

# Seleksi, Karakterisasi Morfologi, dan Identifikasi Aktinobakteri Penghasil Mananase Asal Hutan Tanah Jambi untuk Produksi Manan oligosakarida

## (Selection, Morphological Characterization, and Identification of Mannanase-Producing Actinobacteria)

Rahayu Wulan<sup>1</sup>, Rika Indri Astuti<sup>2,5</sup>, Yaya Rukayadi<sup>3</sup>, Sri Estuningsih<sup>4</sup>, Anja Meryandini<sup>2,5\*</sup>

(Diterima Juli 2021/Disetujui April 2022)

### ABSTRAK

Indonesia sebagai negara penghasil minyak sawit mentah terbesar di dunia juga menghasilkan hasil samping *palm kernel cake* (PKC) yang tinggi. PKC memiliki kandungan manan yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi prebiotik manan oligosakarida (MOS). MOS dapat diproduksi secara enzimatis dengan pendekatan mikrobiologi, yaitu menggunakan enzim mananase yang diproduksi oleh aktinobakteri. Isolat HJ45B-1 merupakan isolat terbaik dengan puncak produksi enzim 0,338 U/mL pada hari ke-10 inkubasi. Enzim mananase tersebut stabil pada suhu penyimpanan 27°C. Produksi menggunakan PKC 1% menghasilkan MOS dengan derajat polimerisasi terbaik pada inkubasi selama 1 sampai 3 jam. Karakteristik morfologi dan identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat HJ45B-1 merupakan *Streptomyces* spp.

Kata kunci: aktinobakteri, mananase, manan oligosakarida, *palm kernel cake*, *Streptomyces*

### ABSTRACT

As the world's largest producer of crude palm oil, Indonesia also produces high palm kernel cake (PKC) by-products. PKC has a high mannan content, so it can be used to produce prebiotic mannan-oligosaccharides (MOS). Enzymatic MOS production can be carried out using actinobacterial mannanase's microbiological approach. The HJ45B-1 isolate was the best isolate, with a peak enzyme production of 0,338 U/mL on the 10th day of incubation. The mannanase enzyme was stable in storage at 27°C. MOS production using 1% PKC substrate produced MOS with the best degree of polymerization (2–4) with incubation for 1–3 hours. Morphological characteristics and molecular identification based on the 16S rRNA gene indicated that the HJ45B-1 isolate was *Streptomyces* spp.

Keywords: actinobacteria, mannanase, mannan-oligosaccharides, palm kernel cake, *Streptomyces*

### PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara penghasil minyak sawit mentah/*crude palm oil* (CPO) tertinggi di dunia juga menghasilkan hasil samping berupa PKC/bungkil inti sawit dalam jumlah besar. Pada tahun 2019, luas

perkebunan kelapa sawit di Indonesia mencapai 14,60 juta ha dengan produksi CPO 48,42 juta ton (BPS 2020). Biji kelapa sawit mengandung 19,3% PKC berupa ampas yang diperoleh dari pengepresan buah sawit. PKC sering dimanfaatkan sebagai pakan tambahan pada pakan ternak ruminansia dan unggas karena masih mengandung sekitar 14–18% protein kasar, 12–20% serat kasar, 3–9% ekstrak eter (EE), dan berbagai jenis mineral (Azizi *et al.* 2021). PKC mengandung 48,5% karbohidrat total dengan 35,2% adalah manan (Cerveró *et al.* 2010).

Manan adalah komponen utama fraksi hemiselulosa penyusun dinding sel tumbuhan yang dapat dihidrolisis menjadi prebiotik MOS (Utami *et al.* 2013). Prebiotik adalah substrat yang digunakan secara selektif oleh mikroorganisme inang yang memberikan manfaat kesehatan (Gibson *et al.* 2017). MOS merupakan salah satu jenis prebiotik yang dikenal mempunyai sifat mengaglutinasi bakteri patogen Gram-negatif yang memiliki fimbriae tipe 1 (*mannose sensitive lectin*), seperti *Salmonella* dan *Escherichia coli*. Bakteri patogen tersebut dapat menempel pada MOS sehingga tidak dapat

<sup>1</sup> Sekolah Pascasarjana, Program Studi Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680

<sup>2</sup> Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680

<sup>3</sup> Departemen Sains Makanan, Fakultas Sains dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia, Serdang-Salangor 43400, Malaysia

<sup>4</sup> Departemen Klinik Reproduksi Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680

<sup>5</sup> Pusat Bioteknologi-LPPM IPB, Kampus IPB Darmaga, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

\* Penulis Korespondensi:

Email: ameryandini@apps.ipb.ac.id

menempel pada sel epitel usus untuk menginvasi dan mengolonisasi usus (Baurhoo *et al.* 2007). Selain itu, MOS juga dapat menstimulasi pertumbuhan mikrobiota usus (Jana *et al.* 2021).

MOS dari PKC dapat diproduksi secara kimiawi dan enzimatis. Secara enzimatis, PKC dapat dihidrolisis dengan pendekatan mikrobiologi menggunakan mikrob penghasil enzim mananase seperti cendawan dan bakteri (Azizi *et al.* 2021). Dari golongan bakteri, aktinobakteri yang diisolasi dari tanah dikenal luas sebagai penghasil enzim-enzim di bidang industri. Tanah hutan telah lama dianggap sebagai sumber isolat aktinobakteri unik dengan beragam bioaktivitas yang bermanfaat. Penelitian Nejis *et al.* (2011) melaporkan bahwa dari 40 isolat aktinobakteri asal tanah hutan menunjukkan bahwa 45% menghasilkan selulase, 5% mananase, 12,5% xilanase, 12,5% protease, dan 32,5% lipase. Aktinobakteri tersebut masuk dalam kelompok genus *Streptomyces* dan *Kitasatosporia*. Ariandi *et al.* (2015) juga melaporkan *Streptomyces* BF3.1 dapat menghasilkan mananase untuk menghidrolisis bungkil kopra menjadi mananoligosakarida. Penelitian ini bertujuan menyeleksi, mengkarakterisasi morfologi, dan mengidentifikasi aktinobakteri penghasil mananase asal tanah Hutan Harapan, Jambi.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2020–April 2021 di Laboratorium Bioenergi dan Bioprospeksi Mikroba, Pusat Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Biologi Terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 isolat aktinobakteri asal tanah Hutan Harapan (HJ42A, OM2rh(e)1, HJ46, HJ45B, dan HJ45B-1) koleksi Laboratorium Bioenergi dan Bioprospeksi Mikroba IPB, PKC ukuran 80 mesh, *locust bean gum* (LBG; Oxoid, UK), manosa (Oxoid, UK), 3,5-dinitrosalicic acid DNS (Sigma-Aldrich, US), media *Internasional Streptomyces Project 4* (ISP 4 1000 mL: pati 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, *trace salt solution* 1 mL), media LBG 1%/ PKC1% (100 mL: LBG/ PKC 1 g, KNO<sub>3</sub> 0,2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 g, MgSO<sub>4</sub> 0,05 g, NaCl 0,05 g, CaCO<sub>3</sub> 0,3 g, *yeast extract* 0,05 g), NaCl, pewarna merah kongo (Sigma-Aldrich, USA), agar-agar bakto (Himedia, IND), bufer fosfat pH 7,00, fenol 5% (Sigma-Aldrich, USA), dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 97% (Sigma-Aldrich, USA).

### Karakterisasi Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis Aktinobakteri

Lima isolat aktinobakteri HJ42A, OM2rh(e)1, HJ46, HJ45B, dan HJ45B-1 diremajakan pada media

agar-agar ISP4 dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang (27 °C). Koloni murni aktinobakteri diamati karakteristik makroskopisnya yang meliputi warna miselium substrat (permukaan bawah), warna miselium aerial (permukaan bawah), dan morfologi koloni tunggal menggunakan mikroskop stereo (Leica, DEU) dengan perbesaran 40x. Morfologi mikroskopis diamati pada penataan rantai spora pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop Olympus CX23 binokuler LED (Olympus, JPN).

### Seleksi Isolat Aktinobakteri Penghasil Mananase

Isolat aktinobakteri diseleksi berdasarkan aktivitas kualitatif dan kuantitatif mananase. Mananase isolat HJ42A, OM2rh(e)1, HJ46, HJ45B, dan HJ45B-1 diuji secara kualitatif berdasarkan pembentukan zona bening pada media padat LBG 0,5% metode pewarnaan merah kongo 0,1% (Downie *et al.* 1994). Isolat aktinobakteri umur 5 hari diinokulasikan pada media agar LBG 0,5%, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27°C. Selanjutnya, pewarna merah kongo 0,1% diteteskan di atas media dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Sisa pewarna merah kongo pada media dicuci dengan larutan NaCl 0,2 M sebanyak 3 kali setiap 10 menit hingga zona bening terlihat. Indeks mananolitik dihitung berdasarkan rumus berikut (Meryandini *et al.* 2008):

$$\text{Indeks Mananolitik (IM)} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Tiga isolat aktinobakteri yang mempunyai nilai IM tertinggi pada media LBG 0,5% ialah HJ45B-1, HJ42A, dan OM2rh(e)1 diuji aktivitas mananasenya secara kuantitatif. Setiap isolat aktinobakteri umur 5 hari pada media ISP4 diambil sebanyak 1 *cork borer* dan diinokulasikan pada 50 mL media cair PKC 1% kemudian diinkubasi pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 100 rpm dan suhu 27°C selama 5 hari. Sebanyak 1,5 mL kultur dipanen dan disentrifugasi menggunakan sentrifugator dengan kecepatan 5000 rpm (*fixed rotor*) dan suhu ruang selama 15 menit. Supernatan (enzim ekstrak kasar, EEK) diambil untuk diukur aktivitas mananasenya dengan metode DNS (Miller 1959). Aktivitas enzim mananase diukur pada suhu 27°C menggunakan substrat LBG 0,5% (dalam bufer fosfat 50 mM pH 7,0). Perhitungan gula pereduksi didasarkan pada kurva standar manosa dengan konsentrasi manosa dari 0,0–0,8 mg/mL. Aktivitas mananase diukur berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas mananase (U/mL)} = \frac{(X_s - X_k) \times FP \times 1000}{T \times \text{BM manosa}}$$

Keterangan:

X<sub>s</sub> = Kadar manosa sampel

T = Waktu inkubasi (menit)

X<sub>k</sub> = Kadar manosa kontrol

FP = Faktor pengenceran

BM = Bobot molekul (Mr) manosa (180,56 g/mol)

Satu unit aktivitas mananase dalam penelitian ini didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat

memproduksi 1  $\mu\text{mol}$  manosa dalam 1 menit pada kondisi pH 7,00 dan suhu 27 °C

### Identifikasi Molekuler Aktinobakteri

Isolat aktinobakteri dengan aktivitas kuantitatif mananase terbaik, yaitu HJ45B-1, diidentifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA. DNA genom kultur HJ45B-1 umur 10 hari pada media agar-agar ISP4 diisolasi menggunakan Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit Zymo Research D6005 (Zymo Research, USA). DNA genom diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan spektrofotometer *Nanodrop* 2000 (Thermoscientific, USA). DNA genom aktinobakteri selanjutnya dijadikan sebagai templat pada proses amplifikasi daerah 16S rRNA.

Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan reagen MyTaq HS Red Mix BIO-25048 (Bioline, USA). Primer yang digunakan adalah 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Heuer *et al.* 1997). Kondisi PCR diatur sebagai berikut: pra-denaturasi (94°C, 2 menit), denaturasi (94°C 1 menit), penempelan (55°C, 1,5 menit), pemanjangan (72°C, 1 menit), pasca-pemanjangan (72°C, 3 menit), dan pendinginan (15°C, 5 menit) dengan 35 siklus. Amplikon dielektroforesis dalam gel agarose TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,8% pada tegangan 75 V selama 30 menit. Sekuensing amplikon dilakukan oleh PT Genetica Science Indonesia (GSI) dengan metode *bi-directional (Sanger) sequencing*.

Analisis sekuens yang diperoleh diawali dengan melakukan *contig* sekuens DNA menggunakan perangkat lunak *SeqTrace*. Sekuens DNA disejajarkan dengan data *GenBank* pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLASTn) di <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Filogenetik dianalisis menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA X). Konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan metode *neighbour joining* model *p-distance* dengan uji *bootstrap* 1000 kali ulangan (Tamura *et al.* 2013).

### Kurva Produksi Harian Mananase HJ45B-1

Isolat dengan aktivitas mananase terbaik, yaitu *Streptomyces* spp. HJ45B-1, ditumbuhkan pada media ISP4 padat selama 5 hari. Sebanyak 1 *cork borer* kultur diinokulasikan pada 50 mL media cair PKC 1%, kemudian diinkubasi pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 100 rpm dan suhu 27°C selama 12 hari. Aktivitas harian mananase diukur pada hari ke-3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, dan 12. EEK dipanen dan diukur aktivitas kuantitatif mananasenya dengan metode DNS (Miller 1959). Aktivitas enzim mananase diukur pada suhu ruang (27°C) dan pH netral (pH 7,0), dan dihitung berdasarkan rumus aktivitas mananase.

### Stabilitas enzim

Stabilitas enzim didapatkan pada dua kondisi, yaitu pada suhu ruang (27°C) dan suhu lemari pendingin 6°C. EEK yang digunakan adalah EEK dengan aktivitas tertinggi, yaitu EEK pada hari ke-10 inkubasi. Sari setiap EEK diambil 3 mL, dibiarkan pada suhu 27°C dan 6°C. Pengamatan dilakukan pada jam ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, dan 24 penyimpanan pada suhu masing-masing. Aktivitas mananase dihitung berdasarkan gula pereduksi yang terbentuk menggunakan metode DNS (Miller 1959). Aktivitas enzim mananase diukur pada suhu 27°C pH 7,0 dan dihitung berdasarkan rumus aktivitas mananase. Stabilitas enzim diketahui dengan menghitung nilai (%) aktivitas enzim relatif (Inayah *et al.* 2016).

$$\text{Aktivitas enzim relatif (\%)} = \frac{\text{Aktivitas enzim yang diperoleh}}{\text{Aktivitas enzim optimum}} \times 100\%$$

### Produksi MOS secara Enzimatis

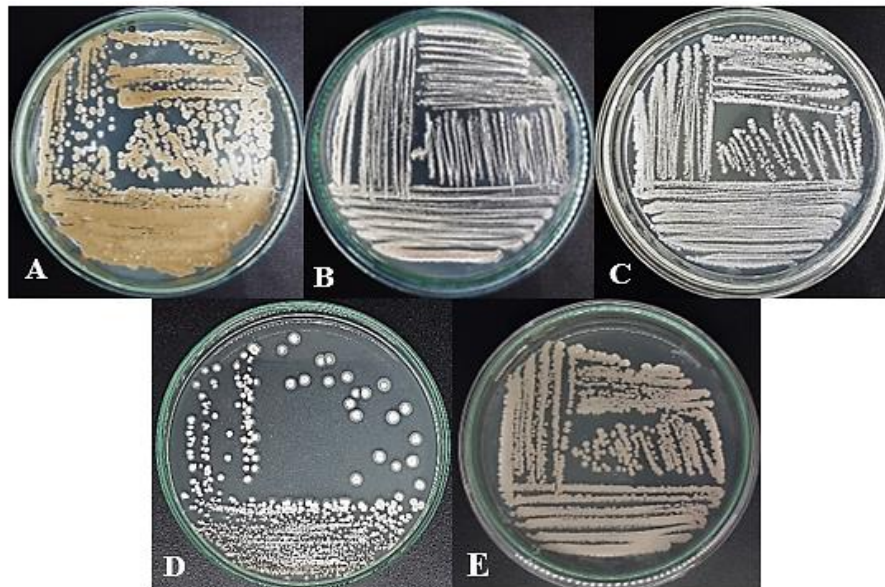
MOS diproduksi dengan menghidrolisis PKC menggunakan EEK mananase kultur *Streptomyces* spp. HJ45B-1 umur 10 hari. Sebanyak 18 mL EEK dicampur dengan substrat PKC 1% dan 5%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (27°C). Gula total dan gula reduksi sampel produk hidrolisis ditetapkan pada jam ke-1, 2, 3, 4, 5, dan 24. Gula reduksi diukur berdasarkan metode DNS (Miller 1959), sedangkan gula total ditetapkan berdasarkan metode fenol-sulfat (Dubois *et al.* 1956). Analisis produk hidrolisis secara kuantitatif didasarkan pada nilai derajat polimerasi (DP). DP merupakan nisbah antara gula total dan gula pereduksi yang dihasilkan, yang dihitung berdasarkan rumus berikut ini:

$$\text{Derajat polimerisasi (DP)} = \frac{\text{Gula total (mg/mL)}}{\text{Gula pereduksi (mg/mL)}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Keragaman Morfologi Aktinobakteri Asal Tanah Hutan Harapan Jambi, Indonesia

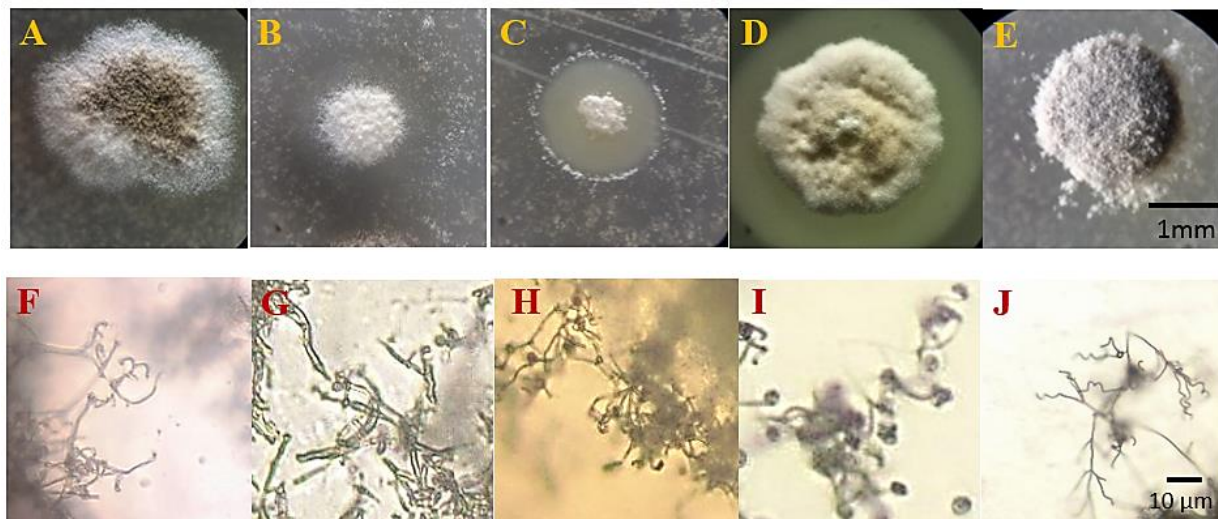
Sebanyak lima isolat aktinobakteri asal tanah Hutan Harapan Jambi memiliki karakter morfologi yang beragam pada media ISP-4 (Gambar 1). Media ISP-4 (*inorganic salts-starch agar*) merupakan salah satu media standar yang digunakan untuk mengamati dan mempelajari morfologi dan pertumbuhan aktinobakteri (Shilring & Gottlieb 1966). Semua isolat aktinobakteri pada media ISP-4 tumbuh dan bersporulasi dengan baik membentuk miselia aerial setelah berumur 10 hari. Warna miselia aerial dan miselia substrat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 1. Koloni aktinobakteri terlihat melekat pada permukaan media dan miselia aerial pada aktinobakteri membentuk struktur yang tampak seperti kapas. Isolat aktinobakteri mempunyai tipe penataan rantai spora yang berbeda-beda (Gambar 2). Berdasarkan metode karakterisasi morfologi



Gambar 1 Karakter morfologi koloni aktinobakteri pada media ISP-4 umur 10 hari (A) HJ42A, (B) OM2rh(e)1, (C) HJ46, (D) HJ45B, dan (E) HJ45B-1.

Tabel 1 Karakteristik morfologi aktinobakteri asal tanah Hutan Harapan Jambi pada media ISP-4 inkubasi selama 10 hari

Kode isolat	Miselia aerial (permukaan atas)	Miselia substrat (permukaan bawah)	Rantai spora
HJ42A	Cokelat-kehijauan	Coklat-kehijauan	RA ( <i>Retinaculum Apertum</i> )
OM2rh(e)1	Putih	Krem	RA ( <i>Retinaculum Apertum</i> )
HJ46	Putih	Putih-kekuningan	<i>Spira</i>
HJ45B	Putih	Putih-kekuningan	<i>Spira</i>
HJ45B-1	Abu-abu	Kuning	MV-S ( <i>Monoverticillus Spira</i> )



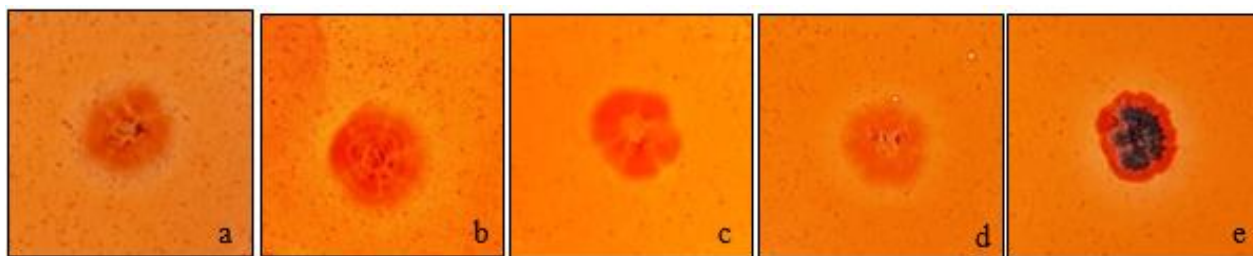
Gambar 2 Kenampakan morfologi makroskopis koloni aktinobakteri yang ditumbuhkan pada media ISP-4 selama 10 hari: (A) HJ42A, (B) OM2rh(e)1, (C) HJ46, (D) HJ45B, (E) HJ45B-1 dan karakter rantai spora aktinobakteri (F) HJ42A, (G) OM2rh(e)1, (H) HJ46, (I) HJ45B, dan (J) HJ45B-1 pada perbesaran 400x.

menurut Shilring & Gottlieb (1966), isolat-isolat aktinobakteri asal tanah Hutan Harapan Jambi memperlihatkan karakter morfologi yang mirip dengan kelompok *Streptomyces*.

#### Sifat Kualitatif dan Kuantitatif Enzim Mananase Aktinobakteria

Enzim endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-mananase (E.C. 3.2.1.78) merupakan enzim katalis yang dapat menghidrolisis

secara acak ikatan  $\beta$ -1,4 manosidik yang merupakan rangka utama pada manan, glukomanan, dan galaktomanan (Srivastava *et al.* 2017). Hidrolisis galaktomanan pada LBG 0,5% menjadi manan oligosakarida dan monosakarida lain mengakibatkan terbentuknya zona bening di sekitar koloni aktinobakteri setelah pewarnaan dengan merah kongo 0,1% (Gambar 3). Pewarna merah kongo merupakan pewarna spesifik polisakarida



Gambar 3 Kenampakan zona bening aktinobakteri HJ42A (a), OM2rh(e)1 (b), HJ46 (c), dan HJ45B (d), dan HJ45B-1 (e) yang ditumbuhkan pada media LBG 0,5% selama 5 hari dengan pewarnaan merah kongo 0,1%.

yang mampu mengikat ikatan  $\beta$ -1.4-D-manopiranosil pada manan (Downie *et al.* 1994).

Hasil uji kualitatif mananase menunjukkan bahwa lima isolat aktinobakteri mempunyai IM kisaran 0,08–0,38 dengan HJ42A, OM2rh(e)1, dan HJ45B-1 mempunyai IM tertinggi, yaitu 0,37, 0,37, dan 0,38, sedangkan isolat HJ46 dan HJ45B mempunyai nilai IM kecil sehingga tidak dilanjutkan dalam uji kuantitatif aktivitas enzim mananase (Tabel 2). Nilai IM dari kelima aktinobakteri tersebut mempunyai nilai yang relatif sama dengan IM aktinobakteri penelitian Evan *et al.* (2020) yang berkisar 0,21–0,44. Nilai IM yang rendah kemungkinan juga dapat disebabkan oleh MOS masih dapat mengikat ikatan  $\beta$ -1.4-D-manopiranosil sehingga ikut terwarnai oleh pewarna merah kongo dan tidak membentuk zona bening (Downie *et al.* 1994).

Isolat HJ42A, OM2rh(e)1, HJ45B-1 dilanjutkan dalam uji aktivitas kuantitatif enzim mananase. Isolat HJ45B-1 memperlihatkan aktivitas enzim mananase tertinggi, yaitu 0,149 U/mL pada hari ke-5 dibandingkan dengan isolat HJ42A dan OM2rh(e)1 yang mempunyai aktivitas kuantitatif mananase sangat rendah, yaitu masing-masing 0,003 dan 0,002 U/mL (Tabel 3). Akan tetapi, aktivitas tersebut masih lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas *Streptomyces* spp. BF 3.1 dengan aktivitas mananase 0,99 U/mL pada hari ke-5 (suhu ruang dan pH 6,0) (Ariandi *et al.* 2015). Satu unit aktivitas mananase dalam penelitian ini didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1  $\mu$ mol manosa dalam 1 menit pada kondisi pH 7,0 dan suhu 27°C.

**Identitas Molekuler Isolat Aktinobakteri Berdasarkan Gen 16S rRNA**

Isolat terbaik penghasil mananase, yakni HJ45B-1 diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R (Heuer *et al.* 1997). Amplikon gen 16S rRNA aktinobakteria HJ45B-1 mempunyai pita tunggal ukuran ~1500 bp (Gambar 4). Ukuran tersebut dikonfirmasi dengan hasil sekuensing yang menghasilkan ukuran sekuen gen 16S rRNA sepanjang ~1356 bp. Hasil BLASTn menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA aktinobakteri HJ45B-1 memiliki kemiripan (*percent identity*) 100% dengan *Streptomyces rochei*.

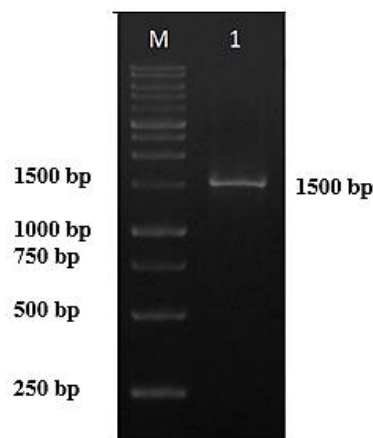
Konfirmasi kekerabatan menggunakan analisis pohon filogenetik menunjukkan isolat HJ45B-1 memiliki kekerabatan dekat dengan ketiga sekuen

Tabel 2 Indeks mananolitik aktinobakteria pada media LBG 0,5%

Nama isolat	Aktivitas kualitatif (Indeks mananolitik)
HJ42A	0,37
OM2rh(e)1	0,37
HJ46	0,08
HJ45B	0,22
HJ45B-1	0,38

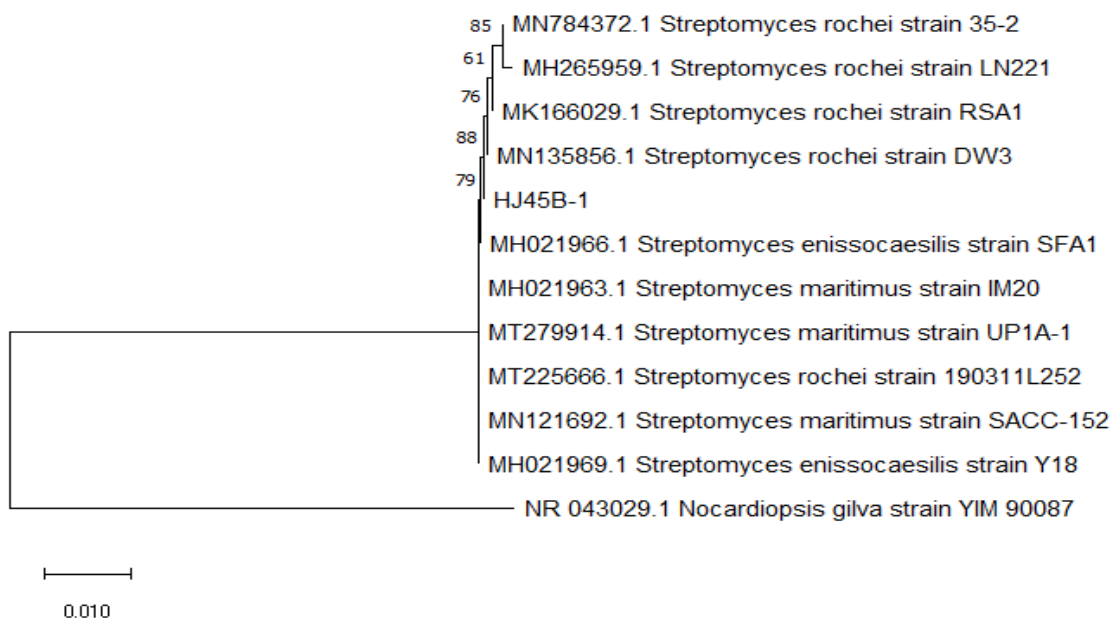
Tabel 3 Aktivitas kuantitatif enzim mananase pada media PKC 0,5%

Nama isolat	Aktivitas kuantitatif hari ke-5 (U/mL)
HJ42A	0,003
OM2rh(e)1	0,002
HJ45B-1	0,149



Gambar 4 Visualisasi gen 16S rRNA aktinobakteri HJ45B-1 menggunakan primer 27F dan 1492R pada gel TBE agarose 0,8%. Marker (M) dan HJ45B-1 (1).

spesies rujukan, yaitu *Streptomyces rochei*, *S. enissocaesilis*, dan *S. maritimus*. Isolat HJ45B-1 mempunyai kekerabatan tertinggi dengan *S. rochei* DW3 (Gambar 5). Oleh karena itu, isolat HJ45B-1 merupakan *Streptomyces* spp. *S. rochei* yang diisolasi dari tanah asal Mesir telah dilaporkan dapat menghasilkan enzim xilanase ekstraseluler yang digunakan dalam industri pulp dan kertas (Nadia *et al.* 2010). *Streptomyces* berperan penting dalam ekologi tanah karena mampu mendegradasi berbagai macam polisakarida (selulosa, kitin, xilan, dan agar) dan makromolekul lainnya (Chater *et al.* 2010).



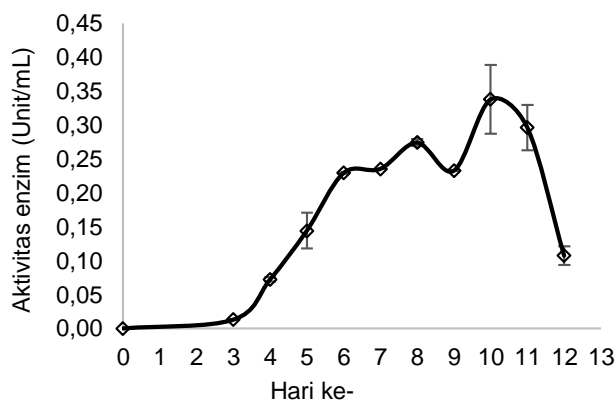
Gambar 5 Pohon filogenetik aktinobakteri HJ45B-1 berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dengan nilai *bootstrap*1000x ulangan dan *Nocardioopsis gilva* strain YIM 90087 dengan no. aksesori NR 043029 sebagai *outgroup*.

### Aktivitas Harian Mananase *Streptomyces* spp. HJ45B-1

Aktivitas enzim mananase *Streptomyces* spp. HJ45B-1 pada media PKC 1% dari hari ke hari meningkat dan puncaknya terjadi pada hari ke-10, yakni 0,338 U/mL (Gambar 6). Setelah hari ke-10, aktivitas enzim mananase menurun. Hari ke-10 ditentukan sebagai waktu pemanenan EEK mananase *Streptomyces* spp. HJ45B-1 untuk digunakan dalam hidrolisis PKC. Aktivitas enzim mananase dalam penelitian ini masih lebih kecil dibandingkan aktivitas aktinobakteri temuan Evan *et al.* (2020) yang memperlihatkan puncak pada hari ke-7 dengan menghasilkan mananase 0,895 U/mL pada suhu ruang dan pH 6,0. Hal tersebut karena setiap aktinobakteri *Streptomyces* spp. memiliki pertumbuhan unik (Chater *et al.* 2010). Penentuan suhu dan pH optimum diperlukan dalam penelitian selanjutnya untuk mengetahui aktivitas optimum dari mananase aktinobakteri tersebut.

### Stabilitas Enzim Mananase

Stabilitas enzim diuji untuk mengukur kemampuannya dalam mempertahankan aktivitasnya pada penyimpanan suhu tertentu. Stabilitas enzim dapat diketahui dengan mengukur aktivitas enzim relatif (%). Penyimpanan pada suhu ruang menggambarkan nilai aktivitas enzim relatif (%) lebih stabil dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 6°C. Stabilitas enzim mananase asal *Streptomyces* spp HJ45B-1 cukup baik karena mempunyai aktivitas enzim relatif 76,56% dan 68,40% masing-masing setelah penyimpanan 5 jam dan 24 jam pada suhu 27°C. Aktivitas enzim relatif mananase pada suhu penyimpanan 6°C berfluktuasi (Gambar 7). Oleh karena itu, digunakan penyimpanan suhu 27°C pada produksi hidrolisis PKC agar kerja enzim mananase lebih stabil dan diharapkan diperoleh produk yang lebih tinggi. Hal tersebut sejalan dengan laporan

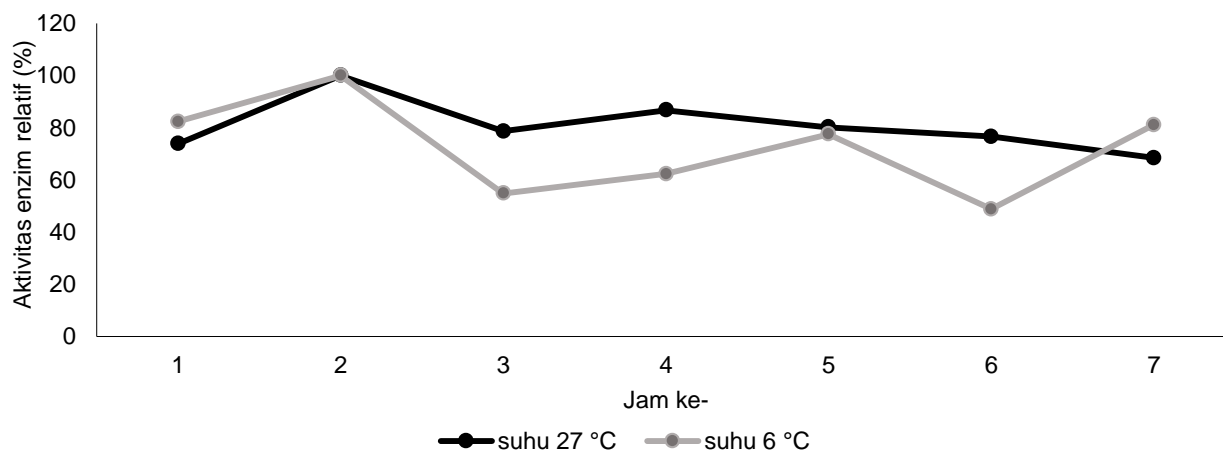


Gambar 6 Aktivitas enzim ekstrak kasar mananase *Streptomyces* spp. HJ45B-1 pada pH 7,00 dan suhu 27°C. Kultur ditumbuhkan pada media PKC 1%, suhu 27°C, dan agitasi 100 rpm.

Susantri *et al.* (2021) bahwa aktivitas relatif enzim di atas 50% cukup baik. Mohapatra (2021) mengungkapkan bahwa enzim mananase asal *Streptomyces* spp. mempunyai aktivitas yang stabil pada suhu 10–30°C dan pH 7–8.

### Produksi Mananoligosakarida secara Enzimatis

Aktivitas EEK yang digunakan dalam produksi MOS adalah 1,73 U/mL. Total aktivitas enzim yang digunakan sebesar 31,14 U/mL dalam 18 mL. Konsentrasi PKC yang digunakan adalah 1% dan 5% (b/v). Nilai DP didapatkan berdasarkan nisbah total gula dan gula pereduksi. Hidrolisis PKC 1% menghasilkan molekul dengan nilai DP 2–4 dengan waktu hidrolisis 1 hingga 3 jam, sedangkan hidrolisis PKC 5% menghasilkan molekul yang lebih kecil lagi dengan nilai DP <2 (Tabel 4). Nilai DP tersebut lebih rendah dibandingkan dengan temuan Utami *et al.* (2013) dengan DP produk hidrolisis PKC 1%, yaitu 8–18. Nilai DP produk hidrolisis PKC semakin



Gambar 7 Stabilitas enzim ekstrak kasar mananase *Streptomyces* spp. HJ45B-1. Enzim disimpan pada suhu 6°C dan 27°C. Aktivitas diuji pada pH 7,00 dan suhu 27°C.

Tabel 4 Derajat polimerisasi hasil hidrolisis PKC 1% dan 5% dalam 18 mL enzim ekstrak kasar (1,73 U/mL), suhu inkubasi 27°C

Konsentrasi PKC	Waktu hidrolisis (jam)	Derajat polimerisasi (DP)
1%	1	4,60 ± 0,02
	2	2,55 ± 0,09
	3	2,30 ± 0,00
	4	1,42 ± 0,02
	5	1,27 ± 0,29
	24	1,11 ± 0,18
5%	1	1,43 ± 0,03
	2	1,25 ± 0,07
	3	1,05 ± 0,01
	4	1,50 ± 0,02
	5	1,12 ± 0,01
	24	0,89 ± 0,00

menurun seiring dengan pertambahan waktu hidrolisis. DP MOS 2–3 dapat meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus* spp. dan menghambat enteropatogen *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* (Jana et al. 2021).

### KESIMPULAN

Seleksi awal aktivitas mananase aktinobakteri pada suhu ruang (27°C) dan pH 7,0 menghasilkan HJ45B-1 sebagai isolat terbaik penghasil mananase. Karakteristik morfologi dan identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat HJ45B-1 merupakan *Streptomyces* spp. Mananase asal *Streptomyces* spp. HJ45B-1 bersifat stabil pada suhu 27°C dan dapat menghidrolisis PKC 1% menjadi mananoligosakarida dengan DP terbaik pada inkubasi selama 1–3 jam.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan

Teknologi yang telah membiayai penelitian ini melalui beasiswa PMDSU tahun 2018 atas nama Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S.

### DAFTAR PUSTAKA

Ariandi, Yopi, Meryandini A. 2015. Enzymatic hydrolysis of copra meal by mannanase from *Streptomyces* sp. BF3.1 for the production of mannoooligosaccharides. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22(2): 79–86. <https://doi.org/10.4308/hjb.22.2.79>

Azizi MN, Loh TC, Foo HL, Chung ELT. 2021. Is palm kernel cake a suitable alternative feed ingredient for poultry? *Animals*. 11(338): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani11020338>

Baurhoo B, Phillip L, Ruiz-Feria C. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poultry Science*. 86(6): 1070–1078. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1070>

Bada Pusat Statisti [BPS.] 2020. *Indonesian Oil Palm Statistics 2019*. Statistics S of EC, editor. Jakarta (ID): BPS-Statistics Indonesia.

Cerveró JM, Skovgaard PA, Felby C, Sørensen HR, Jørgensen H. 2010. Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol. *Enzyme Microb Technoogy*. 46(3–4): 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.012>

Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*: review article. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(2): 171–198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>

Downie B, Hilhorst HWM, Derek Bewley J. 1994. A new assay for quantifying endo-β-d-mannanase activity using congo red dye. *Phytochemistry*.

- 36(4): 829–835. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90446-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90446-1)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Evan S, Meryandini A, Sunarti TC. 2020. Characteristics of mannanase enzyme in actinomycetes isolated from Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 457(1):1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/457/1/012070>
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14(8): 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8): 3233–3241. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997>
- Inayah MN, ambarsari L, Meryandini A. 2016. Karakterisasi xilanase dari bakteri xilanolitik XJ20 asal tanah Hutan Taman Nasioanal Bukit Duabelas Jambi Indonesia. *Jurnal Sumberdaya Hayati*. 2(1): 25-30. <https://doi.org/10.29244/jsdh.2.1.25-30>
- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Kango N. 2021. Prebiotic mannoooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties. *Food Chemistry*. 342(128328): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128328>
- Meryandini A, Anggreandari R, Rachmania N. 2008. Isolasi bakteri mananolitik dan karakterisasi mananasenya. *Biota*. 13(2): 82-88. <https://doi.org/10.24002/biota.v13i2.2675>
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohapatra BR. 2021. Characterization of  $\beta$ -mannanase extracted from a novel *Streptomyces* species Alg-S25 immobilized on chitosan nanoparticles. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 35(1): 150–161. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1858158>
- Nadia HAEN, El Sayed MM, Wafaa GS, Gehad HES. 2010. Purification and partial characterization of extracellular cellulase free xylanase from *Streptomyces rochei*. *Journal of Applied Sciences Research*. 6(9): 1373–1378.
- Nejis NA, Heng JLS, Hassan R. 2011. Prescreening of bioactivities from actinomycetes isolated from forest peat soil of Sarawak. *AGRIS*. 39(2): 245–253.
- Shirling E, Gottlieb D. 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 323–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Srivastava PK, Panwar D, Prashanth KVH, Kapoor M. 2017. Structural characterization and in vitro fermentation of  $\beta$ -mannooligosaccharides produced from locust bean gum by GH-26 endo- $\beta$ -1,4-mannanase (ManB-1601). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(13): 2827–2838. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00123>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Utami W, Meryandini A, Wiryawan KG. 2013. Characterization of bacterial mannanase for hydrolyzing palm kernel cake to produce mannoooligosaccharides prebiotics. *Media Peternakan*. <https://doi.org/10.5398/medpet.2013.36.3.192>