

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL**



**PRODUKSI PREBIOTIK XILOOLIGOSAKARIDA DARI PEMANFAATAN
LIMBAH AGROINDUSTRI SINGKONG : AMPAS DAN KULIT SINGKONG
MELALUI PROSES HIDROLISIS ENDO- β -1,4-D-XILANASE**

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S. Si, M. Si	NIDN 0025127002
Dr. rer. biol. hum Erma Sulistyarningsih, dr, M.Sc,	NIDN 0022027701
Agung Budi Santoso,S.Si, M.Si	NIDN 0030047104

UNIVERSITAS JEMBER

November 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Produksi prebiotik xilooligosakarida dari pemanfaatan limbah agroindustri singkong ampas dan kulit singkong melalui proses hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 112 / Kimia
Tema Isu Strategis Nasional : Ketahanan dan Keamanan Pangan (Food safety and security)

Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
b. NIDN : 0025127002
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Kimia
e. Nomor HP : 083892526100
f. Alamat surel (e-mail) : dewi_pjw2003@yahoo.com

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr. rer. biol. hum Erma Sulistyaningsih, dr, M.Sc.
b. NIDN : 0022027701
c. Perguruan Tinggi : Universitas Jember

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si.
b. NIDN : 0030047104
c. Perguruan Tinggi : Universitas Jember

Institusi Mitra

a. Nama Institusi Mitra : PT Mocaf Indonesia
b. Alamat : RT/RW 02/08 Desa Kerjo Kecamatan Karangn Kabupaten Trenggalek
c. Penanggung Jawab : Cahyo Handriadi

Tahun pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 84.500.000,-
Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp. 200.000.000

Jember, 2 November 2015

Ketua Ketua Peneliti,



(Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si)
NIP. 197012251997022001



(Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D)
NIP. 196101081986021001



(Prof. Ir. Achmad Subagio, M. Agr. Ph.D)
NIP. 196905171992011001

RINGKASAN

Limbah agroindustri singkong yang berupa ampas dan kulitnya di Indonesia belum dimanfaatkan secara optimal. Setiap tahun tidak kurang dari 4 juta ton limbah singkong terbuang begitu saja bahkan menimbulkan pencemaran lingkungan di sekitar pabrik tapioka. Padahal kandungan lignoselulosa dalam limbah singkong cukup tinggi (24-38%). Lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa kaya xilan adalah polisakarida yang dapat dihidrolisis untuk menghasilkan xilooligosakarida (XOS). XOS diketahui mempunyai aktivitas prebiotik dan termasuk dalam makanan fungsional. XOS tidak dapat dihidrolisis dan diabsorpsi oleh pencernaan manusia tetapi dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik dalam usus besar. Saat ini prebiotik XOS dipasarkan harganya cukup mahal karena dibuat dari substrat komersial dengan biaya produksi cukup tinggi. Produksi XOS dengan hidrolisis panas atau kimiawi juga menimbulkan dampak pencemaran lingkungan. Oleh karena itu pada penelitian ini kami mencoba memproduksi XOS dari bahan yang murah yaitu limbah singkong dengan proses enzimatik yang ramah lingkungan. Limbah singkong yang digunakan berasal dari mitra PT Mokaf Indonesia. Mitra berperan dalam menyediakan limbah yang memenuhi kualitas sebagai bahan baku. Enzim kunci untuk produksi XOS dari hidrolisis xilan adalah endo- β -1,4-D-xilanase. Enzim ini akan menghidrolisis xilan menjadi XOS dan sedikit xilosa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi prebiotik xilooligosakarida dari pemanfaatan limbah singkong (ampas dan kulit singkong) dengan aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase. Pada penelitian ini, kulit dan ampas singkong dihaluskan dan disaring dengan ukuran kurang dari 100 mesh, kemudian dilakukan pre-treatment menghilangkan HCN dengan perendaman 1-5 hari dan perebusan 1-5, untuk ampas singkong hanya perendaman 1 hari. Kandungan HCN yang masih dalam kondisi aman yaitu dibawah 50 ppm adalah kondisi 5 hari baik perlakuan perendaman dan perebusan. Tahap selanjutnya yaitu dengan perendaman 0.5% NaOCl selama 5 jam untuk menghilangkan kandungan lignin dalam kulit maupun ampas singkong, dalam perlakuan delignifikasi dibandingkan juga dengan proses tanpa delignifikasi, dengan tujuan untuk melihat perbandingan rendemen xilan dan total gula reduksi yang dihasilkan. Ekstraksi xilan dilakukan dengan perendaman variasi NaOH: 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14% dan 16% selama 24 jam, diikuti dengan penambahan 5% HCl pH 7,0. Setelah itu disentrifugasi, filtrat yang diperoleh di presipitasi dengan etanol (rasio 1:3) dan dikeringkan pada suhu 80 °C selama 48 jam. NaOH treatment ini berhasil mengisolasi xilan dari kulit sebesar 14 % (dari 8% NaOH pada kondisi tanpa delignifikasi) dan 6,4% (dari 4% NaOH dari kondisi delignifikasi). Rendemen xilan dari ampas singkong sebesar 47% (dari 6% NaOH pada kondisi tanpa delignifikasi) dan 25% (dari 6% NaOH dengan delignifikasi). Kedua rendemen xilan baik dari kulit dan ampas singkong rendemen xilan yang dihasilkan lebih besar pada kondisi tanpa delignifikasi dibandingkan dengan delignifikasi, hal ini disebabkan karena adanya lignin yang ikut terlarut pada saat penambahan NaOH. Namun kondisi delignifikasi dan non delignifikasi dapat dibandingkan dengan total gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan yang terisolasi dengan enzim endoxilanase. Dari hasil Total Gula Reduksi yang dihasilkan kondisi delignifikasi lebih tinggi dari tanpa delignifikasi. Proses hidrolisis menggunakan endoxilanase (2.76 U/mg) dari *Bacillus subtilis* asal abdominal rayap tanah dibawah kondisi pH 5 dan suhu 50 °C selama 15 jam. Analisis TLC menunjukkan produksi XOS, yaitu menunjukkan spot yang tebal pada X₅.

Kromatogram HPLC menunjukkan jumlah kuantitatif X₅ yang dihasilkan sebagai produk dominan dan beberapa XOS yang lain seperti X₃, X₄ dan tidak dihasilkan komponen X₂ dalam produk hidrolisis xilan dari kulit dan ampas singkong. Hasil ini tidak berbeda dengan produk hidrolisis xilan dari oat spelt xilan, namun produknya lebih rendah. Langkah selanjutnya mencari kondisi optimum hidrolisis dengan bervariasi waktu inkubasi selama 5, 16, 20 dan 24 jam. Dari hasil TLC dan total gula reduksi dihasilkan waktu optimal hidrolisis yaitu 20 jam untuk xilan yang berasal dari kulit singkong dan 16 jam untuk xilan yang berasal dari ampas kedelai. Rencana penelitian tahun ke 2 akan melakukan uji prebiotik terhadap XOS yang dihasilkan dari produk hidrolisis xilan yang bersumber dari kulit dan ampas singkong secara *in-vitro* dan *in-vivo*. Beberapa parameter yang akan diamati adalah produk fermentasi bakteri probiotik berupa asam lemak pendek yaitu asam propionat, asam butirat dan asam laktat, pH *fecal* dan berat total *colon* dan *cecal* hewan uji tikus. Tujuan akhir penelitian ini akan dapat menginformasikan bahwa prebiotik xilooligosakarida dapat diisolasi dari limbah singkong menggunakan enzim endo- β -1,4-D-xilanase.

PRAKATA

Atas berkat rahmat Tuhan Yang Maha Kuasa, penelitian ini dapat berjalan sesuai dengan program yang telah dijadwalkan. Penelitian ini memfokuskan pada xilooligosakarida sebagai produk hidrolisis xilan. Xilan merupakan komponen hemiselulosa yang banyak terdapat dalam limbah agroindustri. XOS sebagai prebiotik yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Pada penelitian ini menghasilkan xilan yang bersumber dari limbah kulit dan ampas singkong, yang merupakan limbah agroindustri yang berlimpah dan pemanfaatan belum optimal. Hasil hidrolisis xilan sumber kulit dan ampas singkong dengan menggunakan endoxilanasase dari *Bacillus subtilis* sumber abdominal rayap tanah menghasilkan XOS yang dideteksi dengan analisis TLC dan HPLC.

Dalam kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Indonesia yang telah memberi dana penelitian dalam skem Penelitian Strategis Nasional 2015, Lembaga penelitian Universitas Jember sebagai lembaga yang menaungi bidang penelitian di lingkungan Universitas Jember dan laboratorium CDAST Universitas Jember yang memberi fasilitas penelitian serta mahasiswa S1 yang terlibat dalam penelitian ini.

Jember, 2 November 2015

Peneliti

HALAMAN SAMPUL

HALAMAN PENGESAHAN

RINGKASAN

PRAKARTA

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR LAMPIRAN

Bab I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	8
1.2 Perumusan Masalah	10
1.3 Urgensi	11

Bab II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilan	13
2.2 Enzim Xilanolitik	13
2.3 Xilooligosakarida	14
2.4 Kulit Singkong dan Ampas Singkong	15
2.5 Hasil penelitian yang telah dicapai	16
2.6 Penelitian yang akan dikerjakan	20

Bab III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan penelitian	21
3.2 Manfaat Penelitian	22

Bab IV METODELOGI PENELITIAN

4.1 Road Map Penelitian	23
4.2 Bagan Alur Penelitian	24
4.3 Lokasi Penelitian	25
4.4 Prosedur Penelitian	25
4.5 Indikator Capaian Penelitian	29

Bab V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pre treatment limbah kulit dan ampas singkong	29
5.2 Endo- β -1,4-D-Xilanase dari <i>Bacillus sp</i>	31
5.3 Ekstraksi xilan dari kulit dan ampas singkong	33
5.4 Komposisi XOS produk hidrolisis enzimatis xilan sumber kulit dan ampas singkong	35
5.5 Produksi XOS dan Analisis	36
5.6 Kondisi Waktu Optimum Hidrolisis	38
Bab VI Rencana Penelitian Tahun ke 2	41
Bab VII KESIMPULAN DAN SARAN	41
DAFTAR PUSTAKA	41

Lampiran

Lampiran 1 Biodata Ketua dan Anggota Penelitian

Lampiran 2 Susunan Organisasi dan Pembagian Tugas

Lampiran 3 Artikel dalam Seminar The International Seminar on Molecular and Cellular Life Science : Infectious Diseases, Biochemistry & Structural Biology, MCLS 2015 (Accepted Procedia Chemistry Elsevier)

Lampiran 4 . Usulan Paten UBER HKI : Enzim endo β -1,4-xilanase asal *Bacillus sp* dalam abdominal rayap tanah yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan prebiotik xilooligosakarida dari substrat xilan

Lampiran 5 : Draff Jurnal : Production of Xylooligosaccharides by Endo β -1,4 Xylanase from *Termete* Microorganism

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sedang beranjak menuju negara Industri tetapi tetap dengan mengedepankan pertanian. Pertanian adalah pilar utama bagi ketahanan Negara karena menyangkut ketersediaan pangan. Pengelolaan yang cermat dan terukur dari potensi pertanian akan membawa kesejahteraan bagi bangsa Indonesia. Bahan makanan pokok bangsa Indonesia adalah padi, jagung, sagu dan ketela pohon atau singkong. Tetapi saat ini ketela pohon atau singkong mulai ditinggalkan sebagai bahan makanan pokok. Singkong lebih dikenal sebagai jajanan (singkong goreng, gethuk, tape, keripik) atau bahan baku tepung tapioka dan bioetanol. Sekalipun tidak lagi menjadi bahan makanan pokok, singkong masih memiliki nilai ekonomi yang relatif tinggi.

Produksi Singkong Indonesia pada 2013 sebesar 23.824.008 ton, dengan daerah produksi terbesar Provinsi Jawa Tengah (4.089.635 ton) disusul Jawa Timur (3.601.074 ton) (data BPS, 2013). Kabupaten Jember sendiri, menyumbang produksi 478.030 ton pertahun. Singkong dalam bentuk mentah telah diekspor ke Cina untuk diproses menjadi bioetanol. Singkong juga diekspor dalam bentuk gaplek, pelet dan chip ke berbagai negara termasuk Jepang.

Singkong menjadi komoditi yang mendapat perhatian besar dari Universitas Jember. Penelitian tentang singkong di Universitas Jember sudah menghasilkan capaian yang signifikan. Misalnya Varietas Singkong Gajah yang berhasil mengentaskan kemiskinan di Kabupaten Wonogiri Jawa Tengah. Juga Tepung MOKAF penemuan Prof. Subagyo yang digunakan sebagai bahan baku beras sintesis atau beras cerdas. Usulan ini diharapkan juga menghasilkan sesuatu yang berharga dan menambah pemanfaatan serta nilai ekonomis dari Singkong

Singkong yang digunakan sebagai bahan baku tepung tapioka akan menyisakan limbah berupa kulit dan ampas. Kulit singkong mencapai 15% dari berat singkong basah, sehingga untuk produksi singkong Indonesia tahun 2013 sebesar 23.824.008 ton maka limbah kulitnya saja sudah mencapai 3.573,600 ton. Tingginya produksi tepung tapioka sebanding dengan potensi limbah yang dihasilkan. Hingga saat ini ampas dan kulit singkong belum optimal pemanfaatannya bahkan menimbulkan masalah pencemaran lingkungan ketika dibuang begitu saja di sungai. Muhiddin *et al.* (2000) menyatakan setiap kilogram singkong menghasilkan 150-200 gram kulit singkong.

Ampas dan kulit singkong ini kaya akan lignoselulosa seperti hemiselulosa kaya xilan (24-38%) selulosa, lignin dan pektin (Ezejiofor, 2014 dan Almatsier, 2005). Hemiselulosa yang kaya xilan merupakan heteropolisakarida dengan tulang punggung dibentuk oleh homopolimer sub unit xilosa (Saha, 2003; & Rodrigues *et al.*, 2010), sangat berpotensi sebagai bahan baku prebiotik oligosakarida yaitu xilooligosakarida. Xilooligosakarida adalah oligosakarida mengandung 2 sampai 10 molekul xilosa yang terikat oleh ikatan β 1,4 (Makelainen *et al.*, 2010).

Xilan memiliki potensi menjadi bahan baku prebiotik Xilooligosakarida (XOS). Komposisi dan struktur dari XOS tergantung dari sumber dan proses produksinya. Produksi XOS dari hemiselulose yang kaya akan xilan dapat dilakukan secara kimiawi, enzimatis atau melibatkan kedua metode tersebut. Hidrolisis dapat dilakukan dengan pemanasan menggunakan uap (steam) atau secara kimia. Hidrolisis kimiawi dilakukan dengan penambahan alkali atau asam. Hidrolisis kimiawi memiliki dampak yang membahayakan lingkungan dan membutuhkan biaya tinggi. Alternatif yang ramah lingkungan dalam produksi XOS adalah secara enzimatis.

Xilan dalam lignoselulose berikatan kompleks dengan lignin yang dapat mengganggu proses hidrolisis oleh enzim (Akpinar, O. & Seyda Bostaner, 2009). Untuk hidrolisis lignoselulose sebaiknya diberikan perlakuan awal pemanasan dengan proses steam (Pan, D.X., *et al.*, 2009). Kelompok enzim xilanase akan menghidrolisis ikatan 1,4 glikosidik dalam xilan. Enzim xilanase terdiri dari enzim endoxilanase (1,4-D-xilohidrolase, EC 3.2.1.8), β -xilosidase (Ec 3.2.1,37) dan enzim yang memotong percabangan (esterase) (Akpinar, O. & Seyda Bostaner, 2009)

Enzim *endo- β -1,4-D-xilanase* merupakan salah satu enzim xilanolitik yang mampu mengkatalisis reaksi *endo*-hidrolisis ikatan β -1,4-D-xilosida pada hetero- atau homoxilan dengan menghasilkan xilooligosakarida dan sedikit xilosa. *endo- β -1,4-D-xilanase* memiliki prospek bagus pada industri pangan, pakan, pulp, kertas dan kesehatan. Kelompok peneliti Biokimia dari Jurusan Kimia telah berhasil mengisolasi enzim *endo- β -1,4-D-xilanase* dari bakteri dalam sistem abdominal rayap dan telah dikarakterisasi (Ratnadewi, *et al.*, 2007). Analisa pada hasil hidrolisis xilan oat oleh *endo- β -1,4-D-xilanase* menunjukkan adanya XOS dengan derajat polimerasi (DP) 2,3,4 dan 5. Aplikasi Enzim *endo- β -1,4-D-xilanase* asal bakteri abdominal rayap sebagai

improver roti telah dilakukan. Juga penelitian tentang roti yang diperlakukan tersebut untuk mereduksi resiko kanker kolon pada mencit.

XOS adalah bahan pangan fungsional (Badan POM,2005) yang juga dapat digunakan untuk kosmetika, farmasi dan agrikultur. XOS memiliki potensi dibidang kesehatan karena aktivitas prebiotik dan kemampuan untuk mengurangi resiko kanker (Alonso *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2004; dan Bullock, 2005). XOS memiliki peran prebiotik dalam metabolisme mineral (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001) dan perlindungan terhadap kanker usus (Wollowski *et al.*, 2001). Pemanfaatan XOS sebagai prebiotik dalam diet balita telah dilakukan (Agostoni *et al.*, 2004; Agostoni, 2004). Pada beberapa tahun terakhir pemanfaatan xilan atau produk biokonversinya telah mendapatkan perhatian serius dibidang industri.

Limbah agroindustri masih belum dimanfaatkan dengan optimal. Prosentase pemanfaatannya masih kecil atau belum memberi nilai tambah yang signifikan. Miliaran ton residu agroindustri dibuang begitu saja tanpa dimanfaatkan bahkan menimbulkan permasalahan lingkungan. Padahal limbah tersebut dipastikan banyak mengandung xilan yang bisa dihidrolisis menjadi XOS. XOS merupakan pangan fungsional yang nilai ekonomisnya masih sangat tinggi. Harga XOS di pasaran masih mahal karena substrat yang digunakan adalah substrat komersial. Oleh karena itu pada penelitian ini kami akan memanfaatkan limbah agroindustri singkong yaitu ampas dan kulit singkong sebagai sumber prebiotik XOS. Limbah singkong akan dihidrolisis oleh enzim endo- β -1,4-D-xilanase asal abdominal rayap yang telah kami kembangkan pada payung penelitian kami.

Ketersediaan prebiotik XOS dari komoditas lokal yang murah bahkan berupa limbah akan menurunkan harga produk ini. Bila prebiotik XOS dapat diproduksi dengan biaya yang rendah dan dipasarkan dengan harga terjangkau maka lebih banyak masyarakat dapat mengkonsumsinya. Kelanjutannya adalah peningkatan kesehatan masyarakat, menurunnya prevalensi kanker pencernaan dan meningkatkan ketahanan negara dalam bidang kesehatan. Rakyat yang sehat akan membuat negara lebih kuat.

1.2 Perumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan produksi limbah singkong yang cukup besar di Jawa Timur dan potensi limbah singkong yang mengandung hemiselulosa, yang dapat digunakan sebagai

substrat oleh enzim Endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghasilkan produk prebiotik xilooligosakarida (XOS) maka :

- a. Bagaimana kondisi optimum hidrolisis limbah kulit dan ampas singkong dengan enzim endo- β -1,4-D-xilanase?
- b. Seberapa besarkah limbah singkong (kulit dan ampas singkong) dapat menghasilkan xilooligosakarida (XOS) hasil produksi hidrolisis dengan endo- β -1,4-D-xilanase
- c. Bagaimana karakter XOS yang dihasilkan dari hidrolisis limbah kulit dan ampas singkong dengan enzim endo- β -1,4-D-xilanase?
- d. Apakah XOS dari limbah kulit dan ampas singkong memiliki aktivitas prebiotik ditinjau dari perubahan populasi bakteri *Bifidobacterium sp*, *Laktobacillus* dan *Enterococcus* pada usus hewan uji tikus yang diberi asupan XOS ?
- e. Apakah XOS dari limbah kulit dan ampas singkong memiliki aktivitas prebiotik ditinjau dari perubahan komposisi asam-asam lemak pendek : butirrat, propionat,asetat dan laktat dalam usus hewan uji tikus yang diberi asupan XOS ?

1.3 Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Secara spesifik penelitian ini memiliki urgensi/keutamaan antara lain meliputi:

(a) *Dari perspektif teoritikal,*

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah khazanah keilmuan dan teknologi terutama bidang ilmu biokimia. Potensi prebiotik dari limbah kulit dan ampas singkong belum pernah dieksplorasi. Penelitian ini akan menyumbang data-data terkait hidrolisis xilan limbah kulit dan ampas singkong. Rangkaian penelitian yang akan dilakukan ini memiliki mata rantai penelitian oleh team peneliti, yang diawali dari penapisan bakteri xilanolitik (Ratnadewi dan Handayani, 2006; Ratnadewi dkk., 2007), isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim wild type endo- β -1,4-D-xilanase (Ratnadewi dan Handayani, 2006, 2007; Ratnadewi dkk., 2007), optimasi produksi XOS (Ratnadewi dan Naqib, 2007) hingga aplikasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang mengarah pada fortifikasi pangan seperti adisinya sebagai improver roti (Ratnadewi dkk., 2007) dan produksi XOS sebagai prebiotik (Ratnadewi dan Handayani, 2007). Tahun 2010, melalui Dana Hibah Bersaing tahun anggaran 2010 telah berhasil mendapat rekombinan enzim β -1,4-D-xilanase melalui proses kloning ke dalam plasmid pET30a dan mengidentifikasi mikroorganisme dari abdominal rayap yang menghasilkan enzim β -1,4-D-xilanase melalui 16sRNA (Ratnadewi dan Ni Nyoman Tri),

namun karakter dari enzim rekombinan endo β -1,4-D-xilanase asal *Bacillus* sp sumber abdominal rayap penelitian masih sedang berjalan. Tahun 2012 melalui Hibah Bersaing penelitian berfokus pada deteksi XOS dengan menggunakan substrat xilan komersil yaitu xilan oat dengan melibatkan peranan endo- β -1,4-D-xilanase nature/alami. Xilooligoaskarida yang dihasilkan dalam bentuk xilotriosa (X3) dan xilotetraosa (X4) hasil dideteksi dengan TLC. Berdasarkan beberapa uraian tersebut maka penelitian yang akan dilakukan yaitu mengaplikasikan endo- β -1,4-D-xilanase pada limbah agroindustri singkong untuk menghasilkan XOS

(b) Dari perspektif praktikal,

Penelitian diharapkan menghasilkan produk XOS yang memiliki aktivitas prebiotik dengan dibuktikan pada uji *in vivo* pada tikus. Produk prebiotik yang dihasilkan diharapkan dapat dijual dengan harga terjangkau oleh masyarakat karena bahan bakunya adalah limbah kulit dan ampas singkong. Penelitian ini juga dapat meningkatkan nilai jual singkong, memberikan nilai ekonomis dari limbah dan mengatasi dampak lingkungan dari limbah kulit dan ampas singkong.

Penelitian ini juga sesuai Rencana Induk Penelitian (RIP) UNEJ pada Tema IV: Ketahanan dan keamanan pangan yang berpadu dengan Tema V: Kesehatan, penyakit tropis, gizi & obat-obatan (*health, tropical diseases, nutrition & medicine*).

(c) Dari perspektif sosial,

Pemanfaatan limbah kulit dan ampas singkong akan dapat menambah nilai ekonomis dari singkong sehingga bisa memberikan pendapatan tambahan pada pengusaha pengolahan singkong. Dampak ikutannya adalah peningkatan harga singkong sehingga menambah pendapatan petani singkong. Peningkatan pendapatan ini setidaknya akan berkontribusi pada pengentasan kemiskinan di pedesaan. Sedangkan XOS yang dihasilkan dapat meningkatkan kesehatan masyarakat dengan menekan prevalensi kanker pencernaan. Dengan banyaknya makanan kurang sehat yang saat ini beredar, prebiotik sangat diperlukan untuk mendukung kesehatan masyarakat. Masyarakat yang sehat akan membuat negara kuat dan sejahtera. Penggunaan limbah juga diharapkan dapat menurunkan biaya produksi sehingga XOS yang dihasilkan dapat dipasarkan dengan harga lebih terjangkau.

(d) *Dari perspektif peneliti,*

hasil penelitian ini diharapkan akan menyempurnakan *novelty* penelitian dan mempertajam *track record* peneliti dalam mengembangkan enzim endo- β -1,4-D xilanase asal abdominal rayap dan potensi prebiotik XOS sehingga dapat dipatenkan dan dibukukan menjadi salah satu teknologi tepat guna prebiotik XOS dari limbah agroindustri singkong. Hasil penelitian akan dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi (jurnal Makara Seri Sains Universitas Indonesia) atau jurnal internasional (*Food Research International Elsevier*) serta desiminasi hasil penelitian pada Seminar Nasional/ Internasional Tahun 2015/2016.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilan

Pada tumbuhan, xilan/hemiselulosa terletak di antara lignin dan kumpulan serat selulosa dibawahnya. Berdasarkan kepadatan struktur kimia dan substitusi gugus sampingnya, xilan tampaknya berselang-seling, berjalin, dan berikatan secara kovalen pada beberapa titik dengan cara melapisi lapisan lignin, seraya membentuk lapisan di sekitar dasar untaian selulosa melalui ikatan hidrogen. Lapisan xilan dengan ikatan kovalen terhadap lignin dan interaksi non kovalen dengan selulosa penting dalam mempertahankan integritas selulosa *in situ* dan membantu melindungi serat terhadap degradasi oleh selulase (Uffen, 1997). Kandungan xilan/ hemiselulosa telah diteliti dari beberapa limbah pertanian seperti limbah batang tembakau, kapas dan gandum (Akpinar, O. & Botanci, S., 2009)

Xilan adalah polisakarida linear yang terdiri dari β -D-(1 \rightarrow 4) xilopiranosida sebagai tulang punggung, dan beberapa variasi gugus fungsional seperti (1 \rightarrow 2)-dan atau (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinofuranosidase, (1 \rightarrow 2)- α -D-asam glukoronik, dan O-2-dan atau O-3-group asetil yang terikat pada tulang punggung. Tipe dan jenis gugus fungsional yang terikat pada xilopiranosida sebagai tulang punggung tergantung pada sumber xilan (Biely, 2003; Saha, 2003; Shallom *et al.*, 2003).

2.2 Enzim Xilanolitik

Enzim xilanolitik merupakan kompleks enzim dengan aksi sinergis dan spesifik terhadap substratnya, yang terdiri dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase (EC. 3.2.1.8), ekso-

β -1,4-*D*-xilosidase (EC. 3.2.1.37), α -*D*-glukuronidase (EC. 3.2.1.1/139), α -*L*-arabinofuranosidase (EC. 3.2.1.55), eksoxilanas (EC. 3.2.1.X), asetil xilan esterases (EC. 3.2.1.6/41/72), dan asam fenolat esterases (EC. 3.2.1.73; asam *p*-kumarat esterases dan asam ferulat esterases) (Saha, 2003; Purchart, 2008 & Rasmussen, *et al.*, 2010).

Salah satu enzim xilanolitik yaitu *endo*- β -1,4-*D*-xilanas merupakan fokus utama penelitian yang akan dilaksanakan ini. *Endo*- β -1,4-*D*-xilanas pada awalnya telah dilaporkan oleh Whistler and Masak Jr. (1955) sebagai pentosanase yang selanjutnya diperkenalkan oleh *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) pada tahun 1961 dengan kode EC 3.2.1.8. *Endo*-1,4- β -*D*-xilanas sering disebut sebagai xilanas, endoxilanas, 1,4- β -*D*-xilanas-xilanolitase, β -1,4-xilanas dan β -xilanas (Collins *et al.*, 2005). Sebenarnya eksistensi xilanas telah dibuktikan oleh Sørensen (1953) yang melaporkan bahwa bakteri tertentu beraktivitas pada xilan untuk memproduksi xilooligosakarida dan xilosa. Enzim *endo*- β -1,4-*D*-xilanas adalah enzim dengan aktivitasnya yang mampu mengkatalisis reaksi *endo*-hidrolisis ikatan β -1,4-*D*-xilosida pada hetero- atau homoxilan dan menghasilkan xilooligosakarida (oligomer xilosa) dan sedikit xilosa. Kloning dan karakterisasi *endo*- β -1,4-*D*-xilanas dari mikroorganisme meliputi bakteri, jamur ragi telah banyak dilakukan (Camona, 1998; Polizeli, 2005; Lu, 2008 and Chen, 2009). Pada saat ini aplikasi dari endoxilanas untuk memproduksi xilooligosakarida mempunyai nilai yang sangat tinggi, khususnya xilobiosa yang ditemukan sebagai stimulator yang efektif untuk pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium* dalam intestinal manusia (Achaury, 2009)

2.3 Xilooligosakarida

Xilooligosakarida yang dihasilkan merupakan salah satu prebiotik oligosakarida yang berbasis xilan (Nakakuki, 2002) dan dapat diproduksi di Indonesia, mengingat Indonesia memiliki sumber biomassa yang berlimpah dan biodiversitas mikroorganisme (Sukara, 2005). Xilooligosakarida merupakan oligomer gula yang tersusun atas unit-unit xilosa. Meningkatnya kepentingan komersial terhadap oligosakarida tak terdigerusi ini terletak pada karakteristik kesehatan yang menguntungkan, terutama aktivitas prebiotiknya. Xilooligosakarida menguntungkan bagi pertumbuhan selektif *Bifidobacterium* spp., yang memiliki efek biologis penting karena mampu menekan aktivitas bakteri intestinal patogen, dan *enteroputrefactive* yang terkait dengan produksi

asam lemak berantai pendek (SCF), serta memfasilitasi absorpsi nutrisi (Alonso *et al.*, 2003; Agostoni, 2004).

Limbah agroindustri yang banyak mengandung material lignoselulosa (LM) saat ini banyak dimanfaatkan untuk memproduksi pangan seperti xilooligosakarida yang telah diproduksi dari beberapa limbah pertanian seperti limbah tebu (Rodrigues, *et al.*, 2010; Song & Wei, 2010), limbah tongkang jagung (Yuan, *et al.*, 2004) dan limbah padat dari industri (Gullon, P., *et al.*, 2011). Pemanfaatan enzim dalam proses hidrolisis substrat xilan dari limbah pertanian untuk menghasilkan xilooligosakarida telah banyak dilaporkan penelitian seperti pemanfaatan endo- β -1,4-D-xilanase dengan β -xilosidase (Anand, A., *et al.*, 2013; Akpınar, O. & Bostancı, S., 2009).

2.4. Kulit singkong dan Ampas singkong

Pohon singkong semua bagian dapat dimanfaatkan mulai dari umbi hingga daunnya. Umbi Singkong biasanya hanya diambil dagingnya dan untuk digoreng atau direbus, sedangkan kulitnya dibuang begitu saja atau di jadikan makanan untuk hewan ternak. Kulit singkong selama ini memang sering disepelekan dan dianggap sebagai limbah dari tanaman singkong. Padahal, kulit singkong ini memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi yang dapat dikonsumsi pula oleh manusia. Presentase jumlah limbah kulit bagian luar sebesar 0,5-2% dari berat total singkong segar dan limbah kulit bagian dalam sebesar 8-15%. Selain itu, kulit singkong juga terdiri dari bahan karbon sebesar 59,31% sehingga dapat dimanfaatkan sebagai karbon aktif. Kulit singkong mempunyai komposisi yang terdiri dari karbohidrat dan serat. Menurut Djaeni (1989), kulit singkong mengandung ikatan glikosida sianogenik yaitu suatu ikatan organik yang dapat menghasilkan racun dalam jumlah 0.1% yang dikenal sebagai racun biru (*linamarin*). Oleh karena itu, pemanfaatan kulit singkong belum terlalu luas. Namun sebenarnya racun tersebut dapat dihilangkan dengan cara menguapkannya atau mengeringkannya pada suhu tinggi.

Limbah padat dari produksi tapioka (singkong) disebut ampas singkong yang merupakan hasil sampingan industri tapioka berbentuk padat yang berasal dari proses ekstraksi. Pada proses ekstraksi ini hasil parutan singkong ditambah air lalu disaring menggunakan kain saring, sehingga diperoleh pati sebagai filtratnya dan ampas yang tertinggal di kain saring. Selama ini ampas singkong hanya digunakan untuk pakan

ternak, padahal beberapa peneliti melaporkan bahwa ampas singkong berpotensi sebagai sumber serat pangan. Salvador *et al.* (2000) melaporkan bahwa ampas singkong mengandung polisakarida non pati yang komponennya terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan pektin. Potensi ampas singkong sangat potensial untuk dibuat suatu produk.

2.5. Hasil Penelitian yang Telah Dicapai

Upaya eksplorasi enzim xilanolitik di Indonesia diawali oleh Tan (1999) yang mengisolasi dan mengkarakterisasi *endo-β-1,4-D-xilanase* dari bakteri xilanolitik termofilik sumber air panas. *Track record* enzim xilanolitik semakin jelas manakala BPPT-Balai Pulp dan Kertas Bandung berinisiatif melakukan uji coba laboratorium dan *miniplan* pemasaran *endo-β-1,4-D-xilanase* di Indonesia (Prabowo, 2004). Fakta bahwa produksi enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* di Indonesia ternyata masih relatif baru adalah hal yang tidak dapat dipungkiri. *endo-β-1,4-D-xilanase* memang belum banyak dikenal dikalangan konsumen, khalayak industri maupun peneliti walaupun aplikasinya sangat luas dan memberikan dampak positif bagi lingkungan (Richana, 2002).

Implementasi introduksi *endo-β-1,4-D-xilanase* di Indonesia akan dapat dilakukan melalui kegiatan penelitian yang diusulkan ini, dimana merupakan kelanjutan serangkaian penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti pengusul. Penelitian awal dalam konteks xilanolitik adalah Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xiloöligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker (Hibah Pekerti 2006-2007 yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional melalui surat perjanjian pelaksanaan hibah penelitian tahun anggaran 2007 nomor : 040/SP2H/PP/DP2M/III/2007 tertanggal 29 maret 2007). Penelitian yang berjangka waktu dua tahun tersebut bertujuan untuk mendapatkan senyawa xiloöligosakarida dari mikroba sistem pencernaan rayap yang akan digunakan sebagai pereduksi resiko kanker usus; sedangkan tujuan khususnya adalah untuk mendapatkan salah satu kelompok enzim xilanolitik yaitu *endo-β-1,4-D-xilanase* murni dan memperoleh data atau informasi ilmiah mengenai karakterisasi enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang telah dimurnikan tersebut. Pada penelitian tahap pertama telah diperoleh satu isolat yang memproduksi enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*. Isolat tersebut merupakan isolat dengan

aktivitas enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* terbesar disamping isolat lainnya (6B, 11K, 11S, dan 11B). Isolat 6K diperoleh melalui beberapa tahap isolasi dan penapisan (pengambilan dan pengenceran cairan intestinal rayap, serta kultivasi), seleksi, dan visualisasi aktivitas xilanolitiknya. Seleksi isolat untuk mendapatkan satu isolat (6K) dilakukan secara visualitatif berdasarkan pengujian menggunakan reagen pewarna (*congo red*) dan kuantitatif dengan membandingkan antara keempat enzim xilanolitik yang lain dengan substrat yang berbeda. Secara kuantitatif, aktivitas enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* menunjukkan aktivitas tertinggi dibanding *β-xilosidase*, *α-arabinofuranosidase*, *α-glukuronidase*, dan asetil xilan esterase. Tahap berikutnya adalah produksi enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* pada media yang mengandung *oat-spelt xylan*. Tahap produksi tersebut dilakukan untuk memperoleh ekstrak kasar enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang selanjutnya dilakukan pemurnian berturut-turut dengan fraksinasi ammonium sulfat, dialisis, kromatografi interaksi hidrofobik, dan kromatografi penukar ion. Pada tahap pemurnian dilakukan optimasi (pemurnian dilakukan dalam skala kecil) yaitu pada tahap kromatografi interaksi hidrofobik. Hal ini penting untuk dilakukan agar pada penelitian tahap kedua diperoleh kondisi optimal pemurnian sebagai tahap pendahuluan untuk produksi dan pemurnian berskala besar. Pada tahap pertama ini juga telah dilakukan karakterisasi enzimatik terhadap enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*. Berdasarkan karakterisasi tersebut berhasil diungkap kondisi optimum kinerja enzim yang meliputi aktivitas spesifik sebesar 6,93 U.mg⁻¹ dengan 10,66 kali tingkat kemurnian interaksi hidrofobik terhadap dialisat dan 1,57 U.mg⁻¹ untuk penukar ion dengan 2,42 kali tingkat kemurnian terhadap dialisat, temperatur dan pH optimum (masing-masing pada 40°C dan 5,0), serta stabilitas termal dan pH-nya (masing-masing selama 4 jam pada 40°C dan pH antara 5,0-8,0). Berat molekul enzim sebagai parameter keberhasilan pemurnian diketahui berkisar antara 45.000 hingga 66.200 Dalton berdasarkan elektroforesis sodium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE) dan zimogram (SDS-Xylan-PAGE).

Pada penelitian tahap kedua, telah dilakukan produksi enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* untuk memperoleh ekstrak kasar enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang selanjutnya dilakukan pemurnian berturut-turut dengan fraksinasi ammonium sulfat, dialisis, dan kromatografi penukar ion. Beberapa tahap pemurnian tersebut telah berhasil meningkatkan kemurnian enzim hingga 2,23 kali. Produk hidrolisis yang

dianalisis berdasarkan penggunaan HPLC menunjukkan bahwa xiloöligosakarida eksis sebagai produk utama disamping xilosa yang jauh lebih sedikit. Hal ini membuktikan bahwa aktivitas *endo*-xilanase dimiliki oleh enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* asal bakteri sistem intestinal rayap. Xiloöligosakarida (XO) sebagai produk hidrolisis enzimatis xilan diaplikasikan sebagai prebiotik melalui asupan suplementasi terhadap diet tikus Sprague-Dawley Jantan. Suplementasi diet harian dengan XO dapat meningkatkan populasi *bifidobacteria*, menurunkan pH *caecum*, yang pada akhirnya akan dapat menghambat perkembangan pra-kanker *colon* pada tikus (Ratnadewi dan Handayani 2006 dan 2007).

Pada penelitian berikutnya yang dibiayai melalui Program Insentif Riset Dasar dari Kementrian Negara Riset dan Teknologi Indonesia (2006-2007) berhasil dilakukan Produksi dan Karakterisasi *endo-β-1,4-D-Xilanase* Rayap dengan Kajian Aplikasinya sebagai Improver Roti. Pada penelitian ini berhasil diungkap beberapa karakteristik enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang diperoleh dari sistem intestinal rayap yang selanjutnya digunakan sebagai *improver* roti. Penggunaan monoenzim ini sebagai *improver* merupakan suatu terobosan aplikasi baru. Hal ini disebabkan masih digunakannya secara massal berbagai jenis aditif non enzimatis serta aditif kombinasi beberapa enzim. Melalui penelitian pengembangan dan aplikasi skala mikro ini, diharapkan *endo-β-1,4-D-xilanase* akan memberikan kontribusi sebagai alternatif aditif yang akan mengambil alih peran seluruh aditif tersebut. Signifikansi penelitian ini tampak dengan adanya upaya menggali potensi bakteri sistem intestinal rayap untuk menghasilkan enzim khususnya xilanolitik. Sistem intestinal rayap mengandung bakteri yang mampu mensekresi enzim xilanolitik yang dalam penelitian ini difokuskan pada enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*. Pada proses isolasi hingga pemurniannya, enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* menunjukkan aktivitas spesifik masing-masing 0,65 U.mg⁻¹ untuk ekstrak kasar, 0,74 U.mg⁻¹ untuk fraksi (NH₄)₂SO₄ 50%, 0,95 U.mg⁻¹ untuk dialisat, dan 1,62 U.mg⁻¹ untuk enzim hasil kromatografi penukar ion. Enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* ini beraktivitas optimum pada pH 5,0 dan temperatur 40°C. Karakteristik protein enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang lain adalah massa molekuler relatif yang dimiliki, yaitu berkisar 45.000-66.200 Dalton. Berdasarkan aktivitas dan karakteristik yang dimiliki, enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* dapat diaplikasikan ke dalam pembuatan roti melalui variasi volume enzim tiap 2500 g tepung terigu yang digunakan, yang meliputi

0,0 ml (kontrol); 12,5 ml; 25,0; 37,5 ml; 50,0 ml; 62,5 ml; dan 25,0 ml inaktif. Hal ini ditandai dengan performa fisikokimia (kadar air, kadar gula reduksi, massa, volume, tekstur) dan organoleptis (porositas, daya simpan, citarasa dan aroma) yang dimiliki roti. Roti yang dihasilkan pada variasi volume enzim 25,0 ml tiap 2500 gram tepung menunjukkan volume kembang, porositas, dan kadar gula reduksi yang lebih baik (Ratnadewi dkk., 2007).

Terkait erat dengan kedua penelitian sebelumnya, maka atas pembiayaan DIPA Tahun 2007-10-27 nomor : 0004.0/023-01.0/-/2007 dari Biro Perencanaan dan Kerjasama Luar Negeri Sekretariat Jenderal Departemen Pendidikan Nasional, berhasil dilaksanakan penelitian mengenai Optimasi Kondisi Produksi Xiloöligosakarida dari *Oat-Spelt Xylan* dan Pengembangan Sistem Deteksinya Secara Kromatografi. Xiloöligosakarida adalah rantai karbohidrat pendek dengan monomer xilosa yang memiliki aktivitas biologis bagi beberapa mikroorganisme flora normal sehingga dinyatakan sebagai prebiotik. Xiloöligosakarida diperoleh dari hidrolisis polimer xilan oleh enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* sebagai salah satu kompleks enzim xilanolitik. Enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang digunakan sebagai penghidrolisis terlebih dahulu ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya masing-masing dengan metode Miller (1959) dan Bradford (1976). Penentuan aktivitas *endo-β-1,4-D-xilanase* berbasis pembentukan gula reduksi yang ekuivalen dengan xilosa. Enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* yang digunakan pada penelitian ini memiliki aktivitas $0,773 \text{ U.ml}^{-1}$ dengan kadar protein $1,971 \text{ mg.ml}^{-1}$. Penelitian yang diajukan ini merupakan pengembangan serangkaian penelitian terdahulu, yang bertujuan melakukan eksplorasi produk hidrolisis xilan oleh *endo-β-1,4-D-xilanase* untuk menghasilkan xiloöligosakarida yang bermanfaat bagi kesehatan. Eksplorasi ini melibatkan perlakuan variabilitas yang meliputi waktu inkubasi reaksi hidrolisis xilan serta penggunaan substrat dengan konsentrasi beragam. Variabel-variabel tersebut ditujukan untuk memperoleh kondisi optimum produksi xiloöligosakarida (derajat polimerisasi 3-8 xilosa) secara kualitatif maupun kuantitatif. Pada hidrolisis xilan dengan variasi waktu inkubasi diketahui bahwa produksi xiloöligosakarida optimum terjadi pada waktu antara 9 hingga 15 jam; sedangkan pada variasi kadar xilan diketahui bahwa hidrolisis xilan dapat terjadi pada kadar xilan $1,256 \text{ mg.ml}^{-1}$ dengan kecepatan reaksi hidrolisis *endo-β-1,4-D-xilanase* yang mencapai $0,545 \text{ μmol.menit}^{-1}.\text{mg}^{-2}$. Produk hidrolisis yang dianalisis berdasarkan penggunaan TLC dan

HPLC menunjukkan bahwa campuran xiloöligosakarida eksis sebagai produk utama disamping xilosa yang jauh lebih sedikit (Ratnadewi dan Naqib, 2007).

Dalam kaitannya dengan produksi xiloöligosakarida dan aplikasinya, ketua tim peneliti pengusul berhasil mendapatkan pembiayaan penelitian dari Indonesia Toray Science Foundation angkatan 14 atas topik produksi xiloöligosakarida melalui hidrolisis oleh enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* dan kajian mengenai aktivitas antibakterialnya terhadap bakteri penyebab gangguan kulit.

Penelitian pendahuluan mengenai identifikasi mikroba dari isolat yang terpilih yang memiliki aktifitas enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* telah dilakukan melalui uji fenotipik dan genotipik (melalui analisis gen 16S rRNA). Tahapan penelitian ini memberikan informasi isolat tersebut dikelompok dalam genus dan spesies. Hibah bersaing tahun anggaran 2010 telah berhasil mendapatkan klon gen β -endoxilanase asal *Bacillus sp* dari mikroorganisme abdominal rayap. Pada penelitian ini telah berhasil mengklon 642 bp gen penyandi enzim β -endoxilanase dimulai dari start kodon (ATG) berakhir di stop kodon (TAA) dalam plasmid pET30a dan telah di sequencing untuk menentukan urutan nukleotidanya. Namun ekspresi enzim rekombinan sedang dilakukan. Hibah Bersaing tahun anggaran 2012 telah berhasil mendapatkan komponen xilooligosakarida jenis X3 dan X4 hasil hidrolisis *endo-β-1,4-D-xilanase* dengan substrat xilan oat hasil deteksi dengan kromatografi lapis tipis (TLC)

Berbasis laporan ilmiah dan hasil-hasil penelitian sebelumnya, maka peneliti pengusul merasa layak untuk melanjutkan penelitian ke arah yang lebih jauh dalam kerangka kompetensi yang progresif berkelanjutan. Topik-topik penelitian yang dipilih sebelumnya yang dengan kata lain berada pada ranah keilmuan. Konsep penelitian yang akan diusulkan ini ke ranah eksplorasi yaitu memproduksi prebiotik xilooligosakarida dari pemanfaatan limbah agroindustri singkong, yang merupakan salah satu komoditas unggulan pemerintah dan Universitas Jember.

2.6 Penelitian yang Akan Dikerjakan

Pada tahun pertama penelitian, ekstraksi limbah agroindustri singkong (ampas dan kulit singkong) untuk mendapat hemiselulosa yang kaya xilan. Selanjutnya memproduksi xilooligosakarida dengan melibatkan *endo-β-1,4-D-xilanase* melalui variasi waktu inkubasi dan variasi komposisi substrat dan enzim untuk mendapatkan

prebiotik xilooligosakarida yang optimum. Mendeteksi produk xilooligosakarida yang dihasilkan melalui deteksi secara kualitatif dengan analisa TLC dan kuantitatif dengan analisa HPLC. Selanjutnya menganalisis aktivitas prebiotik xilooligosakarida secara *in vitro* dengan mengamati pertumbuhan *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*

Pada tahun kedua selanjutnya dapat diaplikasikan secara *in-vivo* melalui hewan coba tikus, yang didesain dengan pemberian xilooligosakarida. Produk fermentasi yang dihasilkan oleh bakteri probiotik akan dianalisis perubahan konsentrasi asam lemak pendek yang dihasilkan (SCF) seperti acetat, butirrat, propianat serta asam laktat dalam hewan coba tikus melalui kromatografi gas. Disamping itu pada penelitian tahap 2 akan mengamati pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* dan *Enterococcus* yang diisolasi dari kolon hewan coba tikus. Disamping itu menghitung berat total cecum dan colon dan pH fecal hewan coba tikus.

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah memproduksi XOS dari limbah agroindustri singkong menggunakan enzim endo- β -1,4-D-xilanase. XOS yang dihasilkan diharapkan bersifat prebiotik dimana mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium sp* dan menekan bakteri intestinal patogen

Tujuan pada tiap tahap penelitian adalah sebagai berikut :

Tujuan penelitian Tahun pertama 2015

1. Menentukan kondisi terbaik atau pre treatment yang diperlukan pada limbah kulit dan ampas singkong untuk hidrolisis xilan menggunakan enzim endo- β -1,4-D-xilanase.
2. Mengetahui berapa kadar XOS yang di produksi limbah singkong dengan menggunakan proses hidrolisis enzim endo- β -1,4-D-xilanase
3. Mengetahui karakter yaitu komposisi XOS yang dihasilkan dengan analisis TLC dan HPLC

Tujuan penelitian tahun kedua 2016

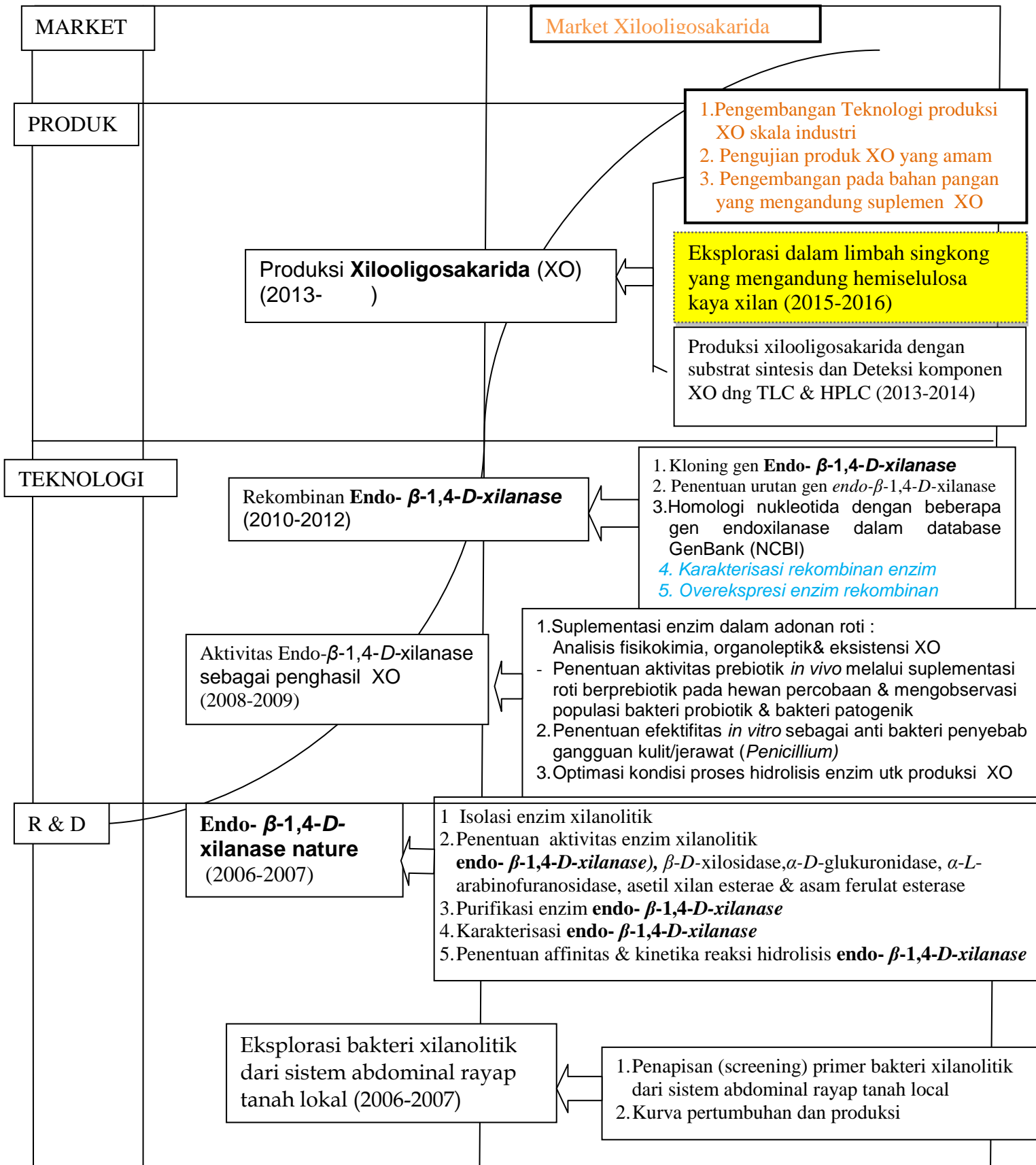
1. Mengetahui pengaruh prebiotik XOS dari limbah kulit dan ampas singkong pada populasi mikrobia seperti *Bifidobacterium*, *Laktobacillus* dan *Enterococcus* dalam usus tikus yang mendapat asupan XOS.
2. Mengetahui pengaruh asupan prebiotik XOS dari limbah kulit dan ampas singkong pada komposisi asam-asam lemak rantai pendek (butirat, propionat,asetat dan laktat) dalam usus tikus.

3.2 Manfaat Penelitian

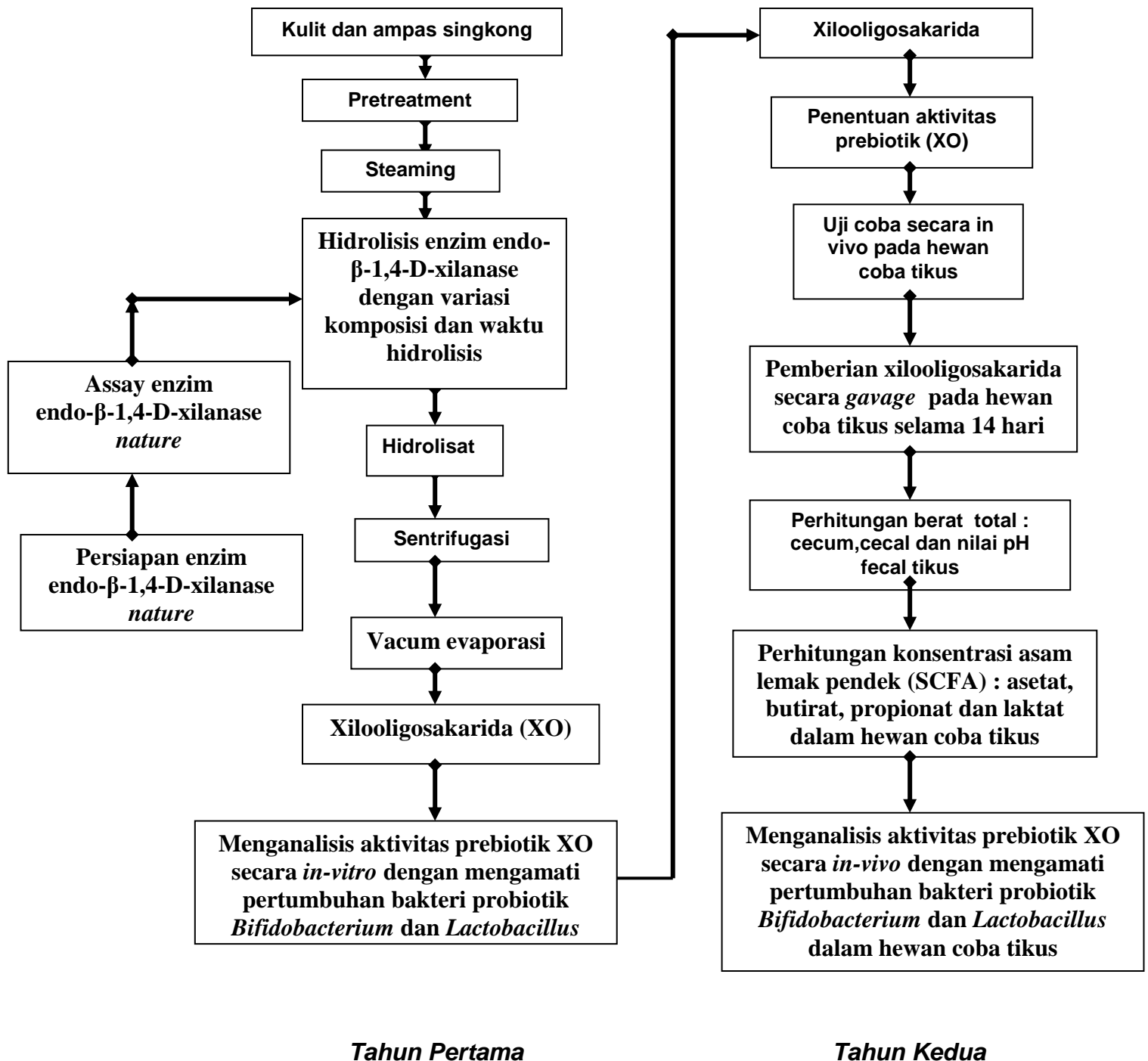
1. Menghasilkan teknologi proses produksi prebiotik XOS dari limbah agroindustri singkong seperti ampas dan kulit singkong.
2. Menghasilkan data yang membuktikan aktivitas prebiotik XOS secara in vivo dalam usus tikus uji.
3. Hasil penelitian akan dipublikasikan pada Seminar Nasional dan Internasional 2015/2016 atau jurnal nasional terakreditasi seperti : jurnal Makara Seri Sains Universitas Indonesia atau jurnal internasional *Food Research International Elsevier*.
4. Teknologi yang dihasilkan dapat dipatenkan sehingga meningkatkan perolehan paten Universitas Jember yang diharapkan berdampak pada peningkatan citra dan pendapatan dari sektor mandiri (RGA) universitas.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Road Map Penelitian Multi Tahun



4.2 Bagan Alir Penelitian



4.3 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Center for Development Advanced of Sciences and Technology (CDAST) Universitas Jember, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember dan LPPT Unit 4 Universitas Gajah Mada.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1. Pre- treatment limbah

Limbah ampas singkong dan kulit singkong diperoleh dari PT mokaf dibersihkan terlebih dahulu. Limbah–limbah tersebut dikeringkan di sinar matahari hingga kadar air mencapai 10-20% (SNI 2007), selanjutnya kedua limbah ampas dan kulit digiling dan diayak dengan ayakan ukuran 80 Mesh, sehingga diperoleh bentuk tepung. Selanjutnya dilakukan *steam* atau pengukusan, tujuan tahapan ini selain proses autolisis, proses ini juga dapat mengurangi bahkan menghilangkan bahan kimia sianida yang terkandung pada limbah kulit singkong. Proses *steam* ini dilakukan pada suhu 120 °C. Selanjutnya produk dari proses steam ini, ditambahkan air dibuat bubur tepung dan siap sebagai substrat yang akan dicampur dengan enzim-*endo-β-1,4-D-xilanase* dalam proses hidrolisis

4.4.2 Persiapan enzim *endo-β-1,4-D-Xilanase*

a. Peremajaan Bakteri Pensекреksi *endo-β-1,4-D-Xilanase*

Koloni tunggal koleksi bakteri pensекреksi *endo-β-1,4-D-Xilanase* diambil dengan ose steril dan ditumbuhkan pada media padat media Luria Bertani (LB). Selanjutnya diinkubasi pada 37 °C selama 16–18 jam.

b. Isolasi *endo-β-1,4-D-Xilanase*

Media inokulum merupakan media cair Luria Bertani (LB). Inokulum dibuat dengan menginokulasikan biakan bakteri yang mengandung *endo-β-1,4-D-xilanase* ke dalam 10 mL media inokulum. Biakan di inokulasi pada temperatur 37 °C dengan kecepatan 150 rpm selama ±16–18 jam. Satu persen biakan inokulum dimasukkan ke dalam 250 mL media produksi. Sel dipanen setelah waktu inkubasi berakhir selama ±16–18 jam, dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 15.000×g selama 10 menit pada 4 °C. Enzim *endo-β-1,4-D-Xilanase* diperoleh dalam supernatan.

c. Penentuan Aktivitas dan Kadar Protein Enzim *endo-β-1,4-D-Xilanase*

Aktivitas enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* ditentukan berdasarkan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan (Sripo *et al.*, 1997; Puspaningsih *et al.*, 2005). Penentuan kadar protein dilakukan menurut metode Lowry *et al.* (1951).

4.4.3 Proses Hidrolisis

Proses hidrolisis ini melibatkan bubur dari ampas dan kulit singkong yang mengandung substrat hemiselulosa yang kaya xilan dengan ekstrak enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*. Proses hidrolisis dilakukan dengan memvariasi masing-masing konsentrasi substrat (bubur ampas dan kulit singkong) dan ekstrak enzim yang digunakan pada temperatur 50 °C selama 10 jam sesuai dengan kondisi optimum proses hidrolisis enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*.

4.4.4 Pemurnian Produk Hidrolisat

Setelah proses hidrolisis secara enzimatik, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm. Tahapan ini mendapatkan supernatan yang mengandung xilooligosakarida, kemudian dikonsentrasikan atau dipekatkan dengan *vacuum evaporation*.

4.4.5 Deteksi Produk Hidrolisat Enzimatis Xilan

Hidrolisat atau produk-produk hidrolisis xilan, termasuk produk xilooligosakarida (derajat polimerisasi 3 hingga 8) dideteksi secara kromatografi melalui penggunaan kromatografi lapis tipis dan kromatografi cairan kinerja tinggi. Pada deteksi ini akan mendapatkan informasi keberadaan xilooligosakarida baik secara kualitatif xilooligosakarida yang dihasilkan melalui TLC dan kuantitatif melalui HPLC

4.4.6 Pengujian Aktivitas Prebiotik Xilooligosakarida

a. Secara *in-vitro*

Assay *in vitro* dilakukan dengan menumbuhkan bakteri probiotik *Bifidobacterium* sp. dalam medium cair BSM (*Bifidus selective medium broth*) dan *Lactobacillus* dalam media cair Ragosa agar, yang telah diinkorporasi xilooligosakarida. Inkubasi *Bifidobacterium* sp. dilakukan dalam kondisi anaerobik menggunakan *oxygen*

absorber selama 2 x 24 jam disertai penggoyangan pada 150 putaran tiap menit (*rotation per minute*, rpm). Suspensi medium tersebut kemudian dilakukan seri pengenceran lebih lanjut. Pembuatan seri pengenceran dilakukan secara duplo yang diawali dengan menyediakan sebanyak 6 atau 7 tabung mikro *Eppendorf* yang telah berisi 900 µl larutan garam fisiologis (NaCl 0,90%) dan diberi label 10^{-1} sampai 10^{-6} atau 10^{-7} . Sebanyak 100 µl pengenceran 10^{-1} diambil dan ditambahkan ke dalam tabung mikro *Eppendorf* I yang telah berisi 900 µl NaCl 0,90% sehingga didapat pengenceran 10^{-2} , demikian seterusnya hingga diperoleh pengenceran 10^{-7} . Hasil pengenceran 10^{-2} hingga 10^{-7} masing-masing diambil sebanyak 30 µl dan disebarlapiskan (*spread-plate method*) pada medium BSM padat (*Bifidus selective medium agar*). Inkubasi *Bifidobacterium* sp. dilakukan dalam kondisi anaerobik menggunakan *oxygen absorber* selama 2 x 24 jam. Jumlah koloni bakteri *Bifidobacterium* sp. yang tumbuh dihitung sebagai jumlah sel dalam satuan *colony forming unit* (CFU) per ml medium cair.

Pada tahap ini akan dihasilkan data berupa besaran jumlah koloni bakteri *Bifidobacterium* sp. yang mampu tumbuh akibat suplementasi fraksi xilooligosakarida ke dalam medium pertumbuhannya. Lebih jauh lagi akan diketahui 1 fraksi xilooligosakarida dengan derajat polimerisasi X yang mampu meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. secara optimum.

b. Secara *in-vivo*

Pengamatan efek *in-vivo* dalam penelitian ini berupa perkembangan jumlah mikroba dalam *cecum* hewan percobaan, berat *colon* dan *cecum* serta pH *fecal*. Disamping itu mengamati produk fermentasi dari bakteri probotik yaitu asam lemak pendek (SCFA) yaitu asam amino butirat, propionat dan asam asetat serta asam laktat. Beberapa tahapan untuk pengujian secara *in-vivo* sebagai berikut :

b.1 Hewan percobaan

Empat puluh mencit jenis Balb/c diberi pakan diet standar selama 6 hari setelah penerimaan. Setiap 4 tikus ditempatkan pada kandang yang memenuhi standar sebagai hewan uji. Penggunaan hewan coba tikus protokolnya ditinjau dan disetujui oleh Laboratorium LPPT unit 4 Universitas Gajah Mada. Lima kelompok tikus pada sekitar usia 6 minggu dengan berat badan 20 g diberi makan dengan diet produk xilooligosakarida yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzim endo- β -1,4-D-xilanase

dengan limbah singkong, sebesar 50 mg/mL. Lamanya penelitian ini adalah 14 hari. Semua percobaan yang sesuai dengan National Pedoman Research Council untuk perawatan dan penggunaan hewan laboratorium Laboratorium LPPT unit 4 UGM). Kelompok kontrol diberi *gavage* fisiologis.

b.2 Koleksi Sampel

Pengambilan sampel pada 14 hari, tikus diberi XO setiap hari. Pada akhir periode percobaan, tikus dibunuh dengan suntikan *intracardiac natrium pentobarbital*. Sebuah garis tengah ventral adalah sayatan dibuat dan *cecum* dan usus besar (*colon*) dipotong. Segera setelah pengangkatan, *cecum* dan *colon*, dengan isi ditimbang untuk menentukan berat total. isi *cecal* dikumpulkan, pH diukur, dan 0,4-g aliquot segera diproses untuk analisis SCFA. sisanya isi *cecal* segera ditempatkan ke tabung uji steril untuk pencacahan bakteri. Setelah penghapusan dari sampel yang tepat, jaringan yang dibersihkan dengan air, diharuskan kering, dan ditimbang untuk menentukan jumlah berat dinding *cecal* dan *colon*.

4.4.7 Analisis SCFA dan analisis laktat

Konsentrasi laktat ditentukan dengan gas kromatografi setelah metilasi dan ekstraksi kloroform dari isi *cecal* (Holdeman et al., 1977). Asam malonat digunakan sebagai standar internal. SCFAs dianalisa dengan kromatografi gas sesuai Jouany (1982) pada supernatan dari dicairkan. Sampel disentrifugasi pada $8000 \times g$ selama 10 menit. 4-Methyl Asam valeric digunakan sebagai standar internal.

4.4.8 Perhitungan Bakteri probiotik

Sampel untuk penghitungan secara umum yang dipilih dari bakteri *cecal* yang serial diencerkan 10 kali lipat dengan anoxic kekuatan seperempat pepton air segera setelah pengumpulan ; 100 ml dari pengenceran yang tepat diinokulasi menggunakan selektif media untuk penghitungan bakteri yang berbeda. Bakteri dihitung ruang oanaerobic ($H_2 : CO_2 : N_2 = 5:10:85$, v / v / v) untuk 24 atau 72 jam yang sesuai . Setelah inkubasi , tunggal koloni dihitung , dan hasilnya dinyatakan sebagai nilai-nilai log dari koloni - forming unit (CFU) per gram berat basah konten *cecal*.

4.4.9 Analisis statistik

Pengujian signifikansi statistik perbedaan dibandingkan dengan salah satu cara analisis varians (ANOVA) . Semua statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS

4.5 Indikator Capaian Penelitian

Beberapa indikator keberhasilan yang akan diperoleh dalam penelitian ini meliputi (a) diperolehnya produk xilooligosakarida dari proses hidrolisis enzim dengan substrat xilan asal limbah ampas dan kulit singkong. (b) Produk Xilooligosakarida mempunyai peran sebagai aktivitas prebiotik dengan mengamati pertumbuhan *Bifidobacterium* dan *Laktobacillus* baik secara *in-vitro* dan *in-vivo* dari usus besar hewan coba tikus dan produk fermentasi yang dihasilkan dengan mengamati perubahan konsentrasi SCFs.

Keseluruhan hasil penelitian ini akan berbentuk laporan ilmiah dan akan diikutsertakan dalam beberapa kegiatan pertemuan ilmiah (seminar, lokakarya, simposium) nasional maupun internasional serta diharapkan dapat memenuhi syarat untuk dipublikasikan secara ilmiah pada jurnal nasional terakreditasi dan Internasional sesuai dengan rencana jurnal yang dituju.

BAB V HASIL DAN KESIMPULAN

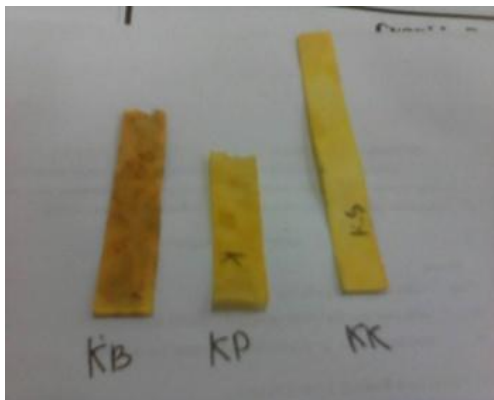
5.1 Pre treatment limbah kulit dan ampas singkong

Kulit singkong yang diperoleh dibersihkan dan dipotong kecil – kecil. Sebanyak 35 gram kulit singkong di rendam selama 24 jam. Setelah direndam, kulit singkong direbus selama 25 menit (untuk menghilangkan enzim linamarase). Kemudian, kulit singkong digiling dan disaring dengan ukuran kurang dari 100 mesh lalu dioven sampai berat konstan, didapatkan berat kering 32,05 gram. Perlakuan 60 gram ampas singkong dioven sampai kering lalu disaring seperti perlakuan kulit singkong, didapat berat kering 20,0 gram

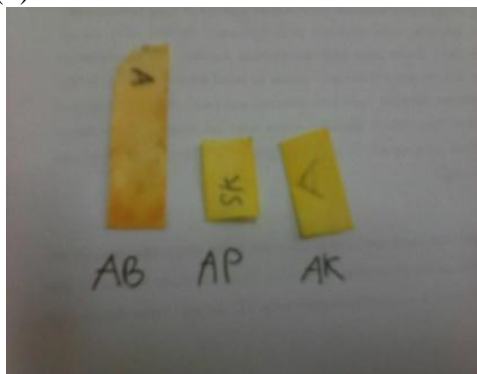
Kulit dan ampas singkong sebelum digunakan sebagai sumber xilan dilakukan pengukuran kadar HCN untuk mengurangi kandungan karsinogen dalam limbah singkong baik pada ampas dan kulit singkong. Pengukuran HCN dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif, secara kualitatif kulit singkong diambil dan dilarutkan dengan air sedikit. Kertas pikrat ditempelkan ke tumbukan kulit singkong tadi. Kemudian

dicocokkan dengan *cyanide test indicator*. Pengukuran secara kuantitatif pengukuran kadar HCN, sebanyak 0,5 gram kulit singkong dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 ml akuades. Selanjutnya kertas pikrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut. Didiamkan selama 30 menit, kemudian sampel diukur dengan spektrofometri UV-Vis pada $\lambda = 510 \text{ nm}$.

Kadar HCN dalam kondisi basah, steaming dan kering dari kulit dan ampas singkong terdeteksi oleh kertas pikrat yang dibandingkan dengan *cyanide test indicator* seperti Gambar 5.1. Ada perbedaan dari warna yang dihasilkan dari keadaan basah, steaming dan kering dari limbah singkong. Kadar HCN mengalami penurunan dari perlakuan steaming dan pengeringan. Data pengurangan kadar HCN setelah 1 sampai 5 hari ditunjukkan dalam Tabel 5.1. Konsentrasi kandungan HCN terjadi penurunan setelah perendaman dan perebusan selama 4 hari, dengan nilai kandungan HCN dibawah grade aman pangan yaitu $< 50 \text{ ppm}$.



(b)



Gambar 5.1 (a) Analisis kualitatif kadar HCN dari kulit singkong dalam kondisi KB (basah), KP (steaming) & KK (Kering). (b) Analisis kuantitatif kadar HCN dari ampas singkong dalam kondisi AB (basah), AP (steaming) & AK (Kering).

Tabel Kandungan HCN dalam kulit dan ampas singkong

Sampel	Kandungan HCN (ppm)									
	Lama Perendaman (hari)					Setelah Perebusan (pada hari ke-)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Kulit Singkong	171,5	131,5	96,2	87,5	71,7	138,2	123,9	67,7	41,9	23,6
Ampas singkong	0,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.2 Endo- β -1,4-D-Xilanase dari *Bacillus sp.*

Endo- β -1,4-D-xilanase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus sp.* dalam abdominal rayap tanah. Koleksi isolat yang memiliki aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase disimpan dalam suhu -80°C pada jangka waktu yang panjang, sehingga isolat bakteri harus diremajakan terlebih dahulu sebelum memproduksi endo- β -1,4-D-xilanase.

Produksi endo- β -1,4-D-xilanase diawali dengan peremajaan isolat bakteri terpilih dalam media padat Luria Bertani (LB) yang mengandung triptofan 1% sebagai sumber nitrogen, NaCl 1% sebagai sumber mineral, yeast 0,5% sebagai sumber senyawa-senyawa organik, dan agar yang berfungsi untuk membentuk struktur padat pada media. Isolat yang telah digoreskan pada media padat diinkubasi selama 17 jam pada suhu 37°C . Isolat bakteri yang berhasil diremajakan membentuk koloni berupa bulatan-bulatan kecil kuning yang tersebar pada goresan media padat. Selanjutnya inokulasi isolat bakteri dilakukan pada media cair yang mengandung xilan oat. Xilan oat 0,5% berfungsi sebagai *inducer* untuk memicu bakteri memproduksi endo- β -1,4-D-xilanase. Medium inokulasi dibuat sebanyak 5 ml yang bertujuan sebagai proses adaptasi bakteri dari kondisi media padat menuju media cair produksi.

Produksi endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan pada 100 ml media produksi dengan komposisi seperti media inokulasi tanpa adanya penambahan xilan. Media produksi berfungsi untuk mendapatkan ekstrak endo- β -1,4-D-xilanase dengan jumlah yang lebih besar. Sebanyak 1% inokulum ditambahkan ke dalam media produksi dan *dishaker*/digoyang selama 17 jam. Bakteri mengalami 2 fase pertumbuhan dalam selang

waktu 17 jam tersebut. Fase pertama disebut fase adaptasi (fase lag) yang terjadi setelah pemindahan bakteri pada media baru. Fase ini disusul dengan fase log, pada fase ini bakteri mengalami pembiakan yang sangat cepat. Bertambahnya jumlah bakteri yang berbiak ditandai dengan meningkatnya kekeruhan pada media produksi. Pada selang waktu lebih dari 17 jam, bakteri memasuki fase konstan (fase stasioner) di mana jumlah bakteri yang berbiak sama dengan jumlah bakteri yang mati. Fase ini disusul dengan fase kematian yang memiliki jumlah bakteri mati semakin banyak (Dwidjoseputro, 2005). Pemanenan endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan pada saat bakteri memasuki akhir fase log dengan cara sentrifugasi media produksi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi mengandung ekstrak endo- β -1,4-D-xilanase.

Ekstrak endo- β -1,4-D-xilanase merupakan enzim ekstrakseluler yang disintesis di dalam sel kemudian disekresikan melalui dinding sel bakteri. Sel-sel bakteri dan sisa xilan yang tidak larut akan terpisahkan dari ekstrak endo- β -1,4-D-xilanase melalui sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Proses sentrifugasi menghasilkan supernatan yang mengandung ekstrak endo- β -1,4-D-xilanase dan pelet yang berupa sel-sel bakteri serta sisa xilan.

Endo- β -1,4-D-xilanase memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan sedikit xilosa. Kemampuan enzim endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghasilkan 1 μ mol xilosa pada kondisi optimum didefinisikan sebagai aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase. Berdasarkan definisi tersebut, maka aktifitas enzim ditentukan dari pembentukan gula pereduksi berupa xilosa sebagai hasil hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan oat. Xilosa yang dihasilkan dapat diukur kuantitasnya dengan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). DNS memberikan hasil 10 kali lebih sensitif dibanding uji nelson-somogyi dan IUPAC telah menyarankan penggunaannya untuk uji gula reduksi pada bidang bioteknologi (Gusakov *et al.*, 2011). Dalam penelitian ini telah dikonfirmasi adanya aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase pada supernatan produksi yang diperoleh melalui pengujian aktivitas terhadap endo- β -1,4-D-xilanase.

Proses penentuan aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase diawali dengan inkubasi bersama substrat xilan oat 0,5% pada suhu 40 °C selama 60 menit di dalam *water bath* (Ratnadewi *et al.*, 2007). Proses inkubasi suhu 40°C bertujuan untuk menjalankan reaksi enzimatik sehingga hidrolisis xilan oat dengan endo- β -1,4-D-xilanase dapat berlangsung.

Setelah proses inkubasi ditambahkan reagen DNS secara berlebih agar semua xilosa yang terbentuk dapat berikatan dengan DNS dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (ANS) berwarna coklat. Penambahan DNS yang bersifat asam secara langsung akan menghentikan proses hidrolisis. Reduksi dari DNS menjadi ANS merupakan reaksi yang tidak spontan pada suhu ruang sehingga diperlukan panas untuk menjalankan reaksi diatas. Campuran enzim-substrat dan DNS dipanaskan selama 10 menit pada suhu 100°C dan didinginkan secara langsung pada air es. Penentuan aktivitas enzim juga didampingi adanya kontrol. Kontrol yang digunakan adalah enzim non-aktif dan diperlakukan sama seperti prosedur diatas. Penggunaan kontrol pada pengujian aktifitas bertujuan untuk meminimalisir adanya aktivitas hidrolisis akibat pemanasan.

Tabel 5.2 Aktivitas spesifik ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase

Nama	V (ml)	A (U/ml)	AT (U)	KP (mg/ml)	KPT (mg)	AS (U/mg)
Ekstrak kasar enzim	50	0,304±0,001	15,2	0,110±0,017	5,5	2,760

V: volume, A: aktivitas, AT: aktivitas total, KP: kadar protein, KPT: kadar protein total, AS: aktivitas spesifik.

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase memiliki kemampuan untuk menghidrolisis substrat xilan oat dengan aktivitas spesifik 2,760 U/mg. Aktivitas spesifik adalah besarnya aktivitas enzim per jumlah protein yang terkandung dalam campuran enzim yang diuji. Aktivitas spesifik menunjukkan ukuran kemurnian suatu enzim.

Berdasarkan hasil tersebut, endo- β -1,4-D-xilanase telah berhasil diproduksi dari isolat *Bacillus sp.* yang ditumbuhkan pada medium LB dengan kandungan sumber karbon, nitrogen, dan mineral. Aktivitas endo- β -1,4-D-xilanase yang telah diperoleh dapat ditingkatkan dengan cara pemurnian dari ekstrak kasar enzim, yaitu melalui fraksinasi amonium sulfat dan dialisis.

5.3 Ekstraksi xilan dari kulit dan ampas singkong

Sebanyak 21,10 gram kulit singkong direndam dengan NaOCl 0,5% selama 5 jam untuk penghilangan lignin. Kemudian hasil rendaman disaring dan dibilas dengan akuades. Penelitian ini juga melakukan tahap tanpa delignifikasi sebagai pembanding

keefektifan proses delignifikasi baik pada kulit dan ampas singkong. Padatan yang diperoleh diredam dengan variasi NaOH 2-16 % selama 24 jam. Kemudian disaring dengan penyaring *Buchner*. Filtrat yang diperoleh dinetralkan dengan menambahkan HCl 6N. Kemudian di sentrifus dengan perbandingan sampel : etanol (1:3). Endapan yang diperoleh merupakan hemiselulosa. Kemudian dioven sampai berat konstan.

Perlakuan NaOH efektif untuk memisahkan xilan dari kompleks lignoselulosa (Tabel 5.3). Setelah overnight perlakuan NaOH, pada kulit singkong dengan perlakuan tanpa delignifikasi, xilan yang diperoleh paling optimum pada kadar NaOH 8% yaitu sebesar 14 % dan pada perlakuan delignifikasi, xilan optimum diperoleh pada kadar NaOH 4% sebesar 6,4 %. Perbedaan perolehan xilan pada perlakuan tanpa delignifikasi kemungkinan adanya komponen lignin yang tercampur. Pada ampas singkong perlakuan tanpa delignifikasi dan delignifikasi, xilan yang diperoleh paling optimum pada kadar NaOH 12% masing-masing xilan yang diperoleh sebesar 47% dan 25 %. Hal ini sama dengan kulit singkong pada tahap delignifikasi perolehan xilan lebih kecil karena pada tahap tanpa delignifikasi ada campuran lignin. Aplikasi NaOH mempunyai peran sangat besar dalam kemampuan untuk melarutkan hemiselulosa dalam kulit dan ampas singkong.

Tabel 5.3 Perolehan xilan dari kulit dan ampas singkong dengan pengurangan HCN

Sampel	Perlakuan	Penambahan NaOH (%)					
		2	4	8	12	14	16
Kulit Singkong	Tanpa Delignifikasi	11,4	13	14	3,4	3	-
	Delignifikasi	5,0	6,4	5,8	5,2	4	-
Ampas Kedelai	Tanpa Delignifikasi	35,6	40,8	42,6	47	19,2	8,6
	Delignifikasi	14,2	17,2	20,8	25	10,2	6,2

Pada Gambar 5.2 produk xilan yang dihasilkan dari proses delignifikasi dan tanpa delignifikasi. Pada kulit singkong nampak warna setelah delignifikasi lebih cerah dibanding tanpa delignifikasi, ini menandakan proses penghilangan lignin berjalan.

Begitu juga untuk ampas kedelai hasil lignifikasi nampak lebih transparan dibanding yang tanpa delignifikasi.



Gambar 5.2 Produk xilan dari (A) Kulit singkong dan (B) Ampas singkong

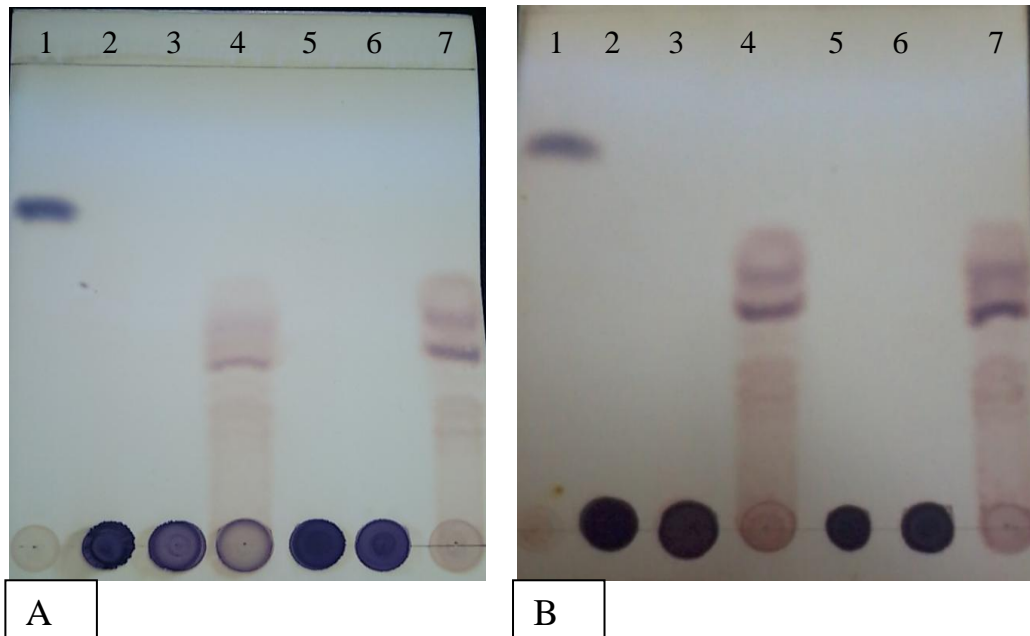
5.4 Komposisi XOS produk hidrolisis enzimatis xilan sumber kulit dan ampas singkong

XOS adalah gula reduksi yang secara kuantitatif dapat diukur dengan metode DNS. Dalam penelitian ini, kami bervariasi konsentrasi substrat xilan dari kulit dan ampas singkong. Seperti terlihat pada Tabel 5.4, total gula reduksi kulit dan ampas singkong pada kondisi delignifikasi lebih tinggi dari tanpa delignifikasi. Ini menunjukkan bahwa walaupun xilan yang terisolasi tanpa delignifikasi lebih besar dari lignifikasi, namun enzim endoxilase akan lebih mudah untuk menghidrolisis substrat yang terdelignifikasi yang ditunjukkan oleh total gula reduksi yang lebih tinggi. Ampas singkong tidak berbeda secara signifikan. Total gula reduksi dari ampas lebih tinggi dari kulit singkong kemungkinan xilan dari kulit singkong lebih sulit untuk dihidrolisis oleh enzim.

Tabel 5.4. Total Gula Reduksi dari Variasi Substrat Xilan dari Konsentrasi Kulit dan Ampas singkong

Sampel	Total Gula Reduksi pada Xilan Dengan Delignifikasi (mg/ml)	Total Gula Reduksi pada Xilan Tanpa Delignifikasi (mg/ml)
Kulit Singkong	2,918± 0,02	1,744± 0,18
Ampas Singkong	3,448 ± 0,02	3,284 ± 0,03

Kromatogram TLC dalam Gambar 5.3 menunjukkan profil diproduksi dari kulit dan ampas singkong. Dalam standar TLC penelitian ini hanya menggunakan standar xilosa, sehingga spot yang ada dibawah xilosa diasumsikan adalah bentuk oligosakarida mulai dari xilobiosa (x2), xilotriosa (x3), xilotetraosa (x4) dan xilopentaosa (x5). Hasil TLC ini akan dilanjutkan ke data HPLC dengan mendapatkan informasi konsentrasi dari masing-masing xilooligosakarida. Sejumlah XOS diproduksi dari kulit dan ampas singkong ditunjukkan oleh spot dibawah spot standar xilosa. Hasil ini konsisten dengan penelitian sebelumnya dengan menggunakan substrat oat spelt xylan yang memproduksi X₅ sebagai produk yang berlimpah. Dalam kromatogram nampak awal penotolan masih terdapat spot yang tebal itu menunjukkan belum semua substrat xilan terhidrolisis oleh enzim dan membutuhkan waktu yang lebih lama lagi dalam proses hidrolisisnya.

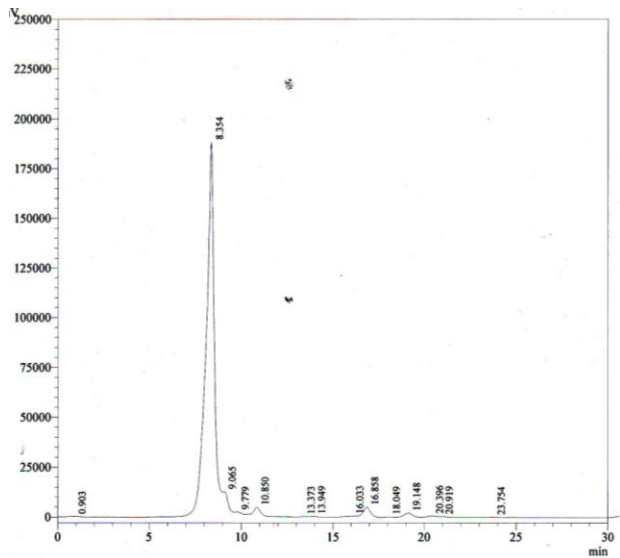


Gambar 5.3 Kromatogram TLC dari produk hidrolisis endoxilanase dengan xilan dari kulit singkong (A) dan ampas singkong (B) pada kondisi 40 °C, pH 5 dan 16 jam. Kondisi (1) standar xilosa, (2) kontrol (substrat delignifikasi), (3) enzim inaktif (delignifikasi), (4) enzim aktif (delignifikasi), (5) kontrol (substrat-tanpa delignifikasi), (6) Enzim inaktif (tanpa delignifikasi), (7) Enzim aktif (tanpa delignifikasi)

5.5 Produksi XOS dan Analisis

Analisis HPLC menunjukkan komposisi XOS dari hidrolisis xilan dari kulit dan ampas singkong oleh enzim endoxilanase dibawah kondisi 40 °C, pH 5 selama 16 jam. Kromatogram HPLC menunjukkan adanya distribusi monosakarida dan XOS hasil

hidrolisis. XOS yang dibentuk secara kuantitatif dihitung dari perbandingan luas peak area dari XOS dengan standar (xilosa, xilobiosa, xilotriosa dan xilopentaosa). Kromatogram HPLC menunjukkan sejumlah XOS meliputi X₁, X₂, X₃ dan X₅. Tidak ada X₂ yang terdeteksi baik dari kulit dan ampas singkong.. Produk dominan adalah X₅ seperti terlihat pada Gambar 5.4. dan Gambar 5.5 Kromatogram HPLC di simpulkan pada tabel 5.5 dan 5.6 dari konsentrasi setiap XOS dari kulit dan ampas singkong.

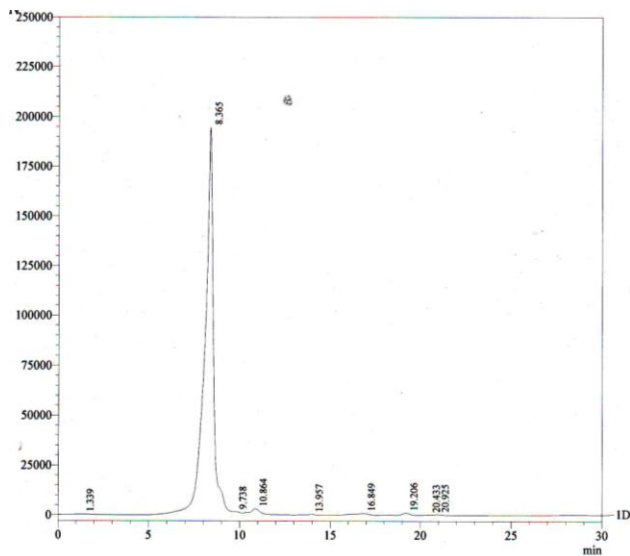


Gambar 5.4 Kromatogram HPLC dari XOS produk hidrolisis xilan dari kulit singkong

Tabel 5.5 Konsentrasi XOS dalam kulit singkong

Xylooligosaccharides	Konsentrasi (ppm)
Xylopentaose (X ₅)	5963.99
Xylotetraose (X ₄)	2.59
Xylotriose (X ₃)	65.55
Xylobiose (X ₂)	ND
Xylose (X ₁)	7.67

ND : Not Detection



Gambar 5.5 Kromatogram HPLC dari XOS produk hidrolisis xilan dari ampas singkong

Tabel 5.6 Konsentrasi XOS dalam ampas singkong

Xylooligosaccharides	Konsentrasi (ppm)
Xylopentaose (X ₅)	5591.15
Xylotetraose (X ₄)	35.17
Xylotriose (X ₃)	89.80
Xylobiose (X ₂)	ND
Xylose (X ₁)	7.43

ND : Not Detection

5.6 Kondisi Waktu Optimum Hidrolisis

Tahap penentuan waktu optimum dengan memvariasi waktu untuk mendapatkan produk hidrolisis (total gula reduksi) yang paling tinggi. Variasi waktu yang dilakukan selama 5 jam, 16 jam, 20 jam dan 24 jam, dengan perlakuan pengurangan HCN dan tanpa pengurangan HCN. Masing-masing tahap tersebut dilakukan juga proses delignifikasi dan non delignifikasi. Total gula reduksi yang optimal yang diperoleh kulit singkong sebesar $3,140 \pm 0,13$ pada proses pengurangan HCN dengan delignifikasi dengan waktu inkubasi selama 20 jam. Pada ampas singkong total gula reduksi yang diperoleh sebesar $3,448 \pm 0,02$ juga pada proses pengurangan HCN dan delignifikasi pada waktu 16 jam (Tabel 5.7 dan 5.8). Dari kedua sampel kulit dan ampas singkong menunjukkan enzim endoxilanas mempunyai waktu yang lebih pendek yaitu 16 jam untuk menghidrolisis xilan dari ampas kedelai dibanding xilan kulit singkong selama 20 jam, hal ini dimungkinkan polimer xilan yang dihasilkan dari kulit lebih kompleks dibanding dari ampas kedelai. Variasi waktu juga didukung oleh hasil kromatogram TLC untuk mendukung bahwa total gula reduksi yang dihasilkan adalah oligosakarida (XOS), yaitu X2, X3, X4 dan X5 yang ditunjukkan oleh spot dibawah xilosa pada semua kromatogram TLC dari kulit dan ampas singkong.

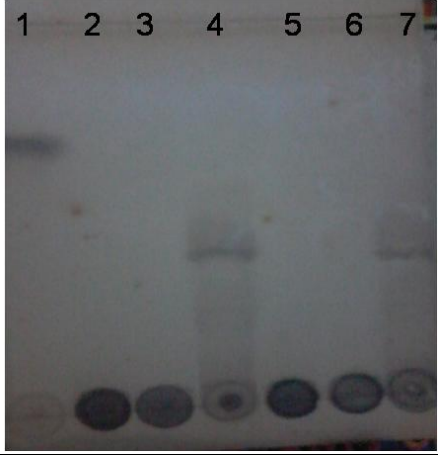
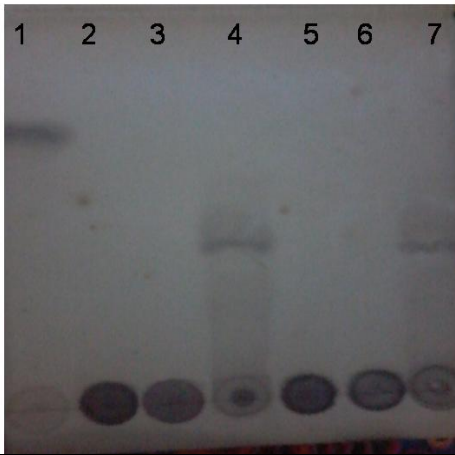
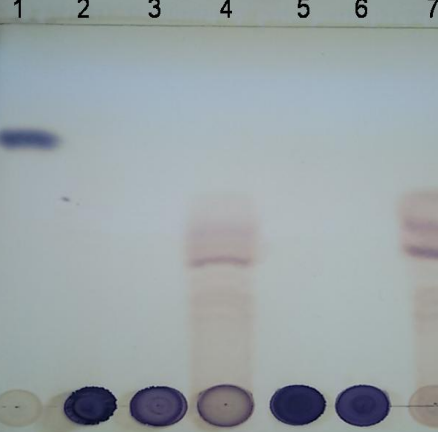
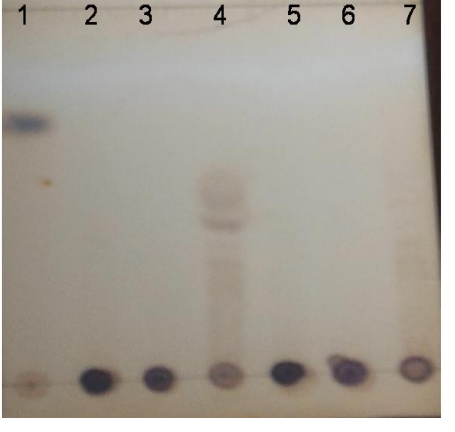
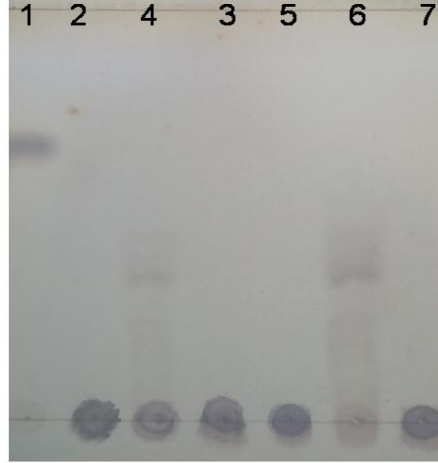
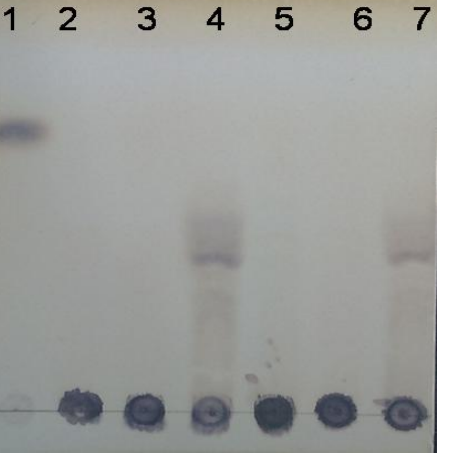
Tabel 5.7 Total Gula Reduksi dalam Produk Hidrolis Xilan dari Kulit Singkong

Sampel Kulit Singkong	Total Gula Reduksi 5 jam		Total Gula Reduksi 16 jam		Total Gula Reduksi 20 jam		Total Gula Reduksi 24 jam	
	Delignifikasi (mg/ml)	Tanpa Delignifikasi (mg/ml)	Delignifikasi (mg/ml)	Tanpa Delignifikasi (mg/ml)	Delignifikasi (mg/ml)	Tanpa Delignifikasi (mg/ml)	Delignifikasi (mg/ml)	Tanpa Delignifikasi (mg/ml)
Dengan Pengurangan HCN	$2,958 \pm 0,02$	$2,585 \pm 0,002$	$2,918 \pm 0,02$	$1,744 \pm 0,18$	$3,140 \pm 0,13$	$2,823 \pm 0,06$	$2,994 \pm 0,006$	$2,793 \pm 0,02$
Tanpa Pengurangan HCN	$2,532 \pm 0,26$	$0,945 \pm 0,18$	$2,485 \pm 0,001$	$0,433 \pm 0,01$	$2,876 \pm 0,14$	$1,955 \pm 0,06$	$2,837 \pm 0,12$	$1,111 \pm 0,15$

Tabel 5.8 Total Gula Reduksi dalam Produk Hidrolis Xilan dari Ampas Singkong

Sampel Ampas Singkong	Total Gula Reduksi 5 jam	Total Gula Reduksi 16 jam	Total Gula Reduksi 20 jam	Total Gula Reduksi 24 jam
Dengan delignifikasi	$3,111 \pm 0,02$	$3,448 \pm 0,02$	$3,104 \pm 0,01$	$3,079 \pm 0,05$
Tanpa delignifikasi	$3,086 \pm 0,04$	$3,284 \pm 0,03$	$3,135 \pm 0,003$	$3,077 \pm 0,02$

Tabel 5.9 Kromatogram TLC pada Variasi Waktu Hidrolisis Xilan dari Kulit Singkong

Variasi Waktu Inkubasi	Pengurangan HCN	Tanpa Pengurangan HCN
5 jam		
16 jam		
24 Jam		

Keterangan : (1) Xilosa, (2) Kontrol substrat delignifikasi, (3) Produk Hidrolisis dengan enzim inaktif (substrat delignifikasi), (4) Produk Hidrolisis dengan enzim aktif (substrat delignifikasi), (5) Kontrol substrat tanpa delignifikasi, (6) Produk Hidrolisis dengan enzim inaktif (substrat tanpa delignifikasi), (7) Produk Hidrolisis dengan enzim aktif (substrat delignifikasi)

Tabel 5.10 Kromatogram TLC pada Variasi Waktu Hidrolisis Xilan dari Ampas Singkong

Variasi Waktu Inkubasi	Pengurangan HCN
5 Jam	
16 Jam	
20 jam	

Keterangan : (1) Xilosa, (2) Kontrol substrat delignifikasi, (3) Produk Hidrolisis dengan enzim inaktif (substrat delignifikasi), (4) Produk Hidrolisis dengan enzim aktif (substrat delignifikasi), (5) Kontrol substrat tanpa delignifikasi, (6) Produk Hidrolisis dengan enzim inaktif (substrat tanpa delignifikasi), (7) Produk Hidrolisis dengan enzim aktif (substrat delignifikasi)

Penelitian ini telah dipublikasi di The International Seminar on Molecular and Cellular Life Sciences: Infectious Diseases, Biochemistry & Structural Biology, MCLS 2015 Surabaya. Artikel ini telah dalam proses accepted untuk di terbitkan dalam Procedia Chemistry Elsevier. Hak Paten sedang diproses dalam pendaftaran PATEN dengan biaya UBER HKI DIKTI 2015

BAB VI RENCANA TAHUN KEDUA DARI PENELITIAN

Rencana penelitian berikutnya akan menguji sifat prebiotik XOS produk hidrolis secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian ini akan melihat pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* terhadap penambahan XOS ditambahkan pada media pertumbuhan. Pengujian secara *in vivo* melalui hewan coba tikus, yang didesain dengan pemberian xilooligosakarida. Produk fermentasi yang dihasilkan oleh bakteri probiotik akan dianalisis perubahan konsentrasi asam lemak pendek yang dihasilkan (SCF) seperti acetat, butirrat, propianat serta asam laktat dalam hewan coba tikus melalui kromatografi gas. Disamping itu pada penelitian tahun 2 akan mengamati pertumbuhan bakteri *Bifidobakterium*, *Lactobacillus* dan *Enterococcus* yang diisolasi dari kolon hewan coba tikus. Disamping itu menghitung berat total cecum dan colon dan pH fecal hewan coba tikus.

BAB VII KESIMPULAN

Dalam penelitian ini xilan telah dapat diisolasi dari limbah singkong yaitu kulit dan ampas singkong sebagai material untuk memproduksi XOS. Endoxilanas dari *Bacillus subtilis* sumber abdominal rayap telah dapat menghidrolisis xilan dari ampas dan kulit singkong untuk menghasilkan XOS dengan variasi polimerisasi seperti X₁, X₃, X₄ dan X₅ sebagai produk dominan. Kondisi optimum yang digunakan oleh enzim untuk memproduksi XOS pada kulit sinkong 20 jam sedang ampas singkong 16 jam.

DAFTAR PUSTAKA

Alonso, J. L., Domínguez, H., Garrote, G., Parajó, J. C., and Vázquez, M^a. J. 2003. Xylooligosaccharides : Properties and Production Technologies. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 2: 230-232.

- Alpinar, O., and Setda Bostanes. 2009. Xylooligosaccharides production from lignocellulosic wastes with *Trichoderma longibrachiatum* xylanase. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(1): 70-74
- Agostoni, C. 2004. Prebiotics in Infant Nutrition. **IFM's Advisory Committee on Child Health and Nutrition, December**, (accessed online from url [http : //www.ifm.net/](http://www.ifm.net/))
- Anand, A., Vikash Kumar and T. Satyanarayana. 2013. Characteristic of thermostable endoxylanase and β -xylosidase of extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. *Extremophiles*, 17: 357-366
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. **Protein Methods (2nd edition)**. New York : Wiley-Liss a John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72 : 248-254.
- Bullock, S. 2005. Xylooligosaccharides Characterization by Aqueous SEC with Evaporative Light-Scattering Detection. **Polymer Laboratories Reader Service the Application Book 15 (March) : 2 / LCGC Europe (March 2) : 2.**
- Carmona, E.C., Brochetto-Braga, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Jorge, J.A. 1998. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiol. Lett.** 166, 311–315.
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS-Microbiology Reviews* 29 : 3-23.
- Chen, L.L., Zhang, M., Zhang, D.H., Chen, X.L., Sun, C.Y., Zhou, B.C., and Zhang, Y.Z. 2009. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresour. Technol.** 100 (21), 5230–5236.
- Ezejiolor, T.I., Uchechi E. Enebaku and Chika Ogueke. 2014. Waste to Wealth- Value Recovery from Agrofood Processing Wastes Using Biotechnology: A Review. *British Biotechnology Journal*, 4(4): 418-481, 2014
- Gullon, P., Maria Jesus Gonzales-Munoz, and Juan Carlos Parajo. 2011. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid waste, **Bioresource Technology**, 102: 6112-6119.
- Hsu, C. -K., Liao, J. -W., Chung, Y. -C., Hsieh, C.-P., and Chan, Y. -C. 2004. Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats. **Journal of Nutrition** 134 : 1523-1528.
- Muhiddin, N.H., Juli, N. & Aryanta, I.N.P. 2001. Peningkatan Kandungan Protein Kulit umbi kayu melalui fermentasi. *Journal Matematika dan Sains*, 6(1) 1-12
- Nakakuki, T. 2002. Present Status and Future of Functional Oligosaccharide Development in Japan. **Pure and Applied Chemistry** 74 : 1245-1251.

- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591
- Pan-Dong Xiao, Fen-qin Chen, Tian-xing Wu, Hong-gang Tang and Zhan-yu ZHAO. 2009. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* 10(4); 258-263
- Rasmussen, L.E., and Anne S. Meyer. 2010. Endogeneous β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase. *Biotechnol Lett.* 37. 1883-1891
- Rastal, R.A., 2011. Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. Annual Review. *Food Science and Technology*, 1: 335-339
- Ratnadewi, A. A. I., dan Handayani, W. 2006. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xilooligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker. **Laporan Penelitian Tahun I Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi.** Jember : Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Ratnadewi, A. A. I., dan Handayani, W. 2007. Produksi dan Karakterisasi enzim β -endoxilanas dari bakteri sistem intestinal Rayap, *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(2). 110-117
- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., Santoso, A. B., dan Idrial. 2007. Produksi dan Karakterisasi *beta*-Endoxilanas Rayap dan Kajian Aplikasinya sebagai Improver Roti. **Laporan Penelitian Program Insentif Riset Dasar.** Jember : Lembaga Penelitian Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanas dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio* 5 : 29-36.
- Roberfroid, M. 2002. Functional Food Concept and its Application to Prebiotics. *Digestive and Liver Disease* 34 : S105-S110.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. Review Paper. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 : 279 -291.
- Salvador, D., Sugama, T., Kithahara, K., Tanoue, H., dan Ichiki, M. 2000. Monosaccharide Composition of Sweet Potato Fiber and Cell Wall Polysaccharide from Sweet Potato, Casava, and Potato Analyzed by The High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection Methode. *J. Agric. Food Chem.* (48):3448-3454
- Smejkal, C., Kolida, S., Bingham, M., Gibson, G., and McCartney, A. 2003. Probiotics and Prebiotics in Female Health. *Journal of the British Menopause Society* 9 : 69-74.
- Sun, H. J., Yoshida, S., Park, N. H., and Kusakabe, I. 2002. Preparation of (1 \rightarrow 4)- β -D-Xylooligosaccharides from an Acid Hydrolysate of Cotton-Seed Xylan : Suitability of Cotton-Seed Xylan as a Starting material for the Preparation of (1 \rightarrow 4)- β -D-Xylooligosaccharides. *Carbohydrate Research* 337 : 657-661.
- Sugumaran, K.R., Boshetty Kiran Kumar, M. Mahalakshmi and V. Ponnusami. 2014. Cassava bagasse - Low cost substrate for thermotolerant xylanase production

- using *Bacillus subtilis*. International Journal of ChemTech Research. 5(1)394-400
- Sørensen, H. 1953. Enzymatic Hydrolysis of Xylan. **Nature 172 : 305-306.**
- Yuan, QP., H Zhang, ZM Qian and XJ Yang. 2004. Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration, **Journal of chemical Technology and Biotechnology**, 79: 1073-1079.
- Sugumaran, K.R., Boshetty Kiran Kumar, M. Mahalakshmi and V. Ponnusami. 2014. Cassava bagasse - Low cost substrate for thermotolerant xylanase production using *Bacillus subtilis*. International Journal of ChemTech Research. 5(1)394-400

LAMPIRAN 1

Biodata Peneliti

1. Peneliti Utama

A. Identitas diri

1. Nama Lengkap	Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S. Si, M. Si
1. Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
2. Jabatan Struktural	-
4. NIP.	197012251997022001
5. NIDN	0025127002
6. Tempat & Tanggal lahir	Denpasar, 25 Desember 1970
7. Alamat rumah	Perumahan Pesona Regensi AF-4 Jember
8. Nomor Telepon/Faks/Hp	-/-/ 0818265665
9. Alamat Kantor	Kampus Tegalboto Jln Kalimantan 37 Jember 68121
10. Nomor Telepon/ Fax	(0331) 334293 / (0331) 330225
11. Alamat email	dewi_pjw2003@yahoo.com
12. Lulusan yang telah dihasilkan	S1 = 25 orang
13. Mata Kuliah yang Diampu	1. Kimia dasar
	2. Biomolekul
	3 Bioregulasi
	4 Biorekasi

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2	S3
Nama Perguruan Tinggi	Airlangga	ITB	Airlangga
Bidang Ilmu	Kimia	Biokimia	Biokimia
Tahun Masuk-Lulus	1991-1997	1998-2001	2009-2013
Judul Skripsi/ Thesis/Disertasi	Proses Koamobilisasi Amilase Dan Glukoisoamilase Untuk Pembuatan Fruktosa	Studi Ekspresi Mutan <i>sup45</i> Hipersensitif Paromomisin Dan Sensitif Temperatur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Karakterisasi dan Identifikasi Domain Katalitik dan Domain Pengikat Substrat β -xilosidase asal <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08
Nama Pembimbing	Ni Nyoman Tri Puspaningsih S.Si, M.Si	Akhmaloka Ph.D	1.Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. 2.Prof. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMk 3. Dr. Zeily Nurachman, D.Sc

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jml (Juta Rp)
1	2006-2007	Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xilooligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker	Hibah Pekerti	75
2	2007	Produksi dan Karakterisasi <i>beta</i> -Endoxilanase Rayap dan Kajian Aplikasinya sebagai Improver Roti	Ristek	100
3	2007	Optimasi Kondisi Produksi Xilooligosakarida dari <i>Oat-Spelt Xylan</i> dan Pengembangan Sistem Deteksi secara Kromatografi	Sekretariat Jenderal Depdiknas Biro Perencanaan dan Kerjasama Luar Negeri	20
4	2008	Identifikasi bakteri xilanolitik asal mikrob sistem abdominal rayap dan overekspresi <i>endo-β-1,4-d-xilanase</i> sebagai produsen prebiotik	Hibah Bersaing	48
5	2009	Pemurnian dan deteksi prebiotik xilooligosakarida serta seleksi kapabilitasnya dalam meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik <i>bifidobacterium</i> sp.	Hibah Bersaing	35
6	2012	Karakterisasi Eksoxilanase Putative Rekombinan asal <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08	Hibah Doktor	40

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jml (Juta Rp)
1	2007	Peternakan Itik dengan Sistem Plasma-Inti sebagai Upaya Pengentasan Kemiskinan di Sentra Peternakan Iptekda LIPI	IPTEKDA	100

		Puger, Kabupaten Jember, Jawa Timur		
2	2013	Pembuatan Briket dari Limbah Biji Kopi	BOPTN Unej	35 Juta

E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor/Tahun	Nama Jurnal
1	2007	Penapisan Bakteri Xilanolitik dari Sistem Intestinal Rayap	2007	Jurnal Teknologi Proses
2	2007	Produksi dan Karakterisasi enzim β -endoxilanase dari bakteri sistem intestinal Rayap	Vol 8/2/2007	Jurnal Ilmu Dasar
3	2013	β -D-Xylosidase from <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08: Biochemical Characterization and Bioinformatics of the Enzyme	Vol 170/4/2013	Jurnal Internasional Applied Biochemistry and Biotechnology, Springer

F Pengalaman Presentasi Oral 5 tahun terakhir

Tahun	Judul	Kegiatan
2008	Isolation and some properties of xylanase from soil-termite guts and influence of enzymes in baking	The Second Gruber – Soedigdo Lecture, ITB 2008
2009	Production and detection of xylooligosaccharides: introducing the use of prebiotic cosmetics	International Conference on Biological Science UGM
2009	Prospek perkembangan enzim xilanase asal bakterisistem abdominal rayap tanah lokal (<i>macrotermesgilvus</i>): suatu kajian di kbi biokimia jurusan kimia fmipa Universitas Jember	Seminar Nasional Bioteknologi Enzym “Tren masa kini dan masa depan “ Univ Atmajaya Jakarta

2009	Hidrolisis <i>oat-spelt xylan</i> oleh enzim xilanase serta deteksi xilooligosakarida secara kromatografi	NasionalSains IPB “Peningkatan Peran Sains dalam pertanian dan Industri”, 2009
2012	Kloning gen endoxilanase dari mikroorganime dalam abdominal rayap	Seminar dan Workshop Bioteknologi Pengujian Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetika, Jember, 8 November 2013
2013	Determination of Phylogenetic Tree of Xylanolytic Bacteria Abdominal System Soil Termite based on 16S rRNA	International Conference Indonesia Chemical Society 2014, Yogyakarta
2014	Produksi dan Deteksi Prebiotik Xilooligosakarida serta Kapabilitasnya dalam Meningkatkan Pertumbuhan Bakteri Probiotik <i>Bifidobacterium</i> sp	Seminar Nasional Bioteknologi Universitas Surabaya

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidak-sesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi. Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Strategis Nasional 2014

Jember, 25 April 2014

Pengusul



(Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si)

2. Peneliti Anggota 1

Identitas diri

1. Nama Lengkap	Erma Sulistyaningsih
3. Jabatan Fungsional	Lektor
4. Jabatan Struktural	-
4. NIP.	197702222002122001
5. NIDN	0022027701
6. Tempat & Tanggal lahir	Banyuwangi, 22 Pebruari 1977
7. Alamat rumah	Pesona Regency Blok AA-22 Jember
8. Nomor Telepon/Faks/Hp	089694995109
9. Alamat Kantor	Fakultas Kedokteran Universitas Jember
10. Nomor Telepon/ Fax	Telp. (0331) 337877 Fax. (0331) 337877
11. Alamat email	sulistyaningsih.fk@unej.ac.id
12. Lulusan yang telah dihasilkan	
13. Mata Kuliah yang Diampu	

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2	S3
Nama Perguruan Tinggi	Brawijaya	Gajah Mada	Germani
Bidang Ilmu	Kedokteran	Bioteknologi	Kedokteran
Tahun Masuk-Lulus	1994-2000	2004-2006	2008-2012
Judul Skripsi/ Thesis/Disertasi		Thesis : Cloning of cDNA Encoding GRA1 Protein of Tachyzoites Toxoplasma gondii Local Isolate	Characterisation of <i>var</i> genes and of the PfEMP- 1 binding capacity to ICAM-1 of <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> isolates from Indonesia
Nama Pembimbing			

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

Tahun	Judul Penelitian	Sponsor	Besar
2010	Molecular Comparison of Variant Surface Antigens (VSA) in Severe Malaria and	DAAD	Eur 2.500

	VSA in Uncomplicated Malaria		
2011	Molecular Characterisation of DBL domain of <i>Plasmodium falciparum</i> var gene and its Binding Capacity to ICAM-1	Friedrich Baur Stiftung-Germany	Eur 7.500
2014	Kloning dan Analisis Sekuen DBL β C2-var gene <i>Plasmodium falciparum</i> sebagai Kandidat Vaksin dan Target Terapi Pencegah Malaria Berat	BOPTN UNEJ	Rp. 35.500.000

E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor/Tahun	Nama Jurnal
1	2013	Diversity of the var gene family of Indonesian <i>Plasmodium falciparum</i> isolates.	2013	Malaria Journal, 12:80. DOI: 10.1186/1475-2875-12-80
2	2010	Diagnostic Difficulties with <i>Plasmodium knowlesi</i> Infection in Humans.	2010	Emerg Infect Dis (EID) 16 (6): 1033-1034 . DOI: 10.3201/eid1606.100022
3	2007	PCR : New Age of Diagnosis and Management of Infectious Diseases. Jurnal Biomedis-FK UNEJ 1 (1).	2007	Jurnal Biomedis-FK UNEJ 1 (1).

F. Presentations (Oral and Poster Presentations)

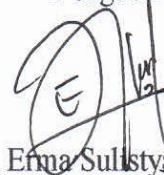
- 15-16.03.2012 DTG/DGP – Jahres Tagung, Heidelberg, Germany.
 “DBL domain expression in *Plasmodium falciparum* from Indonesia”
- 3-6.10.2011 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health, Barcelona, Spain.
 “Expression of variant surface antigens in Indonesian Isolates from severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria patients”

- “Sequence diversity of Indonesian *var* genes of *Plasmodium falciparum* isolates in severe and uncomplicated malaria”
- 11-12.05.2010 DoktaMed 2010, the annually meeting of departments and students of Medical Faculty, LMU, Munich, Germany.
“Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection found in Indonesia”
- 03-05.05.2010 The sixth Annual BioMalPar Conference on the Biology and Pathology of the Malaria Parasite, Heidelberg, Germany.
“Genetic Diversity of DBL α domain of *P. falciparum var* gene in field Isolates from Indonesia”
- 06-07.11.2009 The Tropical Medicine 2009 Conference, the annually meeting of the German Society of Tropical Medicine and International Health (DTG), Munich, Germany
“Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Infection in Human beings, Indonesia”

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidak-sesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi. Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Strategis Nasional 2014

Jember, 25 April 2014

Pengusul



(Dr. Erma Sulistyarningsih)

3. Peneliti Anggota 2

Identitas Diri

Biodata Anggota 2

1	Nama lengkap	Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si
	Jabatan Fungsional	Assisten Ahli
	NIP	197104301998031003
	NIDN	00300471004
	Tempat tanggal lahir	Malang, 30 April 1971
	E mail	agungbsantoso@yahoo.com
	No HP	082230602528
	Alamat kantor	Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember Jalan Kalimantan 37 Jember
	Telepon / Faks	0331 334293/0331 330225
	Lulusan yang telah dihasilkan	23
	Mata kuliah yang diampu	Biokimia, Kimia Dasar, Kimia Lingkungan

	S-1	S-2
Nama Perguruan Tinggi	Universitas Brawijaya	Institut Teknologi Bandung
Bidang Ilmu	Kimia	Kimia
Tahun Masuk-Lulus	1990 - 1997	2000-2003
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Pengaruh konsentrasi enzim papain terhadap hidrolisa daging ikan lemuru (<i>Sardinella longiceps</i> sp.)	Varian C16.223t pada Human MtDNA Sebagai Awal Penentuan Identitas Melalui Suatu Algoritma
Nama Pembimbing	Drs-Hari Utomo	Dr.A. Sjaifuddin Noer.

Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan
1	2007	Produksi dan Karakterisasi <i>beta</i> -Endoxilase Rayap dan Kajian Aplikasinya sebagai Improver Roti	Ristek
2	2007	Optimasi Kondisi dan	Sekretariat Jenderal Depdiknas Biro

		Produksi Xilooligosakarida dari <i>Oat-Spelt Xylan</i> dan Pengembangan Sistem Deteksi secara Kromatografi	Perencanaan dan Kerjasama Luar Negeri
--	--	---	---------------------------------------

Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan
			Sumber
1	2007	Peternakan Itik dengan Sistem Plasma-Inti sebagai Upaya Pengentasan Kemiskinan di Sentra Peternakan Iptekda LIPI Puger, Kabupaten Jember, Jawa Timur	IPTEKDA

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidak-sesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi. Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Strategis Nasional 2014

Jember, 20 April 2014



Agung Budi Santoso S.Si., M.Si.

LAMPIRAN 2

Pelaksanaan Pembagian Tugas

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (Jam/minggu)	Pembagian Tugas
1	A.A.Istri Ratnadewi/ 0025127002	Unej	Biokimia	12 jam/minggu	Ekstraksi pemisahan limbah singkong dan optimasi kondisi untuk menghasilkan XO optimal dan purifikasi XO
2	Erma Sulistyaningsih /0022027701	Unej	Kedokteran	6 jam/minggu	Uji sifat prebiotik baik secara invivo dan in vivo
3	Agung Budi Santoso /00300471004	Unej	Biokimia	6 jam/minggu	Analisis HPLC dan TLC
4	Dulkolim	Unej	Teknisi		Membantu dalam penyiapan bahan dan alat
5	Cahyo	-	Ketua PT Mokaf	-	Penyiapan bahan limbah ampas dan kulit singkong

The International Seminar on Molecular and Cellular Life Sciences: Infectious Diseases, Biochemistry & Structural Biology, MCLS 2015

Application Of Peel and Cassava Waste As Raw Material For Xylooligosaccharides Production Using Endoxylanase From *Bacillus subtilis* Of Soil Termite Abdomen

Anak Agung Istri Ratnadewi^{1,2}, Agung Budi Santoso¹, Erma Sulistyaningsih^{2,3}
and Wuryanti Handayani¹

¹Departement of Chemistry, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Universitas Jember, Jalan Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia

²Center for Development of Advance Sciences and Technology, Universitas Jember, Jalan Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia

³Departement of Faculty Medical, Universitas Jember, Jalan Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia

Abstract

Xylooligosaccharides (XOS) are the sugar produced from xylan hydrolysis. XOS have a characteristic of prebiotic by promoting the growth of probiotic microorganisms. Xylan containing agriculture wastes e.g. rice straw, sugarcane bagasse, corncobs, peel and cassava waste could be applied to produce XOS by consecutively process of alkali-pretreatment and enzymatic hydrolysis. In this study, we emphasized on enzymatic production of XOS from peel and cassava waste, low cost material and relatively high xylan content. The dried peel and cassava waste were ground and sieved to be <100 mesh size, then subjected to pretreatment by soaking in 0.5 % (w/v) sodium hypochloride solution for 5 h to remove lignin in sample. The next stage, the extraction of xylan to treatment by soaking in sodium hydroxide (NaOH) 10 % for 24 h, followed by adjusting pH 7 by adding 5 % (w/v) hydrochloric acid (HCl). Later in centrifugation, the filtrate obtained was precipitated with ethanol (rasio 1:3) and dried at 80 oC for 48 h. NaOH-pretreatment enabled almost 4.83% and 6.23 % recovery of xylan, present in the peel and cassava waste. Xylan from peel and cassava waste were hydrolyzed using endoxylanase (2.21 U/mL) from *Bacillus subtilis* of soil termite abdomen under condition of pH 5 and 50 °C for 15 h. Analyzes by TLC shown production of XOs especially X5 as thickest band. HPLC chromatogram were confirm the most abundant product is X5 in peel and cassava waste. X3 and X4 also founded but no X2. This result not so different with hydrolyzes xylan from oat spelt xylan, but relatively lower yield.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V.

Peer-review under responsibility of the organizing committee of MCLS 2015.

Keywords: Xilooligosaccharides, Peel and Cassava Waste, Endoxylanase Xilooligosaccharides, Peel and Cassava Waste, Endoxylanase

1. Introduction

Cassava is an abundant product in Indonesia, especially in East Java. According to Indonesia Statitiscal Board, in 2013 the production of cassava in Indonesia was 23,824,000 tones and in East Java Province was 3,600,000 tones. Around 16% of weight of cassava is waste such as peel and fiber. These waste products contain water almost 70% and dry weight. Among the dry weight, there are protein 3.5%, crude fiber 10%, lignin 11%, cellulose 14% and hemicelluloses 27%¹. There is also a small amount

of poisonous HCN that is available in food and feed. HCN must be reduced below 10 ppm to make it less poisonous. Cassava wastes are used as bioethanol, compost, cattle feed and food. Hemicelluloses are the second highest content in cassava waste. Bioconversion of hemicelluloses gets high attention because of its benefit in many fields such as generating fuel and chemicals, delignification of paper pulp, clarification of juice, digestibility enhancement of animal feedstuffs in addition to the production of emerging prebiotics, i.e., xylooligosaccharides (XOS)²⁻⁴. Among the available list of prebiotics, only XOS could be produced from the lignocellulosic biomass which is renewable, abundantly available and does not compete with human foods. XOS have demonstrated physiological benefits along with protection against several chronic and infectious diseases⁵. There is a need to identify new raw materials for XOS production in accordance with the growth of prebiotic demands in the near future.

Xylooligosaccharides are sugar oligomers composed by 2-10 units of xylose and considered as non digestible food ingredients⁶. XOS exhibit prebiotic effect when consumed as an agent to maintain and improve a balance intestinal microflora for enhancing health and well-being, such as *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* and hence improves one's health⁷⁻⁸. XOS are produced from various xylan rich agro-residues by physico-chemical, biological, or combination of various processes. XOS are produced from biomass such as wheat straw, rice straw, corncobs, tobacco stalk, sunflower stalk etc. by various methods such as chemical, autohydrolysis, direct enzymatic hydrolysis of susceptible portion, acid hydrolysis, or a combination of the other methods⁹⁻¹¹. Generally, xylan exists as xylan-lignin complex in the lignocellulosic biomass and is resistant to hydrolysis. Therefore, XOS production is carried out in two stages: alkaline extraction of xylan from lignocellulosic biomass followed by enzymatic hydrolysis^{10,12}.

In this research, we used endoxylanase enzyme isolated from *Bacillus* sp of soil termite abdomen. Our former research (unpublished) has tested this enzyme on hydrolyzing xylan of oat spelt xylan that produces xylooligosaccharide. There are xylobiose X2, xylotriose X3, xyloetraose X4 and xylopentaose X5 xilooligosaccharides produced with X5 as dominant product. Considering the potential market demand of XOS in food and pharmaceutical industry, the present study aimed to produce XOS from cassava peel and waste employing indigenous endoxylanase enzyme from *Bacillus subtilis* of soil termite abdomen. Xylan was extracted from cassava peel and waste by dilute alkali treatment and enzymatically hydrolyzed for XOS production.

2. Materials and Methods

All the reagents, media and chemicals used in this research were analytical grades (Qualigens, Hi-media, Merck, Sigma). Xylan from Oat spelt xylan was procured from Sigma, Germany. Standard xylooligosaccharides (X2,X3,X4 and X5) were purchased from Megazyme, Ireland. TLC plates of silica gel 60 F254 were obtained from Merck, Germany. Agro wastes like cassava peel and waste were procured from local farmers.

2.1. Microorganism

Bacillus sp from microorganisms abdomen soil termite was used as an endo- β -1,4-D-xylanase producer and was maintained at -20 °C in glicerol stock.

2.2. Production and partial purification of endo- β -1,4-D-xylanase

Endoxylanase production, the cultured bacteria in LB (Luria Bertani) medium were incubated at 37 °C. The crude enzyme was separated from debris cells by centrifugation at 7,500×g for 30 min at 4 °C. Partial purification of endoxylanase was carried out by adding calculated amount of solid ammonium sulfate (30 - 70%) to the crude endoxylanase with constant stirring at 10 °C. Upon centrifugation at 8500 g for 20 min at 4 °C, the precipitates were dissolved in small volume of 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.3). Enzyme solution was subjected to dialysis for about 18–24 h at 10 °C against 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.3). Endoxylanase and protein assay were carried out at each step of purification. The samples were stored at 4 °C until use.

2.3. Enzyme assays and protein estimation

Endoxylanase (E.C. 3.2.1.8) activity was measured using 1% oat spelt xylan solution as substrate¹³. The release of reducing sugars in 10 min at 50 °C, pH 5.3 (50 mM sodium citrate buffer) was measured as xylose equivalents using dinitrosalysilic acid (DNS) method¹⁴. One unit of xylanase activity (U) is defined as the amount of enzyme liberating 1 μ mol of xylose/min under assay condition.. The soluble protein was determined by Folin's method using bovine serum albumin as standard¹⁵. Protein concentration was determined by the Bradford method¹⁶ using bovine serum albumin as a standard.

2.4. Extraction of xylan from soybean waste

Cassava peel and waste were cut and immersed in water for many hours and several times then rinsed to reduce hydrogen cyanide (HCN) content. Reduction of HCN was also done by steaming after several rinses in water. Concentration of HCN was analyzed in every this step. The material was dried in oven at 65 °C until constant weight. Dry material was mashed in mortar to get powder. Delignitation was done by the addition of 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl) solution then filtration. Cassava peel and waste (100 g) were soaked in 250 ml of 0.5% NaOCl solution at room temperature for an hour to remove lignin and colored materials. After washing with water, the solid material was dewatered by filtration. The delignified wet material was soaked in 10% NaOH at room temperature for 24 h to extract the xylan. After filtration, the filtrate was neutralized with 6 M HCl, the xylan was precipitated using 3 volume of ice-cold 95% ethanol. Then, the precipitated xylan was collected by centrifugation at 8,500 g for 30 min at 10 min at room temperature, the pellet was retained, dried in forced hot air oven at 65 °C until constant weight. The pellet was weighed and powdered in mixer and stored at room temperature for further analysis.

The true yield of xylan was calculated using the following formula:

$$\text{True yield (\%)} = \frac{\text{Dry weight of extracted xylan (g)} \times 100}{\text{Weight of the sample (g)}}$$

The relative yield percent of xylan was derived from percent of true yield and xylan (hemicelluloses) contents of original cassava peel and waste. Hereafter, the best levels

of alkali and its condition were followed to undertake the bulk xylan extraction, analysis, and XOS production.

2.5. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out in the screw cap tubes containing xylan solution from cassava peel and waste with 2.65 U of partially purified endoxylanase (from procedure 2.3). Enzymatic hydrolysis was carried out by incubating the reaction system in water bath at 40 °C with mild shaking. Controls were kept for each reaction in which the enzyme was inactivated by heating. Samples were withdrawn at regular interval of time and subjected for qualitative analysis by Thin-layer chromatography (TLC) and reducing sugars was quantified using dinitrosalysilic acid method (Miller, 1959).

2.6. XOS Production and Analysis

The production of XOS during the enzymatic degradation of cassava peel and waste xylan were detected by TLC on silica plates. The solvent system for TLC was comprised of 1-butanol, acetic acid, and water (2:1:1 v/v) (Kubata *et al.*, 1994). After running of TLC plates for single ascent, XOS was detected through spraying of α -naftol reagents. Xylose, xylobiose, and XOS were used as the reference standards. The enzymatic hydrolysis originated from xylan of cassava peel and waste were analyzed by High performance liquid chromatography (HPLC) using Shim-pack SCR-101N (7,9 mm X 30 cm) column. Aliquots of filtered sample (20 μ l) were injected through the manual injector. The XOS formed during the enzymatic conversion of xylan cassava peel and waste were quantified after comparing the peak areas of XOS with that of standards and expressed as milligrams per milliliter.

3. Results and Discussion

3.1. HCN content

Content of HCN in wet, steaming and dry cassava peel and waste was detected qualitatively by picrate paper and then compared to *cyanide test indicator* as seen in Fig. 3.1. There are differences of the colour from wet, steaming and dry cassava. HCN content was best reduced by steaming and rinsing several times in water and then drying. Picrate paper test is very simple, easy and does not need many instruments, so it is applied well in practical processing. Concentration of HCN was reduced well after immersion and rinse several times in day 1 till day 4. The concentration was still over the allowance limit for food grade. We still explored many processes to reduce HCN efficiently.

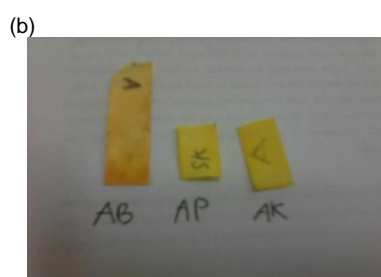
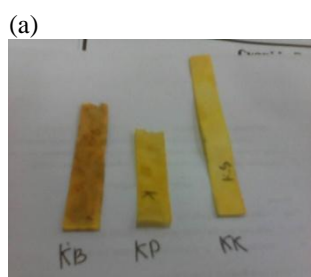


Figure 3.1 (a) Qualitative analysis of HCN from Cassava Peel, KB (wet), KP(steaming) & KK (dry).
 (b) Qualitative analysis of HCN from Cassava Waste, AB (wet), AP(steaming) & AK (dry).

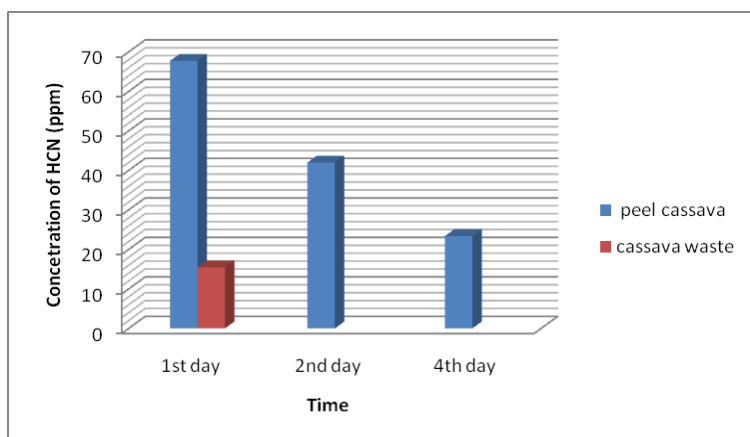


Figure 3.2. Concentration of HCN after immersion in water for days 1 - 4

3.2. Yield of Xylan

In this research, xylan from the cassava peel and waste was extracted through application of NaOH followed by steam treatment or incubation at 25 °C. Material was previously treated with NaOCl 5% to remove lignin. It could be seen that alkali was effective for separating the xylan from the lignocellulosic complex of the cassava peel and waste (Table 1). After overnight incubation, NaOH treatment resulted the yield, approaching 5-6 % of total dry biomass. Xylan is the main hemicelluloses found in the higher plant. Its yield varied depending on the plant and extraction process applied including type of alkali, i.e., sodium, potassium, barium, or calcium hydroxide. There are several methods (organic solvents, dilute acids, enzymes, and water) for removal of xylan from lignocellulosic biomass. Application of NaOH was preferred because of its ability to dissolve hemicelluloses and safe as food processing. Yield of xylan in this research was relatively low compared to hemicelluloses content in cassava that reached 27% of dry mass. From cassava peel, we only got 4.83% and from cassava waste we got 6.23% of xylan as seen in Table 1. The colour and texture of the isolated xylan were different between peel and waste of cassava as seen in Fig. 3.3. It means that there are impurities among them, at least the color compounds.

Table 1. Recovery of xylan from cassava peel and waste

	Cassava Peel (21.10 g)	Cassava Waste (30.0 g)
Concentration of xylan	1.02 g (4.83%)	1.87 g (6.23%)

(a)

(b)



Figure 3.3. product xylan from (a) cassava peel and (b) cassava waste

3.3. Composition of XOS from xylan hydrolysis of cassava peel and waste

Xylooligosaccharides are reducing sugar, that may quantitatively be measure by DNS method. In this research, we varied concentrations of xylan substrate from cassava waste and peel. As seen in Table 2, total XOS as reducing sugar for many substrate concentrations of cassava waste were not significantly different. The production of XOS was conducted with 2.5 U/ml endoxylanase for 10 h at pH 5 and 50 °C. At concentrations of 0.5 – 1.5% cassava waste, total reducing sugar yields were around 14.30 mg/ml. It means the concentrations over 0.5 have no effect on XOS production. We have not yet determined the highest substrate xylan concentration of cassava waste. Limitation of product yield of XOS at similar level (around 14.3 mg/ml) indicates inhibition by product to the responsible enzyme. Further research must be done to clarify and get specific character of this inhibition. Production of XOS from cassava peel at concentrations of 0.5 – 1.5 % increased from 5.63% to 13.69%. XOS Production from cassava peel was lower than that from cassava waste at similar concentration of substrate. It indicates that xylan concentration in cassava peel is lower than that in cassava waste or more difficult to hydrolyze by enzyme.

The TLC chromatogram in Fig 3.4 present XO profile was produced from cassava peel and waste. The most XOS product was X5 as seen as a thick spot in the similar retention time (RT) with standard. The result was consistent with former research done with substrate oat spelt xylan which produced X5 as abundant product. There was also a spot in track of cassava peel and cassava waste which indicated longer chain of hemicellulose that was probably not cut well by the enzyme.

Tabel 2. Total Reducing Sugar from variation concentration substrat peel & cassava waste

Substrate	Concentration Substrate (%)	Total Reducing Sugar (mg/ml)
Cassava Waste	0.5	14.28
	1.0	14.30
	1.5	14.31
Cassava Peel	0.5	5.63
	1.0	10.55
	1.5	13.69

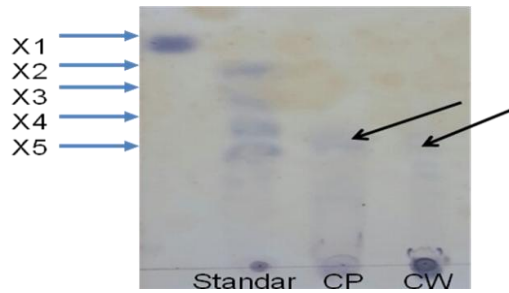


Figure 3.4 Thin layer chromatogram of product hydrolysis endoxylanase with CP (Cassava Peel) & CW (Cassava Waste) in 40 °C, pH 5

3.4. XOS Production and Analysis

HPLC analysis shows composition of XOS from xylan hydrolyzing of cassava peel and waste by endoxylanase enzyme under condition 40 °C, pH 5 for 10 h. The chromatography of the monosaccharides and XOS indicated the the percentage distribution sugar in hydrolysate. The XOS formed was quantified by comparing the peak area of XOS with the standars (xylose, xylobiose, xilotriose, xilotetraose and xilopentaose). HPLC chromatogram shows the amount of XOS includes X1, X3, X4 and X5. There were no X2 detected both from cassava peel and waste. Dominant product is X5 as seen in Fig.3.5. The chromatogram summarizes the concentrations of every XO from Cassava peel and waste in Tables 3 and 4.

Tabel 3. Data HPLC to Peel Cassava

Xylooligosaccharides	Concentration (ppm)
Xylopentaose (X5)	5963.99
Xylotetraose (X4)	2.59
Xylotriose (X3)	65.55
Xylobiose (X2)	ND
Xylose (X1)	7.67

ND : Not Detection

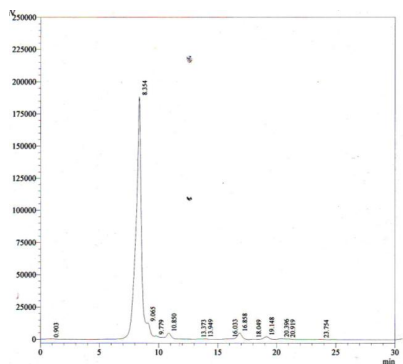


Figure 3.5 Kromatogram HPLC of hydrolysis xylan from (a) peel cassava (Peak correspond to elution of standards of X1 xylose, X3 xylotriose, X4 xylopentaose and X5 xylopentaose)

Tabel 4 Data HPLC to Cassava

Xylooligosaccharides	Concentration (ppm)
Xylopentaose (X5)	5591.15
Xylotetraose (X4)	35.17
Xylotriose (X3)	89.80
Xylobiose (X2)	ND
Xylose (X1)	7.43
ND	Not Detection

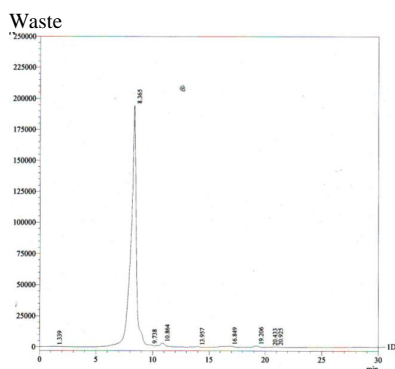


Figure 3.5 Kromatogram HPLC of hydrolysis xylan from (a) waste cassava (Peak correspond to elution of standards of X1 xylose, X3 xylotriose, X4 xylopentaose and X5 xylopentaose)

4. Conclusion

In this study, xylan which has been isolated from cassava peel and waste can be used as a raw material for XOS production. Endoxylanase from *Bacillus subtilis* of soil termite abdomen over the xylan of peel and cassava waste generates XOS in different degrees of polymerization including X1, X3, X4 and specifically X5 as a dominant product. Further research will determine the optimal conditions which include pH, temperature and time of incubation to obtain the maximum concentration of XOS and will further elucidate their role as a gastrointestinal health guard.

5. Acknowledgements

This research was partially supported from the Directorate General of Higher Education, Ministry of Education and Culture, the Republic of Indonesia through *Hibah Strategis Nasional* Program to A.A. Istri Ratnadewi (2015), Center Development Advanced Science Tehnology (CDAST) University of Jember and the students of Chemistry Department Faculty of Mathematic and Natural Sciences who participated in data collection.

References

1. Babayemi OJ, Ifut OJ, Inyang UA, Isaac LJ. Quality and chemical composition of cassava wastes ensiled with Albizia saman Pods. *Agricultural Journal* 2010; 5(3): 225-228
2. Saha BC. Hemicelluloses bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003; 30: 279-291.
3. Aachary AA, Prapulla SG. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011;10: 2-16.
4. Samanta AK, Senani SS, Kolte AP, Sridhar M, Sampath KT, Jayapal N. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food and Bioproducts Processing* 2012; 90: 466-474.
5. Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. Traditional plants as source of functional foods: a review. *CyTa Journal of Food* 2010; 8: 159-167.
6. Manisseri C, Gudipati M. Bioactive Xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *LWT-Food.Sci.Technol* 2010; 43: 421-430
7. Vazquez, MJ, Alonso, JL, Dominguez, H, Parajo, JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends. Food Sci. Technol* 2000; 11: 387-393.
8. Manisseri C, Gudipati M. Bioactive Xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *LWT-Food.Sci.Technol* 2010; 43: 421-430
9. Parajo, JC, Garrote, G, Cruz, JM, Domínguez, H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.* 2004; 15: 115-120.
10. Yoon, KY, Woodams, EE., Hang, YD. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. *LWT-Food Sci. Technol* 2006; 39: 387- 391.
11. Tan, SS, Li, DY., Jiang, ZQ, Zhu, YP, Shi, B, Li, LT. Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritime* xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. *Bioresource Technol* 2008; 99: 200-204.
12. Akpınar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yılmaz, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. *J. Agric. Food Chem* 2007; 55: 5544-5551.
13. Bailey, P, Vrsanska, M, Tenkanen, M, Kluepfer. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J.Biotechnol* 1997; 57,151-166
14. Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determining reducing sugars. *Anal. Chem* 1959; 31:426-428.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 31:426-428.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.

**DRAF PATEN (No pendaftaran Paten 00201508101 Kementrian Hukum dan hak
Asasi Manusia RI Direktorat Jenderal Hak Kekayaan Intlektual**

Deskripsi

**ENZIM β -1,4-D ENDOXILANASE ASAL *Bacillus sp.*
DALAM ABDOMINAL RAYAP TANAH SEBAGAI PENGHASIL PREBIOTIK
XILOOLIGOSAKARIDA**

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan enzim endo- β -1,4-D xilanase dalam mikroorganisme, yaitu *Bacillus sp.* yang hidup pada abdomen rayap tanah. Lebih khusus lagi enzim ini memiliki kemampuan menghasilkan produk prebiotik dari hasil hidrolisis dengan substrat xilan berupa hasil pertanian lokal Indonesia dan limbah agroindustri ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai.

Latar Belakang Invensi.

Selama ini, enzim yang digunakan dalam industri pangan di Indonesia masih diimpor dari negara lain, sehingga berimbas devisa negara dan harga produk yang mahal. Prebiotik xilooligosakarida misalnya, akan menjadi mahal karena enzim yang digunakan masih impor dengan harga tinggi. Apabila kita dapat memanfaatkan potensi kekayaan hayati Indonesia dalam hal ini enzim endo- β -1,4-D-xilanase maka produk prebiotik xilooligosakarida dapat ditekan biaya produksinya dan dipasarkan dengan harga yang dapat dijangkau masyarakat luas.

Enzim endo- β -1,4-D-xilanase (EC 3.2.1.8, β -1,4-D-xilanase) dikenal sebagai xilanase, endo 1,4- β -D-xilan hidrolase, endoxilanase, β -1,4-D-endoxilanase, dan β -

xilanase (Collins *et al.*, 2005; Purich & Allinson, 2000). Xilanase tergolong dalam enzim glikosil hidrolase yang mengkatalisis pemutusan ikatan glikosida pada oligosakarida dan polisakarida. Beberapa bentuk dari xilanase antara lain endoxilanase dan eksoxilanase.

Endo- β -1,4-D-xilanase umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, actinomycetes, ragi (yeasts) dan fungi, namun ada juga yang dihasilkan oleh tumbuhan dan hewan (Subramaniyan & Prema, 2002). Endo- β -1,4-D-xilanase dari sumber satu dengan sumber lainnya memiliki karakteristik yang berbeda. Karakteristik enzim meliputi pH dan suhu optimum, stabilitas pH dan suhu, serta adanya pengaruh logam terhadap aktivitas enzim. Endo- β -1,4-D-xilanase yang dihasilkan oleh *Aspergillus awamori* stabil pada kisaran pH 4,0 - 5,0, dengan suhu optimum 45 - 55°C (Kormelink *et al.*, 1993). Endo- β -1,4-D-xilanase yang dihasilkan dari *Geobacillus* sp. TC-W7 stabil pada kisaran pH 5,2 - 10,2, dengan suhu optimum 70°C serta aktivitasnya meningkat dengan kehadiran ion Li⁺, Na⁺ dan K⁺ (Bin *et al.*, 2012). Endo- β -1,4-D-xilanase dari *Penicillium citrinum* stabil pada pH 8,5 dan suhu 50°C (Dutta *et al.*, 2006) dan endo- β -1,4-D-xilanase dari *Streptomyces* sp. stabil pada pH 6,0 - 8 dan suhu 55 - 60°C (Georis *et al.*, 2000). Endo- β -1,4-D-xilanase digunakan dalam berbagai industri seperti industri kertas, pakan ternak dan roti, selain itu juga industri juice dan bir.

Pada tahun-tahun ini, perhatian khusus untuk penggunaan endo- β -1,4-D-xilanase adalah perlakuan dalam biomassa. Lebih spesifik, endo- β -1,4-D-xilanase digunakan sebagai enzim untuk mendekomposisikan (menghidrolisis) limbah agroindustri untuk memproduksi alkohol, perlakuan enzimatik untuk melepaskan gula pada pakan ternak, khususnya perlakuan enzimatik untuk pemutih kertas, yang

dapat meningkatkan kualitas kertas dan penurunan penggunaan klorin sebagai bahan kimia pemutih kertas. Kemampuan menghasilkan xilosa dan oligosakarida dari hidrolisis substrat xilan oleh endo- β -1,4-D-xilanase dan lebih luas digunakan sebagai bahan baku untuk makanan dan obat-obatan. Xilooligosakarida juga produk hidrolisis xilan diharapkan dapat digunakan sebagai pemanis dan prebiotik. Xilooligosakarida merupakan jenis prebiotik yang memiliki potensi besar untuk dimasukkan ke banyak produk makanan. Xilobiosa (xilooligosakarida dengan DP 2) mempunyai tingkat kemanisan yang setara dengan 30% sukrosa. Sebagai bahan makanan, xilooligosakarida tidak berbau, non-karsiogenik dan rendah kalori (Kumar *et al.*, 2012). Kemampuannya dalam menstimulus secara selektif pertumbuhan bakteri *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* dalam usus dapat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap patogen (Zhou *et al.*, 2009).

Untuk penggunaan pada tujuan tersebut di atas, perlu mempersiapkan xilanase yang cocok bagi produksi massal dengan bahan baku murah. Enzim xilanase tersebut sebaiknya memiliki stabilitas asam, alkali dan / atau panas. Sampai saat ini, beberapa endo- β -1,4-D-xilanase telah diisolasi seperti: *Trichoderma longibrachiatum*, jenis jamur ini mampu menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase untuk memproduksi xilooligosakarida dari berbagai macam sumber xilan seperti: tangkai kapas, tangkai tembakau dan tangkai gandum (Akpinar & Boctanci, 2009), *Thermoascus aurantiacus*, mikroorganisme menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghidrolisis substrat xilan dari ampas tebu (*Surgarcane Bagasse*) untuk menghasilkan xilooligosakarida (Brinzo *et.al.*, 2010), *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, mikro organisme ini mampu menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase untuk memproduksi xilooligosakarida yang eksklusif yaitu X2 (Kubota *et.al.*,

1994), *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 mampu menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan sumber tongkol jagung memproduksi xilooligosakarida (Boonchuay, P & Chaiyaso, T., 2012), *Bacillus halodorans*, mikroorganisme menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan dari pabrik limbah kertas mampu memproduksi xilooligosakarida (Kumar, V & Satyanarayana, T, 2011).

Beberapa invensi yang berkaitan dengan enzim endo- β -1,4-D-xilanase telah dihasilkan, yaitu:

- a. WO 1996002632 A1, dengan judul "*Novel xylanase, process for producing the same, method for the treatment of pulp, and production of xylo-oligosaccharides*". Penemuan novel xilanase, proses produksi enzim, mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim, metode treatment untuk pemutih kertas dengan enzim xilanase dan produksi xilosa dan xilooligosakarida
- b. EP 0353342 A1, dengan judul "*Low molecular weight xylanase glycoprotein*". Endo-xilanase dengan berat molekul rendah diisolasi dari actinomycetes strain Chainia. Enzim ini mempunyai aktivitas spesifik terhadap xilan dan mampu mengubah oligosakarida dan enzim ini tidak mempunyai aktivitas selulose
- c. WIPO 102268419 dengan judul "*Method for preparing endoxylanase*". Penemuan metode untuk menyiapkan endoxilanase dari limbah agricultural seperti corn cobs sebagai material melalui fermentasi mikroba. Endoxilanase dimurnikan melalui metode kimia, endoxilanase ini dapat memproduksi sedikit xilosa dan polimerisasi derajat 2-5, yang dapat digunakan untuk industri produksi XO
- d. WIP010215866, dengan judul "*New xylanase, its production and its use for treatment of pulp and production of xylooligosaccharides*". Invensi ini berhubungan dengan

new enzim yang mempunyai aktivitas xilanase yang mampu menghidrolisis ikatan 1,4 xilosida. Enzim ini stabil terhadap panas (90°C), kerja pada rentang pH yang luas (2,6 - 9,6) dan dapat digunakan untuk treatment pemutih kertas dan produksi xilooligosakarida. Enzim ini diproduksi dari *Bacillus sp.*SD902 (FERM P-13356)

- e. WIPO1020150001167, dengan judul "*Xylanase-active enzyme cell10-cbm6-kg60 gene derived from rumen microorganism from black goat and uses thereof*". Invensi ini berhubungan dengan penemuan xilanase baru yang diisolasi dari rumen mikroorganism dari domba hitam. Enzim ini tidak hanya dikembangkan untuk bahan tambahan pada pakan ternak juga dikembangkan untuk agen deterjen serta untuk produksi biofuel.
- f. WIPO103993025 dengan judul "*Xylanase coding gene with excellent heat resistance and specific activity and application thereof*". Penemuan ini xilan yang dibuat mutan, adanya penggantian pada G200C melalui metode PCR. Performa dari mutan xilan ini berubah dari *wild type*nya seperti: kekuatan panas yang semakin meningkat, pH toleran semakin luas dan aktivitas enzim meningkat. Mutan xilan ini dapat digunakan untuk menghidrolisis hemiselulosa dan menghasilkan xilooligosakarida.
- g. WIPO103756988 dengan judul "*Endo-beta-1,4- xylanase*". Invensi ini berhubungan dengan novel endo-beta-1,4-xilanase dari *Aspergillus niveus* dan *Aspergillus niger*. Karakteristik enzim ini adalah aktivitas enzim 1100 U/mL, pH optimum 5.5, suhu optimum 60 °C. endo-beta-1,4-xilanase dapat digunakan sebagai aditif pakan, dan membantu untuk meningkatkan konsumsi pakan dan penambahan berat badan ayam broiler, meningkatkan tingkat pemanfaatan energi dan tingkat pemanfaatan

protein pakan, menyimpan sumber daya gandum dan biaya pembibitan, dan meningkatkan manfaat produksi.

- h. WIPO102174494 dengan judul "*Marine cryophilic endo beta-xylanase XynB as well as expressing gene xynB and application thereof*". Invensi ini berhubungan dengan a marine cryophilic endo beta-xylanase XynB baik ekspresi dan aplikasinya. Enzim ini mempunyai efisiensi katalitik yang tinggi dan dapat diaplikasinya untuk pemutih kertas, produksi xilooligosakarida dan modifikasi tepung pada suhu kamar dan memastikan bahwa langkah pemanasan dalam proses tradisional dihilangkan sehingga dapat menghemat energi.
- i. WO 2001096531 A1 dengan judul "*Novel Streptomyces sp. wl-2 strain producing xylanase*". Penemuan ini berhubungan dengan strain *Streptomyces sp.* WL-2 memproduksi xilanase, dibandingkan dengan sumber dari tanah. Identifikasi dari strain ini mengandung media α selulosa dan maltosa atau oat spelt xylan.
- j. WO 2013024909 A1 dengan judul "*Novel Paenibacillus sp. hpl-001 strain for producing highly active xylanase having heat resistance and a wide ph range, novel xylanase enzyme isolated therefrom, and method for mass-producing same using a transformant thereof*". Invenzi ini berhubungan dengan strain novel *Paenibacillus sp.* Dan novel protein yang diisolasi dari strain ini. Strain ini memproduksi xilanase dengan aktivitas yang tinggi, ring pH yang luas dan hal yang terpenting digunakan untuk pengembangan biofuel dan material fungsional, biopolimer, pakan ternak.

Perbedaan invensi yang dipaparkan diatas dengan invensi ini adalah dalam hal sumber enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang dihasilkan berasal dari mikroorganisme dalam

abdominal rayap tanah, dan kemampuan enzim untuk memproduksi xilooligosakarida (XOS) yaitu xilopentaosa (X5) sebagai produk yang dominan, selain itu xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) dan sedikit xilosa (X1).

Invensi ini berhasil mengisolasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase dari mikroorganisme dalam abdominal rayap tanah. Telah dilakukan juga pemurnian, karakterisasi, identifikasi, pembacaan urutan DNA dan asam amino serta aplikasi pada berbagai substrat seperti *oat spelt xilan*, tepung terigu, limbah ampas kedelai, limbah kulit dan ampas singkong. Pembuktian fungsi prebiotik juga sudah dilakukan dengan pembuatan roti berbahan tepung terigu yang diperlakukan dengan endo- β -1,4-D-xilanase. Roti kemudian diasupkan pada hewan uji yaitu tikus yang sudah disuntik karsinogen. Bintil kanker pada lambung tikus dibandingkan dengan kontrol dan diperoleh penurunan signifikan jumlahnya. Pengamatan biakan bakteriologi isi perut tikus juga menunjukkan peningkatan bakteri baik seperti *Bifidobacterium* dan penurunan bakteri patogen.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini menghasilkan enzim endo- β -1,4-D-xilanase dari mikroorganisme, yaitu bakteri genus *Bacillus* sp dalam abdominal rayap tanah. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang dihasilkan mempunyai temperatur dan pH optimum masing-masing 40 °C dan 5,0 serta stabil pada 40 °C selama 6 jam pada pH 5,0 dan memiliki kisaran pH 5-8. Protein enzim endo- β -1,4-D-xilanase memiliki berat molekul berkisar 45.000 hingga 66.200 Dalton. Gen penyandi enzim endo- β -1,4-D-xilanase berhasil teramplifikasi dengan ukuran \pm 600bp menggunakan teknik PCR. Sekuensing rekombinan yang diperoleh adalah fragmen gen endo-1,4- β -xilanase yang

mempunyai tingkat homologi sebesar 99% terhadap gen endo-1,4- β -xilanase famili 11 dari *GenBank*.

Kemampuan enzim endo- β -1,4-D-xilanase dapat mendekomposisikan xilan yang bersumber dari limbah agroindustri seperti ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai untuk menghasilkan prebiotik xilooligosakarida yang dapat meningkatkan nilai potensi limbah agroindustri menjadi bahan pangan yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Prebiotik xilooligosakarida yang dihasilkan yaitu jenis xilooligosakarida dominan pada xilopentaosa (X5) dan beberapa gula reduksi lain seperti xilobiosa (X2), xilotriosa (X3) dan xilotetraosa (X4) dan sedikit xilosa (X1).

Uraian Lengkap Inversi

Inversi ini didasarkan pada pemanfaatan potensi sumber daya alam yang ada di Indonesia yang belum termanfaatkan secara maksimal. Selain itu penggunaan enzim dalam proses industri mulai meningkat, hal ini dengan pertimbangan keamanan lingkungan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia dalam proses pengolahannya. Untuk itu dilakukan suatu langkah-langkah untuk mendapatkan sistem enzim xilanolitik dan memproduksinya dari sumber organisme baru, yaitu rayap. Mikroorganisme yang hidup dalam sistem intestinal rayap belum mendapatkan perhatian khusus. Hal ini disebabkan rayap dan fase metamorfosisnya yang tidak sempurna dianggap sebagai organisme yang terkadang merugikan dan tidak memiliki nilai ekonomis. Rayap telah dikenal sebagai organisme yang mendekomposisi material selulosik menjadi produk-produk degradasinya dengan laju akselerasi yang tinggi disebabkan adanya aktivitas selulase dalam sistem intestinalnya. Keberadaan enzim selulosa tersebut dipastikan bukan merupakan sistem

enzim tunggal karena material-material tumbuhan selain tersusun dari selulosa (35-50%) juga oleh biomassa lignoselulosik lainnya seperti hemiselulosa (20-35%) dan lignin (20-30%). Hal ini memungkinkan keberadaan enzim hemiselulosa seperti enzim-enzim xilanolitik dalam mikroorganisme sistem intestinal rayap.

Isolasi suatu enzim adalah hal yang sangat menarik apabila enzim tersebut ternyata memiliki aspek fungsional yang luar biasa dilingkungan yang bukan asalnya (*in vitro*). Optimalisasi terhadap aktivitas enzimatis dilakukan melalui pemurnian atau purifikasi yang terdiri dari beberapa tahap atau secara parsial dan atau non-parsial. Enzim β -endoxilanas dalam pemanfaatannya untuk memperoleh satu produk hasil aktivitas hidrolisis xilan yaitu xilooligosakarida (XOS). Xilooligosakarida (XOS) dalam penelitian ini merupakan produk yang potensial untuk dimanfaatkan sebagai agen prebiotik dan anti-karsinogen. Pemanfaatan ini memiliki prospek yang baik ditengah-tengah kehadiran anti-karsinogen lainnya berdasarkan kemungkinan untuk memperoleh dan mengkonversi xilan sebagai material utama.

Invensi ini menemukan enzim dalam mikroorganisme abdominal rayap tanah dan kemampuan enzim dalam menghasilkan prebiotik xilooligosakarida dalam proses dekomposisinya dalam substrat xilan sumber agroindustri: ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai. Penemuan enzim ini diharapkan dapat digunakan untuk produksi prebiotik xilooligosakarida yang sangat bermanfaat untuk kesehatan serta dengan enzim ini dapat dimanfaatkan pada limbah-limbah agroindustri untuk menghasilkan produk yang lebih bermanfaat.

Penemuan enzim ini dimulai dengan melakukan sekrening terhadap mikroorganisme dalam abdominal rayap tanah,

diperoleh beberapa isolat positif sebagai penghasil enzim enzim xilanolitik yang menunjukkan adanya zona bening pada substrat xilan. Zona halo tersebut menunjukkan daerah medium xilan yang telah terhidrolisis akibat katalisis enzim xilanolitik. Semakin luas zona halo tersebut, maka indeks aktivitas enzim xilanolitik akan semakin tinggi dan diperkuat. Isolat yang terpilih diuji eksistensi enzim endo- β -1,4-D-xilanase, β -xilosidase, β -L-arabinofuranosidase, glukuronidase, dan asetil-xilan esterase. Untuk endo- β -1,4-D-xilanase digunakan substrat oat-spelt xylan dan untuk β -xilosidase, β -L-arabinofuranosidase, glukuronidase, dan asetil-xilan esterase masing-masing menggunakan substrat spesifik berturut-turut (p-nitrofenil)- β -D-xilanopiranosida, (p-nitrofenil)- β -L-arabinofuranosida, (p-nitrofenil)- β -glukuronida, dan (p-nitrofenil)-asetat. Isolat terpilih ternyata menunjukkan hasil positif terhadap enzim endo- β -1,4-D-xilanase, β -L-arabinofuranosidase, dan glukuronidase. Enzim β -xilosidase dan asetil-xilan esterase tidak menunjukkan adanya aktivitas (Tabel 1).

Tabel 1. Pengujian Enzim Xilanolitik dari Isolat terpilih

Enzim (Ekstrak Kasar)	Volume (ml)	Aktivitas (U.ml⁻¹)	Aktivitas Total (Unit)
<i>endo</i> - β -1,4-D-xilanase	100,0	0,048	4,78
α -L-Arabinofuranosidase	25,0	0,078	1,94
β -Xilosidase	25,0	-	-
Glukuronidase	25,0	0,105	2,64
Asetil-Xilan Esterase	25,0	-	-

Pada penelitian selanjutnya dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan dan kurva produksi yang bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan isolat bakteri sistem

intestinal rayap dan aktivitas enzim yang dihasilkan, menunjukkan bahwa pada jam ke 6 selanjutnya digunakan pada proses produksi berikutnya. Selanjutnya dilakukan produksi dan purifikasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase melalui tahapan fraksinasi, dialisis dan kolom kromatografi hidrofobik, diperoleh aktivitas enzim endo- β -1,4-D-xilanase murni sebesar 6,93 U/mg, detail aktivitas ditunjukkan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas dan Kadar Protein Dialisat Enzim endo- β -1,4-D-xilanase

J. P.	Vol (ml)	A (Unit.ml ⁻¹)	A. T. (Unit)	P (mg.ml ⁻¹)	P. T. (mg)	A. S. (Unit.mg ⁻¹)	Hasil (%)	F. K.
Ekstrak kasar	100,0	0,048	4,78	0,074	7,37	0,65	100,00	1,00
Fraksi 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	75,0	0,057	4,28	0,077	5,78	0,74	89,44	1,14
Dialisat	45,0	0,070	3,17	0,074	3,33	0,95	66,32	1,46
Krom. Inter. Hidrofobik	6,0	0,448	2,69	0,064	0,39	6,93	56,28	10,66
Vol., A., A. T., P., P.T., A. S. dan F. K. masing-masing adalah aktivitas, aktivitas total, kadar protein, protein total, aktivitas spesifik, dan faktor kemurnian								

Penentuan berat molekul dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase ditunjukkan oleh protein aktif tersebut tampak diantara kisaran berat molekul 45,0.10³ hingga 66,2.10³ Dalton yang diuji secara zimogram. Karakteristik enzim endo- β -1,4-D-xilanase mempunyai temperatur dan pH optimum masing-masing 40 °C dan 5,0 serta stabil pada 40 °C selama 4 jam pada pH 5,0 dan memiliki kisaran pH 5-8. Penelitian dilanjutkan mengidentifikasi galur kekerabatan antar bakteri dengan menentukan pohon filogenetik berdasarkan identifikasi molekular 16S rRNA. Hubungan kekerabatan bakteri xilanolitik sistem abdominal rayap tanah isolat

bakteri dengan *Bacillus sp* sebesar 94% pada program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Tahapan selanjutnya amplifikasi gen penyandi endo-1,4- β -xilanase, yang kemudian di lakukan kloning ke *E. coli Top10* (pET-30a(+)) dan menentukan urutan basa nukleotida dan tingkat homologi gen penyandi endo-1,4- β -xilanase asal sistem abdominal rayap tanah. Gen penyandi endo-1,4- β -xilanase bakteri xilanolitik asal sistem abdonminal rayap tanah dapat teramplifikasi dengan ukuran \pm 600 bp menggunakan teknik PCR dan dapat diklon ke dalam pET-30a(+)/*E.coli* Top10 dan didapatkan plasmid pET-30a(+) rekombinan (pET-endo). Dari hasil sekuensing, rekombinan yang diperoleh adalah fragmen gen endo-1,4- β -xilanase yang mempunyai tingkat homologi sebesar 99% terhadap gen endo-1,4- β -xilanase famili 11 dari *GenBank* (Tabel 3).

Tabel 3. Beberapa gen yang mempunyai homologi yang tinggi dengan gen penyandi endo-1,4- β -xilanase isolat A asal rayap tanah

Accession	Description	Max ident
DQ100307.1	Bacillus subtilis strain MWO endo-1,4- β -xilanase (xylB) gene, complete cds	99%
M36648.1	B.subtilis xylanase gene, complete cds	99%
Z34519.1	Bacillus subtilis 168 trpC2 xynA gene encoding xylanase	99%
AB457186.1	Bacillus subtilis Xyl gene for xylanase, complete cds, strain: R5	99%
JF312739.1	Bacillus subtilis strain ATF-27 xylanase A gene, complete cds	98%
EU848308.1	Bacillus subtilis strain G1 xylanase gene	97%

Pengujian terhadap aktivitas hidrolisis enzim endo-1,4- β -xilanase terhadap substrat *oat spelt xylan* dan terhadap substrat xilan sumber limbah agroindustri yaitu ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai. Dari substrat *oat spelt xylan* menunjukkan hasil hidrolisis yaitu dominan xilopentaosa (X5) dan diikuti xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) dan sedikit xilosa (X1) (dalam Uji TLC dan HPLC). Sedang dalam substrat xilan sumber limbah agroindustri, baik ampas, kulit singkong dan ampas kedelai enzim ini mampu menghidrolisis dengan menghasilkan xilooligosakarida X5 dominan dan diikutii X2, X3 dan X4 (data TLC dan HPLC) (Tabel 4 dan Tabel 5).

Tabel 4. Kandungan Xilooligosakarida produk hidrolisis endo-1,4- β -xilanase dengan xilan sumber ampas singkong hasil analisis HPLC

Jenis Kandungan	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak	Kadar (ppm)
Xilopentosa (X5)	8,175	3927897	3587,50
Xilotetrosa (X4)	9,505	17565	16,04
Xilotriosa (X3)	10,422	33178	30,30
Xilobiosa (X2)	11,888	4016	8,29
Xilosa (X1)	14,554	6956	10,79

Tabel 5. Kandungan Xilooligosakarida produk hidrolisis endo-1,4- β -xilanase dengan xilan sumber kulit singkong hasil analisis HPLC

Jenis Kandungan	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak	Kadar (ppm)
Xilopentosa (X5)	8,139	3856909	3522,67
Xilotetrosa (X4)	9,491	15897	14,52
Xilotriosa (X3)	10,408	53540	48,90
Xilobiosa (X2)	11,914	9398	19,39

Xilosa (X1)	13,948	4557	7,07
-------------	--------	------	------

Pengujian prebiotik xilooligosakarida yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan telah dilakukan penelitian dengan memasukkan secara in-situ enzim endo- β -1,4-D-xilanase dalam tepung terigu sebagai sumber substrat xilan untuk pembuatan roti. Sifat prebiotik xilooligosakarida yang dihasilkan diamati dengan pemberian roti pada hewan percobaan tikus dan hasilnya menunjukkan peningkatan pertumbuhan bakteri prebiotik dalam sistem pencernaan hewan percobaan tikus yang dibandingkan dengan kontrol. Hasil percobaan inilah yang memperkuat bahwa xilooligosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis enzim endo- β -1,4-D-xilanase berpotensi sebagai prebiotik.

Klaim

1. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang dihasilkan dari bakteri genus *Bacillus* sp. dalam abdominal rayap tanah yang dicirikan:
 - a. karakteristik pH optimum pada 5, suhu 40 °C, berat molekul 45×10^3 sampai dengan $66,2 \times 10^3$ Dalton, stabilitas pH 5-8, stabilitas suhu 40°C masih aktif selama 6 jam;
 - b. panjang gen ukuran \pm 600bp;
 - c. mempunyai homologi sebesar 99% terhadap gen endo-1,4- β -xilanase famili 11 dari GenBank.
2. Penggunaan enzim endo- β -1,4-D-xilanase sebagai penghasil prebiotik xilooligosakarida dari hidrolisis substrat xilan sumber agroindustri seperti ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai.
3. Xilooligosakarida yang dihasilkan dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase spesifik dominan yaitu xilopentosa (X5) dan xilotetraosa (X4), xilotriosa (X3), xilobiosa (X2) dan sedikit xilosa (X1).

Abstrak

ENZIM β -1,4-D ENDOXILANASE ASAL *Bacillus* sp. DALAM ABDOMINAL RAYAP TANAH SEBAGAI PENGHASIL PREBIOTIK XILOOLIGOSAKARIDA

Invensi ini menghasilkan enzim endo- β -1,4-D-xilanase dari bakteri genus *Bacillus* sp. dalam abdominal rayap tanah. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase mempunyai temperatur dan pH optimum masing-masing 40 °C dan 5,0 serta stabil pada 40 °C selama 6 jam pada pH 5,0 dan memiliki kisaran pH 5-8. Protein enzim endo- β -1,4-D-xilanase memiliki berat molekul berkisar 45.000 hingga 66.200 Dalton. Gen penyandi enzim endo- β -1,4-D-xilanase berhasil teramplifikasi dengan ukuran \pm 600bp menggunakan teknik PCR. Sekuensing rekombinan yang diperoleh adalah fragmen gen endo-1,4- β -xilanase yang mempunyai tingkat homologi sebesar 99% terhadap gen endo-1,4- β -xilanase famili 11 dari *GenBank*.

Kemampuan enzim endo- β -1,4-D-xilanase dapat mendekomposisikan xilan yang bersumber dari limbah agroindustri seperti ampas dan kulit singkong serta ampas kedelai untuk menghasilkan prebiotik xilooligosakarida yang dapat meningkatkan nilai potensi limbah agroindustri menjadi bahan pangan yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Prebiotik xilooligosakarida yang dihasilkan yaitu jenis xilooligosakarida dominan pada xilopentaosa (X5) dan beberapa gula reduksi lain seperti xilobiosa (X2), xilotriosa (X3) dan xilotetraosa (X4) dan sedikit xilosa (X1).

