



Seleksi dan Identifikasi Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Tanah Bukit Krakitan, Bayat, Klaten

Selection and identification of xylanase producing alkaliphilic bacteria isolated from soil in Krakitan hill, Bayat, Klaten

HANIFAH THOYIB, RATNA SETYANINGSIH[♥], SURANTO

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

Diterima: 3 Januari 2006. Disetujui: 22 Maret 2006.

ABSTRACT

Xylanase producing alkaliphilic bacteria are bacteria that can grow well in alkaline environment. They can produce xylanase that optimum at high pH to hydrolyze xylans to be xylooligosaccharides and xylose. The calcareous soil with pH more than 7,3 can be xylanase producing alkaliphilic bacteria nature habitat. The aims of this research were (1) to isolate xylanase producing alkaliphilic bacteria isolated from calcareous soil in limestone hill area Krakitan, Bayat, Klaten and (2) to determine the kind of xylanase producing alkaliphilic bacteria which has high xylanolytic activity. For isolation and selection of xylanase producing alkaliphilic bacteria, the alkaline medium pH 9-10 were used, and 0,5 % oat spelt xylan was added. The calcareous soil was taken from limestone hill area and then was filtered and inoculated on to alkaline medium. After that, they were incubated in shaker incubator for 3 days at 150 rpm in 30-37°C. Then, the enrichment sample was grown in the same medium, that 1,8% agar was added. The colonies that grew and produced clearing zone which had the highest xylanolytic activity were chosen then characterized and identified. The growth ability isolates were examined in xylan medium at pH 7, 8, 9, 10, and 11 in order to decide bacteria of fakultative or obligate alkaliphilic. Xylanase producing alkaliphilic bacteria could be isolated from calcareous soil in limestone hill area Krakitan, Bayat, Klaten. The identified 10 xylanase producing alkaliphilic bacteria that had xylanolytic activity were *Pseudomonas* HT-1a, *Pseudomonas* HT-1b, *Bacillus* HT-2a, *Bacillus* HT-2d, *Flavobacterium rigense* HT-3c, *Micrococcus luteus* HT-3d, *Paracoccus alcaliphilus* HT-5c, *Alcaligenes* HT-4c, *Alcaligenes* HT-5a, and *Alcaligenes* HT-5b.

[♥] Alamat korespondensi:
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

Keywords: selection, identification, xylanase producing alkaliphilic bacteria, soil.

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat merombak xilan menjadi xilooligosakarida dan selanjutnya menjadi xilosa. Xilan adalah salah satu jenis hemiselulosa, yang merupakan polisakarida paling berlimpah di alam setelah

selulosa (Yamaura *et al.*, 1997). Polisakarida ini memiliki rantai dasar unit D-xilopiranosida yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida (Anthony *et al.*, 2003). Aktivitas xilanase dalam merombak xilan sangat diperlukan untuk pertumbuhan mikrobial di alam (Hanim, 2002).

Enzim xilanolitik sangat potensial dalam beberapa aplikasi di bidang bioteknologi. Aplikasi xilanase secara komersial digunakan dalam industri makanan dan pemanfaatan limbah pertanian untuk produksi xilosa. Xilosa adalah gula rendah kalori yang dapat dikonsumsi penderita diabetes (Richana dkk., 2000). Pada industri pulp dan kertas, xilanase dapat menggantikan klorin yang digunakan dalam proses pemutihan bubuk kertas (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995). Aplikasi lain xilanase yaitu untuk meningkatkan mutu pakan ternak non ruminansia (Irawan, 2001).

Xilanase merupakan produk bioteknologi yang memiliki kegunaan cukup beragam, tetapi produksinya masih menghadapi beberapa kendala. Kendala yang muncul antara lain masih kurang tersedia biakan mikrobia unggul dan pengetahuan tentang teknologi produksi enzim. Banyak pakar dari negara maju mengakui bahwa negara yang kaya akan keanekaragaman hayatinya, merupakan sumber mikrobia potensial untuk bioproses (Richana dkk., 2000).

Xilanase diproduksi oleh berbagai jenis mikrobia. Beberapa bakteri, fungi, dan aktinomisetes dapat menggunakan xilan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan dan sintesis sel (Alexander, 1976). Mikrobia penghasil xilanase dapat diisolasi dari tanah, rumen ternak dan habitat lain yang banyak mengandung bahan organik. Kondisi pH tanah sangat mempengaruhi mikrobia yang mengawali perombakan xilan. Di tanah dengan pH netral hingga alkali, mikrobia penghasil xilanase yang dominan adalah bakteri (Schlegel dan Schmidt, 1994).

Xilanase yang optimum pada pH tinggi banyak digunakan dalam kegiatan industri. Hal ini dikarenakan, xilan bersifat mudah larut dalam suasana pH alkali (Gupta *et al.*, 2000). Xilanase yang optimum pada pH tinggi tersebut dapat dihasilkan dari bakteri alkalifilik. Bakteri alkalifilik adalah bakteri yang mampu tumbuh optimum pada pH lebih dari 8 (Grant, 1992). Menurut Kushner (1993) bakteri alkalifilik dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu alkalifilik fakultatif dan alkalifilik obligat. Kedua bakteri tersebut dapat tumbuh pada pH 10-12. Meskipun demikian, bakteri alkalifilik fakultatif juga dapat tumbuh pada pH lingkungan yang mendekati netral (6,6-7,3), sedangkan bakteri alkalifilik obligat tidak dapat tumbuh di bawah pH 8,5.

Pada penelitian ini, sumber isolat yang digunakan adalah tanah berkapur dari kawasan bukit gamping Bayat yang terletak di kota Klaten

bagian selatan. Tanah tersebut merupakan tanah berkapur dan memiliki pH lebih besar dari 7,3. Poerwowidodo (1992) mengklasifikasikan pH tanah lebih besar dari 7,3 sebagai tanah alkali. Tanah dengan pH tinggi dapat menjadi habitat alami bakteri alkalifilik perombak bahan organik seperti xilan. Pengambilan sampel tanah alkali sebagai sumber isolat diperlukan untuk memperoleh bakteri yang memiliki enzim stabil pada kondisi alkali, meskipun bakteri yang tumbuh pada tanah tersebut lebih sedikit daripada yang tumbuh di tanah netral. Berdasarkan hal-hal yang telah diuraikan, maka dilakukan seleksi dan identifikasi bakteri alkalifilik penghasil xilanase dari tanah berkapur yang mempunyai pH lebih besar dari 7,3.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri alkalifilik penghasil xilanase dari tanah berkapur kawasan bukit gamping Krakitan, Bayat, Klaten dan mengetahui jenis bakteri alkalifilik penghasil xilanase yang mempunyai aktivitas xilanolitik tinggi.

BAHAN DAN METODE

Sampel Tanah Berkapur

Sumber isolat yang digunakan adalah tanah berkapur dari kawasan bukit gamping Krakitan, Bayat, Klaten. Sampel tanah diambil secara acak berkelompok pada kedalaman 0-15 cm (Rao, 1994). Kemudian sampel tanah halus 10 gr dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 25 ml akuades. Suspensi tanah dikocok selama 30 menit lalu didiamkan 5 menit, dan diukur pHnya (Poerwowidodo, 1992).

Kultur Diperkaya

Sampel tanah berkapur 2 gr dimasukkan ke dalam 20 ml medium xilan pH 9, lalu diinkubasi pada shaker inkubator 150 rpm, 37°C selama 72 jam. Komposisi medium xilan ialah 0,5% baktopepton, 0,5% yeast ekstrak, 0,5% oat spelt xilan (Sigma Chemical Co.), 0,02% MgSO₄.7H₂O, 0,1% K₂HPO₄. Pengaturan medium pada pH 9-10 dilakukan dengan menambahkan 0,2% Na₂CO₃ setelah medium diautoklaf (Nakamura *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995).

Isolasi dan Seleksi Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase

Sampel hasil pengkayaan 10 ml diencerkan dengan akuades steril hingga 10⁻⁸. Hasil pengenceran 10⁻⁵-10⁻⁸ masing-masing diambil 0,1 ml untuk dibiakkan dalam medium xilan agar

dengan metode cawan sebar, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Koloni yang membentuk zona jernih dibiakkan kembali dengan metode cawan gores.

Seleksi dilakukan berdasarkan aktivitas xilanolitik bakteri alkalifilik yaitu, perbandingan antara diameter zona jernih dengan diameter koloni. Kultur murni bakteri diinokulasikan pada medium xilan agar dengan metode titik (Martani dkk., 2003), lalu diinkubasi. Setelah inkubasi, diameter koloni dan diameter zona jernih diukur dengan jangka sorong. Sepuluh bakteri yang mempunyai aktivitas xilanolitik tinggi diidentifikasi.

Identifikasi Bakteri Alkalofilik Penghasil Xilanase

Identifikasi bakteri mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi ke-9 (Holt *et al.*, 1994) dan edisi ke-8 (Buchanan dan Gibbons, 1974). Identifikasi dilakukan berdasar atas pengamatan makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia. Pengamatan makroskopis morfologi koloni meliputi bentuk, tepian, warna, elevasi, dan struktur dalam koloni. Selain itu juga dilakukan uji motilitas (Gandjar dkk., 1992). Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram dan pewarnaan spora untuk mengetahui bentuk dan ukuran sel serta keberadaan dan letak spora (Hadioetomo, 1993).

Uji biokimia yang dilakukan antara lain uji katalase, uji oksidase, uji reduksi nitrat, uji hidrogen sulfida, uji MR (*Methyl Red*), uji VP (*Voges-Proskauer*), uji hidrolisis urea, uji hidrolisis pati (Hadioetomo, 1993), uji fermentasi gula (glukosa, xilosa, manitol, laktosa) dalam tabung Durham, uji hidrolisis tryptofan (Gandjar dkk., 1992), dan uji hidrolisis gelatin (Cowan, 1985).

Uji Pertumbuhan Isolat Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase pada Medium Xilan pH 7-11

Biakan padat bakteri 1 ose diinokulasikan pada medium xilan lalu di inkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kemudian biakan cair bakteri tersebut dikultivasi dalam erlenmeyer yang berisi 10 ml medium xilan pH 7, 8, 9, 10, dan 11, dan diinkubasi pada *shaker inkubator* selama 72 jam pada 150 rpm dan suhu 37°C. Absorbansi suspensi sel diukur pada panjang gelombang 660 nm dengan spektrofotometer UV. Pengukuran dilakukan sebelum inkubasi dan akhir inkubasi sehingga dapat diketahui perubahan massa selnya, yang menunjukkan pertumbuhan dari bakteri tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel tanah berkapur

Hasil pengukuran pH dari sampel tanah berkapur menunjukkan bahwa tanah yang diambil merupakan tanah alkali karena memiliki pH lebih dari 7,3. Nilai pH tanah berkapur ditunjukkan di tabel 1. Tanah alkali merupakan habitat yang baik bagi tumbuhnya bakteri alkalofilik.

Tabel 1. Nilai pH Sampel Tanah Berkapur dari Kawasan Bukit Gamping Krakitan, Bayat, Klaten.

Sumber Isolat	pH
Sampel Tanah 1	8,00
Sampel Tanah 2	7,95
Sampel Tanah 3	7,92
Sampel Tanah 4	7,51
Sampel Tanah 5	7,65

Isolat Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase

Isolasi bakteri alkalifilik penghasil xilanase dilakukan menggunakan medium alkali pH 9-10 yang mengandung xilan 0,5 %. Penambahan xilan bertujuan untuk menyeleksi bakteri yang dapat menghasilkan xilanase untuk menghidrolisis xilan. Indikasi bahwa bakteri menghasilkan xilanase ditandai dengan terbentuknya zona jernih.

Hasil isolasi diperoleh sebanyak 16 isolat bakteri alkalifilik penghasil xilanase. Berdasarkan pengukuran aktivitas xilanolitik bakteri, 10 isolat yang memiliki aktivitas tertinggi diidentifikasi. Aktivitas xilanolitik bakteri ditunjukkan di tabel 2. Hasil identifikasi terhadap 10 isolat bakteri alkalifilik. Hasil identifikasi 10 isolat bakteri diperoleh 6 genus yaitu genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, dan *Alcaligenes*.

Isolat dari Genus *Pseudomonas*

Sebanyak 2 isolat yang telah diidentifikasi yaitu, HT-1a dan HT-1b tergolong sebagai genus *Pseudomonas*. Kedua isolat tersebut teridentifikasi sebagai genus *Pseudomonas* karena sesuai dengan yang dikemukakan Holt *et al.* (1994) dan Madigan *et al.* (2000). Ciri dari genus *Pseudomonas* tersebut antara lain: sel berbentuk batang lurus atau batang melengkung tetapi tidak heliks, dengan ukuran 0,5-1,0 × 1,5-5,0 µm, reaksi gram negatif, tidak berspora, pada umumnya motil. Hidup secara aerob, metabolismenya melalui respirasi, bersifat kemoorganotrof yaitu dapat menggunakan bahan organik sebagai sumber energi dan

karbon. Katalase selalu positif dan oksidase biasanya positif. *Pseudomonas* HT-1a dan HT-1b diperoleh dari sampel tanah alkali pH 8,0. Perbedaan morfologi koloni dapat dilihat di tabel 3. Perbedaan morfologi sel ditunjukkan di tabel 4. Hasil uji biokimia ditunjukkan di tabel 5.

Tabel 2. Aktivitas Xilanolitik Bakteri Alkalifilik yang Diukur Berdasarkan Rasio Antara Diameter Zona Jernih dengan Diameter Koloni Bakteri pada Medium *Oat Spelt Xilan* pH 9-10.

Kode Isolat	Diameter Zona Jernih (mm)	Diameter Koloni (mm)	Aktivitas Xilanolitik
HT-1a	25	6	4,16
HT-1b	24	6	4,00
HT-2a	11	6	1,83
HT-2b	6	5	1,20
HT-2c	7	5	1,40
HT-2d	9	4	2,25
HT-3a	8	6	1,33
HT-3b	10	7	1,42
HT-3c	9	4	2,25
HT-3d	10	6	1,66
HT-4a	4	3	1,33
HT-4b	4	3	1,33
HT-4c	9	6	1,50
HT-5a	10	6	1,66
HT-5b	12	6	2,00
HT-5c	9	6	1,50

Tabel 3. Morfologi Koloni Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Pseudomonas*.

Karakter	<i>Pseudomonas</i> HT-1a	<i>Pseudomonas</i> HT-1b
Bentuk	Tak beraturan (<i>Ireguler</i>)	Tak beraturan (<i>Ireguler</i>)
Tepi	Berlekuk (<i>Lobate</i>)	Berlekuk (<i>Lobate</i>)
Warna	Putih Krem	Putih Krem
Elevasi	Timbul (<i>Low convex</i>)	Timbul (<i>Low convex</i>)
Struktur dalam	Halus (<i>Smooth</i>)	Bergranula kasar (<i>Coarsely granular</i>)
Ukuran (mm)	3,0 – 4,0	3,0- 4,0

Tabel 4. Morfologi Sel Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Pseudomonas*.

Karakter	<i>Pseudomonas</i> HT-1a	<i>Pseudomonas</i> HT-1b
Bentuk	Batang	Batang
Ukuran (µm)	0,5-1,0 x 3,0-3,5	0,5-0,7 x 2,5-3,0
Gram	Negatif	Negatif
Endospora	Tidak ada	Tidak ada

Tabel 5. Hasil Uji Biokimia Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Pseudomonas*.

Karakter	<i>Pseudomonas</i> HT-1a	<i>Pseudomonas</i> HT-1b
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Fermentasi:		
Glukosa	A	A
Xilosa	-	A
Laktosa	A	A
Manitol	-	A
Hidrolisis:		
Gelatin	+	+
Pati	+	+
Urea	-	-
Triptofan	-	-
Reduksi Nitrat	+	+
Produksi H ₂ S	-	-
MR	-	-
VP	+	+

Keterangan: (+): Hasil uji positif, (-): Hasil uji negatif, A: Asam

Pseudomonas HT-1a dan HT-1b mampu tumbuh pada pH 7-11, jadi merupakan bakteri alkalifilik fakultatif. Kedua isolat tumbuh optimum pada pH 9 dan memiliki aktivitas xilanolitik tinggi. Hal tersebut merupakan potensinya untuk dimanfaatkan dalam produksi xilanase. Xilanase yang dihasilkan dapat digunakan untuk formulasi pakan ternak dan untuk proses-proses perombakan xilan yang tidak memerlukan kondisi pH terlalu tinggi.

Isolat dari Genus *Bacillus*

Sebanyak 2 isolat yang teridentifikasi, yaitu HT-2a dan HT-2d memiliki ciri sesuai dengan genus *Bacillus*. Menurut Holt *et al.* (1994) genus ini memiliki ciri: sel berbentuk batang lurus, berukuran 0,5-2,5 x 1,2-10 µm, sering tersusun berpasangan atau berantai. Sel membentuk endospora oval atau bulat. Kebanyakan sel motil, gram positif, positif pada awal pertumbuhan, atau negatif. Katalase biasanya dibentuk oleh hampir semua spesies. Hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, dan bersifat kemoorganotrofik.

Hasil identifikasi 2 isolat genus *Bacillus* belum dapat diketemukan sampai ke nama spesies. Hal ini dikarenakan, ada beberapa uji tidak dilakukan serta karakter yang diperoleh pada uji tidak sama dengan buku yang dijadikan acuan untuk proses identifikasi. *Bacillus* HT-2a dan HT-2d diperoleh dari sampel tanah berkapur pH 7,95. Perbedaan morfologi koloni dan sel

ditunjukkan di tabel 6 dan 7. Hasil uji biokimia ditunjukkan di tabel 8.

Tabel 6. Morfologi Koloni Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Bacillus*.

Karakter	<i>Bacillus</i> HT-2a	<i>Bacillus</i> HT-2d
Bentuk	Bundar (<i>Circular</i>)	Bundar (<i>Circular</i>)
Tepi	Berombak (<i>Undulate</i>)	Licin (<i>Entire</i>)
Warna	Putih Kecokelatan	Kuning
Elevasi	Timbul (<i>Low convex</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)
Struktur dalam	Bergranula kasar (<i>Coarsely granular</i>)	Halus (<i>Smooth</i>)
Ukuran (mm)	2,0 - 3,5	2,0 - 3,0

Tabel 7. Morfologi Sel Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Bacillus*.

Karakter	<i>Bacillus</i> HT-2a	<i>Bacillus</i> HT-2d
Bentuk	Batang	Batang
Ukuran (μm)	0,5-1,0 x 2,5-3,0	0,5-1,0 x 2,0-2,5
Gram	Negatif	Negatif
Endospora	Ada	Ada
Bentuk dan letak endospora	Oval / Tengah (<i>Central</i>)	Oval / Tengah (<i>Central</i>)

Tabel 8. Hasil Uji Biokimia Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Bacillus*.

Karakter	<i>Bacillus</i> HT-2a	<i>Bacillus</i> HT-2d
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Fermentasi:		
Glukosa	A	A
Xilosa	-	-
Laktosa	-	-
Manitol	-	A
Hidrolisis:		
Gelatin	-	+
Pati	-	-
Urea	-	+
Triptofan	-	-
Reduksi Nitrat	+	+
Produksi H ₂ S	-	+
MR	-	-
VP	+	-

Keterangan: (+): Hasil uji positif, (-): Hasil uji negatif, A: Asam

Bacillus HT-2a dan HT-2d tergolong dalam kelompok alkalifilik fakultatif, karena mampu tumbuh pada pH 11 dan 7. Kedua Bakteri tersebut memiliki pertumbuhan yang tinggi pada pH 9, serta pertumbuhan paling rendah pada pH 11.

Isolat dari Genus *Flavobacterium*

Satu isolat yaitu HT-3c merupakan genus *Flavobacterium*, memiliki ciri umum sesuai dengan yang dikemukakan Buchanan dan Gibbons (1974). Ciri genus tersebut adalah bentuk sel batang, ukuran 0,5 x 1,0-3,0 μm , motil atau tidak motil. Endospora tidak dibentuk, gram negatif, tumbuh pada media padat menghasilkan pigmen kuning, orange, merah, atau coklat. Hidup secara aerobik, hanya sedikit spesies yang hidup fakultatif anaerobik, katalase dan oksidase positif. *Flavobacterium* terdistribusi luas di tanah, air, daging mentah, dan susu.

Hasil identifikasi mengacu pada *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition* (Buchanan dan Gibbons, 1974) menunjukkan bahwa isolat memiliki ciri-ciri yang mendekati ciri *Flavobacterium rigense*. Ciri yang dimiliki isolat tersebut adalah mampu tumbuh pada suhu 37°C, koloni berbentuk bundar, tepian licin, warna kuning, elevasi cembung, struktur dalamnya *opaque* (tidak tembus cahaya), dan berukuran 2-3,5 mm. Sel berbentuk batang, 0,6 x 1,6 μm , gram negatif, tidak membentuk endospora. Hasil uji biokimia dapat memproduksi asam dari glukosa, mereduksi nitrat, dan memproduksi H₂S. Hasil uji MR dan VP positif. Gelatin dapat dihidrolisis, sedang pati dan triptofan tidak.

Flavobacterium rigense diperoleh dari sampel tanah berkapur dengan pH 7,92, tergolong dalam kelompok bakteri alkalifilik fakultatif. Pertumbuhan isolat meningkat seiring dengan meningkatnya pH medium yang diujikan, sehingga belum diketahui pH optimumnya. *Flavobacterium rigense* merupakan isolat yang potensial untuk produksi xilanase yang bersifat alkali yang berguna untuk menggantikan klorin dalam proses pemutihan pulp secara enzimatis.

Isolat dari Genus *Micrococcus*

Genus *Micrococcus* memiliki ciri: sel berbentuk bulat, berukuran 0,5-2,0 μm . Sel tersusun tunggal, tetrad, bergerombol. Reaksi gram positif, jarang yang motil, dan tidak membentuk endospora. Koloni biasanya berwarna kuning atau merah. *Micrococcus* hidup secara aerob, katalase positif, sering oksidase juga positif,

meskipun ada juga yang negatif, tidak menghasilkan asam dari karbohidrat atau sedikit menghasilkan asam. Suhu optimum pertumbuhan 25-37°C, biasanya terdapat di kulit mamalia, tanah, air, dan di produk makanan (Holt *et al.*, 1994; Buchanan dan Gibbons, 1974).

Teridentifikasi satu spesies yaitu *Micrococcus luteus* dengan ciri: tidak motil, tidak membentuk asam dari glukosa, xilosa, dan laktosa, dapat menghidrolisis gelatin, uji oksidase positif, tumbuh pada suhu 37°C. Koloni berbentuk bundar, tepian berombak, warna kuning, elevasi cembung, struktur dalamnya *coarsely granular*, berukuran 2-3 mm. Bentuk sel bulat, ukuran 1,0-2,0 µm, gram positif (Holt *et al.*, 1994; Buchanan dan Gibbons, 1974).

Micrococcus luteus tergolong dalam kelompok alkalifilik fakultatif. Pertumbuhan isolat tersebut paling optimum terjadi pada pH 9. *Micrococcus luteus* diperoleh dari sampel tanah berkapur pH 7,92.

Isolat dari Genus *Paracoccus*

Isolat HT-5c dimasukkan dalam genus *Paracoccus* karena memiliki ciri umum sebagaimana yang telah dikemukakan oleh Holt *et al.* (1994) serta Buchanan dan Gibbons (1974). Ciri tersebut adalah bentuk sel bulat atau batang pendek dengan ukuran diameter sel 0,5-1,1 µm, tersusun tunggal atau berpasangan, tidak membentuk endospora, gram negatif, dan tidak motil. Uji katalase dan oksidase positif, hidup secara aerobik, tumbuh secara anaerobik pada medium yang berisi nitrat, jadi mempunyai kemampuan untuk mereduksi nitrat, dan tidak menghasilkan asam dari glukosa. Genus ini biasanya terdapat di tanah.

Identifikasi spesies terhadap genus *Paracoccus* dengan mengacu pada Holt *et al.* (1994) menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki ciri yang hampir sama dengan *Paracoccus alcaliphilus*. Ciri *Paracoccus alcaliphilus* yang membedakannya dengan spesies lain pada genus *Paracoccus* adalah mampu tumbuh pada pH 9 dan dapat menggunakan xilosa untuk pertumbuhannya. Ciri lain dari *Paracoccus alcaliphilus* ialah koloni berbentuk bundar, tepian licin, warna kuning, elevasi cembung, struktur dalam *opaque*, dan berukuran 2-3 mm, tidak membentuk asam dari glukosa, xilosa, laktosa dan manitol, uji MR dan VP negatif, tidak memproduksi H₂S, serta tidak menghidrolisis urea, triptofan, dan pati. Isolat *Paracoccus alcaliphilus* diperoleh dari sampel tanah berkapur pH 7,65.

Hasil uji kemampuan tumbuh isolat pada medium dengan pH 7-11 menunjukkan bahwa isolat merupakan jenis alkalifilik fakultatif. Pertumbuhan paling optimum terjadi pada pH 9, dan paling rendah pada pH 11.

Isolat dari Genus *Alcaligenes*

Isolat HT-4c, HT-5a, dan HT-5b, teridentifikasi sebagai genus *Alcaligenes*. Ciri-ciri *Alcaligenes* yaitu: bentuk sel batang, batang membulat, atau bulat dengan ukuran 0,5-1,0 x 0,5-2,6 µm, gram negatif, motil, dan tidak membentuk endospora. Isolat hidup secara aerob. Suhu optimum untuk pertumbuhan pada 20-37°C. Uji oksidase dan katalase positif. Biasanya tidak dapat menghidrolisis gelatin dan triptofan. Pada beberapa medium garam organik dan amida menghasilkan alkali. Beberapa strain menghasilkan asam dari glukosa dan xilosa. Biasanya terdapat di tanah dan air, beberapa strain dapat diisolasi dari darah, urin, dan *faeces* (Holt *et al.*, 1994; Buchanan dan Gibbons, 1974).

Identifikasi sampai spesies belum didapatkan karena terbatasnya uji yang dilakukan. Perbedaan morfologi koloni dan sel di tunjukkan di tabel 9 dan 10, dan hasil uji biokimia di tabel 11.

Tabel 9. Morfologi Koloni Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Alcaligenes*.

Karakter	<i>Alcaligenes</i> HT-4c	<i>Alcaligenes</i> HT-5a	<i>Alcaligenes</i> HT-5b
Bentuk	Bundar (Circular)	Bundar (Circular)	Bundar (Circular)
Tepi	Licin (Entire)	Berombak (Undulate)	Licin (Entire)
Warna	Kuning	Kuning muda	Krem
Elevasi	Cembung (Convex)	Cembung (Convex)	Cembung (Convex)
Struktur dalam	Bergranula kasar (Coarsely granular)	Bergranula kasar (Coarsely granular)	Bergranula kasar (Coarsely granular)
Ukuran (mm)	2,0 - 3,0	2,5-4,0	2,0 - 3,0

Tabel 10. Morfologi Sel Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Alcaligenes*.

Karakter	<i>Alcaligenes</i> HT-4c	<i>Alcaligenes</i> HT-5a	<i>Alcaligenes</i> HT-5b
Bentuk	Bulat	Bulat	Bulat
Ukuran (µm)	0,5-1,0	0,5-0,8	0,5-0,8
Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Endospora	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

Tabel 11. Hasil Uji Biokimia 3 Jenis Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Genus *Alcaligenes*.

Karakter	<i>Alcaligenes</i> HT-4c	<i>Alcaligenes</i> HT-5a	<i>Alcaligenes</i> HT-5b
Katalase	+	+	+
Oksidase	+	+	+
Fermentasi:			
Glukosa	A	A / G	A
Xilosa	A	A / G	-
Laktosa	-	-	A
Manitol	-	A	-
Hidrolisis:			
Gelatin	+	-	-
Pati	-	-	-
Urea	-	+	+
Triptofan	-	-	-
Reduksi Nitrat	+	+	+
Produksi H ₂ S	-	-	-
MR	+	-	-
VP	-	+	-

Keterangan: (+): Hasil uji positif A: Asam, (-): Hasil uji negatif G: Gas

Alcaligenes HT-4c, HT-5a, dan HT-5b mampu tumbuh pada pH 7 hingga 11, sehingga keduanya tergolong dalam kelompok alkalifilik fakultatif. *Alcaligenes* HT-4c dan HT-5a memiliki pertumbuhan optimum pada pH 9, sedangkan *Alcaligenes* HT-5b belum diketahui pH optimumnya, karena pertumbuhan meningkat seiring dengan meningkatnya pH medium yang diujikan. Pertumbuhan *Alcaligenes* HT-5b kemungkinan masih meningkat hingga pH 12, kemudian terjadi penurunan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Horikoshi (1999) bahwa bakteri alkalifilik mampu tumbuh optimum pada pH 10 hingga 12.

KESIMPULAN

Bakteri alkalifilik penghasil xilanase dapat diisolasi dari tanah berkapur kawasan bukit gamping Krakitan, Bayat, Klaten. Sepuluh isolat bakteri alkalifilik penghasil xilanase yang mempunyai aktivitas xilanolitik tinggi teridentifikasi sebagai: *Pseudomonas* HT-1a, *Pseudomonas* HT-1b, *Bacillus* HT-2a, *Bacillus* HT-2d, *Flavobacterium rigense* HT-3c, *Micrococcus luteus* HT-3d, *Paracoccus alcaliphilus* HT-5c, *Alcaligenes* HT-4c, *Alcaligenes* HT-5a, dan *Alcaligenes* HT-5b.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1976. *Introduction to soil microbiology*. 2nd. New York: John Wiley & Son, Inc.
 Anthony, T., Raj, K.C., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. 2003. "High molecular weight cellulase-free xylanase

- from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1". *Enzyme Microb. Technol.* 32: 647-654.
 Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
 Cowan, S. T. 1985. *Manual for Identification of Medical Bacteria*. Inggris: Cambridge University Press.
 Gandjar, I., Koentjoro, I.R., Mangunwardoyo, W. dan Soebagya, L. 1992. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Jurusan Biologi Fak. MIPA UI.
 Grant, W.D. 1992. Alkaline Environments. In Lederberg, J. (Ed.). *Encyclopedia of Microbiology Volume 1*. New York: Academic Press, Inc. Pp. 73-80.
 Gupta, N., Reddy, V.S., Maiti, S. and Ghosh, A. 2000. "Cloning Expression and Sequence Analysis of the Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endoxylanase from Alkalophilic, Mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG-27". *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6): 2631-2635.
 Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia.
 Hanim, C. 2002. *Karakterisasi dan Analisis Stabilitas Xilanase dari Isolat Bakteri Xilanolitik*. Tesis. Yogyakarta: Program Studi Bioteknologi Program Pasca Sarjana UGM.
 Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T., and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
 Horikoshi, K. 1999. "Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (4): 735-750.
 Irawan. 2001. *Eksplorasi Enzim Xylanolitik Termofilik. Kloning Gen Penyandi Xilanase*. <http://www.hayati-ipb.com/users/ruduct/PPs702/IRAWAN.htm>.
 Kushner, D.J. 1993. Microbial Life in Extreme Environments. In Ford, T.E. (Ed.). *Aquatic Microbiology an Ecological Approach*. Boston: Blackwell Scientific Publication. Pp. 383-407.
 Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganism*. New Jersey: Prentice Hall Inc.
 Martani, E., Haedar, N. dan Margono, S. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Lignin Dari Beberapa Substrat Alami. *Gama Sains*. 5 (2): 97-107.
 Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1993. "Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1". *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (7): 2311-2316.
 Poerwowidodo. 1992. *Metode Selidik Tanah*. Surabaya: Usaha Nasional.
 Rao, N.S.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Jakarta: UI Press.
 Richana, N., Lestari, P., Thontowi, A. dan Rosmimik. 2000. "Seleksi Isolat Bakteri Lokal Penghasil Xilanase". *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 5 (2): 54-56.
 Ruiz-Arribas, A., Fernandes-Abalos, J.M., Sanchez, P., Garda, A.L. and Santamaria, R.I. 1995. "Overproduction, Purification, and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces helstedii* JMB". *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6): 2414-2419.
 Schlegel, H.G. dan Schimdt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Yogyakarta: UGM Press.
 Yamaura, I., Koga, T., Matsumoto, T. and Kato, T. 1997. "Purification Some Properties of Endo-1,4-β-D-xylanase from a Fresh-water Mollusc, *Pomacea insularis* (de Ordigny)". *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (4): 615-620.
 Yang, V. W., Zhuang, Z., Elegir, G. and Jeffries, T. W. 1995. "Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp isolated from kraft pulp". *J. Ind. Microbiol.* 15: 434-441.