

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER MIKROORGANISME TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE DARI LUMPUR PANAS LAPINDO

Isolation and Molecular Identification of Thermophilic Microorganism Producing Xylanase from Hot Mud Disaster Lapindo

Fadeli Muhammad Habibie^{1*}, Agustin Krisna Wardani¹, Mochamad Nurcholis¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: fayt.fadel@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme penghasil enzim xilanase dari lumpur panas Lapindo. Selain itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim xilanase yang dihasilkan. Isolat yang diperoleh dimungkinkan merupakan mikroorganisme termofilik berdasarkan kondisi suhu tinggi di lumpur panas. Penelitian ini terdiri dari pengambilan sampel, isolasi, karakterisasi isolat termofilik dan karakterisasi enzim xilanase yang dihasilkan. Sebanyak 14 isolat berhasil didapatkan dan isolat C211 menunjukkan aktivitas hidrolisis terbaik. Hasil dari identifikasi molekuler berbasis 16S rRNA menunjukkan memiliki kedekatan genetik dengan *B. lichenformis* dan *B. aerius* dengan derajat kesamaan homolog masing-masing 99% dan 98%, mengindikasikan bahwa isolat tersebut termasuk genus *Bacillus*. Isolat C211 merupakan tipe Gram positif dan menunjukkan hasil positif pada uji Voges Proskauer, indol, dan *ornithine*. Suhu pertumbuhan berada pada suhu 45-65^oC dengan kondisi pH 5.8-7.2. Enzim xilanase kasar dari isolat C211 memiliki aktivitas optimum pada suhu 50^oC dan pH 7 sebesar 3.95 Unit/mL.

Kata kunci: Identifikasi berbasis 16S rRNA, lumpur panas Lapindo, mikroorganisme termofilik, xilanase

ABSTRACT

*This study was aimed to isolate and identify thermophilic microbe producing xylanase using molecular identification from hot mud disaster Lapindo. Also, it was aimed to characterize xylanase from the obtained isolates. The isolates were supposed to be thermophilic microorganism. This study comprised of sampling hot mud, isolation and characterization of thermophilic isolates, and characterization of thermophilic xylanase. Fourteen isolates were obtained from hot mud and isolate C211 showed the best activity with hydrolytic activity 1.67. The result of 16S rRNA based identification showed that isolate was closely related to *Bacillus lichenformis* or *Bacillus aerius* with homolog similarity 99% and 98%, indicating that the strain belong to *Bacillus* genus. Isolate C211 is Gram-positive with positive result at Voges Proskauer, indole, and *ornithine*. The crude xylanase characteristic optimum activity on 50^oC pH 7 with 3.95 Unit/mL.*

Keywords: 16S rRNA based identification, hot mud disaster Lapindo, thermophilic microorganism, xylanase

PENDAHULUAN

Lumpur Lapindo merupakan bencana nasional sejak 29 Mei 2006 akibat aktivitas pengeboran minyak yang dilakukan oleh PT. Lapindo Brantas. Hingga saat ini belum ada tanda-tanda bahwa semburan lumpur tersebut akan berhenti dan telah menyemburkan

hampir 6,4 juta meter kubik [1]. Lumpur panas Lapindo ini telah menenggelamkan perumahan penduduk, sekolah, pabrik dan areal persawahan di sekitarnya. Lumpur panas yang dihasilkan mengandung karbon organik sebesar 54.7-55.47%, Pb sebesar 0.27-0.34 mg/L, dan Cu sebesar 0.83-1.31 mg/L dan memiliki suhu antara 45-70°C dengan kondisi pH alkali. Karakteristik ini menunjukkan bahwa lumpur Lapindo berpotensi sebagai sumber mikroorganisme yang bersifat termofilik maupun hipertermofilik dan memiliki potensi dalam mendegradasi komponen penyusun tanaman dan dapat tumbuh pada kondisi alkali.

Salah satu komponen penyusun tanaman terbesar selain selulosa adalah xilan. Xilan merupakan polimer dari xilosa yang banyak ditemukan di dalam hemiselulosa. Hemiselulosa, lignin, dan selulosa merupakan komponen yang membentuk struktur kayu. Oleh karena itu, dimungkinkan terdapat beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim xilanase yang tumbuh di lumpur panas Lapindo. Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik dapat aktif pada suhu tinggi, sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan pada industri yang menggunakan suhu tinggi [2].

Eksplorasi mikroba termofilik penghasil enzim xilanase perlu dilakukan karena penting ditinjau dari sudut pandang bioteknologi dan potensial untuk aplikasi industri. Oleh karena itu penelitian ini diharapkan mampu mendapatkan isolat mikroorganisme termofilik penghasil enzim xilanase yang memiliki karakteristik optimal pada suhu dan pH yang tinggi [3].

Pada penelitian ini isolasi mikroba dilakukan pada sampel yang berasal dari lumpur panas Lapindo untuk mendapatkan mikroorganisme termofilik penghasil enzim xilanase. Isolat yang didapatkan selanjutnya diidentifikasi galurnya dengan uji biokimiawi dan molekuler. Tahap selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap enzim xilanase yang diperoleh dari isolat terbaik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel yang digunakan untuk mendapatkan isolat termofilik diambil dari lumpur panas Lapindo di Porong, Sidoarjo Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades, alkohol 70%, etanol 95%, NaCl, NaOH, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, H₂O₂, KOH 40%, H₂O₂ 3 %, *alphanaphtol*, garam Roschell, *phenol*, *Na-metabisulfite*, HCL 0,1 N, *phenolftalein*, 3, 5-dinitrosalisilat (DNS), *congo red*, reagen Kovacs, *bromtimol blue*, *methyl red*, kristal violet, iodin, safranin, *malachite green*, buffer asetat pH 4 -5, bufer fosfat pH 6- 7, dan buffer Tris-HCl pH 8-9. Media yang digunakan meliputi MR-VP *broth*, Luria Bertani, NB, ekstrak khamir, tripton, *bacto agar*, MIO, SCA dan *beechwood xylan*. Untuk identifikasi menggunakan deteksi gen 16S, primer yang digunakan adalah primer universal yang terdiri dari primer 8F 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' dan primer 1492R 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3', Master Mix Go Tag Green (Promega), buffer Taq, MgSO₄, dNTP, ddH₂O, marker DNA 100bp (Vivantis DNA Plus, 100bp Ladder), TE buffer, gel agarosa , TBE, dan SYBR safe.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (HL-36 AE Hirayama), refrigerator (Toshiba), kompor listrik (Maspion S-300), *vortex* (LW Scientific, GSA MX-S dan Maximix), *Laminar Air Flow* (lokal, Magnehelic, dan Nuaire), Inkubator (Binder dan Memmert), oven (Binder), sentrifugator dingin (Thermo Scientific), *shaker waterbath* (Mempert), *colony counter* (WTW BZG 30), timbangan digital (Mettler Toledo), spektrofotometer (Jenway 6305), mikroskop (Micros Austria), pH meter (Hanna Instrument), mikropipet (Socorex, Finpipette Digital, Nichiryo, dan Eppendorf), kamera mikroskop (Cannon G10), kamera digital (Sony DSC-W710) dan *pipet aid* (Drummond). Sedangkan alat yang digunakan untuk proses identifikasi 16S rDNA adalah *dry bath* (Thermo Scientific Multiblok Heater), NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer), *Polymerase Chain Reaction* (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700), *96-well sequencer* (Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer), perangkat elektroforesis dan visualisasi dengan Gel-Doc XR 1000.

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif yang dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme dari lumpur panas Lapindo. Tahap kedua adalah melakukan produksi dan karakterisasi enzim xilanase kasar yang dihasilkan. Hasil penelitian dipaparkan secara deskriptif berdasarkan tahapan-tahapan penelitian yang dilakukan. Sedangkan hasil pengujian aktivitas enzim xilanase dipaparkan secara kuantitatif.

Metode Penelitian

1. Preparasi Media Xilan Kasar dari Tongkol Jagung

Tongkol jagung didapatkan dari Pasar Belimbing Malang Jawa Timur dan digiling sampai lolos saringan 40 mesh. Xilan kasar yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai media pengkayaan untuk menginduksi pertumbuhan mikroorganisme dalam sampel lumpur Lapindo.

2. Proses Pengambilan Sampel Lumpur Lapindo

Sampel diambil secara aseptis dari lumpur panas Lapindo Porong, Sidoarjo Jawa Timur pada 3 titik yang berbeda. Setiap lokasi pengambilan sampel diukur suhu dan pH menggunakan termometer dan pH meter. Sampel selanjutnya dibawa menuju ke laboratorium untuk dilakukan isolasi dan seleksi mikroba.

3. Pengkayaan dan Isolasi Mikroorganisme Termofilik Xilanolitik.

Sampel lumpur Lapindo diperkaya dalam media Luria Bertani (LB) yang ditambahkan xilan kasar 1%. Sampel diinokulasikan ke dalam media dengan perbandingan 1 : 2 dalam tabung erlenmeyer 250 dan diinkubasi pada suhu 55⁰C, 120 rpm selama 72 jam. Setelah dilakukan pengkayaan dilakukan pengenceran hingga 10⁻⁵ dan diambil 3 pengenceran terakhir. Selanjutnya sampel ditumbuhkan media Nakamura yang mengandung 2 g LB, 0,1 g KH₂PO₄, 0,02 g MgSO₄.7H₂O dan ditambahkan xilan kasar 0.5 g per 100 ml menggunakan metode *pour plate* dan *spread plate* [14]. Isolat diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 48 jam untuk menyeleksi mikroorganisme termofilik. Setiap isolat yang tumbuh dilakukan isolasi kembali pada media Nakamura untuk memastikan isolat yang diperoleh merupakan kultur tunggal.

4. Identifikasi dan Karakterisasi Mikroorganisme Termofilik Xilanolitik

Identifikasi awal dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media Nakamura yang mengandung *beechwood xylan* 0.5 % dan mengamati zona bening yang terbentuk. Isolat terpilih yang mampu menghasilkan zona bening diidentifikasi secara morfologi, mikroskopis, dan biokimia. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepian dan warna pada koloni. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram untuk mengetahui jenis Gram dan dan pewarnaan endospora untuk mengetahui keberadaan endospora pada isolat. Uji biokimia sederhana meliputi uji katalase, uji sitrat, uji MR (*Methyl Red*), uji VP (*Voges-Proskauer*), uji indol, dan uji *ornithine*.

Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan metode PCR dan sekuensi gen 16S rRNA. Proses amplifikasi secara PCR menggunakan primer universal 8F (*forward*; 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (*reverse*; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Proses ini dilakukan selama 30 siklus, yakni denaturasi 94⁰C selama 30 detik, penempelan 50⁰C selama 30 detik, dan elongasi 72⁰C selama 3 menit. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya disekuensing menggunakan DNA *sequencer*. Data hasil sekuensing selanjutnya dikomparasi dengan data sekuen yang ada di GenBank menggunakan program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sebanyak 17 rRNA sekuen dari spesies relatif dari genus *Bacillus* diambil dan dianalisis tingkat kekerabatannya menggunakan program CLUSTALW. Selanjutnya dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik metode *neighbor-joining plot* menggunakan program MEGA5.

5. Produksi Enzim Xilanase Termofilik

Isolat terpilih diinokulasikan pada media Luria Bertani untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimal. Sebanyak 10 ml kultur cair dimasukkan ke dalam 140 ml media Nakamura dan diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 18 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh

dengan memisahkan supernatan dan pelet kultur pada kecepatan sentrifugasi 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

6. Pengujian Aktivitas Xilanase

Pengujian aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan mengukur kadar gula reduksi dpada substrat *beechwood xylan* menggunakan metode *Dinitrosaliclyc acid* (DNS) [13]. Sebanyak 1 ml substrat ditambahkan supernatan 1 ml dan diinkubasikan pada suhu 55°C. Setelah 1 jam, ditambahkan 3 ml larutan DNS dan didiamkan 10 menit. Kemudian dididihkan selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. 1 unit aktivitas enzim xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim xilanase yang dibutuhkan untuk melepaskan 1 µmol gula reduksi (xilosa) per menit pada kondisi reaksi optimum.

7. Penentuan pH dan Suhu Optimum Enzim Xilanase

Penentuan pH optimum enzim xilanase dilakukan dengan menginkubasi 1 mL supernatan (ekstrak kasar enzim) dan 1 mL substrat xilan (*beechwood xylan* 1%) pada rentang pH 5,0-8,0. Buffer yang digunakan adalah buffer asetat pH 4 dan 5, bufer fosfat pH 6 dan 7, dan bufer Tris-HCl pH 8 dan 9. Untuk menentukan pH optimal, enzim dan substrat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 55°C dan diukur aktivitasnya sesuai dengan pengujian aktivitas enzim. Penentuan suhu optimum enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sama selama 1 jam dengan variasi suhu 45°C, 50°C, 55°C, 60°C dan 65°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme

Isolat termofilik mampu tumbuh pada temperatur 45-70°C. pada penelitian ini digunakan *beechwood xylan* 0.5% dalam medium untuk menselesksi mikroorganisme yang mampu menghasilkan xilanase yang ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Didapatkan total 14 isolat yang berhasil diisolasi dari lumpur panas Lapindo, yakni A102, A103, B101, B102, C101, C102, C103, C104, C105, C111, C112, C113, C114, C115, C211, C212. Isolat tersebut dapat tumbuh di media Nakamura pada suhu 55°C. Aktivitas xilanolitik pada semua isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Xilanolitik Mikroorganisme Termofilik Berdasarkan Rasio antara Diameter Zona Bening dengan Diameter Koloni.

Isolat	Diameter Koloni (cm)	Diameter Zona Bening (cm)	Aktivitas Hidrolisis
A102	0.70	1.10	1.57
A103	0.70	1.10	1.57
B101	0.70	1.00	1.43
B102	0.90	1.30	1.44
C101	0.80	1.20	1.50
C102	0.80	1.20	1.50
C103	0.90	1.20	1.33
C111	1.00	1.30	1.30
C112	0.70	1.10	1.57
C113	0.80	1.20	1.50
C114	0.90	1.30	1.44
C115	0.70	1.10	1.57
C211	0.60	1.00	1.67
C212	0.70	1.10	1.57

Dari hasil pengujian aktivitas xilanolitik menunjukkan bahwa isolat C211 memiliki aktivitas hidrolisis tertinggi sebesar 1.67. Isolat tersebut dipilih untuk proses identifikasi fenotipe, biokimiawi dan molekuler. Isolat C211 merupakan tipe Gram positif dan bersifat

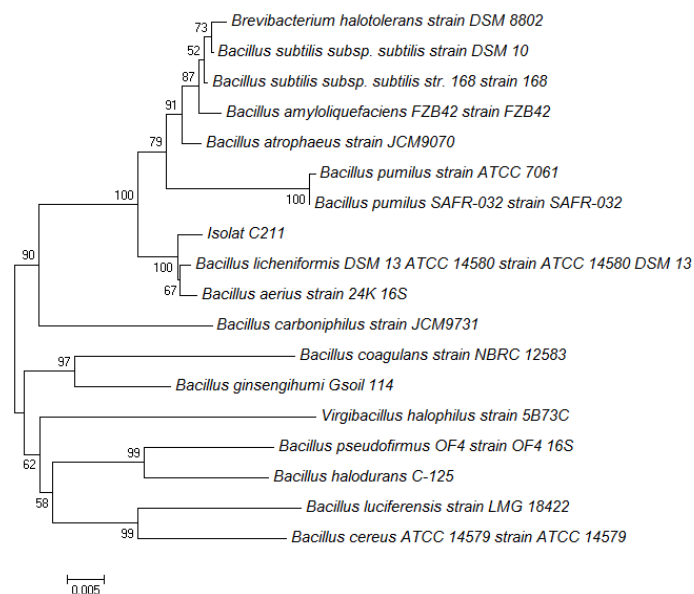
motil. Hasil morfologi menunjukkan bahwa koloni C211 berbentuk sirkuler, berwarna putih, dan bentuk sel batang. Selain itu, isolat tersebut juga mampu menghasilkan endospora pada kondisi stasioner. Dalam uji biokimia, isolat tersebut memiliki hasil positif pada uji VP, indol, dan *ornithine*. Sedangkan uji katalase, sitrat, dan MR memberikan hasil negatif. Suhu pertumbuhan berada pada suhu 45-65°C dengan kondisi pH 5.8-7.2 (Tabel 2).

Tabel 2. Karakterisasi Fenotipe Isolat C211 dan Spesies Relatif

Karakterisasi	Isolat C211	<i>B. lichenformis</i>	<i>B. aerius</i>
Bentuk sel	Basil	Basil	Basil
Bentuk Koloni	Sirkuler	Sirkuler - iregular	Iregular
Warna	Putih	Putih	Putih
Gram	+	+	+
Endospora	+	+	+
Suhu pertumbuhan (°C)	45-65	10-70	10-37
pH pertumbuhan	5.8-7.2	5.7-6.8	6-10
Katalase	-	+	+
<i>Methyl Red</i> (MR)	-	TD	-
<i>Voges-Proskauer</i> (VP)	+	TD	+
Motilitas	+	+	+
Indol	+	-	-
<i>Ornithine</i>	+	-	-
Sitrat	-	-	+

Keterangan : (+) = hasil uji positif , (-) = hasil uji negatif , TD= tidak ditentukan, *B. lichenformis* [10], *B. aerius* [17]

Hasil dari analisis filogenetik mengindikasikan bahwa isolat C211 memiliki kedekatan ciri genetik dengan *B. lichenformis* DSM13 ATCC 14580 [10] atau *B. aerius* strain 24K !S [17]. Hasil sekuen rRNA menunjukkan derajat kesamaan homolog masing-masing 99% dan 98%.

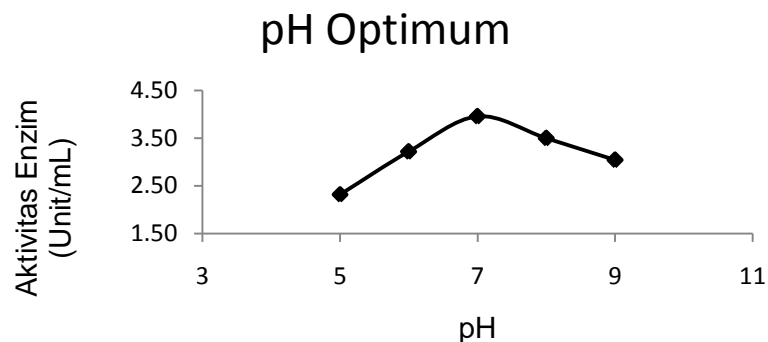


Gambar 1. Pohon filogenetik isolat C211 dan spesies relatif menggunakan *NJ-plot* berdasarkan hasil analisis 16S rRNA. Seluruh sekuen yang digunakan diperoleh dari *genbank* di NCBI. Skala bar menunjukkan jarak evolusi antar spesies.

Berdasarkan hasil analisis fenotipe dan genotipe mengindikasikan bahwa isolat C211 termasuk dalam genus *Bacillus*. Hasil analisis genotipe disebutkan memiliki kedekatan ciri genetik terdekat dengan *B. lichenformis* yakni 99%. Akan tetapi dari hasil analisis fenotipe dan membandingkannya dengan karakteristik *B. lichenformis* yang ada terdapat beberapa perbedaan. Hal ini mengindikasikan isolat yang diperoleh tersebut bisa saja merupakan jenis isolat baru dari genus *Bacillus*. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut guna mengetahui karakteristik dari isolat C211 dan memastikan jenis isolat yang diperoleh dari identifikasi molekuler.

2. Aktivitas Xilanase

Enzim mampu bekerja secara optimal dan menghasilkan aktivitas optimum pada kondisi pH optimal. Karlson [11] menyebutkan bahwa struktur ion enzim dipengaruhi oleh kondisi pH lingkungannya yang akan mempengaruhi sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase kasar dapat dilihat pada Gambar 2.



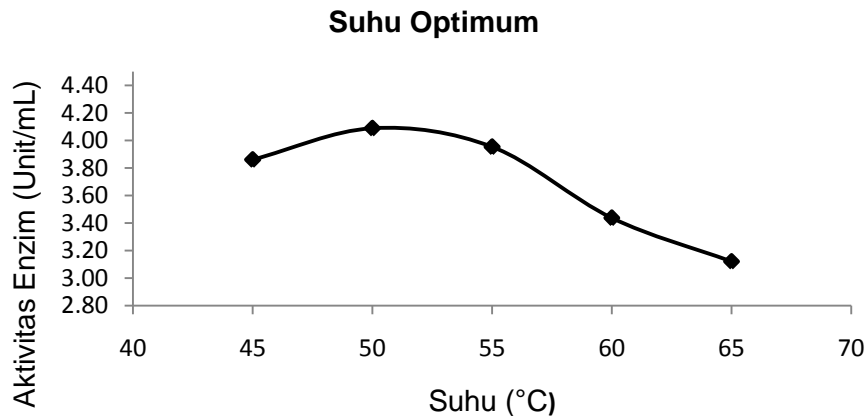
Gambar 2. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Kasar dari Isolat C211

Data hasil menunjukkan bahwa aktivitas enzim xilanase mengalami kenaikan dari pH 5.0 hingga pH 7.0, selanjutnya menurun hingga pH 9.0. Enzim xilanase kasar yang diisolasi dari isolat C211 memiliki pH optimum 7.0 dengan aktivitas enzim sebesar 3.95 Unit/mL. Pada kondisi pH optimum, enzim memiliki konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat sehingga dapat membentuk kompleks enzim-substrat yang tepat dan menghasilkan produk secara maksimal. Sebaliknya pada kondisi pH yang kurang optimal, enzim akan mengalami perubahan konformasi yang menyebabkan enzim mengalami perubahan struktur dan kehilangan aktivitasnya. Davidson dan Sittman [6] menyatakan bahwa perubahan pH dapat mempengaruhi tingkat ionisasi terhadap gugus pemberi dan penerima proton pada sisi katalitik enzim.

Aktivitas enzim xilanase kasar pada pH optimum 7.0 ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan Grupta *et al.* [9] yang menunjukkan bahwa enzim xilanase yang diperoleh dari *Bacillus sp.* NG-27 memiliki pH optimum 7.0 yang stabil pada kisaran 6.0-10.0. Hasil penelitian lainnya yang dilakukan oleh Esteban *et al.* [8] yang mengisolasi enzim xilanase dari *Bacillus circulans* WL-12 memiliki pH optimum pada kisaran 5.5 hingga 7.0. Menurut Beg *et al.* [3], pH optimum xilanase dari bakteri adalah 5.0 sampai 9.0. Hal ini menunjukkan bahwa pH optimum dari kitinase isolat C211 berada dalam kisaran pH optimum bakteri penghasil xilanase pada umumnya.

Selain pH, faktor lain yang mempengaruhi aktivitas katalitik enzim adalah suhu. Aktivitas katalitik enzim akan mencapai nilai maksimal ketika dikondisikan pada suhu optimum enzim dimana pada suhu tersebut enzim mampu bekerja secara maksimal dan memiliki konformasi sisi aktif yang stabil. Menurut Lehninger [12], pemberian suhu yang melebihi suhu optimumnya dapat menyebabkan aktivitas katalitik enzim menurun atau bahkan hilang. Hal ini disebabkan kenaikan suhu yang tinggi dapat merusak konformasi sisi

aktif enzim sehingga enzim mengalami denaturasi. Pengaruh suhu optimum dan kestabilan suhu terhadap enzim xilanase kasar dari isolat C211 dapat dilihat pada Gambar 3



Gambar 3. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Kasar dari isolat C211

Data hasil menunjukkan Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim xilanase kasar mencapai titik maksimumnya pada suhu 50°C. Aktivitas enzim xilanase kasar selanjutnya menurun hingga suhu 50°C. Pada kondisi suhu tersebut terjadi peningkatan energi yang menyebabkan molekul-molekul enzim dan substrat lebih mudah menempel sehingga mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat sehingga produk yang terbentuk semakin banyak [15]. Enzim xilanase mulai mengalami penurunan aktivitas yang signifikan ketika diuji pada suhu 60°C. Pada kondisi ini, enzim mulai kehilangan aktivitasnya disebabkan sisi konformatif aktif enzim terganggu dan terjadi denaturasi.

Kondisi suhu optimum enzim xilanase dari isolat C211 ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Blanco *et al.* [4] terhadap *Bacillus sp.* strain BP-23 dengan suhu optimum 50°C dan stabil pada suhu 55°C. Penelitian lainnya oleh Cordeiro *et al.* [5] yang mengidentifikasi *Bacillus sp.* termofilik dari tanah menunjukkan bahwa enzim xilanase yang dihasilkan memiliki suhu optimum 60°C dan stabil pada suhu 55°C. Bahkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Grupta *et al.* [9] menunjukkan bahwa enzim xilanase yang dihasilkan dari *Bacillus sp.* NG-27 memiliki suhu optimum yang tinggi yaitu 70°C dan memiliki kestabilan suhu yang luas dari 40-90°C. Pada penelitian ini, isolat C211 memiliki pertumbuhan maksimum pada suhu 55°C dan enzim xilanase yang dihasilkan optimum pada suhu 50-55°C. Menurut Richana [16], enzim memiliki suhu optimum yang tidak jauh berbeda dengan suhu pertumbuhan optimum mikroorganisme yang menghasilkan enzim tersebut.

SIMPULAN

Sebanyak 14 isolat berhasil didapatkan dan salah satu diantaranya (isolat C211) menunjukkan aktivitas hidrolisis terbaik. Hasil dari identifikasi molekuler 16S rRNA menunjukkan memiliki kedekatan genetik dengan *B. lichenformis* atau *B. aerius* dengan derajat kesamaan homolog masing-masing 99% dan 98. Isolat C211 merupakan tipe Gram positif dan hasil positif positif pada VP, indol, dan *ornithine*. Isolat tersebut memiliki rentang suhu pertumbuhan pada suhu 45-65°C dengan kondisi pH 5.8-7.2. Hasil dari karakterisasi enzim xilanase kasar menunjukkan optimum pada suhu 50°C dan pH 7 dengan aktivitas enzim 3.95 Unit/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi (DIKTI), Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas bantuan pendanaan penelitian melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP) 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) AFP, 2013. New study ignites debate over Indonesia's mud volcano. Phys.org. 22 Jul 2013. Downloaded at <http://phys.org/news/2013-07-ignites-debate-indonesia-mud-volcano.html>
- 2) Agustini, R. 2010. Protease Characterization and Amobilization from Thermophilic Isolate Cg-10 Isolated from Hot Water Spring Cangar-East Java. Research Report, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
- 3) Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 26-38.
- 4) Blanco A., Vidal T., Colon J.F., Pastor, F.I.J. 1995. Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Appl Environ Microbiol* 61:4468–4470
- 5) Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., daSilva, R.F. 2002. Production and Properties of Xylase of Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 45. 4: 413:418.
- 6) Davidson, V.L., dan Sittman, D.B. 1999. Biochemistry. 4th Edition. Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia.
- 7) Davies, R, Swarbrick, RE, Evans, RJ & Huuse, M. (2007) Birth of a mud volcano: East Java. *GSA Today*, 29 May, p.4-9.
- 8) Esteban, R., Villanueva, J.R., Villa, T.G. 1982. β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Can J Microbiol* 28:733–739
- 9) Gupta, N., Vohra, R.M., Hoondal, G.S. 1992. A thermostable extracellular xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. NG-27. *Biotechnol Lett* 14:1045–1046
- 10) Hoyles, L., Honda, H., Logan, N.A., Halket, G., La Ragione, R., McCartney, A.L. 2012. Recognition of Greater Diversity of *Bacillus* Species and Related Bacteria in Human Faeces. *Research in Microbiology*. 163: 3-13.
- 11) Karlson, P. 1979. Introduction to Modern Biochemistry (3rd Edition). Academic Press. New York.
- 12) Lehninger, A.L. 1997. Dasar-dasar Biokimia. Alih Bahasa Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja. Penerbit Erlangga, Bandung. .
- 13) Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagenty for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- 14) Nakamura S, Nakai R, Wakabayashi K, Ishiguro Y, Aono R, Horikoshi K. 1994. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:78-81.
- 15) Price, N.C., dan Stevens, L. 1999. Fundamentals of Enzymology The Cell and Molecular Biology of Catalytic Protein. 3th Edition. Oxford University Press. New York.
- 16) Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio* 5(1):29-36
- 17) Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., Bhargav, P.M. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratospherichus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *USEM* 56 : 1465-1473.