

Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya

Nur Richana¹, Tun T. Irawadi², Anwar Nur², dan Khaswar Syamsu³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 12, Bogor 16114

²Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Baranangsiang, Jl. Pajajaran, Bogor 16144

³Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRACT

Isolation and Identification of Xylanase Producing Bacteria and Characterization of Its Enzyme Properties. Nur Richana, Tun T. Irawadi, Anwar Nur, and Khaswar Syamsu. Xylanase is an extracellular enzyme produced by microorganisms. This enzyme is able to hydrolyse xylane (hemicellulose) to produce xylooligosaccharide and xylose. Thermoalkaliphilic xylanase is an agent that can be used as a substitute in the pulp whitening process instead of chlorine. A study was done to isolate, identify of bacteria and characterize xylanase. The isolation of xylanase producing bacteria has been done from soil and waste of starch industry. Colonies which produced clearing zone were presumed as xylanolytic bacteria and chosen for further screening. Identification of potential isolate in xylanase production was done using 16S ribosomal RNA sequencing. Isolate *Bacillus pumilus* RXA-III5 originated from lime or alkaline soil was more potential isolate in xylanase production than other 24 isolates. Precipitation of xylanase, that was done using ammonium sulphate followed by dialyses produced xylanase of a higher specific activity (267.1 U.mg^{-1}) than that using acetone (131.1 U.mg^{-1}) and ethanol (186.65 U.mg^{-1}). Xylanase was done at purification produced three fractions of xylanase. Xylanase characteristics consist of pH and temperature (9 and 50°C), K_m and V_{maks} value 6 mg.ml^{-1} and $0.2 \text{ mol.minute}^{-1}$, respectively. The Fe^{2+} was the strongest activator and Mg^{2+} was the strongest inhibitor activity. This enzyme was detected as a cellulose-free xylanase. Xylanase is a prospective agent for bio-bleaching of paper.

Key words: Isolation, identification, bacteria, xylanase.

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi. Aplikasi xilanase untuk industri di antaranya untuk industri pangan, pakan, dan pemutih bubuk kertas/*pulp*. Penggunaan penggunaan klor dengan enzim xilanase untuk pemutihan *pulp* telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi dan sekarang telah digunakan pada beberapa pabrik kertas (Bourbonnais *et al.* 1997, Beg *et al.* 2000).

Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi, yang biasanya dihasilkan oleh bakteri atau khamir. Untuk pembuatan kertas diperlukan xilanase yang bersifat termostabil dan tahan pada pH alkali. Xilanase komersial untuk proses pemutihan *pulp* telah mulai dipasarkan. Namun demikian semua enzim komersial ini masih belum memenuhi kriteria ideal yang dibutuhkan untuk aktivitas enzimatik yang diperlukan, yaitu aktivitas optimum pada pH 10 dan suhu lebih dari 90°C (Kulkarni dan Rao 1996). Oleh karena itu, masih diperlukan upaya untuk mencari galur mikroba unggul yang tahan pada pH dan suhu tinggi (alkalofilik termofilik), atau setidaknya tahan pada pH tinggi.

Upaya pemanfaatan enzim dari mikroba potensial hasil isolasi diperlukan pengetahuan mengenai karakteristik dari enzim yang dihasilkan. Pencirian suatu enzim di laboratorium, dilakukan dengan menetapkan kinetika enzim, nilai K_m , V_{maks} dan aktivitas tertinggi. Untuk maksud tersebut serangkaian percobaan dilakukan pada suhu dan pH tetap dan menggunakan substrat yang sesuai. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, aktivator, inhibitor spesifik enzim tertentu, pengaruh senyawa non-spesifik seperti garam dan bufer, pH, kekuatan ionik, suhu, dan dalam beberapa kasus dipengaruhi oleh interaksi dengan protein atau membran (Tucker 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil xilanase serta mengetahui karakter enzim xilanase yang dihasilkan. Karakter enzim meliputi kondisi katalitik (aktivitas) optimum (pH dan suhu), kinetika enzimatik (K_m dan V_{maks}), kestabilan enzim, sifat, perilaku inhibisi, dan aktivitasnya, serta kemampuan xilanase menghidrolisis substrat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioproses, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, dan Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Isolasi bakteri dari contoh tanah dilakukan dengan mengacu pada penelitian Nakamura *et al.* (1993). Komposisi media cair un-

tuk satu liter adalah 0,1 g ekstrak khamir, 0,5 g polipepton, 0,1 g K_2HPO_4 , 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 0,1 g *oat spelt xylan* (Sigma). Media diatur pada pH 9,5 dengan menambahkan Na_2CO_3 1%. Konsentrasi inokulan yang digunakan sebanyak 10%. Inkubasi dilakukan dengan agitasi 150 rpm pada suhu 30-38°C selama 3 hari. Seleksi koloni bakteri penghasil xilanase dilakukan secara bertahap berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekeliling koloni pada media padat di petridish yang bersifat alkali. Tahapan ini merupakan langkah awal untuk mengetahui apakah isolat tersebut dapat mendegradasi substrat (xilan) pada media pertumbuhannya. Apabila mampu mendegradasi dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni maka isolat dinyatakan menghasilkan xilanase. Pada tahap ini seleksi untuk masing-masing isolat diulang tiga kali.

Pengujian selanjutnya dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni bakteri dari masing-masing isolat pada media cair. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui tingkat kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan xilanase. Media cair yang digunakan memiliki komposisi sama dengan media untuk isolasi, sebanyak 50 ml dalam erlemeyer. Setelah panen beberapa pengamatan dilakukan, yaitu bobot biomassa, kandungan protein terlarut dan aktivitas xilanase. Peubah yang diukur, yaitu biomassa dengan mengukur kerapatan optik kultur jaringan pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer *double beam* Hitachi U2010. Protein terlarut diukur dengan metode Bradford (1976). Aktivitas xilanase diukur dengan uji kemampuan enzim menghidrolisis xilan menjadi gula reduksi menurut Winterhalter dan Liebl (1995). Analisis gula reduksi dilakukan dengan pereaksi DNS (3,5 asam dinitro salisilat) dan berdasarkan serapannya pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai pembandingan digunakan deret larutan standar xilosa. Satu unit aktivitas xilanase adalah jumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi (xilosa) sebanyak 1 μ mol/menit (Kubata *et al.* 1992).

Identifikasi Bakteri Unggul Penghasil Xilanase

Identifikasi isolat unggul bakteri penghasil xilanase dilakukan berdasarkan pada sekuen 16S ribosomal RNA dengan metode Drancourt *et al.* (2000). Tahapan yang dilakukan, yaitu persiapan media, perbanyakkan bakteri, isolasi DNA, amplifikasi 16S-rRNA dengan PCR, *sequencing*, dan analisis hasil *sequencing*. Persiapan media dilakukan untuk perbanyakkan isolat bakteri RXA-III5, kemudian setelah kultivasi, bakteri dipisah dengan cara sentrifugasi, kemudian dilakukan isolasi DNA genom menurut metode Marmur dan Doty (1961). Setelah diperoleh DNA genom, kemudian di-amplifikasi 16S-rRNA dengan PCR. Primer 16S-rRNA

adalah subunit ribosom yang dapat digunakan sebagai penanda, pembeda dan sebagai *evolutionary marker* pada bakteri. Hasil dari PCR kemudian *disequencing* dengan metode Altschul *et al.* (1997). Hasil *sequencing* dibandingkan dengan database 16S-rRNA yang ada di Bank Gen. Selanjutnya dibuat pohon filogenetik dengan program *Neighbor* dari *web Angis* (*Australian National Genetic Information System*).

Pengendapan dan Pemurnian Enzim

Produksi xilanase dari isolat bakteri terpilih dan telah diidentifikasi, dilakukan pada media cair dengan komposisi sama dengan media untuk isolasi. Fermentasi dihentikan setelah 48 jam dan dilanjutkan dengan pemisahan biomassa bakteri dari cairan kultivasi (*broth*) dengan sentrifugasi (kecepatan 4.000 rpm). Semua tahapan dilakukan pada kondisi suhu 4°C. Supernatan hasil kultivasi yang telah dipisahkan dari biomassa, kemudian diendapkan dengan amonium sulfat sampai tingkat kejenuhan 80% jenuh. Endapan didialisis bufer fosfat 50 mM, pH 7, selama 15 jam pada suhu 4°C (Lin *et al.* 1999). Bufer dites dengan meneteskan di larutan $BaCl_2$ sampai tidak menghasilkan warna putih, apabila masih putih maka bufer diganti. Hasil dialisis dimurnikan menggunakan alat *preparative electrophoresis* Prepcell 491 (Biorad). Native-PAGE (non SDS_PAGE) digunakan untuk menghilangkan protein kontaminan (Nakamura *et al.* 1993). Pemurnian dalam gel dengan alat ini memerlukan waktu 8 jam, dengan kuat arus 40 mA (12 watt *constant power*). Hasil pemurnian berupa fraksi xilanase dikumpulkan dengan *fraction collector*. Setiap fraksi diuji aktivitas enzimnya berdasarkan kemampuan xilanase dalam menghidrolisis xilan.

Penentuan Aktivitas dan Stabilitas Enzim pada pH dan Suhu Optimum

Penentuan aktivitas dan stabilitas xilanase pada pH dan suhu optimum dilakukan menurut Ratakhanokchai *et al.* (1999). Untuk mengetahui pH aktivitas optimum xilanase dilakukan uji terhadap enzim kasar hasil dialisis dengan menggunakan DNS. Kondisi pH katalitik optimum diperoleh dengan melarutkan enzim dalam bufer masing-masing dengan pH 4,0-11, serta masa inkubasi 30 menit dan suhu 50°C. Bufer yang digunakan, yaitu bufer asetat (pH 4-5), bufer fosfat (pH 6-7), bufer tris-HCl (pH 8), bufer karbonat (pH 9-11). Menurut Eisenthal dan Danson (1991), pemilihan bufer didasarkan pada pertimbangan kisaran pH yang diinginkan. Stabilitas bufer berhubungan dengan substrat, kofaktor, kekuatan ion, dan kondisi bebas kontaminan. Pengaruh pH terhadap stabilitas xilanase, diketahui dengan menginkubasikan enzim tersebut pada

bufer yang sama, dan pada suhu 4°C selama 0, 18, dan 24 jam. Inkubasi untuk kestabilan suhu dilakukan pada selang suhu 40-70°C selama 5, 10, dan 15 menit pada pH 9. Aktivitas sisa xilanase diukur dengan metode standar menurut Ratakhankochai *et al.* (1999).

Penentuan K_m dan V_{maks}

Nilai V_{maks} dan K_m dari xilanase diperoleh dari uji hidrolisis dengan substrat xilan pada interval konsentrasi 0-2% (b/v). Xilosa yang terbentuk diukur dengan metode pengukuran aktivitas standar. Penentuan nilai V_{maks} dan K_m ini dilakukan terhadap enzim kasar berdasarkan grafik Lineweaver-Burk (Tucker 1995).

Pengaruh Inhibitor dan Aktivator

Pengujian pengaruh logam terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan menginkubasi cairan enzim kasar dengan ion logam dan senyawa lain pada konsentrasi akhir 0,1-10 mM. Ion logam berat yang dicobakan adalah Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ag^{2+} , dan ion Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , pada konsentrasi 2,0; 4,0; dan 10,0 mM dalam persenyawaan garamnya. EDTA konsentrasinya ditetapkan 0,1; 0,2; dan 0,5 mM. Pada penelitian juga diperiksa pengaruh hasil hidrolisis oleh enzim yang berupa gula-gula reduksi. Senyawa yang dimaksud adalah glukosa, maltosa, dan sukrosa yang ditetapkan konsentrasinya sebesar 2, 4, dan 10 mM. Inkubasi dilakukan selama 30 menit pada suhu 50°C dan aktivitas enzim diukur dalam kondisi standar. Tingkat inhibisi/aktivasi relatif ditentukan dengan perbandingan dalam persen antara aktivitasnya dengan inhibitor/aktivator terhadap aktivitas enzim tanpa inhibitor/aktivator.

Kemampuan Enzim Kasar Mendegradasi Substrat Spesifik

Untuk mengetahui kemampuan enzim kasar mendegradasi beberapa substrat spesifik dilakukan dengan menginkubasi enzim kasar dengan substratnya yaitu *oat spelt xylan*, xilan tongkol jagung, *carboxymethyl cellulose* (CMC), dan avicel. Sebanyak 1 ml enzim kasar ditambahkan 5 ml larutan substrat (1 g) diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C pH 9 (Dung *et al.* 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Penghasil Xilanase

Pengujian isolasi bakteri menghasilkan 25 koloni yang mampu tumbuh pada media xilan dan dapat menghasilkan zona bening, dengan diameter lebih dari 3 mm. Isolasi bakteri yang dilakukan berasal dari tanah tempat pembuangan limbah tapioka (onggok) dengan pH asam dan tanah berkapur dengan pH lebih

dari 7. Maksud penggunaan tanah berkapur dengan pH tinggi adalah agar diperoleh isolat yang mampu tumbuh pada media yang memiliki pH 7 atau lebih. Pada umumnya isolat bakteri yang dihasilkan mempunyai kemampuan tumbuh tidak jauh dari habitatnya. Seperti halnya hasil penelitian Saha (2002), isolasi mikroba penghasil xilanase yang berasal dari limbah jagung (silase) dengan pH kurang dari 7 menghasilkan xilanase yang stabil pada pH 5-7,5.

Pengamatan kepekatan optik pada akhir pembiakan berkisar antara 0,288-1,249 (Tabel 1) 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 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.

Kandungan protein hasil kultivasi dari isolat bakteri berkisar 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 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.

Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada beberapa isolat uji menunjukkan bahwa aktivitas enzim terendah sebesar 0,051 U/ml. Hasil tertinggi ditunjukkan oleh isolat RXA-I5, yaitu 12,430 U/ml. Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan berkisar antara 0,22-41,579 U/mg protein, aktivitas tertinggi dicapai oleh isolat RXA-III5. Aktivitas enzim yang tinggi tidak selalu diikuti dengan aktivitas spesifik yang tinggi, demikian pula sebaliknya.

Hasil penelitian ini cukup berpotensi dibandingkan dengan penelitian lainnya, seperti Dung *et al.* (1993) yang melaporkan bahwa aktivitas spesifik xilanase dari *Aeromonas caviae* W-61 ialah 1,87 U/mg protein, sedangkan Kubata *et al.* (1995) mengemukakan aktivitas spesifik xilanase *A. caviae* ME-1 ialah 8 U/mg protein. Demikian juga Park *et al.* (1992) melaporkan aktivitas spesifik xilanase dari *Bacillus* sp. YC-335 ialah 1,65 U/mg protein. Namun demikian, hasil penelitian ini masih lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Nakamura *et al.* 1993, yaitu aktivitas spesifik xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 sebesar 86,1 U/mg protein. Berdasarkan hasil pengamatan kepekatan optik, pro-

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

No.	Isolat bakteri	Kepekatan optik	Protein (mg/ml)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
1.	RXON-1	0,981±0,127	0,231±0,007	0,051±0,104	0,464±0,065
2.	RXON-2	0,931±0,089	0,198±0,014	4,468±0,394	22,552±0,381
3.	RXON-3	1,021±0,277	0,187±0,011	5,546±0,241	29,751±3,087
4.	RXON-4	0,897±0,013	0,234±0,017	5,546±0,578	23,853±4,200
5.	RXON-5	0,931±0,156	0,219±0,003	0,198±0,013	0,907±0,072
6.	RXA-I1	0,288±0,098	0,311±0,004	2,917±0,662	9,385±1,024
7.	RXA-I2	0,402±0,092	0,311±0,005	0,734±0,662	2,347±1,095
8.	RXA-I3	0,397±0,096	0,332±0,004	2,449±0,882	7,363±0,256
9.	RXA-I4	0,664±0,123	0,290±0,002	1,670±0,662	5,741±0,226
10.	RXA-I5	0,376±0,051	0,338±0,001	12,430±0,882	36,719±2,529
11.	RXA-I6	0,329±0,045	0,298±0,003	1,826±0,882	8,105±1,883
12.	RXA-I7	0,502±0,156	0,301±0,007	3,697±0,882	12,363±1,232
13.	RXA-I8	0,589±0,129	0,302±0,002	2,449±0,882	8,105±1,883
14.	RXA-I9	0,337±0,040	0,281±0,001	2,761±0,441	9,825±0,520
15.	RXA-II1	0,528±0,117	0,297±0,002	1,826±0,882	6,141±0,941
16.	RXA-II4	0,654±0,158	0,264±0,005	2,761±0,441	10,467±1,477
17.	RXA-II5	1,249±0,198	0,289±0,001	3,385±0,323	11,729±1,558
18.	RXA-III1	1,013±0,198	0,332±0,001	1,826±0,882	5,506±1,649
19.	RXA-III2	0,894±0,167	0,313±0,001	0,890±0,441	2,842±0,396
20.	RXA-III3	0,931±0,078	0,270±0,002	3,385±0,441	12,510±1,533
21.	RXA-III4	0,991±0,136	0,305±0,001	2,449±0,441	8,032±0,446
22.	RXA-III5	0,857±0,079	0,306±0,001	11,182±0,882	41,579±1,794
23.	RXA-III6	1,017±0,027	0,262±0,001	1,046±0,662	3,987±0,504
24.	RXA-III7	0,876±0,035	0,294±0,002	0,422±0,221	1,189±0,743
25.	RXA-III8	0,742±0,071	0,355±0,001	0,110±0,221	0,464±0,065

ON = onggok (asam), A = tanah Alkali, I = pH tanah 7,67, II = pH tanah 6,98, III = pH tanah 7,89.

tein, aktivitas xilanase, dan aktivitas spesifik pada Tabel 1, diperoleh isolat yang potensial, yaitu RXA-III5.

Identifikasi Isolat Bakteri Unggul Penghasil Xilanase

Identifikasi dilakukan dengan metode identifikasi berdasarkan urutan 16S-rRNA. Alasan yang digunakan untuk memanfaatkan urutan 16S-rRNA ini adalah karena molekul rRNA mengandung urutan yang sangat konservatif secara evolusi. Daerah yang sangat konservatif dapat digunakan sebagai situs pelekatan primer sehingga dapat diamplifikasi secara *in vitro* dengan PCR. Dengan cara ini kita dapat mempelajari adanya keragaman genetik dari suatu lingkungan lebih detail karena mikroba yang tidak dapat dikulturkan pun dapat diperoleh gen 16S-rRNA-nya. Urutan yang lebih konservatif dapat digunakan untuk menghasilkan pohon filogenetik yang lebih diskriminatif sehingga dapat membagi organisme ke dalam tiga domain, yaitu *Archaea*, *Bacteria*, dan *Eucarya*. Urutan yang lebih beragam dari molekul 16S-rRNA sangat cocok untuk membedakan suatu organisme ke dalam taksa yang lebih rendah seperti genus dan spesies. Urutan 16S-rRNA ini juga menyediakan data yang secara statistik cukup valid (Amann *et al.* 1995). Di samping itu, menurut Han *et al.* (2002) identifikasi dengan menggunakan metode ini lebih cepat dibandingkan dengan metode medium sintetik. Untuk metode mengguna-

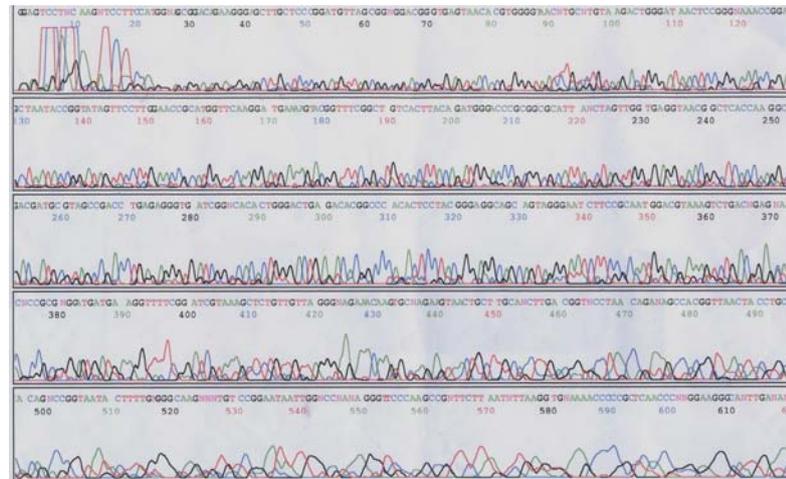
kan 16S-rRNA hanya memerlukan waktu 3 hari sedangkan dengan medium sintetik waktu yang diperlukan lebih dari 8 minggu.

Hasil *sequencing* isolat bakteri RXA-III5 disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil analisis urutan 16S-rRNA, isolat ini termasuk ke dalam genus *Bacillus* dan mempunyai kedekatan dengan *Bacillus pumilus* pada nilai 769 bits (388), dengan identitas 388/388 (100%). Menurut taksonomi, pernyataan sebagai bakteri adalah 100 bits, sebagai *Bacillaceae* 90 bits, sebagai *Bacillus* 86 bits, dan sebagai *B. pumilus* 59 bits. Angka ini tertinggi dibandingkan dengan *Bacillus* lain, yaitu antara 1-7 bits. Berdasarkan pohon filogenetiknya, isolat RXA-III5 mempunyai jarak yang terdekat dengan *B. pumilus* 2 (Gambar 2). Dengan demikian, isolat bakteri RXA-III5 mendekati *B. pumilus*.

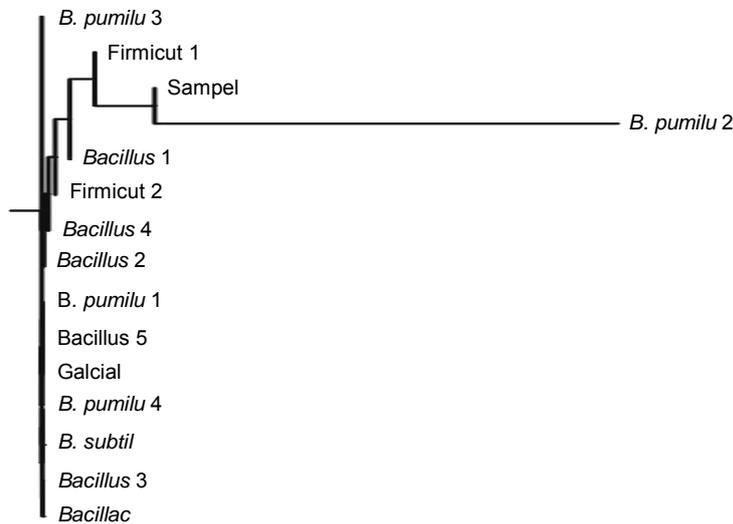
Pengendapan dan Pemurnian Enzim Xilanase

Pengendapan menyebabkan aktivitas spesifik meningkat. Hasil aktivitas spesifik dari perlakuan pengendapan amonium sulfat dilanjutkan dengan dialisis, yaitu 25105,5 U/ml, dengan tingkat kemurnian 2,35 kali (Tabel 2).

Ekstrak kasar xilanase yang diperoleh dari pengendapan amonium sulfat kemudian didialisis, selanjutnya dimurnikan secara *elektroforesis preparatif* menggunakan *tubular polyacrylamide gel*, Prep Cell model 491 (Bio-rad) pada kondisi suhu 4°C. Dari hasil



Gambar 1. Hasil sequencing isolat bakteri RXA-III5.



Sampel adalah isolat bakteri RXA-III5.

Gambar 2. Kedudukan taksonomi isolat bakteri RXA-III5 berdasarkan pohon filogenetiknya.

Tabel 2. Pemurnian xilanase dari *Bacillus pumilus* RXA-III5.

Tahap	Volume (ml)	Protein Total (mg/ml)	Aktivitas Total (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian (Kali)	Perolehan Kembali (%)
Supernatan	1.000	465	52.871	113,70	1	100
Pengendapan-dialisis	25	94,00	25.105,50	267,10	2,35	47,48
Fraksi I	15	2,19	1.839,30	838,54	7,38	3,48
Fraksi II	35	11,80	7.626,50	1.490,73	13,11	14,42
Fraksi III	15	3,08	2.145,75	697,16	6,13	4,06

* Fraksi I, II, dan III hasil pemurnian dengan *Prep Cell* dari Crude-dialisis.

pemurnian diperoleh 3 fraksi positif yang menunjukkan 3 puncak protein (pada kerapatan optik 280 nm) dan 3 puncak aktivitas xilanase yang hampir berimpit (Gambar 3). Selama pergerakan protein di dalam gel poliakrilamid, enzim-enzim terpisah berdasarkan muatan dan ukuran molekul akibat perbedaan poten-

sial listrik pada kedua ujung gel. Pemurnian dalam gel dengan alat ini memerlukan waktu kurang lebih 8 jam dengan arus sebesar 40 mA.

Pemurnian dengan *Prep Cell*, menghasilkan tingkat kemurnian dari ketiga kelompok fraksi berturut-turut adalah 7,38; 13,11; dan 6,13 kali dibandingkan

dengan supernatannya. Hasil pemurnian untuk fraksi II (13,11 kali) lebih tinggi dibandingkan dengan hasil pemurnian dalam penelitian Araki *et al.* (1999) yang menghasilkan kemurnian enzim 11 kali dengan cara pemurnian yang sama. Hasil perolehan kembali (*recovery*) dalam penelitian ini sebesar 3,48; 14,42; dan 4,06% dengan total perolehan kembali 21,96%.

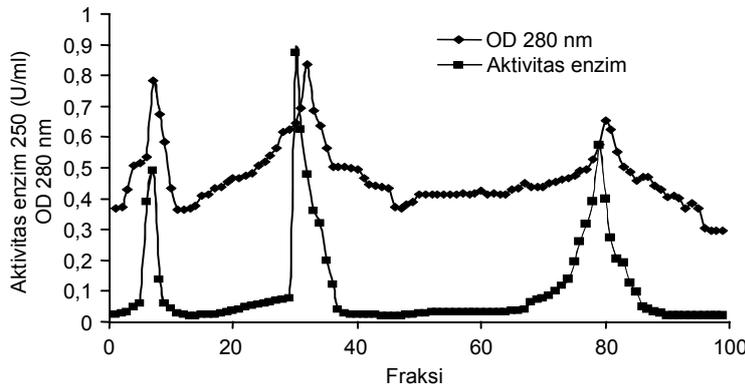
Hasil pemurnian ini tidak jauh berbeda dengan hasil pemurnian xilanase dari *Bacillus* sp. alkalifilik menggunakan kolom Sephadex G-75 yang dilakukan oleh Gessesse dan Mamo (1999), yang mencapai kemurnian 13,5 untuk Xyl A dan 9,5 Xyl B, dengan perolehan kembali 13,6 dan 0,6%. Demikian juga hasil penelitian Kubata *et al.* (1995) pada pemurnian xilanase dari *Aeromonas caviae* ME-1 dengan menggunakan tiga cara, yaitu Sephadex G-75, kolom *Toyo-Pearl* HW-55, dan kolom *Mono-Q* HPLC yang menghasilkan kemurnian berturut-turut 8, 11, dan 25 kali. Hasil penelitian Nakamura *et al.* (1993) pada pemurnian xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 alkalifilik menggunakan HPLC kolom *Toyo-Pearl* 650 M mendapatkan perolehan kembali mencapai 15,3%.

Karakterisasi Xilanase

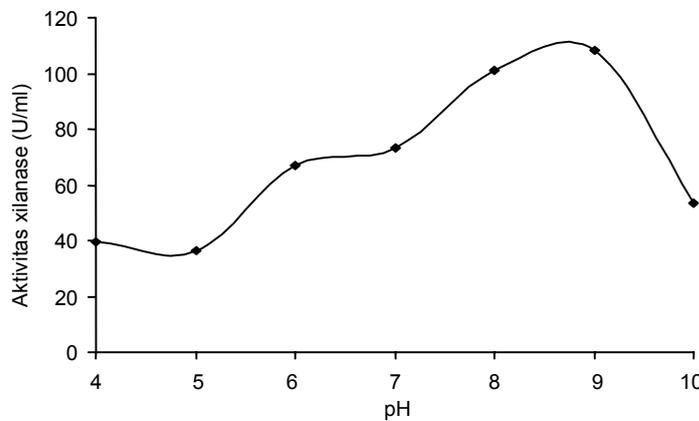
Penentuan pH dan suhu optimum

Hasil penelitian untuk pH optimum, menunjukkan aktivitas xilanase meningkat dengan meningkatnya pH sampai pH 9, kemudian pada pH yang lebih tinggi aktivitasnya menurun. Aktivitas xilanase pada pH 5 adalah 36,54 U/ml, 66,84 U/ml pada pH 6, dan 108,25 U/ml pada pH 9, kemudian aktivitas xilanase mengalami penurunan yang tajam (Gambar 4). Kondisi pH optimum dibutuhkan oleh enzim untuk mengaktifkan seluruh enzim yang mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian Nakamura *et al.* (1994), pada xilanase dari isolat *Bacillus* sp. TAR-1 alkalofilik dan termofilik yang memperlihatkan aktivitas xilanase pada kisaran pH 5-9,5 dan optimum pada pH 9. Semua xilanase dari bakteri alkalofilik menunjukkan aktivitas dekat titik pH netral, meskipun aktivitas tertinggi di daerah basa.

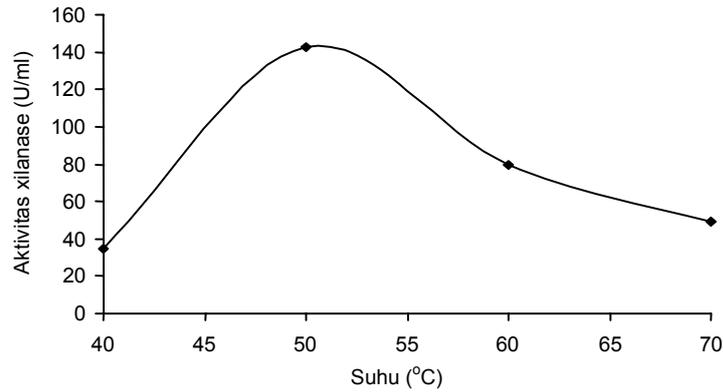
Hasil uji suhu optimum xilanase yang dicobakan pada interval suhu 40-70°C dengan menggunakan DNS menunjukkan aktivitas xilanase yang meningkat, kemudian menurun. Pada suhu 40°C aktivitas xilanase



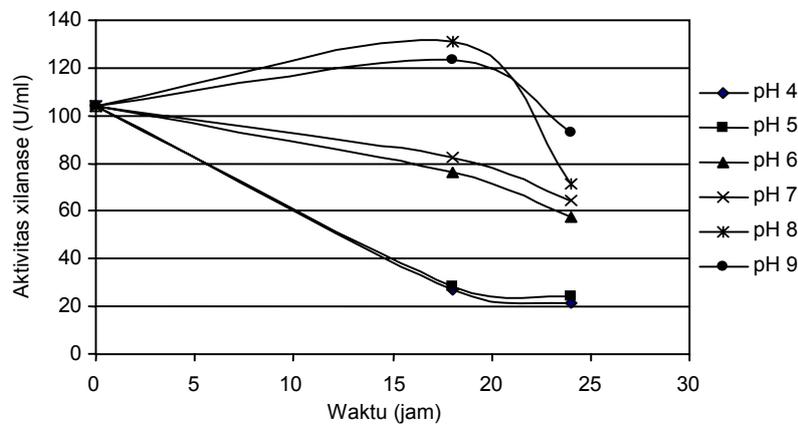
Gambar 3. Hasil analisis ekstrak xilanase dengan menggunakan Prep Cell model 491 (Biorad).



Gambar 4. Aktivitas xilanase dari *Bacillus pumilus* RXA-III5 pada kondisi pH substrat 4-10.



Gambar 5. Kurva aktivitas xilanase pada beberapa kondisi suhu.



Gambar 6. Stabilitas xilanase dari isolat *Bacillus pumilus* RXA-III5 pada pH 4-10.

36,09 U/ml, kemudian pada suhu 50°C mencapai aktivitas xilanase tertinggi, yaitu 142,37 U/ml, kemudian menurun hingga 48,87 U/ml pada suhu 70°C (Gambar 5).

Kondisi optimum dibutuhkan xilanase untuk membentuk kompleks enzim-substrat pada semua sisi aktif enzim. Dibandingkan dengan xilanase dari mikroba lain, suhu optimum xilanase masih pada kisaran suhu optimum sebagian besar xilanase dari *Bacillus* sp. Menurut Sunna dan Antranikian (1997), xilanase dari *Bacillus* sp. mempunyai kisaran suhu optimum antara 50-70°C pada pH 6-10. Kulkarni *et al.* (1995) membuktikan bahwa xilanase dari *Bacillus* sp. NCIM 59 mempunyai suhu optimum 60°C, pH optimum 6. Dhillon dan Khanna (2000) menunjukkan bahwa xilanase dari *B. circulans* AB 16 yang ditumbuhkan pada sekam gandum mempunyai suhu optimum pada 80°C dan pH 6-7. Menurut Yang *et al.* (1995), aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp. VI-4 mencapai optimum pada pH 9 dan suhu 55°C. Pada pH yang sama dan suhu 60°C, aktivitas enzim berkurang 50-20%. Hasil ini sama dengan hasil penelitian Nakamura *et al.* (1993) yang menunjukkan pH optimum xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 dicapai

pada pH 9 dan menunjukkan penurunan yang drastis pada pH 10 dan 11.

Stabilitas xilanase

Kestabilan enzim terhadap kondisi pH dan suhu adalah kemampuan enzim menjaga konformasinya, sehingga mampu mempertahankan aktivitasnya pada kondisi tertentu. Pada Gambar 6, terlihat bahwa xilanase pada beberapa pH stabil sampai 18 jam. Namun demikian, pada pH 8-9 aktivitas lebih tinggi dibandingkan pada pH lainnya. Xilanase stabil pada pH 8-9 sampai 18 jam, kemudian aktivitas menurun terutama untuk pH 8, sedangkan untuk pH 9 sampai 24 jam masih tinggi dibandingkan pada lainnya. Di samping itu, dengan masa inkubasi 18 jam dan 24 jam, xilanase stabil pada kisaran pH 6-9 dengan aktivitas sisa berkisar antara 40,65-58,34%.

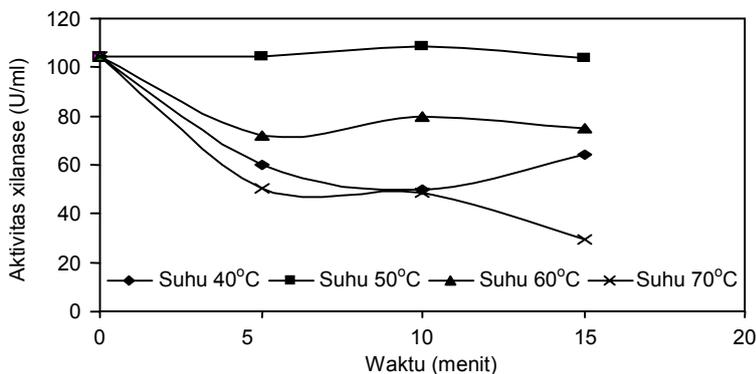
Aktivitas xilanase dapat dipertahankan setelah inkubasi 10 menit pada suhu 60°C dengan aktivitas sisa sebesar 55,85%. Pada suhu 70°C selama 15 menit, aktivitas menurun tajam hingga tersisa 20,44%. Grafik stabilitas suhu (Gambar 7) menunjukkan bahwa xilanase

stabil pada suhu 50°C dengan inkubasi 15 menit. Hal ini ditunjukkan dengan tingginya aktivitas sisa xilanase yang mencapai 87,04% setelah diinkubasi 50°C selama 15 menit. Rendahnya aktivitas setelah inkubasi pada suhu tertentu diakibatkan oleh karena berubahnya konformasi xilanase yang bersifat detrimental sehingga jumlah xilanase yang aktif berkurang.

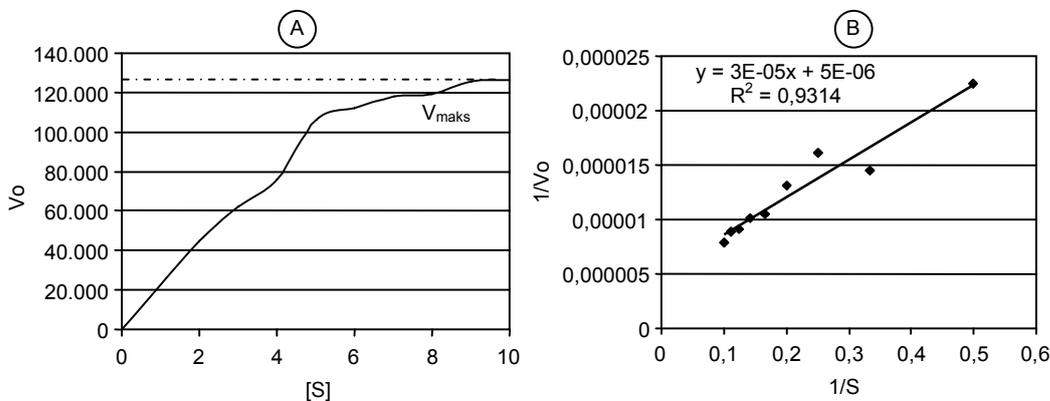
Demikian juga pada suhu tinggi, substrat dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam berikatan dengan sisi aktif enzim (Suhartono, 1989). Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian Kulkarni *et al.* (1995) yang menunjukkan xilanase alkalofilik termofilik dari *Bacillus* sp. NCIM 59 stabil pada suhu 50°C selama 24 jam dan pada pH 6-8. Menurut hasil penelitian Dhillon dan Khanna (2000) xilanase dari *B. circulans* AB16 stabil pada 60°C, pH 8-9. Demikian juga hasil penelitian Ratanakhanokchai *et al.* (1999), yaitu xilanase dari *Bacillus* sp. strain K-1 stabil pada suhu 50°C, tetapi pada suhu 60°C sisa aktivitas masih mencapai 90%. Hasil lain dari *B. thermophilus* T-6 stabil pada suhu 70°C selama 10 menit dan pH 5,5-6.

Penentuan K_m dan V_{maks} xilanase dari *Bacillus pumilus* RXA-III5

Karakter utama yang ditentukan dalam mempelajari sifat kinetik enzim adalah kecepatan katalitik maksimum (V_{maks}) dan konsentrasi substrat pada saat kecepatan katalitik mencapai setengah maksimum (K_m). Untuk itu dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas xilanase dari *B. Pumilus* RXA-III5 menggunakan substrat xilan dari tongkol jagung dengan konsentrasi pada interval 0-2% dan menggunakan xilosa sebagai standar. Pengujian tersebut dilakukan pada kondisi standar, yaitu pada suhu 50°C dan pH 9. Konstanta V_{maks} dan K_m xilanase ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk. Grafik hubungan V_o dan konsentrasi substrat disajikan pada Gambar 8. Nilai K_m dan V_{maks} diperoleh berdasarkan pemetaan data $1/[S]$ terhadap $1/V_o$ menggunakan kurva Lineweaver-Burk dengan ketentuan: $V_o = (V_{maks} S)/(K_m + S)$ dan $1/V_o = (K_m/V_{maks})(1/S) + (1/V_{maks})$. Perpotongan pada sumbu $1/V_o$ sebesar 5×10^{-6} merupakan nilai $1/V_{maks}$, maka V_{maks} adalah $2 \times 10^5 \mu \text{ mol/menit}$, sedangkan K_m/V_{maks} dari hasil linier adalah 3×10^{-5} , sehingga nilai K_m adalah 6 mg/ml.



Gambar 7. Stabilitas suhu xilanase dari isolat *Bacillus pumilus* RXA-III5.



Gambar 8. Kurva Lineweaver-Burk. A = hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan katalitik, B = hubungan antara 1/substrat dan 1/kecepatan katalitik ($1/V_o = (K_m/V_{maks})(1/S) + (1/V_{maks})$).

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui xilanase dari *B. pumilus* RXA-III5 memiliki nilai V_{maks} sebesar 0,2 mol/menit (menggunakan standar xilosa). Kecepatan maksimum ini akan berlangsung apabila substrat yang tersedia berlebih. Konsentrasi substrat yang memberikan kecepatan reaksi sebesar 1/2 nilai V_{maks} merupakan nilai K_m sebesar 6 mg/ml. Hasil ini setara dengan 0,6% dari substrat *oat spelt xylan* (Sigma), sehingga untuk mendapatkan kecepatan maksimum reaksi katalis enzim dibutuhkan konsentrasi substrat lebih dari 12 mg/ml. Dengan mengetahui nilai K_m dan V_{maks} suatu enzim maka dapat dilakukan optimalisasi penggunaan enzim tersebut sebagai biokatalisator reaksi pemecahan substrat menjadi produk.

Hasil K_m dalam penelitian ini tidak berbeda dengan hasil penelitian Kulkarni *et al.* (1995) yang menunjukkan bahwa xilanase dari *Bacillus* sp. NCIM-59 menghasilkan K_m 5,8-8,5 mg/ml. Data V_{maks} dari penelitian ini jauh lebih tinggi ($0,2 \times 10^5 \mu$ mol/menit) dibanding Kulkarni *et al.* (1995), yaitu V_{maks} 0,01 μ mol/menit. Demikian juga hasil penelitian George *et al.* (2001) menunjukkan bahwa xilanase dari *Thermomonospora* sp. menghasilkan K_m yang hampir sama, yaitu $K_m = 7$ mg/ml, sedangkan Nakamura *et al.* (1993) dengan penelitian xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 menghasilkan K_m yang lebih kecil, yaitu 3,3 mg/ml dan V_{maks} 1,1 M/menit.

Nilai K_m yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai K_m semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya (V_{maks}). Rendahnya afinitas ekstrak enzim kasar disebabkan masih adanya protein, yaitu enzim lain yang juga memiliki afinitas terhadap xilan, sehingga tidak semua rantai pentosa diputus menjadi gula reduksi.

Pengaruh beberapa ion logam terhadap aktivitas xilanase

Senyawa-senyawa tertentu dapat mengikatkan diri pada enzim tanpa terlebih dahulu mengalami modifikasi. Bila senyawa-senyawa tersebut terdapat pada protein, mereka dapat memodifikasi aktivitas katalitik dari enzim tersebut, ke arah positif atau negatif. Beberapa molekul kecil pada enzim umumnya, terutama ion-ion anorganik (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}) termasuk jenis aktivator.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada beberapa perlakuan peningkatan konsentrasi ion, menyebabkan aktivitas xilanase menurun. Dari sejumlah pengujian, aktivitas xilanase masih tinggi pada konsentrasi rendah (2 Mm) kecuali $MgSO_4$ (Tabel 3).

Data percobaan yang diperoleh ternyata ion Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ag, EDTA, glukosa, maltosa, dan sukrosa dapat meningkatkan aktivitas xilanase, sedangkan ion Co^{2+} mempunyai aktivitas xilanase yang tinggi tetapi penambahan konsentrasi tidak meningkatkan aktivitas xilanase.

Ion Fe^{2+} merupakan aktivator tertinggi, kemudian diikuti Cu^{2+} dan Co^{2+} . Hasil ini selaras dengan penelitian Ratanakhanokchai *et al.* (1999). Ion Fe^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase sampai 261,6% (dari $FeCl_2$) dan 289% (dari $FeSO_4$).

Kenaikan konsentrasi ion akan menurunkan aktivitas xilanase, yaitu terjadi pada penambahan $MgSO_4$, $MgCl_2$, Na_2SO_4 dan $NaCl_2$. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya sifat inhibitor kompetitif dari ion logam yang diujikan. Ion Mg^{2+} dari senyawa $MgSO_4$, ternyata mempunyai hambatan yang tertinggi.

Senyawa aktivator sampai jumlah tertentu (maksimum) dapat meningkatkan kecepatan reaksi katalis enzim, namun kelebihan aktivator dapat menyebabkan kompetisi aktivator bebas dengan kompleks aktivator-substrat terhadap enzim. Kelebihan antara aktivator bebas tersebut menyebabkan penghambat kompetitif.

Kemampuan enzim kasar mendegradasi substrat spesifik

Enzim kasar xilanase dari penelitian ini ternyata mempunyai aktivitas yang tinggi pada *oat spelt xylan* dan xilan tongkol jagung, tetapi tidak pada substrat CMC dan avicel (Tabel 4). *Oat spelt xylan* dan tongkol jagung merupakan induser bagi mikroba untuk menghasilkan xilanase, sedangkan CMC dan avicel merupakan induser bagi mikroba penghasil selulase. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim kasar tersebut tidak mengandung selulase tetapi hanya mengandung xilanase. Hal tersebut didukung dengan hasil penelitian pemurnian enzim, yaitu dihasilkan 3 fraksi enzim yang ketiganya terdeteksi mempunyai aktivitas xilanase.

Dengan demikian, enzim xilanase yang diperoleh dari penelitian ini mempunyai sifat tahan alkali (pH 9) dan tidak mengandung selulase (*celulase free*) sehingga enzim ini diharapkan prospektif untuk pemutih kertas.

KESIMPULAN

Isolat RXA-III5 dinyatakan sebagai isolat potensial penghasil xilanase. Hasil identifikasi berdasarkan sekuen 16S-rRNA, isolat RXA-III5 termasuk genus *Bacillus* dan mempunyai kedekatan dengan *B. pumilus*.

Tabel 3. Aktivitas xilanase dengan perlakuan beberapa senyawa yang mengandung ion logam.

Bahan	Konsentrasi (mM)	Aktivitas xilanase (U/ml)	Tk. aktivitas (%)	Bahan	Konsentrasi (mM)	Aktivitas xilanase (U/ml)	Tk. aktivitas (%)
Kontrol enzim	-	67,93	99,98				
FeCl ₂	2	66,83	98,38	MnSO ₄	2	59,16	87,09
	4	75,56	111,29		4	60,26	88,71
	10	101,89	150,00		10	84,36	124,19
MgSO ₄	2	59,16	87,09	ZnSO ₄	2	59,12	87,09
	4	55,87	82,26		4	67,93	99,98
	10	47,11	69,35		10	58,07	85,48
MgCl ₂	2	72,31	106,45	AgNO ₃	1	59,58	87,71
	4	55,87	82,26		2	83,05	122,26
	10	56,97	83,87		4	94,66	139,35
Na ₂ CO ₄	2	69,02	101,61	EDTA	0,1	77,63	114,28
	4	66,83	101,33		0,2	84,85	124,91
	10	63,54	93,54		0,5	88,46	130,22
CoCl ₂	2	76,69	112,90	Glukosa	2	72,21	106,30
	4	70,12	103,23		4	81,24	119,59
	10	77,78	114,52		10	96,37	141,86
CuSO ₄	2	62,48	91,94	Maltosa	2	57,77	85,04
	4	76,69	112,90		4	61,38	90,36
	10	86,55	127,42		10	94,01	138,39
CaCl ₂	2	54,78	80,65	Sukrosa	2	63,19	93,62
	4	56,97	83,87		4	64,99	95,67
	10	60,26	88,71		10	68,61	101,00
NaCl ₂	2	72,31	106,45				
	4	62,45	91,94				
	10	61,35	90,32				

mM = milimol.

Tabel 4. Aktivitas enzim pada beberapa substrat.

Substrat	Aktivitas enzim (U/ml)
<i>Oat spelt xylan</i>	160,65
Xilan tongkol jagung	177,57
CMC	0,00
Avicel	0,00

Pengendapan xilanase dengan amonium sulfat yang dilanjutkan dengan dialisis menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi (267,1 U/mg). Purifikasi menghasilkan 3 fraksi xilanase dengan tingkat kemurnian berturut-turut adalah 7,38; 13,11; dan 6,13 kali dibandingkan dengan supernatannya, serta perolehan kembali (*recovery*) sebesar 3,48; 14,42; dan 4,06%, sehingga total perolehan kembali 21,96%.

Xilanase yang dihasilkan memiliki karakteristik pH dan suhu optimum 9 dan 50°C, nilai K_m dan V_{maks} berturut-turut adalah 6 mg/ml dan 0,2 mol/menit. Ion Fe³⁺ merupakan aktivator terkuat, dan Mg²⁺ merupakan inhibitor. Xilanase bersifat tahan alkali (pH 9) dan tidak mengandung selulase (*celulase free*) sehingga enzim ini diharapkan prospektif untuk pemutih kertas.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Identification of uncultured bacteria. A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60:360-365.
- Altschul, F. Stephen, L. Thomas, Madden, A. Alejandro, Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Araki, T., S. Tani, K. Maeda, S. Hashikawa, H. Nakagawa, and T. Morishita. 1999. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(11):2017-2019.
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal. 2000. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:326-338.

- Bourbonnais, R., M.G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, and S. Borneman. 1997.** Reactives of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4632.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive methods for quantitative proteins utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-354.
- Dhillon, A. and S. Khanna. 2000.** Production of a thermostable alkali-tolerant xylanase from *B.circulans* AB.16 grown on wheat straw. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 27(3):325-327.
- Drancourt, M., C. Bollet, and A. Carlouz. 2000.** 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38:3623-3630.
- Dung, N.V., S. Vetayasuporn, Y. Kamio, N. Abe, J. Kaneko, and K. Izaki. 1993.** Purification and properties of β -1,4 xylanase 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(10):1708-1712.
- Eisenthal and Danson. 1991.** *Food Enzymology.* Academic Press. London.
- George, S.P., A. Ahmad, and M.B. Rao. 2001.** Involvement of a lysine residue in the active site of thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:48-54.
- Gessesse, A. and G. Mamo. 1999.** High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *J. Enz. Microbiol. Technol.* 25:68-72.
- Han, X.Y., A.S. Pham, J.J. Tarrand, P.K. Sood, and R. Luthra. 2002.** Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. *J. Microbiology and Infectious Disease Am. J. Clin. Pathol.* 118(5):796-801.
- Kubata, K.B., H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa, and T. Suzuki. 1992.** Xylanase I of *Aeromonas caviae* ME-1 Isolated from the intestine of a herbivorous insect (*Samia cyrithia pryeri*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(9):1463-1464.
- Kubata, K.B., K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, and H. Horitsu. 1995.** Xylanase IV, an exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylooligosaccharide as the only low-molecular-weight oligosaccharide from xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 6(4):1666-1668.
- Kulkarni, N., J. Chauthaiwale, and M. Rao. 1995.** Characterization of the recombinant xylanases in *Escherichia coli* from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59. *J. Enz. Microb. Technol.* 17:972-976.
- Kulkarni, N. and M. Rao. 1996.** Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. for pulp. *J. Biotechnol.* 51:167-173.
- Lin, J., L.M. Nellovu, S. Singh, and B. Pillay. 1999.** Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:73-79.
- Marmur, J. and P. Doty. 1961.** Determination of the base composition of deoxyribonucleid Acid from its terminal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5:109-118.
- Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono, and K. Horikoshi. 1993.** Purification and some properties of an xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7):2311-2316.
- Nakamura, S., R. Nakai, K. Wakabayashi, Y. Ishigoro, R. Aono, and K. Horikoshi. 1994.** Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(1):78-81.
- Park, Y.S., D.Y. Yum, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1992.** Xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. YC-335. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(8):1355-1356.
- Ratanakhanokchai, K., K.L. Kyu, and M. Tanticharoen. 1999.** Purification and properties of a xylan-binding exoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 65(2):694-697.
- Saha, B.C. 2002.** Production, purification, and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry* 37:1279-1284.
- Suhartono, M.T. 1989.** Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi - Pusat Antar Universitas - Institut Pertanian Bogor.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997.** Xylanolytic enzyme from fungi and bacteria. *Crit. Rev. in Biotechnol.* 17(1): 39-67.
- Tucker, G.A. 1995.** Fundamentals of enzyme activity. In Tucker and Wood (*Eds.*). *Enzyme in Food Processing.* Chapman and Hall. India.
- Winterhalter, C. and W. Liebl. 1995.** Two extremely thermostable xylanase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSBB. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1810-1815.
- Yang, V.W., Z. Zhuang, G. Elegir, and T.W. Jeffries. 1995.** Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. (VI-4) isolated from kraft pulp. *J. Industrial Microbiol.* 15:434-441.
-