

ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI XILAN DAN MANAN DARI PERAIRAN INDONESIA

Isolation of Xylan and Mannan Degrading Bacteria from Indonesian Waters

Winda Tasia^{1*}, Rina Zuraida² dan Yopi¹

¹ Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.

² Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi Kelautan, Badan Penelitian dan Pengembangan Energi dan Sumber Daya Mineral, Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral, Jl. Dr. Djunjunan 236, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

*Korespondensi Penulis : winda.tasia@gmail.com

Diterima: 10 April 2016; Disetujui: 1 Mei 2016

ABSTRAK

Bakteri laut penghasil enzim xilanase dan mananase menyimpan banyak potensi bagi bioteknologi kelautan. Informasi sebarannya juga dapat digunakan untuk memetakan keragaman bakteri laut serta analisis lingkungan perairan Indonesia sehingga pemanfaatannya dapat tepat sasaran. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri laut pendegradasi xilan dan manan dari Indonesia. Penapisan kemampuan xilanolitik dan manolitik menggunakan metode *Congo red* dilakukan pada isolat bakteri yang diisolasi dari Laut Jawa, Selat Makassar, Laut Flores, dan Laut Sawu pada kedalaman 5 dan 20 m. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat X7517, X1654, dan XM26511 diketahui menghasilkan xilanase dengan kondisi optimal reaksi enzim masing-masing adalah pH 9, T 90 °C (2,253±2,075 U/ml), pH 6, T 70 °C (0,633±0,082 U/ml), dan pH 6, T 70 °C (2,293±0,066 U/ml). Ketiganya diketahui memiliki kesamaan genetik dengan *Halomonas aquamarina* DSM 30161, *Alteromonas macleodii* NBRC 102226, dan *H. meridiana* NBRC 15608. Isolat bakteri manolitik L15203 dan L16571 memiliki kesamaan dengan *Idiomarina zobellii* KMM231, sedangkan isolat L2207 memiliki kesamaan dengan *Bacillus* sp. MB 71. Ketiga bakteri tersebut memiliki aktivitas mananase optimal pada kondisi alkali, masing-masing pada pH 8, T 80 °C (0,477±0,024 U/ml) untuk L 15203, pH 9, T 90 °C (0,476±0,009U/ml) untuk L16571 dan pH 9, T 80 °C (0,528±0,057 U/ml) untuk L2207. Bakteri laut xilanolitik dan manolitik yang berpotensi dalam produksi xilanase dan mananase melimpah di sebagian perairan Indonesia, terutama di perairan yang semakin dekat permukaan laut atau perairan dangkal.

KATA KUNCI: bakteri laut Indonesia, xilanase, mananase

ABSTRACT

*Xylanase and mannanase producing marine bacteria are potential to be utilized in marine biotechnology. Information of their distribution is important to determine the biodiversity pattern of marine bacteria and to analyze the aquatic environment in Indonesia, therefore, they can be appropriately utilized. This research aimed to isolate Indonesian marine bacteria for xylan and mannan degradation. Congo red method was employed to screen xylanolytic and mannolytic abilities on bacteria isolated from Java Sea, Makassar Strait, Flores Sea, and Savu Sea in depth of 5 and 20 m. Results of this study showed that isolate X7517, X1654, and XM26511 produced xylanase with optimal reaction condition at pH 9, T 90 °C (2.253±2.075 U/ml), pH 6, T 70 °C (0.633±0.082 U/ml), and pH 6, T 70 °C (2.293±0.066 U/ml), respectively. They are genetically similar with *Halomonas aquamarina* DSM 30161, *Alteromonas macleodii* NBRC 102226, and *H. meridiana* NBRC 15608. Mannolytic bacteria L15203 and L16571 were similar with *Idiomarina zobellii* KMM 231, while isolate L22207 was similar with *Bacillus* sp. MB71. They had mannanase activities which work optimally at alkaline condition of pH 8, T 70 °C (0.477±0,024 U/ml), pH 9, T 80 °C (0.476±0,009U/ml) and pH 9, T 80 °C (0.528 ±0,057 U/ml), respectively. Xylanolytic and mannolytic marine bacteria that are potential for xylanase and mannanase production were found abundantly on parts of Indonesian waters particularly at shallow water.*

KEYWORDS: Indonesian marine bacteria, xylanase, mannanase

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki bentangan hutan dan perairan seluas 129.425 ribu hektar (BPS, 2015) dengan keragaman dan kelimpahan biota di dalamnya, termasuk bakteri laut. Menurut Sembiring (2015), bakteri laut memiliki peluang untuk dapat dimanfaatkan dalam industri bioteknologi kelautan, seperti untuk memenuhi kebutuhan farmasi, kosmetik, pangan, pakan, dan produk non konsumsi. Penelitian terkait bakteri laut Indonesia untuk kebutuhan bioremediasi (Andriana, Sudiana & Sembiring 2009; Harwati, Kasai, Kodama, Susilaningih, & Watanabe, 2009; Muniarsih, Yopi & Budiawan 2009; Muniarsih & Yopi, 2009) dan farmasi (Bahri, 2012; Blunt, Copp, Munro, Northcote, & Prinsep 2005) cukup banyak dilaporkan. Meskipun demikian, publikasi hasil penelitian mengenai potensi bakteri laut Indonesia sebagai pendegradasi xilan dan manan masih terbatas.

Xilan, xiloglukan, glukomanan, galaktomanan, galaktoglukomanan, dan arabinogalaktan merupakan komponen penyusun hemiselulosa pada dinding sel tanaman, dengan xilan sebagai komponen utama. Pemotongan ikatan β 1,4 pada xilan dapat dibantu dengan enzim hidrolitik xilanase (EC 3.2.1.x), yang berperan dalam produksi xilosa dan berperan sebagai sumber karbon utama dalam metabolisme sel. Di sisi lain, terdapat enzim hidrolitik mananase (EC 3.2.1.x) yang secara acak memotong ikatan β 1,4 pada rantai utama glukomanan, galaktomanan, dan galaktoglukomanan (Collins, Gerday & Feller, 2005; McCleary, 1988). Enzim xilanase dan mananase banyak diaplikasikan dalam kegiatan industri, seperti untuk kebutuhan pakan, pangan, energi, hingga pembuatan kertas (Chen, Ko, Huang & Guo, 2015; Comfort et al., 2004; Dhawan & Kaur, 2007; Khasin, Alchanati & Shoham, 1993).

Beberapa penelitian terkait bakteri laut Indonesia penghasil enzim xilanase dan mananase telah dilaporkan dalam 5 tahun terakhir. Yopi, Djohan dan Ambarsari (2014) mengisolasi bakteri laut *Bacillus safensis* LBF002 dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta untuk menghasilkan enzim mananase. Enzim tersebut berpotensi untuk memproduksi pangan fungsional, manooligosakarida. Selain itu, *B. safensis* LBF002 dapat menghasilkan enzim xilanase yang berpotensi dalam pengurangan limbah jerami padi dan untuk produksi pangan fungsional serta energi (Djohan, Perwitasari & Yopi, 2016; Rahmani, Robbani, Suparto, & Yopi, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri laut Indonesia berpotensi dalam menghasilkan enzim xilanase dan mananase untuk industri berbasis bioteknologi kelautan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menggali potensi bakteri laut penghasil enzim xilanase dan mananase untuk kebutuhan industri pangan dan lingkungan. Analisis sebaran bakteri laut pendegradasi xilan dan manan digunakan untuk memetakan keragaman bakteri laut Indonesia sehingga pemanfaatannya dapat tepat sasaran. Informasi ini juga tepat digunakan untuk analisis lingkungan perairan dan biodiversitas laut Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel air laut

Sampel air laut adalah air laut yang diambil dari 22 titik di Laut Jawa, Selat Makassar, Laut Flores, dan Laut Sawu pada kedalaman 5 dan 20 m. Sampel diambil pada Bulan Agustus 2015 dan disimpan dalam tabung 50 ml pada suhu 4 °C. Lokasi dan waktu pengambilan sampel disajikan pada Tabel 1.

Media

Isolasi bakteri laut dilakukan dengan media cair dan padat yang mengandung 0,1% xilan murni (Sigma)/manan (*locust bean gum*/LBG) (Sigma), 0,1% pepton (Bacto), dan 1,5% agar (Bacto) dalam air laut buatan. Proses penapisan dilakukan dengan media isolasi padat. Enzim diproduksi dengan media cair yang mengandung 0,5% xilan/manan, 0,1% pepton, dan 0,1% ekstrak khamir dalam air laut buatan.

Metode

Isolasi dan purifikasi isolat bakteri laut

Isolasi bakteri dilakukan dengan pengenceran bertingkat. Sampel air laut (0,5 ml) ditambahkan ke dalam media isolasi cair (4,5 ml) dan diinkubasi pada suhu 30 °C dengan kecepatan pengocokan 150 rpm. Hasil pengenceran tingkat keempat hingga keenam (10^{-4} - 10^{-6}) diinokulasikan ke media padat (xilan/manan) dalam cawan petri dengan metode tebar (*spread plate method*). Koloni bakteri dengan morfologi yang berbeda-beda ditumbuhkan terpisah pada media padat untuk mendapatkan koloni tunggal dan disimpan pada suhu 4 °C sebagai isolat.

Penapisan bakteri pendegradasi xilan dan manan

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media penapisan dengan metode titik (*spot plate method*) dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30 °C. Penapisan dilakukan

Tabel 1. Lokasi dan waktu pengambilan sampel air laut di Laut Jawa, Selat Makassar, Laut Flores, dan Laut Sawu, Indonesia

Table 1. Location and time of sampling at Java Sea, Makassar Strait, Flores Sea, and Savu Sea, Indonesia

No	Kode Sampel/ Sample Code	Tanggal/ Date	Waktu/ Time (WIB)	Lokasi/Location		
				Garis lintang/ Latitude	Garis bujur/ Longitude	Perairan/Sea, Strait
1	CTD-WS-04	5-08-2015	15:42:00	-401,005	110,156	Laut Jawa/Java Sea
2	CTD-WS-07	6-08-2015	12:32:00	-49,413	1,110,666	
3	CTD-WS-11	7-08-2015	22:16:00	-504,367	1,128,617	
4	CTD-WS-15	9-08-2015	15:11:00	-464,263	1,172,403	Selat Makassar/Makassar Strait
5	CTD-WS-16	9-08-2015	23:44:00	-470,213	1,172,403	
6	CTD-WS-17	10-08-2015	13:16:00	-481,657	1,188,087	
7	CTD-WS-18	10-08-2015	20:26:00	-547,154	1,189,387	
8	CTD-WS-18-YOYO-5	11-08-2015	15:57:00	-54,619	1,189,467	Laut Flores/Flores Sea
9	CTD-WS-19	12-08-2015	2:12:00	-573,579	1,192,194	
10	MAJAFLOTE CTD-WS-20	12-08-2015	8:39:00	-598,894	1,196,134	
11	MAJAFLOTE CTD-WS-21	12-08-2015	16:23:00	-638,216	1,198,519	
12	CTD-WS-22	13-08-2015	1:41:00	-681,383	1,194,306	
13	MAJAFLOTE CTD-WS-23	14-08-2015	7:11:00	-721,844	1,189,396	
14	MAJAFLOTE CTD-WS-24	14-08-2015	19:26:00	-743,464	1,182,045	
15	MAJAFLOTE CTD-WS-25	15-08-2015	11:52:00	-729,778	1,164,045	
16	MAJAFLOTE CTD-WS-26	15-08-2015	19:34:00	-728,267	115,599	
17	MAJAFLOTE CTD-WS-27	19-08-2015	8:28:00	-106,668	1,230,391	
18	CTD-WS-28	19-08-2015	3:01:00	-105,571	122,881	Laut Sawu/Savu Sea
19	CTD-WS-29	18-08-2015	22:14:00	-107,547	1,226,087	
20	MAJAFLOTE CTD-WS-30	18-08-2015	19:50:00	-107,646	-1,225,339	
21	MAJAFLOTE CTD-WS-31	21-08-2015	2:26:00	-107,932	1,232,882	
22	MAJAFLOTE CTD-WS-32	21-08-2015	23:45:00	-108,524	1,232,973	

dengan pengujian *congo red* 0,25% yang dituang ke media penapisan hingga seluruh permukaan media terendam dan didiamkan di suhu ruang selama 30 menit. Media dibilas dengan NaCl 1 M selama 15 menit sebanyak 2 kali. Zona bening menunjukkan kemampuan isolat mendegradasi xilan/manan. Asam asetat 5% dituang ke dalam media penapisan untuk visualisasi zona bening yang lebih baik (Yopi et al., 2007).

Produksi enzim xilanase dan mananase

Prekultur dengan kerapatan sel 0,2 pada panjang gelombang 660 nm ditambahkan ke dalam media kultur (20 ml). Kultur diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28-30 °C dengan kecepatan kocok 150 rpm. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari selama 5 hari. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 15 menit. Supernatan disimpan sebagai enzim kasar.

Pengujian kualitatif enzim kasar

Enzim kasar xilanase dan mananase dari hari ke-0 hingga hari ke-5 ditetaskan pada media padat yang mengandung xilan/manan 0,1% sebanyak 2 µl. Media diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari. Pengujian kualitatif dilakukan dengan pewarnaan *Congo red* 0,25% dan asam asetat 5% dengan melihat zona bening yang terbentuk setiap hari selama 5 hari.

Optimasi pH dan suhu enzim xilanase dan mananase

Nilai pH dioptimasi pada kisaran pH 4-10 dengan menggunakan larutan buffer sitrat (pH 4 dan 5), buffer fosfat (pH 6 dan 7), dan buffer glisin (pH 8-10) sebagai pelarut substrat (xilan/manan). Optimasi suhu dilakukan pada kisaran 30-100 °C. Aktivitas harian enzim xilanase dan mananase (Bailey, Biely, & Poutanen, 1992) diukur dengan menginkubasi 250 µl

larutan xilan/manan (0,1%) dengan 250 µl sampel enzim selama 15 menit, dilanjutkan dengan pengukuran gula reduksi dengan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959).

Identifikasi molekuler isolat bakteri laut dengan sebagian gen 16S rDNA

Isolat bakteri laut terpilih diidentifikasi secara molekuler dengan metode *polymerase chain reactive* (PCR) koloni menggunakan primer 9F (5' GAGTTTGATCITIGCTCAG 3') dan 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). Kit PCR *GoTaq* (Promega) digunakan untuk mengisolasi sebagian gen 16S rDNA dari koloni isolat. Analisis urutan basa nitrogen dilakukan oleh *1st BASE Sequencing INT*. Program *DNA Baser* dan *BLAST* (Anonim, 2016) digunakan untuk mengidentifikasi spesies isolat bakteri.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil Isolasi Bakteri Xilanolitik dan Manolitik

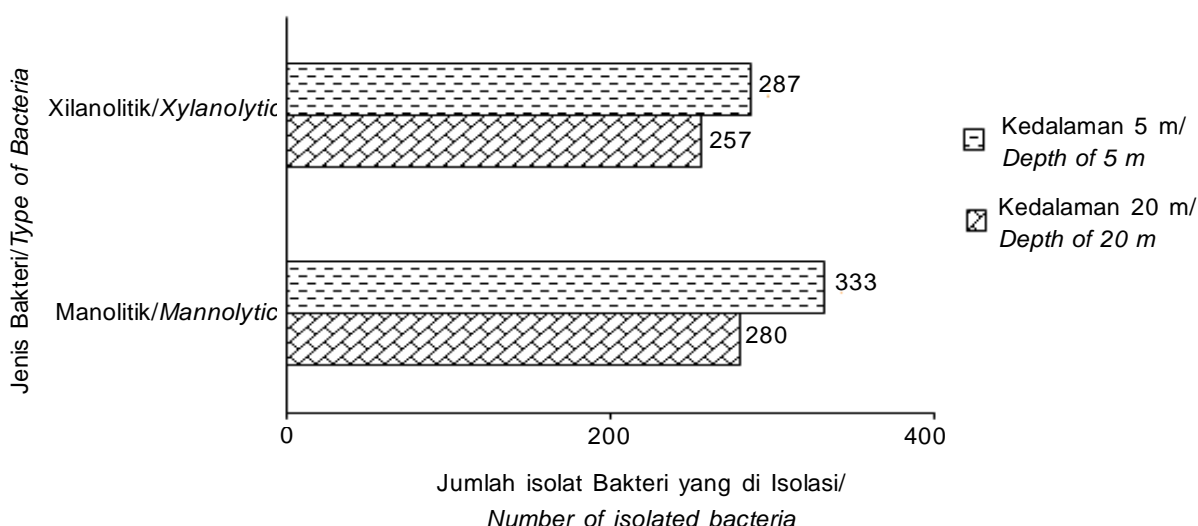
Dua puluh dua titik lokasi di perairan Indonesia diteliti sampel air lautnya untuk memperoleh bakteri laut potensial dalam menghasilkan enzim xilanase dan mananase. Dari masing-masing titik lokasi, diambil dua sampel air laut, yaitu dari kedalaman 5 dan 20 m. Sebanyak 287 isolat bakteri xilanolitik berhasil diisolasi dari sampel air laut kedalaman 5 m,

sedangkan isolat bakteri manolitik sebanyak 333 isolat. Dari kedalaman 20 m diperoleh lebih sedikit isolat bakteri xilanolitik maupun manolitik, yaitu masing-masing sejumlah 257 dan 280 isolat. Perbandingan jumlah isolat bakteri xilanolitik dan manolitik yang berhasil diisolasi dari laut kedalaman 5 dan 20 m disajikan pada Gambar 1.

Jumlah isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari masing-masing titik sampel dapat dilihat pada Tabel 2. Tekanan hidrostatik dan ketersediaan nutrisi dapat menjadi penyebab dari perbedaan hasil isolasi ini. Semakin dalam dari permukaan laut, maka tekanan hidrostatik semakin tinggi dan membatasi jumlah spesies makhluk hidup, termasuk mikroorganisme. Faktor nutrisi di laut juga memengaruhi karena makanan diproduksi di zona eufotik (lapisan air bagian atas dan tembus cahaya). Selain itu, permukaan laut atau laut dangkal juga mendapat nutrisi yang teralirkan dari daratan (Sanders & Hessler, 1969; Scheffer & van Nes, 2007).

Hasil Penapisan dan Pengujian Kualitatif Isolat Bakteri Xilanolitik dan Manolitik

Terdapat 3 isolat bakteri xilanolitik dan 3 isolat bakteri manolitik terpilih hasil pengujian dengan *Congo red* dan asam asetat. Pewarna *Congo red* berikatan dengan xilan/manan dan terserap di media sehingga warna media menjadi merah. Berdasarkan hal tersebut, zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa xilan/manan di zona tersebut dapat didegradasi dan dimanfaatkan



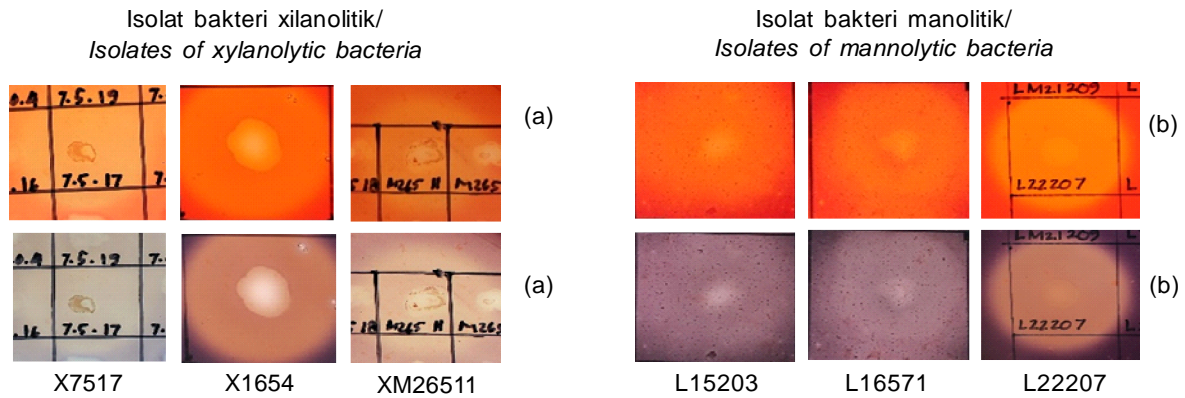
Gambar 1. Perbandingan jumlah isolat bakteri laut xilanolitik dan manolitik yang berhasil diisolasi dari perairan Indonesia pada kedalaman 5 dan 20 m.

Figure 1. Comparison of xylanolytic and mannolytic bacteria isolated from sea of Indonesia at depth of 5 and 20 m.

Tabel 2. Jumlah jenis isolat bakteri laut pendegradasi xilan dan manan dari 22 titik sampel pada kedalaman 5 dan 20 m.

Table 2. Number of bacteria isolated from 22 sampling site from the depth of 5 and 20 m.

Sampel/Sample		Jumlah isolat yang diisolasi/ Number of isolates		
Kode Sampel/ Sample Code	Lokasi/ Location	Kedalaman/ Depth (m)	Xilanolitik/ Xylanolytic	Manolitik/ Mannolytic
CTD-WS-04		5	4	6
		20	3	3
CTD-WS-07	Laut Jawa/ Java Sea	5	20	17
		20	1	4
CTD-WS-11		5	16	19
		20	2	2
CTD-WS-15		5	20	20
		20	2	4
CTD-WS-16	Selat Makassar/ Makassar Strait	5	4	5
		20	19	19
CTD-WS-17		5	25	24
		20	9	6
CTD-WS-18		5	12	18
		20	1	5
CTD-WS-18-YOYO-5		5	17	17
		20	22	21
CTD-WTS-19		5	14	18
		20	10	6
MAJAFLOTE CTD-WS-20		5	12	16
		20	12	14
MAJAFLOTE CTD-WS-21	Laut Flores/ Flores Sea	5	12	16
		20	7	12
CTD-WS-22		5	15	16
		20	13	9
MAJAFLOTE CTD-WS-23		5	12	16
		20	25	23
MAJAFLOTE CTD-WS-24		5	18	12
		20	10	22
MAJAFLOTE CTD-WS-25		5	13	18
		20	16	17
MAJAFLOTE CTD-WS-26		5	14	14
		20	14	12
MAJAFLOTE CTD-WS-27		5	12	15
		20	15	19
CTD-WS-28		5	14	14
		20	8	15
CTD-WS-29	Laut Sawu/ Savu Sea	5	7	16
		20	17	18
MAJAFLOTE CTD-WS-30		5	10	13
		20	15	12
MAJAFLOTE CTD-WS-31		5	8	14
		20	23	20
MAJAFLOTE CTD-WS-32		5	8	9
		20	13	17

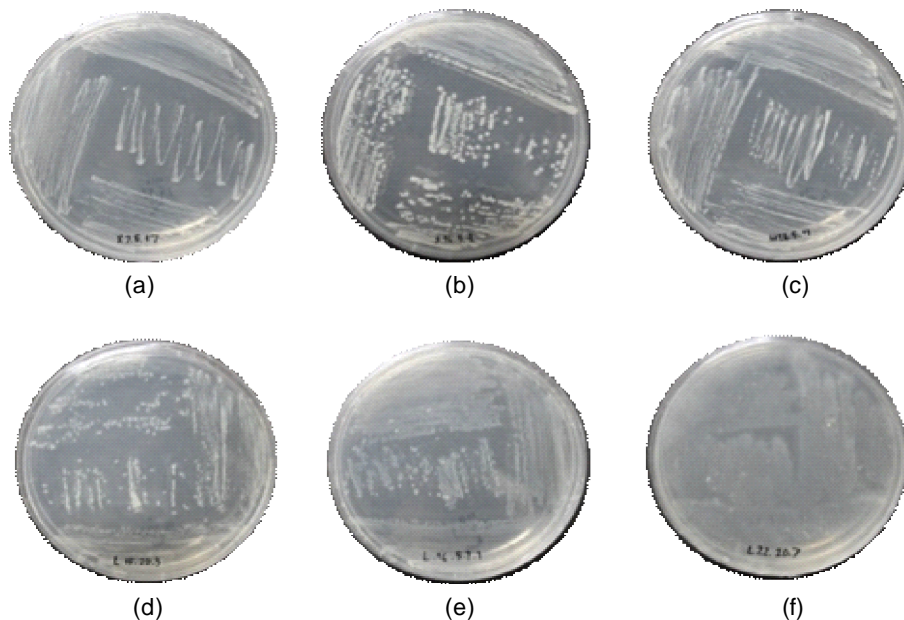


Gambar 2. Hasil penapisan bakteri xilanolitik dan manolitik dengan pengujian (a) Congo red 0,25% dan (b) penambahan asam asetat 5% untuk visualisasi zona bening yang lebih baik.
 Figure 2. Screening of xylanolytic and mannolytic bacteria using (a) 0,25% Congo red method and (b) addition of 5% acetic acid for better clear zone visualization.

oleh isolat bakteri sebagai sumber karbon (Downie, Hilhorst, & Bewley, 1994). Hasil penapisan dan pengujian isolat bakteri xilanolitik dan manolitik menggunakan Congo red disajikan pada Gambar 2.

Isolat X7517, X1654, dan XM26511 adalah isolat bakteri laut yang memiliki kemampuan xilanolitik. Isolat-isolat bakteri tersebut diisolasi dari kedalaman 5 m dari tiga lokasi yang berbeda, masing-masing dari Laut Jawa (CTD-WS-07), Selat Makassar (CTD-

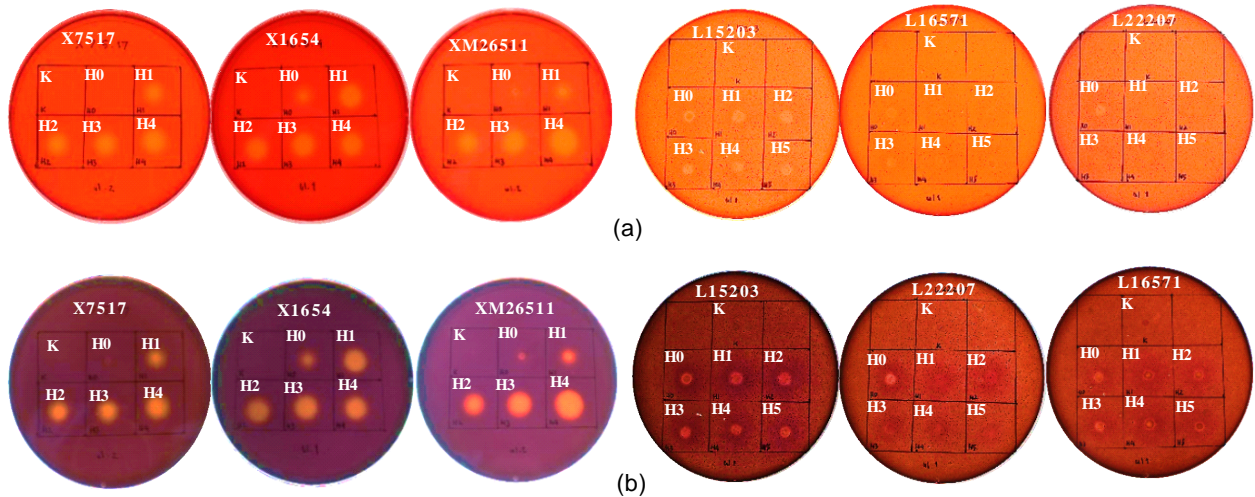
WS-16), dan Laut Flores (MAJAFLOTE-CTD-WS-26). Isolat bakteri manolitik terpilih yaitu L15203 dan L16571, diisolasi dari Selat Makassar, masing-masing dari titik sampel CTD-WS-15 kedalaman 20 m dan CTD-WS-16 kedalaman 5 m. Isolat bakteri L22207 juga merupakan isolat bakteri manolitik terpilih yang diisolasi dari Laut Flores (CTD-WS-22) pada kedalaman 20 m. Morfologi isolat-isolat terpilih disajikan dalam Gambar 3.



Keterangan/Note:

- (a) Isolat X7517/ X7517 isolate
- (b) Isolat X1654/ X1654 isolate
- (c) Isolat XM26511/ XM26511 isolate
- (d) Isolat L15203/ L15203 isolate
- (e) Isolat L16571/ L16571 isolate
- (f) Isolat L22207/ L22207 isolate

Gambar 3. Morfologi isolat bakteri terpilih pendegradasi xilan (a, b, c) dan manan (d, e, f).
 Figure 3. Morphology of selected bacterial isolates for xylan (a, b, c) and mannan (d, e, f) degradation.



Gambar 4. Pengujian kualitatif aktivitas xilanolitik dan manolitik dengan (a) analisis Congo red 0,25% dan (b) asam asetat 5% untuk visualisasi yang lebih baik.

Figure 4. Qualitative assay for xylanolytic and mananolytic activity determination (a) 0,25% Congo red analysis (b) 5% acetic acid for better visualization.

Aktivitas enzim kasar xilanase dan mananase tampak dari terbentuknya zona bening pada pengujian kualitatif enzim harian. Enzim xilanase dan mananase yang diproduksi oleh isolat bakteri terakumulasi setiap hari sehingga zona bening yang terbentuk semakin membesar, seperti pada Gambar 4.

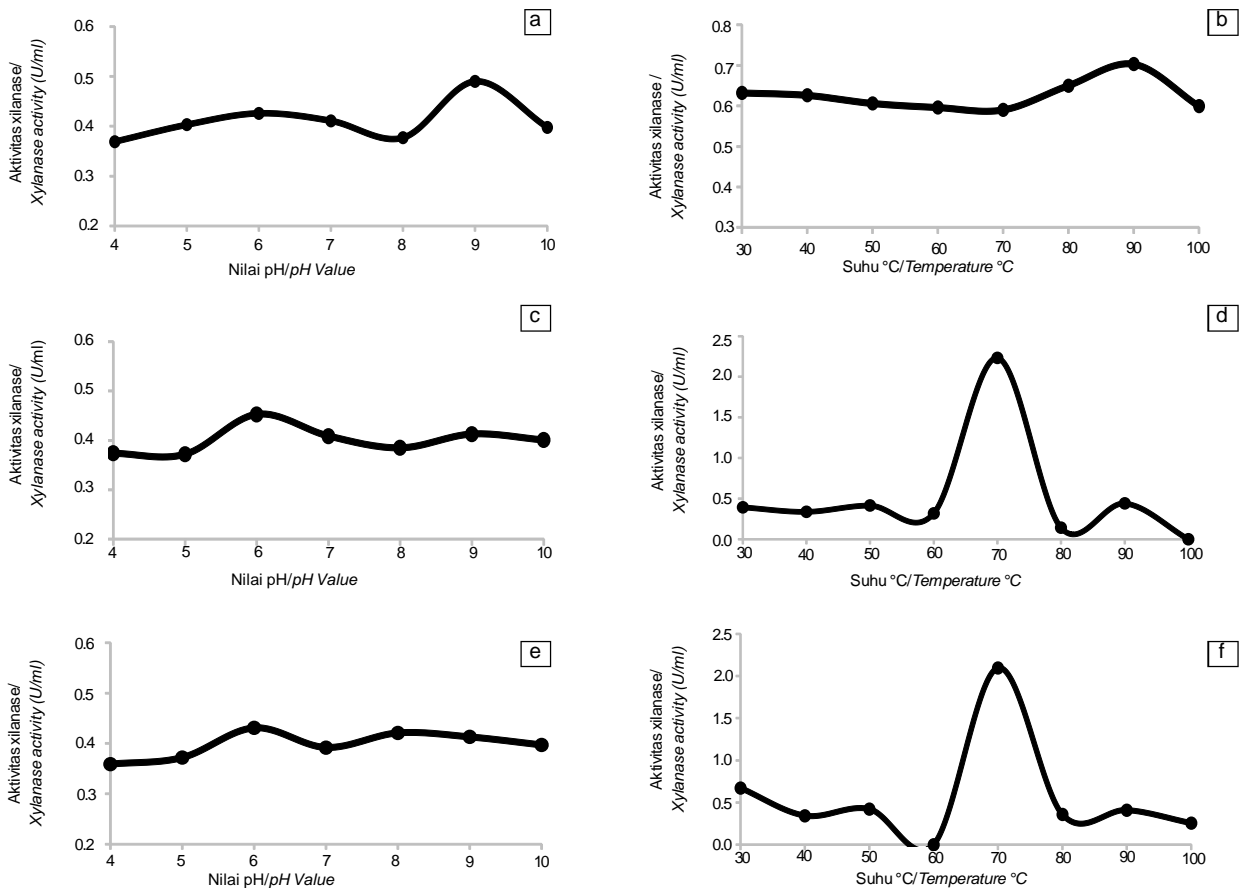
Pengujian dilakukan dengan sampel harian enzim kasar masing-masing isolat dari hari ke-0 (H0) hingga hari ke-4 (H4) dengan kontrol (K) sebagai pembanding untuk mengetahui aktivitas enzim xilanase. Pengujian hingga hari ke-5 (H5) dilakukan pada enzim kasar mananase untuk membandingkan aktivitas enzim mananase dan xilanase secara kualitatif. Hasil menunjukkan bahwa meskipun waktu pengamatan dilakukan lebih lama terhadap aktivitas mananase (5 hari), zona bening yang terbentuk tidak terlihat meningkat sehingga secara kualitatif aktivitas enzim mananase dapat dikatakan lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas enzim xilanase. Pengujian aktivitas enzim xilanase dan mananase secara kuantitatif penting dilakukan untuk memastikan hal tersebut.

Zona bening menunjukkan kemampuan enzim kasar dalam mendegradasi xilan murni dan LBG. Enzim kasar xilanase dimungkinkan masih mengandung dua kelas endoxilanase, lima selulase, dan enzim-enzim lain yang terkait (Miao, Li, Xiao, Shen, & Zhang, 2015). Begitu pula dengan enzim kasar mananase yang mengandung beberapa komponen enzim di dalamnya (Araujo & Ward, 1990). Mempertimbangkan hal tersebut, langkah purifikasi untuk xilanase dan mananase spesifik yang diinginkan pun banyak dilakukan (Araujo & Ward; Miao et al.)

Nilai pH dan Suhu Optimal Reaksi Enzim Xilanase dan Mananase

Xilanase yang diperoleh dari isolat bakteri laut adalah xilanase alkali dan netral. Isolat X7517 menghasilkan xilanase alkali dengan reaksi optimal di pH 9, sedangkan isolat X1654 optimal di pH 6. Xilanase dari isolat XM26511 memiliki aktivitas optimal di pH 6 ($0,431 \pm 0,007$ U/ml), tidak berbeda jauh dengan aktivitas di pH 8, yakni $0,421 \pm 0,066$ U/ml (Gambar 5). Pada penelitian sebelumnya yang telah dilaporkan, xilanase alkali dari *B. subtilis* yang diisolasi dari muara Vellar, India bekerja optimal di pH 9 dengan aktivitas 128 U/ml (Annamalai, Thavasi, Jayalakshmi & Balasubramanian, 2009). *B. subtilis* XP10 dari air laut di Jeddah, Arab Saudi juga menghasilkan xilanase alkali yang optimal di pH 8 ($2,82$ U/ml) (Tork, Aly, Alakilli & Al-Seeni, 2013), sedangkan Menon, Mody, Keshri, dan Jha (2010) mengisolasi *Bacillus pumilis* GESF-1 dari sedimen pertanian garam yang menghasilkan xilanase optimal di pH 8. Xilanase alkali dimanfaatkan industri *pulp* dan kertas untuk meningkatkan kualitas kertas (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001; Thomas, Sindhu & Pandey, 2013).

Mananase yang diperoleh dari isolat bakteri terpilih adalah mananase alkali. Mananase dari isolat L15203 optimal di pH 8, sedangkan isolat L16571 dan L22207 optimal di pH 9 (Gambar 6). Tidak banyak penelitian yang melaporkan enzim mananase alkali dari bakteri laut, terutama dari perairan Indonesia. Mannanase alkali banyak dilaporkan diproduksi dari *Bacillus* (Hatada et al., 2005) dan *Streptomyces* (Yoo et al., 2015; Pradeep et al., 2016), sedangkan Yopi et al.



Gambar 5. Optimasi pH dan suhu isolat xilanolitik (a & b) isolat X7517, (c & d) isolat X1654 dan (e & f) isolat XM 26511

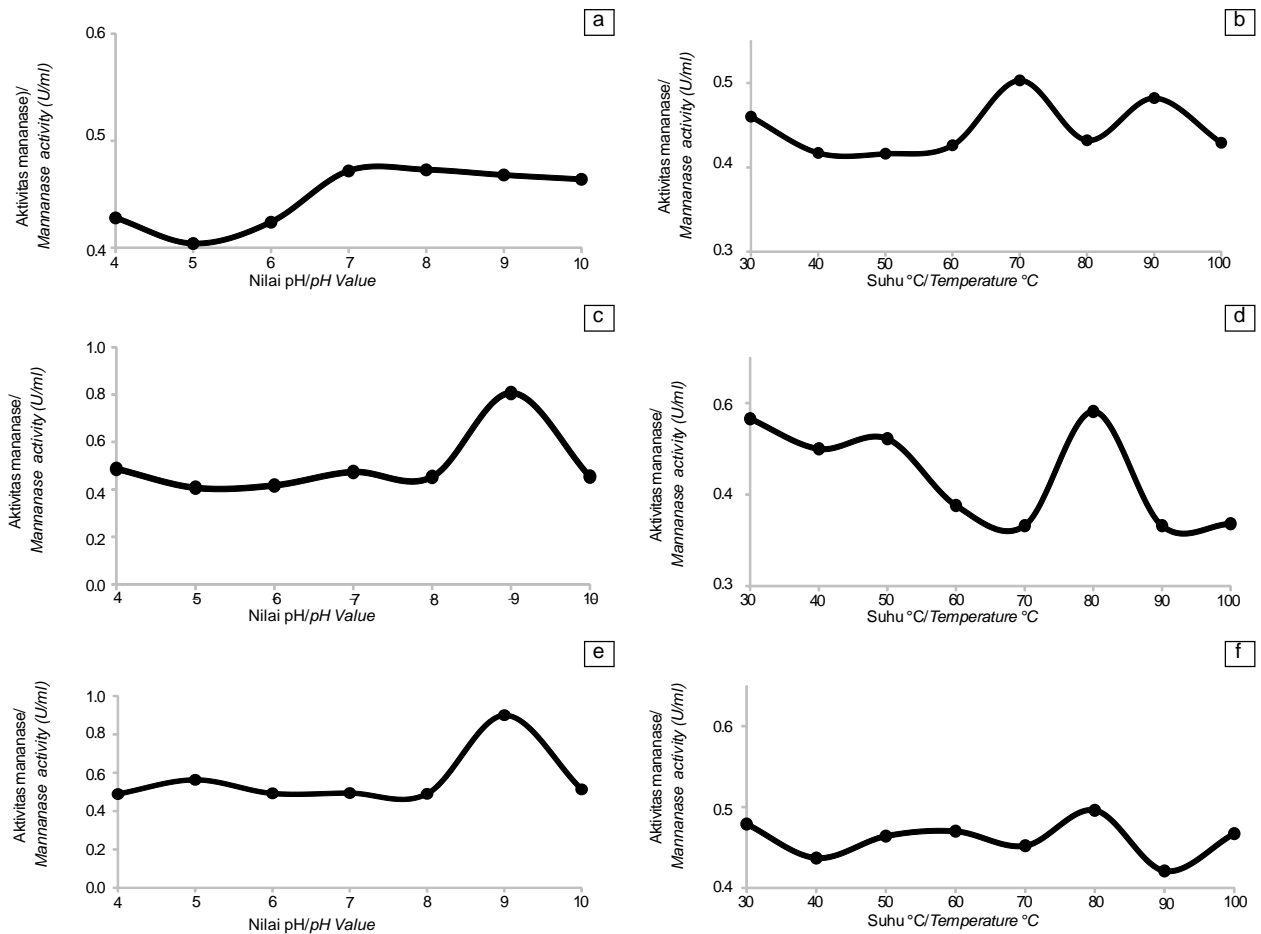
Figure 5. Optimization of pH and temperature of xylanolytic isolates (a & b) X7517 isolate, (c & d) X1654 isolate and (e & f) XM 26511 isolate

(2014) mengisolasi *Bacillus* manolitik dari air laut di Pulau Pari, DKI Jakarta untuk produksi manooligosakarida. Potensi mananase alkali sangat luas, seperti dimanfaatkan oleh industri deterjen dan kertas karena sebagian besar proses di industri tersebut dilakukan di pH tinggi (Chauhan, Puri, Sharma, & Gupta, 2012; Dhawan & Kaur, 2007; Hatada et al., 2005).

Reaksi xilanase dan mananase dari isolat terpilih optimal pada kisaran suhu 70-90 °C. Xilanase dari isolat X7517 optimal pada suhu 90 °C, X1654 dan XM26511 di suhu 70 °C (Gambar 5). Hal serupa dilaporkan Winterhalter dan Liebl (1995) yang menguji xilanase dari bakteri laut *Thermotoga maritima* MSB8, optimal pada suhu 92 °C dan 105 °C. Enzim kasar xilanase dari *Geobacillus* sp. yang diisolasi dari laut dalam Pasifik Timur pun memiliki karakteristik aktif di suhu 70-90 °C dan pH 5-10 (Wu, Liu & Zhang 2006). Karakteristik enzim xilanase ini diperlukan di industri

pakan ternak, produksi *biofuel*, pembuatan bir (Chen et al., 2015), dan industri *pulp* dan kertas sebagai katalis dalam proses pemutihan (*pulp bleaching*) (Khasin et al., 1993).

Mananase dari bakteri laut yang stabil di suhu tinggi juga belum banyak dilaporkan. Enzim mananase komersial, *Pyrolase 160* dan *Pyrolase 200*, merupakan mananase yang stabil di suhu tinggi hingga 93 °C dan dapat dimanfaatkan oleh industri minyak dan gas (Dhawan & Kaur, 2007). Mananase dari isolat L15203 aktif di suhu 70 °C, sementara dari isolat L16571 dan L22207 optimal di suhu 80 °C (Gambar 6). Karakteristik serupa dimiliki endo-(1,4)- α -mananase dari bakteri laut *Rhodothermus marinus* yang optimal di suhu 85 °C dan masih terdapat aktivitas hingga suhu 90 °C (Politz, Krah, Thomsen & Borriss, 2000). Potensi mananase ini dapat menjadi alternatif pengganti enzim komersial yang digunakan oleh industri minyak dan gas untuk meningkatkan aliran



Gambar 6. Optimasi pH dan suhu isolat manolitik (a & b) isolat L15203, (c & d) isolat L16571 dan (e & f) isolat L22207

Figure 6. Optimization of pH and temperature of mannolytic isolates (a & b) L15203 isolate, (c & d) L16571 isolate and (e & f) L22207 isolate

minyak dan gas selama proses pengeboran (Comfort et al., 2004).

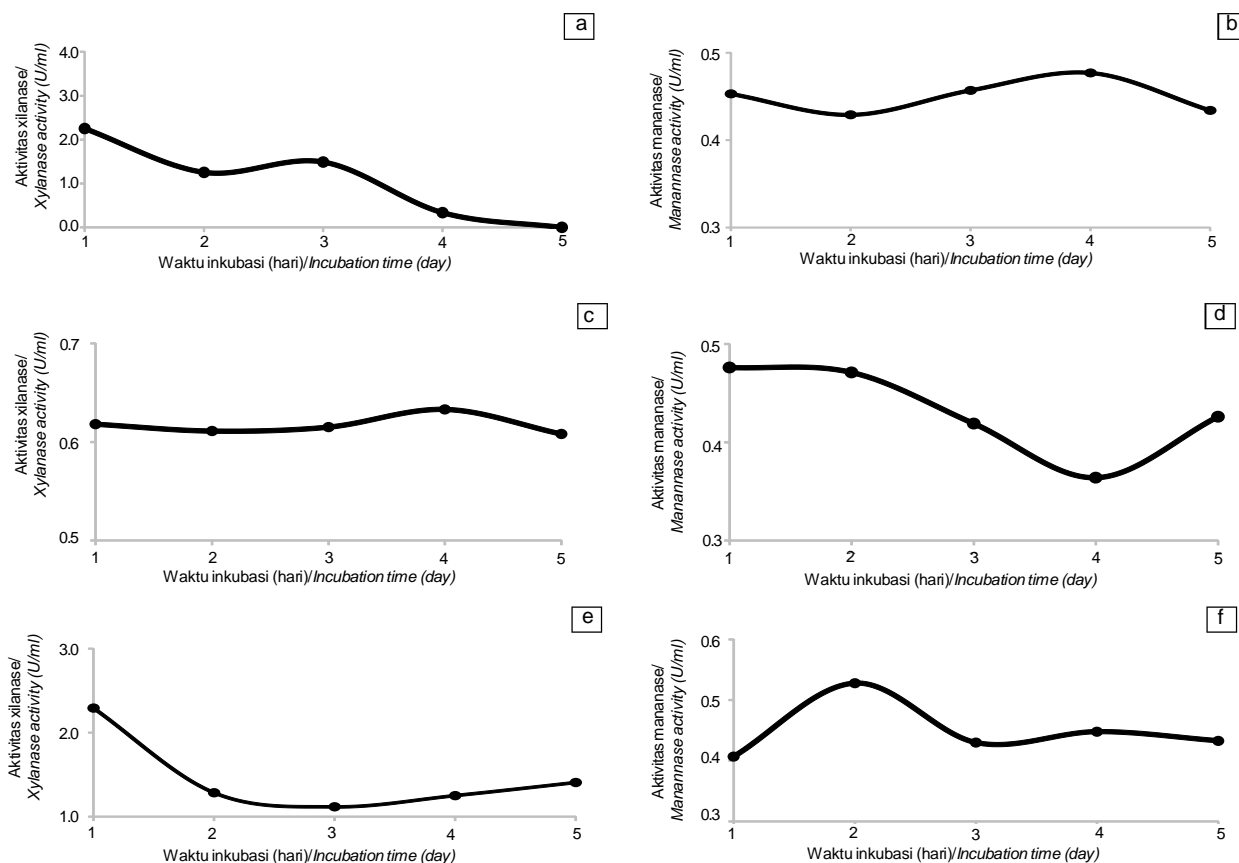
Aktivitas enzim kasar xilanase dan mananase pada isolat terpilih dari hari pertama hingga hari kelima diukur dengan metode DNS. Hasil menunjukkan bahwa waktu optimal aktivitas masing-masing enzim berbeda-beda seperti tampak pada Gambar 7. Xilanase dari isolat X7517 optimal di hari pertama dengan aktivitas $2,253 \pm 2,075$ U/ml dan berangsur-angsur semakin menurun hingga hari kelima. Pola yang serupa ditunjukkan oleh xilanase dari isolat XM26511 dengan aktivitas tertinggi $2,293 \pm 0,066$ U/ml di hari pertama. Xilanase dari isolat X1654 memiliki aktivitas lebih rendah, yaitu $0,633 \pm 0,082$ U/ml pada hari keempat produksi, namun nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan aktivitasnya di hari pertama hingga ketiga, maupun di hari kelima.

Aktivitas tertinggi mananase dari isolat L15203 dan L16571 memiliki nilai yang tidak berbeda jauh, yaitu

masing-masing $0,477 \pm 0,024$ U/ml dan $0,476 \pm 0,009$ U/ml. Meski demikian, keduanya memiliki pola aktivitas enzim yang berbeda (Gambar 7). Aktivitas xilanase dari isolat L15203 tertinggi di hari keempat, sedangkan dari isolat L16571 di hari pertama. Aktivitas mananase dari isolat L22207 lebih tinggi dibandingkan dua mananase lainnya, yaitu $0,528 \pm 0,057$ U/ml di hari kedua produksi.

Identifikasi Isolat Bakteri Xilanolitik dan Manolitik

Berdasarkan identifikasi sebagian gen 16S rDNA, genus dan spesies masing-masing isolat terpilih dianalisis. Isolat X7517 dan XM26511 teridentifikasi sebagai bakteri *Halomonas* dengan derajat similaritas sebesar 99% (Tabel 3). Isolat X7517 memiliki kemiripan genetik dengan *Halomonas aquamarina* strain DSM 30161 yang sebelumnya dilaporkan oleh Arahal, Ludwig, Schleifer dan Ventosa (2002). Bakteri



Gambar 7. Waktu optimal aktivitas enzim xilanase dan mananase dari isolat bakteri terpilih berbeda-beda dalam rentang waktu produksi satu hingga lima hari (a) isolat X7517, (b) isolat L15203, (c) isolat X1654, (d) isolat L16571, (e) isolat XM26511, dan (f) isolat L22207.

Figure 7. Different optimal time of xylanase and mannanase activity from selected bacterial isolates on the range of production time from one to five days (a) X7517 isolate, (b) L15203 isolate, (c) X1654 isolate, (d) L16571 isolate, (e) XM26511 isolate, and (f) L22207 isolate.

Tabel 3. Hasil identifikasi molekuler gen 16S rDNA isolat bakteri laut terpilih dengan BLAST
Table 3. Result of molecular identification using 16S rDNA gene on selected marine bacteria using BLAST

No	Kode Isolat/ Code of isolate	Kemampuan/ Ability	Hasil Identifikasi/ Identification Result	Similaritas/ Similarity	No. Akses/ Accession number
1	X7517	Xilanolitik/ Xylanolytic	<i>Halomonas aquamarina</i> DSM30161	99%	NR 042063.1 (Arahal et al., 2002)
2	X1654	Xilanolitik/ Xylanolytic	<i>Alteromonas macleodii</i> NBRC 102226	99%	NR 114053.1
3	XM26511	Xilanolitik/ Xylanolytic	<i>Halomonas meridiana</i> NBRC 15608	99%	NR 113779.1
4	L15203	Manolitik/ Mannolytic	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM231	99%	NR 024892.1 (Ivanova et al., 2000)
5	L16571	Manolitik/ Mannolytic	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM231	84%	NR 024892.1 (Ivanova et al., 2000)
6	L22207	Manolitik/ Mannolytic	<i>Bacillus</i> sp. MB 71	78%	AB 518983.1 (Velmurugan et al., 2011)

H. aquamarina DSM 30161 merupakan koleksi kultur Braunschweig, Jerman yang diisolasi dari air laut di Hawaii, Amerika Serikat. Isolat XM26511 teridentifikasi sebagai *Halomonas meridiana* NBRC 15608 yang merupakan koleksi kultur NITE, Jepang. Mata, Martinez-Canovas, Quesada, dan Bejar (2002) melaporkan perbedaan fenotip secara umum di antara kedua spesies tersebut. *H. aquamarina* memiliki morfologi batang dan berwarna *cream*, sedangkan *H. meridiana* berbentuk panjang dengan warna putih.

Isolat L15203 dan L16571 teridentifikasi sebagai spesies bakteri yang sama dengan derajat similaritas yang berbeda. Isolat L15203 memiliki similaritas 99% dengan *Idiomarina zobelli* KMM 231, sedangkan similaritas L16571 sebesar 84%. Derajat similaritas yang rendah dapat disebabkan oleh informasi genetik yang tidak lengkap atau termasuk dalam bakteri jenis baru, sehingga pengulangan analisis sebagian gen 16S rDNA perlu dilakukan. Bakteri *I. zobelli* KMM 231 diisolasi dari kedalaman 4000-5000 m di barat laut Samudera Pasifik dan merupakan koleksi mikroorganisme laut *Russian Academy of Sciences*, Rusia. Ivanova et al. (2000) melaporkan bahwa *I. zobelli* KMM 231 merupakan bakteri aerob yang berukuran 0,7-0,9 µm dan dapat tumbuh pada kisaran konsentrasi NaCl 1-10%.

Isolat X1654 memiliki kesamaan genetik sebesar 99% dengan bakteri yang diisolasi dari air laut Hawaii, Amerika Serikat, *Alteromonas macleodii* NBRC 102226 yang merupakan koleksi NITE, Jepang (Anon., 2016). Menurut Lopez-Perez et al. (2012), *A. macleodii* merupakan bakteri laut Gammaproteobacteria yang terdistribusi luas di perairan tropis. Hal ini sesuai dengan kondisi perairan Indonesia yang terletak di daerah tropis.

Informasi genetik dari sebagian gen 16S rDNA L22207 tidak selengkap isolat terpilih lainnya, sehingga dalam analisis molekuler diketahui similaritas isolat L22207 rendah, yaitu 78% dengan *Bacillus* sp. MB 71. Bakteri *Bacillus* sp. MB 71 diisolasi dari sedimen laut pada kedalaman 1-3 m di Laut Kuning, Korea Selatan (Velmurugan et al., 2011). Meskipun demikian, rendahnya derajat similaritas juga dapat berarti kemungkinan ditemukannya bakteri jenis baru. Berdasarkan hal tersebut, pengulangan analisis molekuler untuk isolat L22207 perlu dilakukan untuk memastikan informasi genetik isolat L22207.

KESIMPULAN

Sebagian dari perairan Indonesia memiliki kelimpahan bakteri pendegradasi xilan dan manan penghasil xilanase netral dan alkali yang tahan pada suhu 70-90 °C serta mananase alkali yang tahan suhu

tinggi (70-80 °C). Jumlah isolat bakteri dari kedalaman 5 m yang diisolasi lebih banyak, yaitu 620 isolat, dibandingkan pada kedalaman 20 m, yang berjumlah 537 isolat. Berdasarkan karakteristik aktivitas enzimnya, isolat bakteri XM26511 penghasil xilanase dan L22207 penghasil mananase merupakan isolat paling berpotensi untuk diteliti lebih lanjut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada DIPA Tematik Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI 2016 atas dukungan dana yang diberikan untuk penelitian ini. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel yang diambil pada bulan Agustus 2015 dalam Penelitian Lingkungan Geologi Perairan Laut Jawa, Laut Sulawesi Selatan hingga Sawu dengan menggunakan Kapal Riset Geomarin III (MAJAFLOTE). Penelitian tersebut merupakan kerjasama antara Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi Kelautan, Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral dengan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriana, S. E., Sudiana, I. M., & Sembiring, L. (2009). *Bakteri laut Pantai Sorong Papua Barat pendegradasi komponen crude oil*. Prosiding Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA, Yogyakarta, 148-157.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Balasubramanian, L. (2009). Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian J. Biotechnol.*, 8, 291-297.
- Anonim. (2004). <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRC/CatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00102226>.
- Anonim. (2016). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Arahal, D. R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Ventosa, A. (2002). Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S r DNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 241-249.
- Araujo, A., & Ward, O. P. (1990). Purification and some properties of the mannanases from *Thielavia terrestris*. *J. Industr Microbiol*, 6, 269-274.
- Bahi, M. (2012)., Isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari bakteri laut *Streptomyces* sp. *Depik*, 1(3), 161-164.
- Bailey, M. J, Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, 23, 257-270.
- Beg, Q. K, Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial application: the review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326-338.

- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 22, 15-61.
- BPS. (2015). *Luas kawasan hutan dan perairan*. Diakses dari <https://www.bps.go.id/>.
- Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., & Gupta, N. (2012). Mannanase: microbial sources, production, properties, and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1817-1830.
- Chen, C., Ko, T., Huang, J., & Guo, R. (2015). Heat- and alkaline-stable xylanases: application, protein structure, and engineering. *Chem. Bio. Eng. Rev.*, 2, 95-106.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 29, 3-23.
- Comfort, D. A., Chhabra, S. R., Connors, S. B., Chou, C., Epting, K. L., Johnson, M. R., Jones, K. L., Sehgal, A. C., & Kelly, R. M. (2004). Strategic biocatalysis with hyperthermophilic enzymes. *Green Chem.*, 6, 459-465.
- Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27, 197-216.
- Djohan, A. C., Perwitasari, U., & Yopi. (2016). Saccharification waste biomass rice straw IR-64 by using xylanase from indigenous marine bacteria *Bacillus safensis* LBF-002. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, 6(1), 40-44.
- Downie, B., Hilhorst, H. W. M., & Bewley, J. D. (1994). A new assay for quantifying endo- α -D-mannanase activity using congo red dye. *Phytochemistry*, 36, 829-835.
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningsih, D., & Watanabe, K. (2009). *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 392-396.
- Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W. D., Ito, S., & Horikoshi, K. (2005). Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme.
- Khasin, A., Alchanati, I., & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1725-1730.
- Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Chun, J., Matte, M. H., Matte, G. R., Mikhailov, V. V., Svetashev, V. I., Huq, A., Mangel, T., & Colwell, R. R. (2000). *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobelli* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 901-907.
- Lopez-Perez, M., Gonzaga, A., Martin-Cuadrado, A., Onyshchenko, O., Ghavidel, A., Ghai, R., & Rodriguez-Valera, F. (2012). Genomes of surface isolates of *Alteromonas macleodii*: the life of a widespread marine opportunistic copiotroph. *Sci. Report*, 2, 696.
- Mata, J. A., Martinez-Canovas, J., Quesada, E., & Bejar, V. (2002). A detailed phenotypic characterization of the strains of *Halomonas* species. *System Appl. Microbiol.*, 25, 360-375.
- McCleary, B. V. (1988). α -D-Mannanase. *Methods in Enzymology*, 160, 596-610.
- Menon, G., Mody, K., Keshri, J., & Jha, B. (2010). Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilis* GESF-1. *Biotechnol. Biopro. Engineer.*, 15, 998-1005.
- Miao, Y., Li, J., Xiao, Z., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Characterization and identification of the xylanolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* Z5. *BMC Microbiol.*, 15, 126.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Muniarsih, T., & Yopi. (2009). Isolasi, karakterisasi, dan potensi bakteri laut pendegradasi poliaromatik hidrokarbon asal pelabuhan Tanjung Mas Semarang. *Jurnal Kelautan Nasional*, 2, 95-100.
- Muniarsih, T., Yopi, & Budiawan. (2009). Biodegradasi fenantren oleh bakteri laut *Pseudomonas* sp KalP3b22 asal Kumai Kalimantan Tengah. *Makara Sains*, 13(1), 77-80.
- Politz, O., Krah, M., Thomsen, K. K., & Borriss, R. (2000). A highly thermostable endo-(1,4)- α -mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 715-721.
- Pradeep, G. C., Cho, S. S., Choi, Y. S., Jee, J., Seong, C. N., & Yoo, J.C. (2016). An extremely alkaline mannanase from *Streptomyces* sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannooligosaccharides. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 84.
- Rahmani, N., Robbani, N. U. J., Suparto, I. H., & Yopi. (2014). Optimization of production xylanase from marine bacterium *Bacillus safensis* P20 on sugarcane bagasse by submerged fermentation. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, 4(6), 31-34.
- Sanders, H. W., & Hessler, R. R. (1969). Ecology of the deep sea benthos. *Science*, 163, 1419-1424.
- Scheffers, M., & van Nes, E. H. (2007). Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth, and lake size. *Hydrobiologia*, 584, 455-466.
- Sembiring, M., (2015). *Prospek pengembangan bioteknologi kelautan dan perikanan*. Diakses dari <http://www.pusluh.kkp.go.id/arsip/>.
- Thomas, L., Sindhu, R., & Pandey, A. (2013). Identification and characterization of a highly alkaline and thermotolerant novel xylanase from *Streptomyces* sp. *Biologia*, 68, 1022-1027.
- Tork, S., Aly, M. M., Alakilli, S. Y., & Al-Seeni, M. N. (2013). Production and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus subtilis* XP10 isolated from marine water. *Afr. J. Biotechnol.*, 12, 780-790.

- Velmurugan, N., Kalpana, D., Cho, J., Lee, G., Park, S., & Lee, Y. (2011). Phylogenetic analysis of culturable marine bacteria in sediments from South Korean Yellow Sea. *Microbiology+*, 80, 261-272.
- Winterhalter, C., & Liebl, W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1810-1815.
- Wu, S., Liu, B., & Zhang, X. (2006). Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1210-1216.
- Yoo, H. Y., Pradeep, G. C., Kim, S. W., Park, D. H., Choi, Y. H., Suh, J. W., & Yoo, J. C. (2015). A novel low-molecular weight alkaline mannanase from *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioproc. Enginee.*, 20, 453-461.
- Yopi, Susilaningih, D., Thontowi, A., Purnawan, A., Djohan, A. C., Fahrurrozi, & Lisdiyanti, P. (2007). *Study on hemicellulolytic bacteria: production of oligosaccharides from palm kernel cake using fermentation*. Prosiding dalam Seminar Internasional Advances in Biological Science: contribution towards a better human prosperity. UGM, 111-113.
- Yopi, Djohan, A. C., & Ambarsari, L. (2014). *Mannanase from isolated marine bacteria of Pari Island for manno-oligosaccharides production*. Prosiding dalam Asiahorcs 2013, 149-159.

