

AKTIVITAS XILANASE DARI *Bacillus altitudinis* YANG DIPRODUKSI DENGAN VARIASI WAKTU INKUBASI DAN KONDISI PENGUJIAN pH NETRAL DAN ALKALIN [*Xylanase Activity of Bacillus altitudinis Produced with Various Incubation Time and Neutral and Alkaline pH Assay Conditions*]

Sugiyono Saputra^{1✉*}, Alida Hanoum², Mulyadi², dan Achmad Dinoto²

¹Pusat Riset Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

²Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

Jl. Raya Jakarta Bogor Km 46 Cibinong 16911 Indonesia

Email dan kontributor utama: sugiyono.saputra@brin.go.id

ABSTRACT

Xylanases are a group of hydrolytic enzymes which randomly catalyse the cleavage of β -1,4 backbone of xylan, a major component of polysaccharide in plant cells. In this study, we investigate the extracellular enzyme activity of three strains of *Bacillus altitudinis* which produced with various production times in neutral (pH 7) and alkaline (pH 9) conditions. Crude enzyme was obtained from inoculated production medium containing 2% w/v xylan after six different time of incubations, including 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The stationary phase of those three strains was observed after 72 hours of incubation, in accordance with significant increase of xylanase activity both in neutral and alkaline assay conditions. However, the highest of xylanase activity was obtained after 92 hours of incubation, in all three bacterial strains tested. A thin layer chromatography (TLC) was performed, and it confirmed that the crudes enzymes was able to breakdown the xylan into oligosaccharides. A higher activity of xylanase was obtained in alkaline condition but not significantly different between those two conditions. *B. altitudinis* KBX08 has the highest xylanase activity (46.9U/ml) which produced after 96 hours of incubation, indicating their potential for further development as xylanase producer.

Key words: Xylanase, xylan, *Bacillus altitudinis*, production time, pH

ABSTRAK

Xilanase adalah enzim hidrolitik yang dapat secara acak memotong ikatan β -1,4 dari xilan, sebuah polisakarida dinding sel tanaman yang kompleks. Dalam penelitian ini, kami menyelidiki aktivitas enzim ekstraseluler dari tiga strain *Bacillus altitudinis* yang diproduksi dengan berbagai waktu produksi dalam kondisi netral (pH 7) dan basa (pH 9). Enzim kasar diperoleh dari kultur media produksi yang mengandung 2% b/v xilan, setelah enam waktu inkubasi yang berbeda, yaitu 0, 24, 48, 72, 96 dan 120 jam. Fase stasioner ketiga isolat tersebut terjadi setelah 72 jam inkubasi, yang juga sejalan dengan peningkatan aktivitas xilanase yang signifikan baik dalam kondisi pengujian netral maupun basa. Aktivitas xilanase tertinggi diperoleh setelah 92 jam inkubasi pada ketiga strain bakteri yang diuji. Kromatografi lapis tipis (KLT) telah dilakukan, dan diduga bahwa enzim kasar mampu memecah xilan menjadi oligosakarida. Tidak ada perbedaan aktivitas xilanase yang signifikan antara pengujian kondisi netral maupun basa. *B. altitudinis* KBX08 memiliki aktivitas enzim tertinggi (46,9U/ml) yang dihasilkan setelah 96 jam inkubasi yang berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut dalam produksi enzim.

Kata kunci: Xilanase, xilan, *Bacillus altitudinis*, waktu produksi, pH

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan kelompok enzim glikosidase (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) yang mengkatalis proses hidrolisis ikatan 1,4- β -D-xylosidic pada xilan (Collins *et al.*, 2005). Enzim ini dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis dan properti fisikokimia (Flores *et al.*, 1997). Hingga kini, ada lebih dari 77 famili dari xilanase namun ada dua enzim kunci dalam proses degradasi xilan, yaitu endo- β -1,4-D-xylanase (β -1,4-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) yang dapat secara acak memecah ikatan β -1,4-glycosidic menjadi xilooligosakarida dan β -1,4-D-xylosidase (β -1,4-D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) yang akan memecah bagian ujung rantai xilooligosakarida menjadi fraksi xilosa (Flores *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2005).

Penelitian tentang xilanase menjadi penelitian yang sangat menarik karena memiliki potensi yang cukup besar dan luas dalam berbagai aplikasi

industri, termasuk hidrolisis lignoselulosa untuk gula fermentasi dalam produksi bahan bakar etanol (Samsuri *et al.*, 2010), dan pulp (Duarte *et al.*, 2003; Sridevi *et al.*, 2017). Sebagai biokatalis dalam industri pangan, xilanase banyak digunakan dalam pembuatan roti dan minuman fermentasi (Harris dan Ramalingam, 2010), dan pangan fungsional atau prebiotik dengan produk turunannya yang berupa xilosa dan xilooligosakarida (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017). Selain itu, xilanase juga sangat penting dalam meningkatkan kualitas nutrisi pakan hewan melalui degradasi dari limbah tanaman (Bocchini *et al.*, 2002; Katapodis *et al.*, 2007).

Xilanase dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroorganisme, termasuk bakteri, jamur dan khamir (Collins *et al.*, 2005), maupun protozoa (Berra-Maillet *et al.*, 2005). Jenis mikroorganisme yang diketahui mampu memproduksi xilanase adalah bakteri, dimana xilanase yang dihasilkan

*Kontributor Utama

*Diterima: 30 Januari 2022 - Diperbaiki: 5 Juli 2022- Disetujui: 5 Juli 2022

merupakan jenis ekstraseluler. Isolasi bakteri penghasil xilanase telah dilakukan dari berbagai sampel, seperti tanah dan serasah (Ghimire *et al.*, 2016) dan isi saluran cerna hewan herbivora (Zorec *et al.*, 2014). (Saputra dan Dinoto, 2021) juga telah berhasil mengisolasi bakteri xilanolitik asal saluran cerna kerbau belang Toraja (*Bubalus bubalus*) di Tana Toraja, Sulawesi Utara dan beberapa strain tersebut yaitu KBX04, KBX07 dan KBX08 teridentifikasi sebagai *Bacillus altitudinis*. Untuk mengetahui strain yang memiliki kemampuan produksi xilanase tertinggi dari ketiga strain *Bacillus altitudinis* tersebut, maka dilakukanlah penelitian ini, dimana optimasi aktivitas xilanase akan dibandingkan terhadap waktu inkubasi dan kondisi pH ketika proses hidrolisis berlangsung. Diharapkan, strain unggul dapat diperoleh yang nantinya sangatlah potensial untuk pengembangan xilanase lebih lanjut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Strain bakteri dan medium produksi.

Sebanyak tiga strain bakteri, yaitu *B. altitudinis* KBX04, KBX07 dan KBX08 yang diisolasi dari saluran cerna kerbau belang Toraja (*Bubalus bubalis carabanensis*) telah diketahui memiliki aktivitas xilanase (Saputra dan Dinoto, 2021). Karakterisasi morfologi koloni dan sel dilakukan sebelum strain tersebut digunakan. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium produksi yang dengan xilan sebagai sumber karbon. Komposisi per liter medium produksi yang digunakan meliputi K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) 0.44, KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) 0.3 g, $(NH_4)_2SO_4$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0.26 g, $MgCl_2$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0.02 g, $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0.004 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0.0002 g, *yeast extract* (Himedia, Mumbai, India) 1.0 g, $NaHCO_3$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0.16 gram, L-cysteine (Merck, Darmstadt, Germany) 0.1 g, dengan sumber karbon berupa xilan dari *beechwood* (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) sebanyak 1%, dan pure agar 22 g (Duarte *et al.*, 2002).

Preparasi inokulum dan produksi.

Koloni tunggal bakteri diinokulasikan pada medium induksi yang mengandung xilan 1%, ditumbuhkan pada suhu 37°C selama 20 jam. Kultur semalam tersebut kemudian diukur kerapatan optiknya pada panjang gelombang 600 nm. Inokulasi isolat ke dalam medium produksi dilakukan dengan nilai kerapatan optik yang sama (OD 0.75), yang diencerkan dengan larutan fisiologis steril. Sebanyak 5% starter diinokulasikan ke dalam medium produksi xilanase dan diinkubasi

pada suhu 37°C. Pengamatan untuk mengetahui kemampuan produksi enzim xilanase dan kerapatan sel-nya dilakukan setelah kultur diinkubasi selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam. Enzim yang digunakan dalam pengujian adalah berupa ekstrak kasar. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan memisahkan sel dengan supernatant melalui sentrifugasi kultur pada kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Ekstrak kasar enzim dapat disimpan terlebih dahulu pada suhu -20°C sebelum dilakukan pengujian.

Uji aktivitas enzim xilanase.

Uji aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan mengukur pembentukan gula reduksi yang berupa xilosa. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya satu mol xilosa yang dihasilkan dalam kondisi suhu dan waktu percobaan (Cosson *et al.*, 1999). Buffer yang digunakan dalam pengujian adalah larutan buffer fosfat pH 7 dan larutan buffer glisin-NaOH pH 9. Pada pengujian aktivitas enzim, sebanyak 0,1 mL ekstrak kasar enzim direaksikan dengan 0,1 mL larutan xilan dalam buffer fosfat pH 7 dan larutan buffer glisin-NaOH pH 9 kemudian divorteks dan diinkubasikan pada suhu 50°C selama 30 menit. Kontrol enzim dibuat dengan mereaksikan 0,1 mL ekstrak kasar enzim xilanase dengan 0,1 mL larutan xilan ke dalam kedua buffer, sedangkan blanko dibuat dengan mereaksikan 0,1 mL akuades dengan 0,1 mL larutan xilan dalam bufer kemudian divorteks. Ketiga jenis reaksi tersebut ditambahkan 600 mL larutan *dinitrosalicylic acid* dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kadar xilosa yang terkandung dalam masing-masing sampel dan kontrol ditentukan berdasarkan kurva standar xilosa yang dihitung menggunakan regresi linier. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim (AE)} = \frac{([\text{Gula reduksi sampel}] - [\text{Gula reduksi kontrol}]) \times \text{vol. larutan BM xilosa} \times \text{vol. enzim} \times \text{waktu inkubasi}}{\text{BM xilosa} \times \text{vol. enzim} \times \text{waktu inkubasi}}$$

Kromatografi lapis tipis.

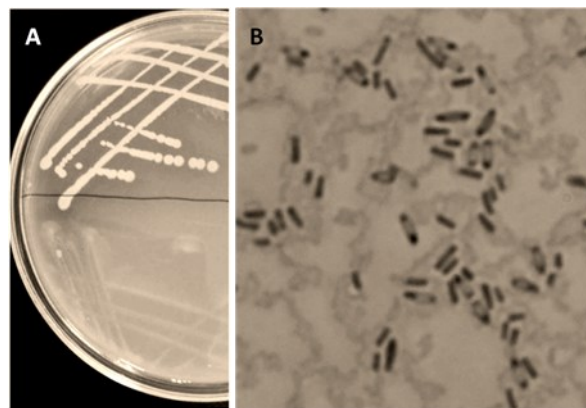
Langkah ini dilakukan untuk melihat hasil hidrolisis xilan oleh ekstrak kasar enzim dari ketiga strain bakteri (Annamalai *et al.*, 2008). Larutan eluen yang digunakan adalah isopropanol: 1-butanol: akuades dengan perbandingan 12:5:4. Sebelum hasil kromatografi diinkubasi dengan pemanasan 100°C selama 5 menit, terlebih dahulu diberi larutan penampak warna, yaitu asam sulfat: methanol dengan perbandingan 5:95. Penanda yang digunakan meliputi glukosa 2%, larutan xilosa 2%, larutan xilan 2%, maltotetraosa, maltopentaosa dan fruktooligosakarida.

HASIL

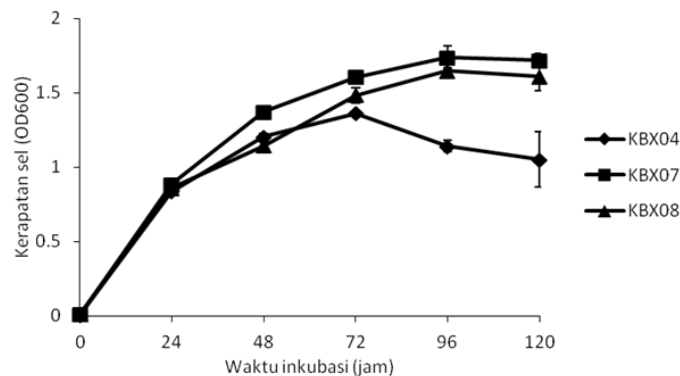
Karakter Strain dan Pola Pertumbuhan

Aktivitas xilanolitik dari ketiga strain *Bacillus altitudinis* dikonfirmasi secara kualitatif dengan ditumbuhkan pada medium yang berbasis xilan. Adanya *clear zone* di sekitar koloni menunjukkan adanya degradasi xilan (Gambar 1.A) walaupun tanpa dilakukan pewarnaan dengan *iodine*. Sedangkan dari morfologi sel, ketiga strain bakteri tersebut memiliki bentuk sel yang serupa, dengan sel berbentuk batang dan adanya pembentukan endospora, yang merupakan ciri khas dari genus *Bacillus* (Gambar 1.B).

Pola pertumbuhan dari ketiga isolat ditunjukkan pada (Gambar 2). Pada umumnya, ketiga isolat tersebut mampu tumbuh dengan baik pada medium berbasis xilan. Setelah jam ke-24, ketiga strain tersebut menunjukkan pertumbuhan sel yang meningkat tajam, dibandingkan dengan waktu inkubasi setelahnya. Strain *B. altitudinis* KBX07 dan KBX08 menunjukkan kerapatan optik tertinggi pada jam ke-96, setelah itu menuju fase stasioner pada jam ke-120. Kedua strain tersebut memiliki pertumbuhan sel yang lebih baik daripada strain *B. altitudinis* KBX04. Hal tersebut dapat dilihat dari lebih rendahnya kerapatan optik setelah jam ke-72.



Gambar 1. Morfologi koloni dan morfologi sel *B. altitudinis* KBX00. Pada (Gambar 1.A) terlihat adanya *clear zone* di sekitar koloni (cawan bagian atas) pada media berbasis xilan. Koloni yang tidak menunjukkan adanya *clear zone* (cawan bagian bawah) merupakan contoh bakteri non-xilanolitik. Pada (Gambar 1.B) terlihat adanya pembentukan endospora pada sel *B. altitudinis* KBX08. (Colony morphology and cell morphology of *B. altitudinis* KBX00. (Figure 1.A) shows a clear zone around the colony (top plate) on xylan-based media. Colonies that do not show a clear zone (bottom plate) are examples of non-xylanolytic bacteria. (Figure 1.B) shows the formation of endospores in *B. altitudinis* KBX08 cells).

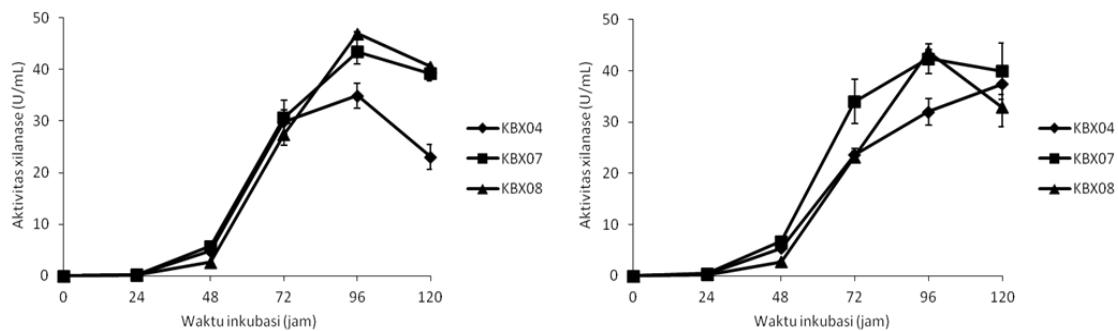


Gambar 2. Pola pertumbuhan strain *B. altitudinis* KBX04, KBX07 dan KBX08 pada medium berbasis xilan. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 600nm dengan pengenceran 6x. (Growth pattern of *B. altitudinis* strains KBX04, KBX07 and KBX08 on xylan-based medium. Measurements were carried out at a wavelength of 600nm with a 6x dilution).

Aktivitas xilanase dan variasi waktu produksi

Pada jam ke-0 hingga jam ke-48, aktivitas xilanase masih relatif rendah. Hal ini disebabkan jumlah xilanase yang terdapat pada larutan enzim yang diuji masih sedikit, sehingga jumlah substrat yang dapat dihidrolisis persatuan waktu inkubasi juga rendah dan jumlah gula pereduksi yang terdeteksi pun sedikit. Bertambahnya waktu pengukuran inkubasi menyebabkan aktivitas enzim xilanase meningkat sampai tercapainya waktu

inkubasi optimum. Pada saat inkubasi optimum, kecepatan reaksi enzimatik. Aktivitas xilanase mulai meningkat tajam setelah jam ke-72 dan mencapai titik optimum setelah 96 jam inkubasi. Setelah itu, aktivitas enzim kembali menurun seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Aktivitas xilanase dengan pH buffer 7 (netral) dengan pH buffer 9 (basa) menunjukkan pola yang serupa.



Gambar 3. Pola aktivitas xilanase dari jam ke-0 hingga jam ke-72 pada strain *B. altitudinis* KBX04, KBX07 dan KBX08. Pengujian dilakukan dengan kondisi pada pH 7 (A) dan pH 9 (B). (*The pattern of xylanase activity from 0 to 72 hours in B. altitudinis strains KBX04, KBX07 and KBX08. Tests were carried out with conditions at pH 7 (A) and pH 9 (B).*)

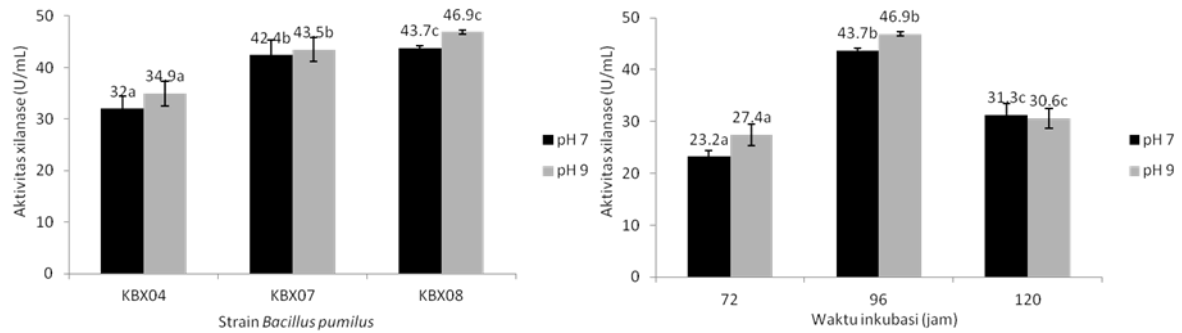
Analisis statistik telah dilakukan dengan uji Duncan pada taraf 5% untuk melihat pengaruh waktu inkubasi dan pH buffer terhadap ketiga strain *B. altitudinis*. Ketiga strain tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap aktivitas enzim. Berdasarkan rata-rata aktivitas yang dilakukan pada setiap jam, strain yang memiliki aktivitas tertinggi hingga terendah berturut-turut adalah KBX07, KBX08 dan KBX04. Strain *B. altitudinis* KBX07 memiliki aktivitas xilanase rata-rata yang relative lebih tinggi setelah inkubasi 72 jam, 96 jam dan 120 jam namun tidak signifikan. Akan tetapi, strain *B. altitudinis* KBX08 menunjukkan aktivitas xilanase tertinggi dibandingkan dengan strain yang lain, dengan aktivitas xilanase sebesar 46.9 U/mL pada jam ke-96 dengan pH buffer 9. Sedangkan pada strain *B. altitudinis* KBX04 masih menunjukkan aktivitas xilanase yang meningkat pada waktu inkubasi 96 jam, pH 9. Akan tetapi, berdasarkan hasil analisis, strain ini memiliki aktivitas xilanase yang lebih rendah. Hal tersebut berkorelasi positif terhadap nilai kerapatan optik yang diperoleh, yang juga lebih rendah dibandingkan dua strain yang lain.

Aktivitas xilanase dan pH pengujian

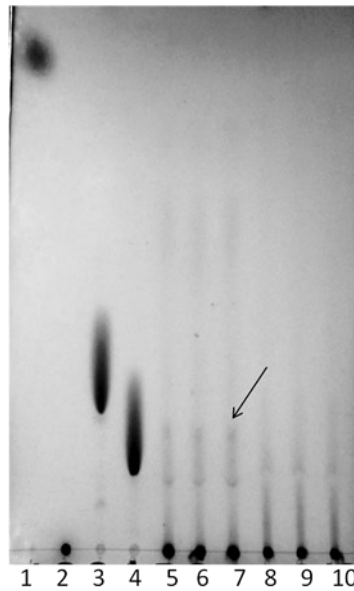
Walaupun strain dan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase, pH buffer pada saat hidrolisis ternyata tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase. (Gambar 4) menunjukkan bahwa ketiga strain cenderung memiliki aktivitas xilanase yang lebih tinggi pada pH buffer 9 daripada pH buffer 7. Namun nilai tersebut tidak berbeda nyata, sehingga dapat dikatakan pada saat hidrolisis, enzim xilanase dapat aktif baik pada kondisi netral maupun basa atau memiliki ketahanan terhadap pH yang cukup luas dengan rentang 7 – 9.

Konfirmasi hasil hidrolisis

Berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis (Gambar 5), pecahan molekul xilan hasil hidrolisis menunjukkan perbedaan bercak dibandingkan dengan penanda dan ekstrak kasar enzim. Molekul yang diperoleh tersebut hampir sejajar dengan maltopentosa. Akan tetapi, bercak yang timbul tidak setebal penanda yang digunakan. Hal tersebut menandakan konsentrasi hidrolisat yang terbentuk masih tergolong kecil.



Gambar 4. (A) Aktivitas xilanase tiga strain *B. altitudinis* dengan waktu inkubasi 96 jam. (B) Aktivitas xilanase strain *B. altitudinis* KBX08 dengan waktu inkubasi 72, 96 dan 120 jam. Huruf sama pada setiap strain dan waktu inkubasi menunjukkan tidak adanya pengaruh yang nyata terhadap aktivitas xilanase. ((A) *Xylanase activity of three strains of B. altitudinis with incubation time of 96 hours.* (B) *Xylanase activity of strain B. altitudinis KBX08 with incubation times of 72, 96 and 120 hours. The same letter in each strain and incubation time showed no significant effect on xylanase activity.*)



Gambar 5. Kromatografi lapis tipis aktivitas xilanase. Keterangan 1. xilosa 2%, 2. xilan 2%, 3. maltotetraosa 2%, 4. Maltopentaosa 2%, 5–7. Hasil hidrolisis xilan menggunakan ekstrak kasar enzim dari strain *B. altitudinis* KBX 04, KBX 07, dan KBX 08, 8–10. Ekstrak kasar enzim strain *B. altitudinis* KBX04, KBX07 dan KBX08. (*Thin layer chromatography of xylanase activity. Description 1. xylose 2%, 2. xylan 2%, 3. maltotetraose 2%, 4. maltopentaose 2%, 5–7. The results of xylan hydrolysis using crude extract of enzymes from B. altitudinis strains KBX 04, KBX 07, and KBX 08, 8–10. Crude extract of the enzyme strains of B. altitudinis KBX04, KBX07 and KBX08.*)

PEMBAHASAN

Dalam studi kualitatif ini, yang bertujuan untuk menentukan salah satu strain yang memiliki aktivitas xilanase tertinggi dan kondisi optimumnya, memiliki beberapa temuan utama. Pertama, waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk memproduksi enzim xilanase adalah 72 jam, yang terobservasi pada ketiga strain yang diujikan. Kedua, xilanase memiliki aktivitas yang lebih

tinggi pada kondisi alkalin (pH 9) dibandingkan netral (pH 7) namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Ketiga, *B. altitudinis* KBX08 memiliki aktivitas xilanase tertinggi dibandingkan dengan dua strain lainnya, konsisten pada waktu inkubasi 96 jam dan kondisi alkalin.

Studi mengenai bakteri xilanolitik telah banyak dilakukan sebelumnya (Tabel 1). Sumber bakteri tersebut diantaranya berasal dari kayu busuk dan

saluran cerna sejenis rayap. Pada umumnya, waktu inkubasi yang diperlukan untuk ekstraksi enzim adalah setelah 36 jam hingga 7 hari, dengan besarnya aktivitas xilanase bervariasi dengan rentang sebesar 16.1-328 U/ml, sedangkan dalam studi ini aktivitas tertinggi adalah 46.9 U/ml.

Substrat yang digunakan pun bervariasi dengan kondisi keasaman tertentu, tergantung jenis mikroba. Selain itu, genus *Bacillus* memang dikenal memiliki aktivitas yang tinggi pada pH netral dan basa.

Tabel 1. Referensi aktivitas xilanase pada suhu dan pH buffer optimum. (*Reference to xylanase activity at optimum buffer temperature and pH*).

Mikroba (Microbes)	Sumber (Source)	Substrat xilan (Xylan substrate)	Waktu inkubasi (Incubation time)	pH buffer	Aktivitas xilanase (Xylanase activity)	Referensi (Reference)
<i>B. altitudinis</i> KBX08	feses	beechwood	92 jam	9	46.9 U/ml	Studi ini
<i>B. altitudinis</i> CBMAI 0008	kayu busuk	birchwood	72 jam	9	83 U/mL	(Duarte <i>et al.</i> , 2003)
<i>B. altitudinis</i> PU4-2	usus <i>Termitidae</i>	wheat pollard	36 jam	7	157 U/mL	(Widjaja <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. altitudinis</i> 13a	kayu busuk	birchwood	72 jam	9	328 U/mL	(Duarte <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. circulans</i> D1	kayu busuk	birchwood	48 jam	7	19.1 U/ml	(Bocchini <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. megaterium</i> BM07	tanah	xylose	72 jam	8	40 U/ml	(Irfan <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. pumilus</i> H10-1	Feses herbivora	-	7 days	9	20.4 U/ml	(Yoon <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. subtilis</i>	sedimen	oat spelt	36 jam	9	128 U/mL	(Annamalai <i>et al.</i> , 2009)
<i>Chaetomium thermophilum</i>	-	birchwood	48 jam	5.5	32 U/mL	(Katapodis <i>et al.</i> , 2007)
<i>Penicillium oxalicum</i> ZH-30	-	birchwood	144 jam	5	16.1U/mL	(Li <i>et al.</i> , 2007)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap ketiga strain ini, besarnya aktivitas xilanase menunjukkan nilai yang lebih tinggi setelah dilakukan optimasi. Aktivitas tertinggi sebelumnya untuk strain *B. altitudinis* KBX07 tercatat sebesar 1,3 U/mL dengan waktu inkubasi 48 jam pada pH buffer 5.5 (Saputra dan Dinoto, 2021). Namun dalam penelitian ini, diperoleh aktivitas xilanase hingga 43.5 U/mL. Hal tersebut juga menunjukkan waktu inkubasi dan buffer yang digunakan dalam pengujian sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim.

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur gula pereduksi yang terbentuk dari proses hidrolisis. Gula yang terbentuk dari proses ini adalah berupa xilosa, yaitu monomer dari xilan. Degradasi xilan dapat dideteksi dengan mengamati pertumbuhan mikroba pada medium cawan dengan xilan sebagai satu-satunya sumber karbon dan sumber energi. Metode ini didasarkan pada adanya perubahan yang terlihat pada medium cawan ketika polisakarida terdegradasi (Ruijssenaars and Hartmans, 2000). Pada medium produksi, penurunan absorbansi dari ketiga strain tersebut dapat mengindikasikan terhentinya pertumbuhan yang disebabkan nutrisi yang terdapat di dalam medium sudah tidak sebanding dengan jumlah sel yang berkembang. Pada saat itu, produksi enzim

ekstraseluler yang dihasilkan oleh sel tersebut juga berkurang.

Hasil hidrolisis enzim xilanase dengan substrat xilan diamati menggunakan kromatografi lapis tipis. Metode ini memungkinkan melihat molekul pecahan xilan secara kualitatif, dalam hal ini adalah bercak yang sejajar dengan kontrol oligosakarida yang digunakan. Beberapa sampel yang diuji dalam studi ini tidak menunjukkan pemisahan fraksi yang jelas pada kromatografi lapis tipis yang dapat disebabkan oleh ketidakmurnian enzim yang digunakan. Namun molekul tersebut diduga xilooligosakarida, yang merupakan hasil pemecahan secara acak xilan oleh enzim endo- β -1,4-D-xylanase (Collins *et al.*, 2008), dilihat dari sejarahnya fraksi sampel dengan maltopentaosa (oligosakarida). *Xylooligosaccharides* (XOS), yang merupakan salah satu pemanis baru dan pangan fungsional, dapat diperoleh dengan mengolah bahan lignoselulosa dengan bantuan enzim xilanase. Oligosakarida umumnya didefinisikan sebagai sakarida yang mengandung antara 2 dan 10 gula gugus. XOS menunjukkan sifat fungsional yang baik, diantaranya non-toksik, dapat memperbaiki fungsi usus, penyerapan kalsium, metabolisme lipid, meningkatkan pertumbuhan bakteri usus yang menguntungkan, dan mengurangi kanker usus besar dengan membentuk rantai

pendek asam lemak (Allonso *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Tiga strain *B. altitudinis* diketahui telah memiliki kemampuan xilanolitik. Lamanya waktu inkubasi dan perbedaan strain berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase. Akan tetapi, pH buffer (netral dan alkalin) dalam proses hidrolisis tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas xilanase. Waktu inkubasi optimum untuk produksi enzim xilanase dari ketiga strain tersebut adalah 96 jam. Aktivitas xilanase tertinggi adalah 46.9 U/mL yang diperoleh strain *B. altitudinis* KBX08 dengan waktu inkubasi 96 jam dan pH buffer 9 pada suhu pengujian 50°C. Analisis kromatografi lapis tipis menunjukkan adanya pemecahan xilan oleh enzim xilanase yang dihasilkan oleh ketiga strain. Studi lanjutan dengan mengkarakterisasi ekstrak kasar xilanase maupun hasil hidrolisinya berguna untuk mengetahui jenis oligosakarida maupun monosakarida yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) tahun 2014 dan tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, J.L., Domínguez, H., Garrote, G., Parajó, J.C. and Vázquez, M.J., 2003. *Xylooligosaccharides: properties and production technologies. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, pp. 230–232.
- Béra-Maillet, C., Devillard, E., Cezette, M., Jouany, J.P. and Forano, E., 2005. Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium sp.*, *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), pp. 149–156.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, pp. 3–23.
- Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E. and da Silva, R., 2002. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 38, pp. 727–731.
- Cossona, T., Vendrellb, A.M.P., Teresac, B.G., Reneb, D., Tailladea, P. and Brufau, J., 1999. Enzymatic assays for xylanase and b-glucanase feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, 77, pp. 345–353.
- Duarte, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugal, E.P., Ponezi, A.N. and Franco, T.T., 2000. Characterization of alkaline xylanase from *Bacillus altitudinis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, pp. 90–94.
- Duarte, M.C.T., da Silva, E.C., de Bulhoes Gomes, I.M., Ponezi, A.N., Portugal, E.P., Vicente, J.R. and Davanzo, E., 2003. Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus altitudinis* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement. *Bioresource Technology*, 88, pp. 9–15.
- Harris, A.D. and Ramalingam, C., 2010. Xylanases and its application in Food Industry: A review. *Journal of Experimental Sciences: 1*(7), Pages 01–11.
- Flores, M.E., Perez, R. and Huitron, C., 1997. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp.* CH-M-1035. *Letters Applied Microbiology*, 24, pp. 410–416.
- Ghimire, S., Bhattarai, S. Phuyal, S., Thapa, B. and Shrestha, B.G., 2016. Isolation and Screening of Potential Cellulolytic and Xylanolytic Bacteria from Soil Sample for Degradation of Lignocellulosic Biomass. *The Journal of Tropical Life Science*, 6(3), pp. 165 – 169.
- Heck, J.X., de Barros Soares, L.H. and Ayub, M.A.Z., 2005. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 417–423.
- Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R. and Syed, Q., 2016. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus sp.* in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Science*, 9(2), pp. 139–147.
- Katapodis, P., Christakopoulou, V., Kekos, D. and Christakopoulos, P., 2007. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35, pp. 136–141.
- Nieto-Dominguez, M., Eugenio, L.E., York-Durán, M.J., Rodríguez-Colinas, B., Plou, F.J., Chenoll E., Pardo, E., Codoñer, F. and Martínez, M.J., 2017. *Food Chemistry*. 1(232) pp.105–11.
- Phitsuwan, P., Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., Mori, Y., Kyu, K.L. and Ratanakhanokchai, K., 2010. A cellulolytic and xylanolytic enzyme complex from an alkalothermoanaerobacterium, *Tepidimicrobium xylanilyticum* BT14. *Journal Microbiology and Biotechnology*, 20(5), pp. 893–903.

- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Prasetya, B. and Nasikin, M., 2010 Utilization of Bagasse Cellulose for Ethanol Production through Simultaneous Saccharification and Fermentation by Xylanase. *Makara Journal of Technology*, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 17–24.
- Saputra, S. and Dinoto, A., 2021. Cellulolytic and xylanolytic faecal bacteria from tedong bonga [Toraja buffalo, *Bubalus bubalis carabanesis*]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 741(1), 012064.
- Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G. and Devi, P.S., 2017. Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*. *3 Biotech*. 7(4): 266.
- Widjaja, S., Purwadaria, T. and Ketaren, P.P., 2008. Apparent induction of xylanase by *Bacillus altitudinis* PU4-2 using pretreated substrates. *Journal Microbiology Indonesia*, pp. 44–48.
- Yang, H., Wang, K., Song, X. and Xu, F., 2011. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology*, 102, pp. 7171–7176.
- Yoon, Y. M., An, G.H., Kim, J.K., Ahn, S.H., Cha, Y.L., Yang, J., Yu, K.D., Ahn, J.W., Moon, Y.H., Koo, B.C. and Choi, I.H., 2014. Xylanase activity of *Bacillus pumilus* H10-1 isolated from *Ceratotherium simum* Feces. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 29(5), pp. 316–322.
- Zorec, M., Vodovnik, M. dan Marinek-Logar, R., 2014. Potential of selected rumen bacteria for cellulose and hemicellulose degradation. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), pp. 210–221.