

Catatan Penelitian

Seleksi Isolat Bakteri Lokal Penghasil Xilanase

The Selection of Xylanase-Producing Indigenous Bacteria

NUR RICHANA*, PUJI LESTARI, AHMAD THONTOWI & ROSMIMIK

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

The isolation and selection of xylanase producing bacteria have been done from soil and waste of starch industry. Strains were cultivated in neutral and alkaline media with xylan as a substrate. Colonies which produced clearing zone were presumed as xylanolytic bacteria and chosen for further screening. Results show that 10 isolates of bacteria in neutral condition and 25 bacteria in alkaline condition. There are three isolates in neutral condition (ON-12, ON-13 and ON-33) have high enzyme activities at 19.93, 23.42 and 19.32 U/ml, and specific activities which were 80.37, 71.85 and 114.36 U/mg protein respectively. On the other hand there are two isolates in alkaline condition (TA-15 and TA-III5) which have high enzyme activities at 12.43 and 11.18 U/ml, and specific activities which were 36.72 and 42.68 U/mg protein respectively.

Key words: xylanase, bacteria, isolation

Perkembangan dan kemajuan bidang pertanian dan industri pertanian di Indonesia telah menimbulkan peningkatan limbah pertanian yang sebagian besar merupakan limbah berlignoselulosa. Limbah ini antara lain yaitu jerami, onggok (ampas tapioka, garut), bonggol dan kulit jagung, sabut serta tandan kosong kelapa sawit, dan bagas tebu. Limbah ini menimbulkan pencemaran lingkungan. Pada dasarnya limbah ini tidak memiliki nilai ekonomi, bahkan mungkin bernilai negatif karena memerlukan biaya penanganan. Namun demikian, limbah lignoselulosa sebagai bahan organik memiliki potensi besar sebagai bahan baku berbagai industri, misalnya pembuatan kertas. Di samping itu fraksinasi limbah ini menjadi komponen penyusunnya akan meningkatkan pendayagunaan dalam berbagai industri.

Lignoselulosa terdiri atas hemiselulosa, selulosa, dan lignin. Hemiselulosa dapat dimanfaatkan menjadi produk xilitol, xilosa, dan fulfural; selulosa dapat dimanfaatkan menjadi kertas, protein sel tunggal, glukosa, fruktosa, dan sorbitol; dan lignin untuk bahan bakar, pelarut, resin, produk karbon dan matriks adsorpsi (Paturau 1969).

Salah satu sasaran dalam pengembangan bioteknologi yaitu merintis pemanfaatan mikrob dalam biokonversi limbah. Pemanfaatan limbah berlignoselulosa menggunakan jasa mikrob dapat menghasilkan enzim ekstrasel yang mampu mendegradasi bahan berlignoselulosa menjadi fraksi penyusunnya.

Xilanase merupakan enzim ekstrasel yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilooligosakarida.

Pada pembuatan kertas, xilanase digunakan untuk menghilangkan hemiselulosa dalam proses *bleaching*. Proses ini bila dilakukan dengan cara enzimatik akan menjadi lebih murah dan bermanfaat serta merupakan pengganti cara kimia yang dapat mengakibatkan pencemaran racun limbah kimia (Arribas *et al.* 1995). Di samping itu xilanase juga dapat digunakan untuk produksi gula xilosa yaitu gula untuk konsumsi penderita diabetes mengingat selama ini gula xilosa masih diimpor.

Sekalipun potensi penggunaan enzim xilanase cukup beragam, tetapi untuk produksinya masih menghadapi beberapa kendala, antara lain tidak tersedianya biakan mikrob unggul dan kurangnya pengetahuan tentang teknologi produksi enzim. Di lain pihak pakar dari negara maju mengakui bahwa negara yang kaya akan keanekaragaman hayatinya, termasuk Indonesia, merupakan sumber mikrob yang potensial untuk bioproses (Fox 1994). Xilanase biasanya dihasilkan oleh bakteri atau khamir. Untuk proses pembuatan kertas diperlukan xilanase yang bersifat termotabil dan tahan pada pH alkali (Nakamura *et al.* 1996), sedangkan untuk xilanase termolabil dapat dimanfaatkan untuk campuran pakan ternak.

Penelitian ini bertujuan menyeleksi dan mendapatkan koleksi isolat bakteri unggul penghasil xilanase berdasarkan karakteristiknya.

Contoh tanah diambil dari daerah limbah pabrik tapioka 'Setia' Kedung Halang, Bogor, daerah tanah berkapur Leuwiliang, dan Gunung Kidul Jawa Tengah. Tanah diambil secara aseptik dan dimasukkan ke dalam kantong plastik steril dan disimpan sampai siap digunakan.

Isolasi bakteri dari contoh tanah dilakukan dengan metode Nakamura *et al.* (1993) yang dimodifikasi serta menggunakan

* Penulis untuk korespondensi, Tel. 62-251-337975, Fax. 62-251-338820, E-mail: borif@indo.net.id

substrat xilan dari *oat spelt* (Sigma). Media yang digunakan ialah media yang bersifat netral dengan pH 7 (A) dan alkali dengan pH 10.5 (B). Komposisi media A terdiri atas ekstrak khamir 0.2%, K_2HPO_4 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, xilan 0.7%, NaCl 0.23%, NH_4Cl 0.5% dan Na_2HPO_4 5.0% (Dung *et al.* 1993), sedangkan komposisi media B terdiri atas polipepton 0.5%, ekstrak khamir 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, xilan 0.5%. Pengaturan pH 10.5 dilakukan dengan menambah Na_2CO_3 1% (Nakamura *et al.* 1993).

Seleksi dilakukan secara bertahap berdasarkan ukuran koloni dan adanya zona bening di sekeliling koloni yang tumbuh pada media A dan B. Isolat murni yang mempunyai kemampuan menghasilkan xilanase pada masing-masing media ditumbuhkan pada media agar kaldu nutrisi miring. Untuk penyimpanan ditumbuhkan pada media kaldu nutrisi dalam gliserol 30% dan disimpan pada suhu $-20^\circ C$.

Setiap isolat yang diperoleh diuji kemampuannya untuk tumbuh dan menghasilkan xilanase dalam media cair. Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media substrat xilan cair 5 ml dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya isolat bakteri dikultivasi di dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml media substrat xilan (konsentrasi inokulum 10%). Inkubasi dilakukan pada kecepatan gerak inkubator 150 rpm pada suhu $30-38^\circ C$ selama empat hari.

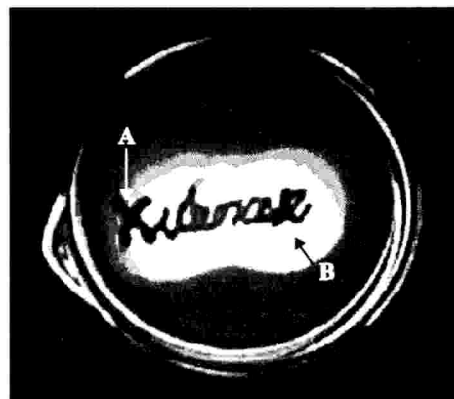
Uji kemampuan tumbuh dilakukan berdasarkan biomasnya dengan mengukur kepekatan optik pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer cairan kultivasi.

Kadar protein terlarut diukur menggunakan metode Lowry *et al.* (1951) dengan standar *bovin serum albumin* pada konsentrasi 100-800 ppm. Hasil reaksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm.

Aktivitas xilanase diuji untuk mengukur kemampuan enzim dalam menghidrolisis xilan menjadi gula reduksi berdasarkan metode Winterhalter dan Liebl (1995). Analisis gula reduksi dilakukan dengan pereaksi 3,5 dinitro salisilic acid (DNS) dan diukur serapannya pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai standar digunakan deret standar xilosa. Satu unit aktivitas xilanase dinyatakan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi (xilosa) sebanyak 1 μmol /menit pada kondisi pengujian (Kubata *et al.* 1992).

Hasil pengujian menunjukkan ada 24 isolat yang dapat menghasilkan zona bening pada media mengandung xilan (Gambar 1). Seluruh isolat tersebut dipilih dari koloni yang berdiameter lebih dari tiga sentimeter dan berzona bening. Zona bening terbentuk karena adanya aktivitas hidrolisis xilan oleh enzim xilanase. Pada media cair ditemukan hanya ada 35 isolat yang tumbuh yaitu 10 isolat pada media netral dan 25 isolat pada media alkali (Tabel 1).

Pengamatan kepekatan optik pada akhir pembiakan (berkisar antara 0.576 sampai dengan 1.249) menunjukkan bahwa ada perbedaan kemampuan setiap isolat untuk memperbanyak diri pada kondisi yang diujikan. Isolat yang mampu tumbuh dengan baik memberikan indikasi bahwa bakteri tersebut mampu



Gambar 1. Pembentukan Zona bening disekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media xilan (A) koloni bakteri (B) zona bening.

Tabel 1. Kepekatan optik, kandungan protein, aktivitas enzim dan aktivitas spesifik dari beberapa isolat bakteri penghasil xilanase.

Isolat pada	Kepekatan optik	Protein (mg/ml)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
Media netral				
ON-11	0.707	0.208	8.870	42.64
ON-12	0.576	0.248	19.931	80.37
ON-13	1.105	0.326	23.424	71.85
ON-33	0.838	0.198	19.327	114.36
ON-34	0.800	0.208	6.096	29.31
ON-41	0.845	0.266	8.648	32.51
ON-42	0.862	0.281	16.708	59.46
ON-53	0.731	0.293	13.081	44.65
ON-55	0.794	0.246	9.379	38.13
ON-85	0.740	0.260	8.720	33.54
Media alkali				
OA-1	0.981	0.231	0.051	0.22
OA-2	1.021	0.187	5.546	29.66
OA-3	0.931	0.198	4.468	22.56
OA-4	0.897	0.234	5.546	23.70
OA-5	0.931	0.219	0.198	0.91
TA-11	0.288	0.311	2.917	9.41
TA-12	0.402	0.311	0.734	2.36
TA-13	0.397	0.332	2.449	7.38
TA-14	0.664	0.290	1.670	5.76
TA-15	0.376	0.338	12.430	36.77
TA-16	0.329	0.298	1.826	6.12
TA-17	0.502	0.301	3.697	12.32
TA-18	0.589	0.302	2.449	8.12
TA-19	0.337	0.281	2.761	9.86
TA-II1	0.528	0.297	1.826	6.15
TA-II4	0.654	0.264	2.761	10.45
TA-II5	1.249	0.289	3.385	11.71
TA-III1	1.013	0.332	1.826	5.52
TA-III2	0.894	0.313	0.890	2.84
TA-III3	0.931	0.270	3.385	12.54
TA-III4	0.991	0.305	2.449	7.98
TA-III5	0.857	0.306	11.182	42.68
TA-III6	1.017	0.262	1.046	3.56
TA-III7	0.876	0.294	0.422	1.19
TA-III8	0.742	0.355	0.110	0.42

ON = Onggok-Netral, OA = Onggok-Alkali, TA = Tanah-Alkali; I = pH tanah 7.67, II = pH tanah 6.98, III = pH tanah 7.89.

memanfaatkan satu-satunya sumber karbon dalam media pertumbuhan yaitu xilan. Dengan demikian produksi enzim akan lebih baik jika menggunakan isolat-isolat yang mampu tumbuh

dengan baik pada substrat yang diinduksi dengan xilan tersebut.

Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada beberapa isolat uji menunjukkan bahwa aktivitas enzim berkisar antara 6.096-23.424 U/ml pada media netral (A) dan 0.051- 12.430 U/ml pada media alkali (B). Hasil tertinggi ditunjukkan oleh isolat ON-13 yang diisolasi dari media A. Dari kedua macam media pertumbuhan yang digunakan ternyata media A lebih potensial dibandingkan media B, walaupun contoh tanah awal yang digunakan bersifat basa (pH 7.98). Namun demikian, dari hasil penelitian ini dapat dikemukakan bahwa semakin tinggi pH contoh tanah yang diisolasi maka aktivitas xilanase alkalofilik lebih tinggi.

Kandungan protein hasil kultivasi dari isolat bakteri yang tumbuh pada media A berkisar antara 0.198-0.326 mg/ml, sedangkan pada media B antara 0.187-0.355 mg/ml. Dari beberapa isolat tersebut ternyata kandungan protein tidak jauh berbeda. Protein yang tinggi diduga menunjukkan enzim yang tinggi pula, namun demikian enzim yang terbentuk belum dapat dipastikan merupakan xilanase. Untuk mengetahui protein tersebut adalah xilanase maka perlu diketahui aktivitas xilanasenya. Hubungan antara aktivitas xilanase dan protein yang dihasilkan dinyatakan dengan aktivitas spesifik.

Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan berkisar 29.31-114.36 U/mg protein pada media A dan 0.22-42.68 U/mg protein pada media B. Aktivitas enzim yang tinggi tidak selalu diikuti oleh aktivitas spesifik yang tinggi, demikian pula sebaliknya. Misalnya isolat bakteri ON-13 yang aktivitas xilanasenya sebesar 23.42 U/ml (terbesar di antara 10 isolat bakteri di media A) namun aktivitas spesifiknya hanya 71.85 U/mg protein, sedangkan isolat bakteri ON-33 yang beraktivitas xilanase 19.32 U/ml, mempunyai aktivitas spesifik 114.36 U/mg protein. Hal ini diduga karena hanya sebagian kecil dari kandungan protein pada hasil kultivasi isolat bakteri ON-13 ialah xilanase, sedangkan untuk isolat bakteri ON-33 protein yang terkandung sebagian besar yaitu xilanase.

Hasil penelitian ini cukup berpotensi dibandingkan penelitian sebelumnya. Dung *et al.* (1993) melaporkan aktivitas spesifik xilanase dari *Aeromonas caviae* W-61 ialah 1.87 U/mg protein, sedangkan Kubata *et al.* (1995) mengemukakan aktivitas spesifik xilanase *Aeromonas caviae* ME-1 ialah 8 U/mg protein. Aktivitas spesifik xilanase dilaporkan pula dari *Bacillus* sp. 41M-1 sebesar 86.1 U/mg protein (Nakamura *et al.* 1993). Park *et al.* (1992) melaporkan aktivitas spesifik xilanase dari *Bacillus* sp YC-335 ialah 1.65 U/mg protein.

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas xilanase dan aktivitas spesifik, isolat ON-12, ON-13, dan ON-33 merupakan isolat bakteri potensial sebagai penghasil xilanase yang bersifat netral. Xilanase ini disarankan pemanfaatannya untuk pakan ternak maupun proses perombakan xilan pada kondisi pH rendah sampai netral. Di samping itu isolat TA-15 dan TA-III5 merupakan isolat bakteri potensial sebagai penghasil xilanase alkalofilik yang nantinya dapat dimanfaatkan untuk proses pemutih pada industri kertas.

DAFTAR PUSTAKA

- Arribas, R. A., J. M. Fernandez-Abalos, P. Sanchez, A. I. Gardu & R. I. Santamaria. 1995. Over production, purification, and biochemical characterization of a xylanase I (xus I) from *Streptomyces halstedii* JMB. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2414-2419.
- Dung, Ng. V., S. Vetayasuporn, Y. Kamio, N. Abe, J. Kaneko & K. Izaki. 1993. Purification and properties of B-1,4-xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:1708-1712.
- Fox, J. K. 1994. Biodiversity promises great prospecting. *Biotechnol. Bioeng.* **13**:544-545.
- Kubata, K.B., H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa & T. Suzuki. 1992. Xylanases I of *Aeromonas caviae* ME-1 isolated from the intestine of herbivorous insect (*Samia cyrthia pryeri*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**:1463-1464.
- Kubata, K.B., K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki & H. Horitsu. 1995. Xylanase IV and exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylooligosaccharide as the only low-molecular-weight oligosaccharide from xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1666-1668.
- Lowry, O. H., N. P. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the feolin phenol reagent. *J. Biochem.* **193**:265-275.
- Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono & Horikoshi. 1993. Purification and same properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2311-2316.
- Nakamura, S., R. Nakai, K. Wakabayashi, Y. Ishiguro, R. Aono & K. Horikoshi. 1996. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alklophilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAP-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **18**:78-81.
- Park, J. S., D. J. Yum, D. H. Bai & J. h. Yu. 1992. Xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain YC-335. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**:1355-1356.
- Paturau, J. M. 1969. By-product of cane sugar industry. *An Introduction to Their Industrial Utilization*, Ed. Ke-1. New York: Elsevier Publishing Company.
- Winterhalter, C. & W. Liebl. 1995. Two extremely thermostable xylanase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1810-1915.