Applied Environment of Microbiology*. Vol: 59. Hal: 2311-2316
- Naomi, A. 2006. Produksi Xilooligosakarida dari Xilan Tongkol Jagung dengan Menggunakan Xilanase *Streptomyces* sp. Asal Indonesia. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor

- Nareswari, A. 2007. Enzim Xilanase *Bacillus licheniformis* AQ1: Pemekatan, Studi Termostabilitas dan Zimogram. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor
- Nelson, D.L dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Edisi ke-4. New York: Worth Publisher
- Oktarina, E. 2008. Penapisan dan Uji Aktivitas Bakteri Alkalo-Termofilik Penghasil Xilanase. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia Depok
- Olempska, Zofia. 2004. Xylanases From *Bacillus subtilis* Expressed in *Bacillus subtilis*. *Chemical and Technical Assesment*
- Orchidea, R., Andi, K.W., Dedy, R.P., Lisa, F.S., Khoir, L., Reza, P., dan Cakra, D.M. 2010. Pengaruh Metode Pretreatment pada Bahan Lignosellulosa terhadap Kualitas Hidrolisat yang Dihasilkan. *Makalah Seminar Nasional Teknik Kimia Soebardjo Brotohardjono*
- Pangesti, N.W., Artini, P., dan Estu, R. 2012. Pengaruh Penambahan Molase pada Produksi Enzim Xilanase oleh Fungi *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi. *Jurnal Bioteknologi*. Vol: 9. No: 2. Hal: 41-48
- Pleczar, M.J dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*. Jakarta: UI Press
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press
- Prima, R. E. 2012. Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia Depok
- Purwadaria T, Haryati T, Frederick E, Tangendjaja B. 2003. Optimisation of β -mannanase production on submerged culture of *Eupenicillium javanicum* as well as pH and temperature enzyme characterization. *JITV*. Vol: 8. No:1
- Purwanti, Afif, C. 2015. Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari *Trichoderma viridae* yang Ditumbuhkan pada Media Tongkol Jagung. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Biologi UIN Malang
- Puspita, P.J. 2010. Optimasi Konsentrasi Xilosa dan Glukosa Untuk Produksi Xilitol Oleh *Candida tropicalis*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Departemen Biokimia FMIPA Institut Pertanian Bogor
- Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam

- Rahayu, P., Siswa, S., dan Harmita. 2008. Productio and Purification of Xylanase From Indonesian Isolat *Bacillus* sp. AQ-1 Grown on Bunch Palm Oil. *Microbiology Indonesia*. Vol: 3. No: 1. Hal 23-26
- Rahmani, N., Nadia, U.J.R., Irma, H.S., dan Yopi. 2014. Optimization of Production Xylanase from Marine Bacterium *Bacillus safensis* P20 on Sugarcane Baggase by Submerged Fermentation. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. Vol: 4. No: 6. Hal: 31-34
- Richana, N., Lestari, P., Thontowi, A., dan Rosmimik. 2000. Seleksi Isolat Bakteri Lokal Penghasil Xilanase. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. Vol: 5. No: 2. Hal: 54-56
- Richana, Nur. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio*. Vol: 5. No: 1. Hal: 29-36
- Richana, N., Tun, T.T., M.A. Nur., Illah, S., Khaswar, S., dan Yandra, A. 2007 Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung. *Jurnal Pascapanen*. Vol: 4. No: 1. Hal: 38-43
- Saleem, M., Muhammad, S.A dan Saman, J. 2002. Production of Xylanase on Natural Substrates by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Agriculture and Biology*. Vol: 4 No: 2. Hal: 211-213
- Saleem, M., Tabassum, M.R., Yasmin, R., dan Imran, M. 2009. Potential f Xylanase From Thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in Biobleaching of Wood Kraft Pulp. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Vol: 63. Hal: 1191-1124
- Sapre, M., Jha, H., dan Patil, M. 2005. Purification and Characterization of A Thermoalkalophilic Xylanase From *Bacillus* sp.. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol: 21. No: 5. Hal: 649-654
- Sarah, M., Naama, S., Inna, R.G., Geir, M., Vincent, G.H.E., Lars, A., Raphael, L., Edward, A.B., dan Itzhak, M. 2013. Establishment of A Simple *Lactobacillus plantarum* cell Consortium for Cellulase-Xylanase Synergistic Interactions. *Applied Environment Microbiology*. Hal: 1-25
- Sari, R.N., Sugiyono, dan Luthfi, A. 2013. Optimasi Waktu Proses Hidrolisis dan Fermentasi dalam Produksi Bioetanol dari Limbah Pengolahan Agar (*Gracilaria* sp.) Industri. *JPB Perikanan*. Vol: 8. No: 2. Hal: 133-142
- Sastrohamodjojo. H. 2005. *Kimia Organik, Sterokimia, Lemak dan Protein*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press

- Schallmeyer, M., Singh, A., dan Ward, O.P. 2004. Development in The Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can J. Microbiology*. Vol: 50. Hal: 1-17
- Septiningrum, K. dan Chandra, A.P. 2011. Produksi Xilanase dari Tongkol Jagung dengan Sistem Bioproses Menggunakan *Bacillus circulans* untuk Pra-Pemutih Pulp. *Jurnal Riset Industri*. Vol: 5. No: 1. Hal: 87-97
- Setyawati, Indah. 2006. Produksi dan Karakterisasi Xilanase Mikroba yang Diisolasi dari Tongkol Jagung. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Program Studi Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor
- Shihab, M. Quraish. 2009. *Tafsir Al-Misbah Volume 7*. Jakarta: Lentera Hati
- Shinsetsu, A. 2010. Pembuatan Pulp dan Kertas dari Ampas Tebu dengan Proses *Acetosoly*. (Online): <https://aprysilverfox.blogspot.com/2010/08/makalah-pembuatan-pilp-dan-kertas-dari.html&h=400>, diakses pada 23 Februari 2016 pukul 13.05 WIB
- Slepecky, R.A., dan H. Ernest H. The Genus *Bacillus* – Nonmedical. *Prokaryotes*. No: 4. Hal: 530-562
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H dan Setianingrum, N. 2011. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Jurnal Media Litbang Kesehatan*. Vol: 21. No: 2. Hal: 89-95
- Sonia, N.M.O dan Kusnadi, J. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol:3. No: 4. Hal: 11-19
- Subramaniyan, S dan Prema, P. 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases, Enzymology, Molecular Biology and Application. *Crit Reviewd Biotechnology*. Vol: 22. Hal: 33-46
- Sugumaran, K.R, Boshetty, K.K., M. Mahalaksmi, dan V. Ponnusami. 2013. Cassava Bagasse – Low Cost Substrate For Thermotolerant Xylanase Production Using *Bacillus subtilis*. *International Journal of ChemTech Research*. Vol: 5. No: 1. Hal: 394-400
- Suhartono, M.T. 1992. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Bioteknologi IPB
- Sulistyaningtyas, A.S., Prasetyawan, S., dan Sutrisno. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Fe^{3+} Terhadap Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal*. Vol: 2. No: 2. Hal: 470-476

- Sumardi. 2005. Optimasi produksi enzim β -mananase ekstraseluler dari bakteri *Geobacillus Stearothermophilus* L-07. *J. Sains Tek.* Vol: 11. No: 2
- Suparjo. 2008. Degradasi Komponen Lignoselulosa oleh Kapang Pelapuk Putih. *Artikel.* Laboratorium Makanan Ternak fakultas Peternakan Universitas Jambi
- Susilowati, Prima, E., Sapto, R., Desi, K, Rahmawati, R., Sumarlin, dan Ardiansyah. 2012. Produksi Xilanase dari Isolat Sumber Air Panas Sonai, Sulawesi Tenggara Menggunakan Limbah Pertanian. *Jurnal Natur Indonesia.* Vol: 14. No: 3. Hal: 199-204
- Tjahjono, J dan Sudarmin. 2008. Pengaruh Xilanase pada Perlakuan Awal Pemutihan Terhadap Kualitas Pulp. *Berita Selulosa.* Vol: 43. No: 2. Hal: 62-68
- Trismillah dan Deden, R.W. 2009. Produksi Xilanase Menggunakan Media Limbah Pertanian dan Perkebunan. *Jurnal Teknik Lingkungan* Vol: 10. No: 2. Hal: 137-144
- Vanadianingrum, Ervin, S. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Xilanase dari Cairan Rumen Kambing dan Domba dan Sumber Air Panas di Cipanas. *Skripsi Tidak Diterbitkan.* Prodi Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak IPB Bogor
- Wahyudi, P., Suwahyono, U., dan Mulyati. 2010. Pertumbuhan *Trichoderma harzianum* pada Medium yang Mengandung Xilan. *Jurnal Penerapan Teknologi.* Vol: 1. No: 1. Hal: 1-7
- Wang, C.Y., Chan, H., Lin, HT, Shyu, Y.T. 2010. Production, Purification and Characterization of A Novel Halostable Xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. *Annals of Applied Biology.* Vol: 156. No: 2. Hal: 187-197
- Wardani, Agustin K., dan Indah, K. 2015. Pretreatment Ampas Tebu (*Saccharum officinarum*) Sebagai Bahan Baku Bioetanol Generasi Kedua. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* Vol: 3. No: 4. Hal: 1430-1437
- Wenzl, H K.J. 1990. *The Chemical Technology of Wood.* London: Academic Press Inc
- Widyani, I.G.A. 2002. Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung dan Kulit Ari Kedelai. *Skripsi Tidak Diterbitkan.* Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor
- Windari, Hema, A.S, Sutrisno dan Anna, R. 2014. Penentuan Waktu Fermentasi Optimum Produksi Xilanase dari *Trichoderma viride* Menggunakan

Substrat Kulit Kedelai dan Kulit Kacang Hijau Melalui Fermentasi Semi Padat. *Kimia Student Journal*. Vol: 1. No: 1. Hal: 85-91

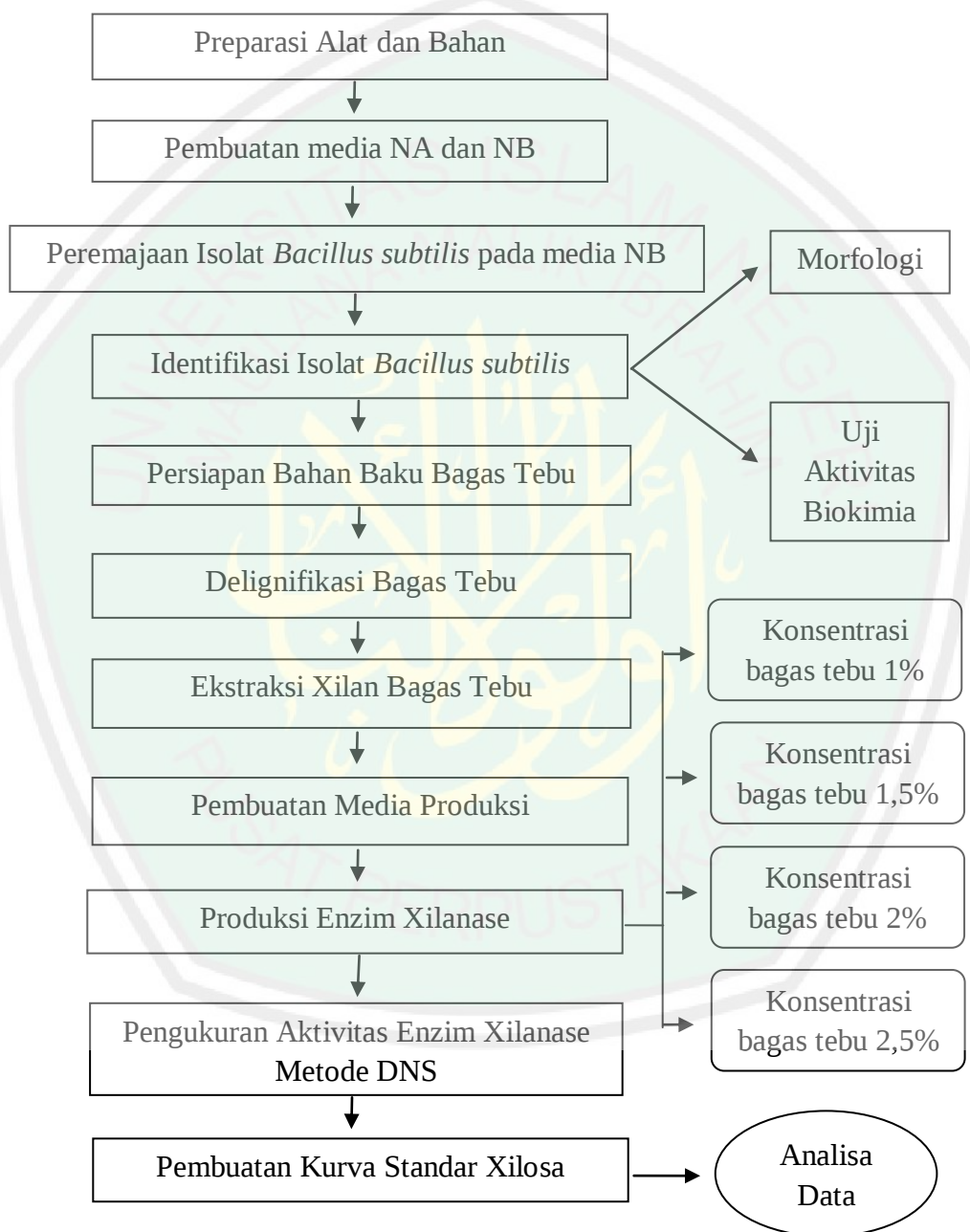
Yang, R, Xu, S., Wang, Z., dan Yang, W. 2005. Aqueous Extraction of Corn cob Xylan and Production of Xylooligosaccharides. *Swiss Social Food Science Technology*. Vol: 38. No: 677-682

Yuneta, R. dan Surya, R.P. 2010. Pengaruh Suhu pada Lipase dari Bakteri *Bacillus subtilis*. *Jurnal Prosiding Skripsi Kimia ITS Surabaya*

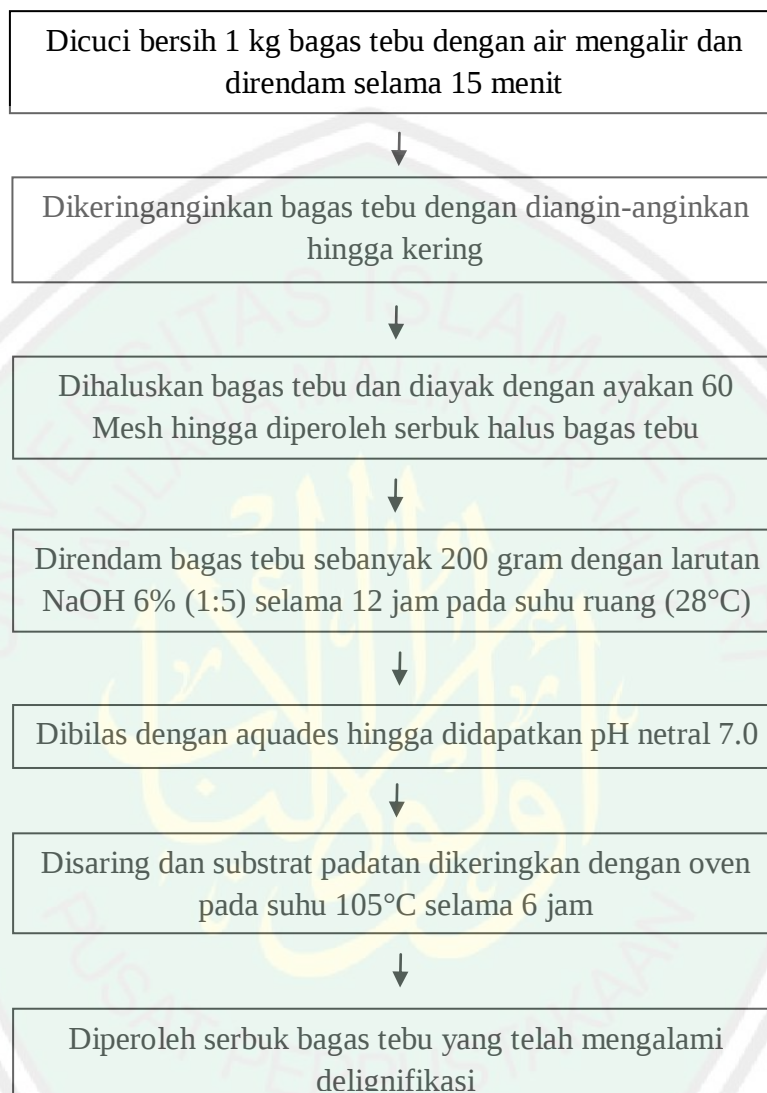


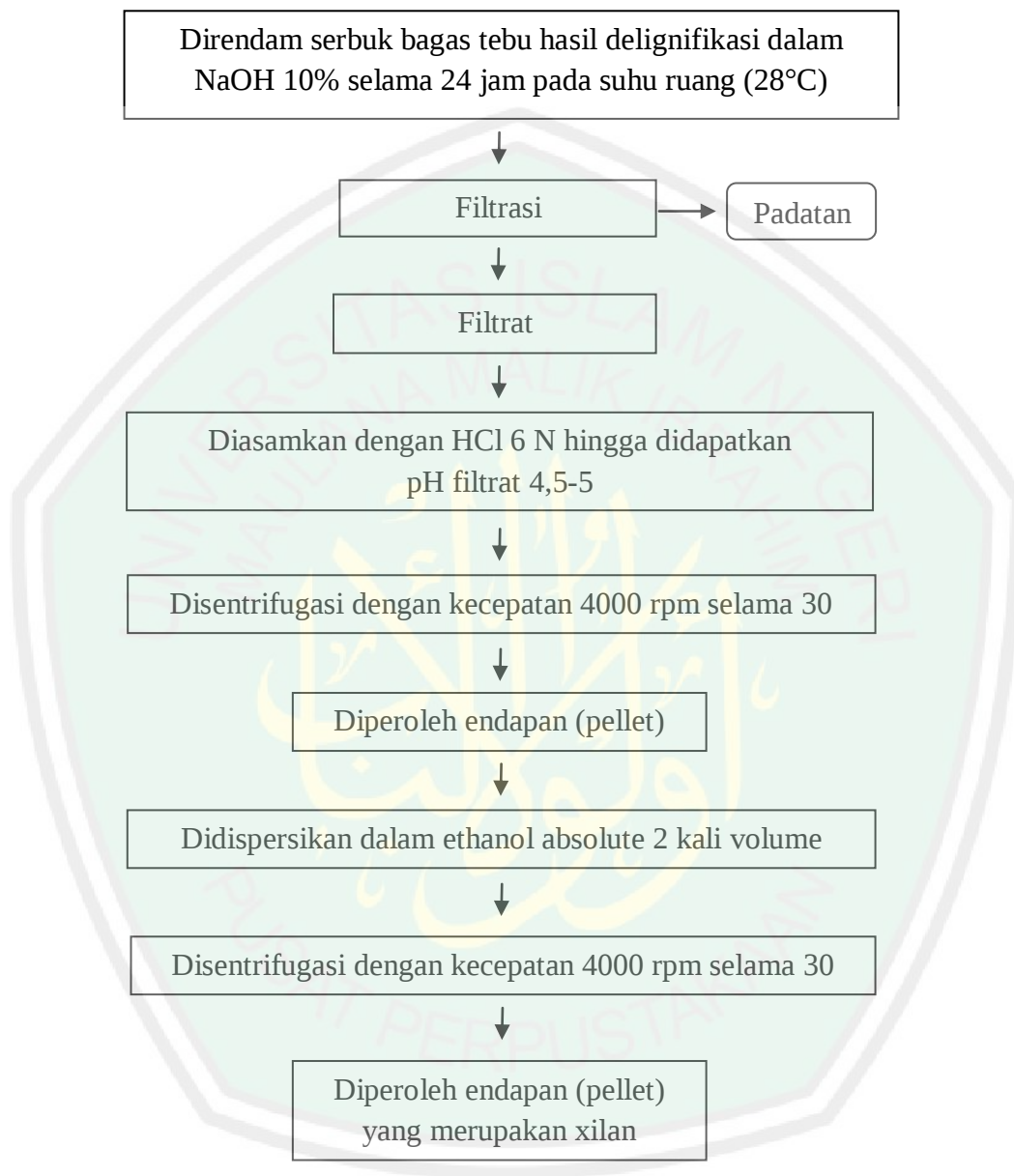
LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Rancangan Penelitian



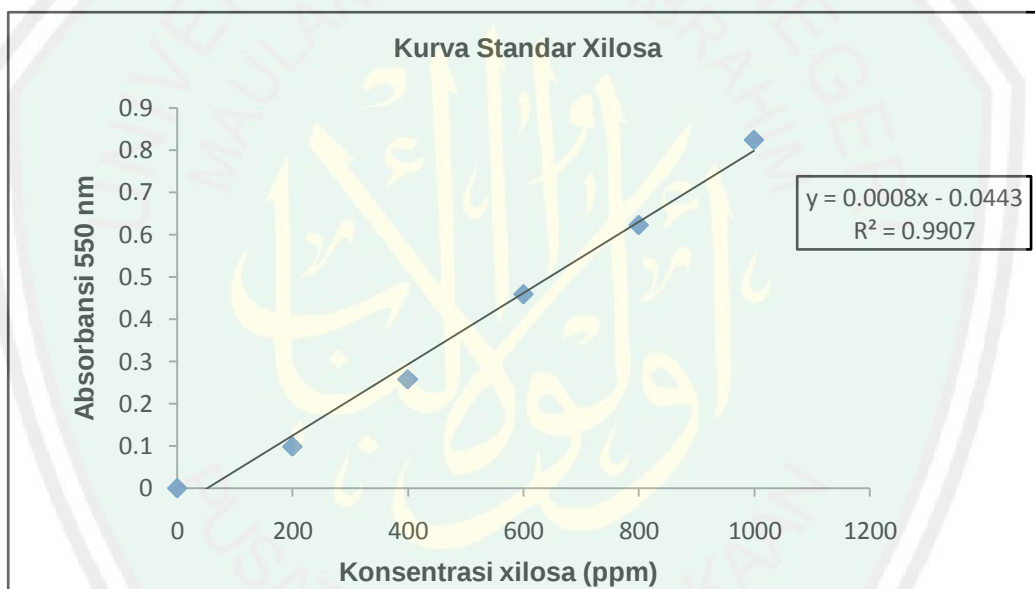
Lampiran 2. Delignifikasi Bagas Tebu



Lampiran 3. Hidrolisis Hemiselulosa Bagas Tebu Metode Asidifikasi

Lampiran 4. Kurva Standar Xilosa

Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi (550 nm)			Rata-rata
	I	II	III	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
200	0.095	0.100	0.099	0.098
400	0.250	0.260	0.262	0.257
600	0.448	0.470	0.461	0.459
800	0.610	0.630	0.627	0.622
1000	0.820	0.823	0.831	0.824



Lampiran 5. Data Absorbansi Sampel

Perlakuan		Nilai Absorbansi (550 nm)			Rata-rata
Konsentrasi Substrat (%)	Lama Inkubasi (jam)	I	II	III	
1	10	0,009	0,008	0,006	0,007
	12	0,012	0,011	0,014	0,012
	14	0,013	0,016	0,018	0,015
	16	0,025	0,024	0,027	0,025
1,5	10	0,015	0,012	0,013	0,013
	12	0,026	0,024	0,027	0,025
	14	0,032	0,034	0,031	0,032
	16	0,044	0,042	0,045	0,043
2	10	0,025	0,026	0,025	0,025
	12	0,035	0,032	0,033	0,033
	14	0,051	0,052	0,054	0,052
	16	0,064	0,067	0,065	0,065
2,5	10	0,030	0,031	0,033	0,031
	12	0,043	0,045	0,042	0,043
	14	0,086	0,088	0,085	0,086
	16	0,057	0,053	0,056	0,055

Lampiran 6. Data Absorbansi Kontrol

Perlakuan		Nilai Absorbansi (550 nm)			Rata-rata
Konsentrasi Substrat (%)	Lama Inkubasi (jam)	I	II	III	
1	10	0,006	0,003	0,003	0,004
	12	0,004	0,005	0,007	0,005
	14	0,006	0,008	0,009	0,007
	16	0,013	0,012	0,013	0,012
1,5	10	0,007	0,008	0,005	0,006
	12	0,010	0,009	0,011	0,010
	14	0,017	0,015	0,016	0,016
	16	0,020	0,019	0,022	0,020
2	10	0,012	0,015	0,013	0,013
	12	0,017	0,014	0,016	0,015
	14	0,021	0,020	0,026	0,022
	16	0,030	0,030	0,034	0,031
2,5	10	0,014	0,012	0,016	0,014
	12	0,019	0,018	0,021	0,019
	14	0,032	0,031	0,035	0,032
	16	0,024	0,025	0,028	0,025

Lampiran 7. Data Absorbansi Terkoreksi (Nilai y)

Perlakuan		Ulangan			Rata-rata
Konsentrasi Substrat (%)	Lama Inkubasi (jam)	I	II	III	
1	10	0,003	0,005	0,003	0,004
	12	0,008	0,006	0,007	0,007
	14	0,007	0,008	0,009	0,008
	16	0,012	0,012	0,014	0,013
1,5	10	0,008	0,004	0,008	0,007
	12	0,016	0,015	0,016	0,015
	14	0,015	0,019	0,015	0,016
	16	0,024	0,023	0,023	0,023
2	10	0,013	0,011	0,012	0,012
	12	0,018	0,018	0,017	0,018
	14	0,030	0,032	0,028	0,030
	16	0,034	0,037	0,031	0,034
2,5	10	0,016	0,019	0,017	0,017
	12	0,024	0,027	0,021	0,024
	14	0,054	0,057	0,050	0,054
	16	0,033	0,028	0,028	0,030

Lampiran 8. Data Konsentrasi Xilosa Produk (ppm)

Perlakuan		Ulangan			Rata-rata
Konsentrasi Substrat (%)	Lama Inkubasi (jam)	I	II	III	
1	10	5.912,5	6.162,5	5.912,5	5.995,8
	12	6.537,5	6.287,5	6.412,5	6.412,5
	14	6.412,5	6.537,5	6.625,5	6.525,2
	16	7.037,5	7.037,5	7.287,5	7.120,8
1,5	10	6.537,5	6.037,5	6.537,5	6.370,8
	12	7.537,5	7.412,5	7.537,5	7.495,8
	14	7.412,5	7.912,5	7.412,5	7.579,2
	16	8.537,5	8.412,5	8.412,5	8.454,2
2	10	7.162,5	6.912,5	7.037,5	7.037,5
	12	7.787,5	7.787,5	7.662,5	7.745,8
	14	9.287,5	9.537,5	9.037,5	9.287,5
	16	9.787,5	10.162,5	9.412,5	9.787,5
2,5	10	7.537,5	7.912,5	7.662,5	7.704,2
	12	8.537,5	8.912,5	8.162,5	8.537,5
	14	12.287,5	12.662,5	11.787,5	12.245,8
	16	9.662,5	9.037,5	9.037,5	9.245,8

Lampiran 9. Data Aktivitas Enzim (U/ml)

Perlakuan		Ulangan			Rata-rata
Konsentrasi Substrat (%)	Lama Inkubasi (jam)	I	II	III	
1	10	2,622	2,733	2,622	2,672
	12	2,899	2,788	2,844	2,843
	14	2,844	2,899	2,938	2,893
	16	3,121	3,121	3,232	3,158
1,5	10	2,899	2,677	2,899	2,825
	12	3,343	3,287	3,343	3,324
	14	3,287	3,509	3,287	3,361
	16	3,786	3,731	3,731	3,749
2	10	3,176	3,066	3,121	3,121
	12	3,454	3,454	3,398	3,435
	14	4,119	4,230	4,008	4,119
	16	4,341	4,507	4,174	4,340
2,5	10	3,343	3,509	3,398	3,416
	12	3,786	3,953	3,620	3,786
	14	5,450	5,616	5,228	5,431
	16	4,285	4,008	4,008	4,100

Lampiran 10. Metode Perhitungan Aktivitas Enzim Xilanase

Perhitungan aktivitas enzim xilanase berdasarkan persamaan kurva standar xilosa $y = 0.0008x - 0.0443$

$$x = \frac{y + 0.0443}{0.0008}$$

Keterangan : y = nilai absorbansi $[(A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}})]$

x = konsentrasi xilosa sampel

Misal, pengukuran aktivitas enzim xilanase pada perlakuan konsentrasi substrat 1% dan lama inkubasi 10 jam.

Diketahui : $y = [(0.009 - 0.000) - (0.006 - 0.000)]$

$$= 0.003$$

$$x = \frac{y + 0.0443}{0.0008}$$

$$= \frac{0.003 + 0.0443}{0.0008}$$

$$= 59,125 \text{ ppm}$$

$$x = 87.875 \times \text{fp}$$

$$= 87.875 \times 100$$

$$= 5.912,5 \text{ ppm}$$

Nilai x menunjukkan banyaknya xilosa yang dihasilkan pada reaksi fermentasi. Aktivitas enzim xilanase dapat diketahui dengan persamaan:

$$\begin{aligned} \text{Unit Aktivitas Enzim} &= \frac{C}{\text{BM}_{\text{xilosa}} \times t} \times \frac{H}{E} \\ &= \frac{5.912,5}{150,1 \times 30} \times \frac{1}{0,5} \\ &= 2,622 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas enzim xilanase dinyatakan sebagai jumlah μmol produk xilosa hasil hidrolisis enzim xilanase tiap satu menit pada kondisi pengujian.

Lampiran 11. Uji Normalitas Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Substrat Bagas Tebu dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Xilanase

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		aktivitasenzim
N		48
Normal Parameters ^a	Mean	3.53529
	Std. Deviation	.701748
Most Extreme Differences	Absolute	.140
	Positive	.140
	Negative	-.097
Kolmogorov-Smirnov Z		.970
Asymp. Sig. (2-tailed)		.304

a. Test distribution is Normal.

Lampiran 12. Analisa Hasil Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Substrat Bagas Tebu dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Xilanase

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:aktivitasenzim

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	22.763 ^a	15	1.518	127.196	.000
Intercept	599.918	1	599.918	5.028E4	.000
konsentrasisubstrat	11.220	3	3.740	313.479	.000
lamainkubasi	6.962	3	2.321	194.508	.000
konsentrasisubstrat * lamainkubasi	4.581	9	.509	42.664	.000
Error	.382	32	.012		
Total	623.063	48			
Corrected Total	23.145	47			

a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .976)

ANOVA

data

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.892	15	1.526	94.443	.000
Within Groups	.517	32	.016		
Total	23.410	47			

data

Duncan

perla kuan	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	3	2.65900								
5	3	2.82500	2.82500							
2	3	2.84367	2.84367							
3	3		2.89367							
9	3			3.12100						
4	3			3.15800	3.15800					
10	3			3.30267	3.30267	3.30267				
6	3			3.32433	3.32433	3.32433				
7	3				3.36100	3.36100				
13	3					3.41667				
8	3						3.74933			
14	3						3.78633			
16	3							4.10033		
11	3							4.11900		
12	3								4.34067	
15	3									5.43133
Sig.		.101	.539	.081	.082	.325	.724	.858	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 13. Pembuatan Media dan Reagen

1. Pembuatan Media *Nutrient Agar* dalam 100 ml Aquades

No	Bahan	Jumlah
1	NA Powder	6 gram
2	Aquades	100 ml

2. Pembuatan Media *Nutrient Broth* dalam 100 ml Aquades

No	Bahan	Jumlah
1	NB Powder	4 gram
2	Aquades	100 ml

3. Pembuatan Larutan NaOH 6%

No	Bahan	Jumlah
1	NaOH	6 gram
2	Aquades	100 ml

4. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N dalam 100 ml aquades

$$\begin{aligned}
 N \text{ NaOH} &= M \text{ NaOH} \times \alpha \\
 &= \frac{\text{massa} / \text{Mr NaOH}}{V} \times \alpha \\
 0,1 \text{ N} &= \frac{\text{massa} / 40 \text{ gr/ml}}{100 \text{ ml}} \times 1 \\
 \text{massa NaOH} &= 0,4 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

No	Bahan	Jumlah
1	NaOH	0.4 gram
2	Aquades	100 ml

5. Pembuatan Pereaksi DNS

No	Bahan	Jumlah
1	DNS	1 gram
2	Phenol	0.2 gram
3	Natrium Sulfit	0.05 gram
4	NaOH	1 gram
5	Aquades	100 ml

6. Pembuatan Larutan KNa-Tartrat 40%

No	Bahan	Jumlah
1	KNa-Tartrat	40 gram
2	Aquades	100 ml

7. Pembuatan Larutan Induk Xilosa 5000 ppm

$$5000 \text{ ppm} = \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{5 \text{ g}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

No	Bahan	Jumlah
1	Xilosa	0.5 gram
2	Aquades	100 ml

a. Pembuatan Larutan Standar 200 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 200 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \times 200 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 20 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar xilosa 200 ppm, diambil dan dimasukkan 20 ml larutan induk xilosa dalam labu ukur 100 ml, dan kemudian ditambahkan 80 ml aquades

b. Pembuatan Larutan Standar 400 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 400 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \times 400 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 40 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar xilosa 400 ppm, diambil dan dimasukkan 40 ml larutan induk xilosa dalam labu ukur 100 ml, dan kemudian ditambahkan 60 ml aquades

c. Pembuatan Larutan Standar 600 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 600 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \times 600 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 60 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar xilosa 600 ppm, diambil dan dimasukkan 60 ml larutan induk xilosa dalam labu ukur 100 ml, dan kemudian ditambahkan 40 ml aquades

d. Pembuatan Larutan Standar 800 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 800 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \times 800 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 80 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar xilosa 800 ppm, diambil dan dimasukkan 80 ml larutan induk xilosa dalam labu ukur 100 ml, dan kemudian ditambahkan 20 ml aquades

e. Pembuatan Larutan Standar 1000 ppm

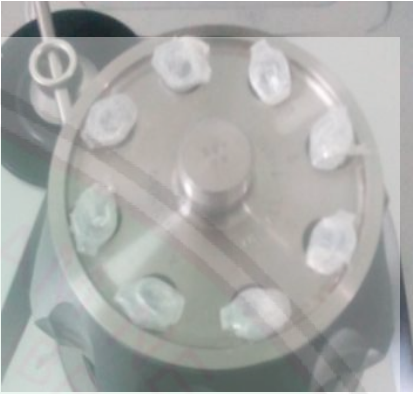
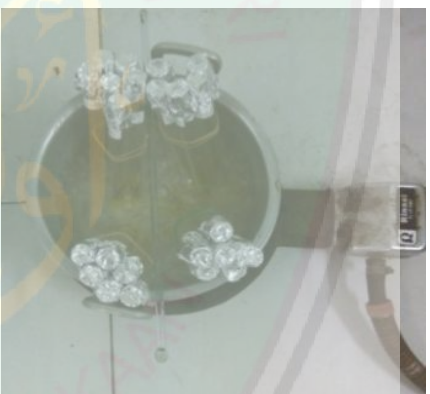
$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} \\V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\V_1 &= 100 \text{ ml}\end{aligned}$$

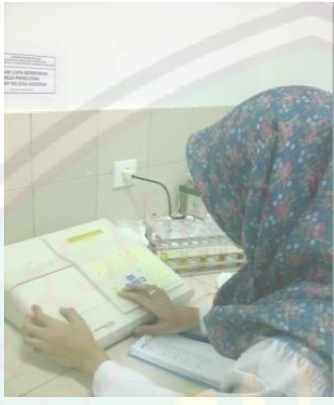
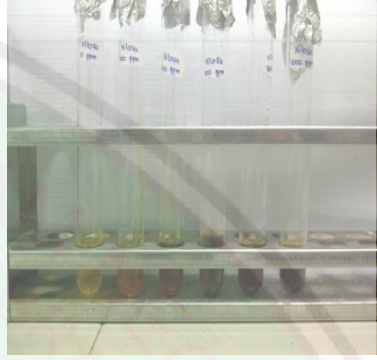
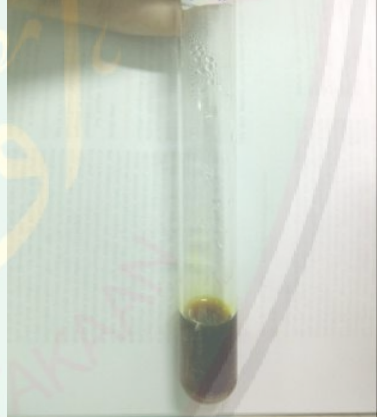
Jadi, untuk membuat larutan standar xilosa 1000 ppm, diambil dan dimasukkan 100 ml larutan induk xilosa dalam labu ukur 100 ml.



Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian

a.	Bagas tebu PG. Kebon Agung Malang	b.	Bagas tebu setelah dihaluskan dan diayak dengan ayakan 60 Mesh
			
c.	Delignifikasi bagas tebu dalam larutan NaOH 6%	d.	Bagas tebu hasil delignifikasi
			
e.	Ekstraksi xilan bagas tebu	f.	Peremajaan isolat Bacillus subtilis pada media NA miring
			

g.	Produksi xilanase oleh <i>Bacillus subtilis</i> pada substrat bagas tebu	h.	Pemanenan ekstrak kasar enzim dengan sentrifuge dingin pada suhu 4°C
			
i.	Ekstrak kasar enzim xilanase oleh <i>Bacillus subtilis</i>	j.	Proses pemanasan suspensi (enzim, substrat dan reagen DNS)
			

k.	Pengukuran absorbansi xilosa menggunakan spektrofotometer	l.	Sampel kurva standar yang diukur absorbansinya setelah dipanaskan
			
m.	Sampel yang akan diukur kadar xilosa sebelum dipanaskan	n.	Sampel xilosa yang diukur absorbansinya setelah dipanaskan
			



KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Umdatul Khasanah
NIM : 12620059
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*
Dosen Pembimbing : Ir. Hj. Liliek Harianie, A.R., M.P.

No	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1	15 Februari 2016	Konsultasi Judul	
2	18 Februari 2016	Konsultasi Bab I dan III	
3	19 Februari 2016	Revisi Bab I dan III	
4	22 Februari 2016	Revisi Bab I	
5	29 Februari 2016	Revisi Bab I dan Konsultasi Bab II	
6	09 Maret 2016	Revisi Bab II dan III	
7	21 Maret 2016	ACC Bab I, II dan III	
8	03 Juni 2016	Konsultasi Bab IV	
9	15 Juni 2016	Revisi Bab IV	
10	22 Agustus 2016	Revisi dan Konsultasi Bab IV	
11	27 September 2016	Revisi dan Konsultasi Bab IV dan V	
12	06 Desember 2016	Konsultasi Bab I, II, III, IV dan V	
13	09 Desember 2016	Revisi Bab I, II, III, IV dan V	
14	16 Desember 2016	Konsultasi Naskah Keseluruhan	
15	20 Desember 2016	ACC Naskah Keseluruhan	

Malang, 22 Desember 2016

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.

NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTRIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

KARTU KONSULTASI AGAMA

Nama : Umdatul Khasanah
NIM : 12620059
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Lama Inkubasi dan Konsentrasi Substrat Bagas Tebu (*Saccharum officinarum*) Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*
Dosen Pembimbing : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.

No	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1	22 Februari 2016	Konsultasi Bab I	
2	29 Februari 2016	Revisi Bab I	
3	09 Maret 2016	Konsultasi Bab I dan II	
4	18 Maret 2016	Revisi Bab I dan II	
5	21 Maret 2016	ACC Bab I, II, III	
6	23 Agustus 2016	Konsultasi Bab IV	
7	27 September 2016	Konsultasi Bab IV	
8	21 Desember 2016	Konsultasi Naskah Keseluruhan	
9	22 Desember 2016	ACC Naskah Keseluruhan	

Malang, 22 Desember 2016

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.

NIP. 19741018 200312 2 002