

Isolasi dan Karakterisasi Enzim Xilanase dari *Bacillus Subtilis* pada Media *Nutrient Broth* dengan Penambahan Xilan Hasil Isolasi Jerami Padi

Yanidya Tanjihah Ardiansyah^a, Nies Suci Mulyani^{a*}, Purbowatiningrum Ria Sarjono^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: niessuci@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: Rice straw, <i>Bacillus subtilis</i>, Xylan, Xylanase</p>	<p>Rice straw is a lignocellulosic waste containing xylan. Xylan in rice straw can be utilized as carbon source, substrate and inducer on <i>Bacillus subtilis</i> growth medium to produce xylanase which has the ability to hydrolyze xylan into xylose or xylooligosaccharide. In this research, several stages were conducted i.e. xylan isolation of rice straw, determination of growth curve of <i>Bacillus subtilis</i>, xylanase production, purification of xylanase with fractionation of ammonium sulfate and dialysis. The xylanase activity test was performed using DNS method, while protein content was tested using Lowry method. The specific activity of xylanase was calculated by xylanase activity unit per mg of protein. Characterization was then performed on fractions with the highest specific activity including temperature, pH and incubation time. The result showed that the highest specific activity was obtained at fraction of F2 that is 5,178 Unit/mg protein. The optimum condition of xylanase obtained from the characterization was at 40°C, pH 8, incubation time 30 minutes and specific activity of F2 fraction at optimum condition of 6,088 Unit/mg protein.</p>
<p>Kata Kunci: Jerami padi, <i>Bacillus subtilis</i>, Xilan, Xilanase</p>	<p>Abstrak</p> <p>Jerami padi merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung xilan. Xilan pada jerami padi dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon, substrat dan inducer pada media pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i> untuk menghasilkan xilanase yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa atau xilooligosakarida. Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahap, yaitu isolasi xilan dari jerami padi, penentuan kurva pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>, produksi xilanase, pemurnian xilanase dengan fraksinasi bertingkat amonium sulfat dan dialisis. Pengujian aktivitas xilanase dilakukan dengan menggunakan metode DNS, sedangkan kadar protein diuji dengan menggunakan metode Lowry. Aktivitas spesifik xilanase dihitung berdasarkan unit aktivitas xilanase per mg protein. Selanjutnya dilakukan karakterisasi pada fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi meliputi suhu, pH dan waktu inkubasi. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada fraksi F2 yaitu sebesar 5,178 Unit/mg protein. Kondisi optimum xilanase yang diperoleh dari hasil karakterisasi yaitu pada suhu 40°C, pH 8, waktu inkubasi 30 menit dan aktivitas spesifik fraksi F2 pada kondisi optimum sebesar 6,088 Unit/mg protein.</p>

1. Pendahuluan

Perkembangan dan kemajuan bidang pertanian di Indonesia telah menimbulkan peningkatan limbah pertanian dimana sebagian besar merupakan limbah yang mengandung lignoselulosa. Limbah lignoselulosa yang mempunyai potensi cukup besar bagi proses industri yang memerlukan bahan baku berkadar hemiselulosa antara lain jerami, biji kedelai, onggok, bonggol dan kulit jagung, sabut serta tandan kosong kelapa sawit dan lain sebagainya [1]. Kandungan terbesar dalam hemiselulosa adalah xilan [2], oleh karena itu diharapkan xilan dari jerami padi dapat ditambahkan pada media pertumbuhan sebagai sumber karbon, substrat dan *inducer* bagi *Bacillus subtilis* untuk menghasilkan enzim xilanase.

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat dimanfaatkan untuk proses pemutih kertas, penjernihan sirup, pembuatan gula xilosa dan sebagainya. Penggunaan xilanase untuk mengurangi pemakaian klorin dalam pemutih kertas, telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi [3, 4].

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh enzim xilanase yang dihasilkan dari *Bacillus subtilis* pada media yang telah ditambahkan dengan xilan dari jerami padi sebagai sumber karbon, substrat dan *inducer*, memperoleh karakter enzim meliputi pH, suhu dan waktu inkubasi optimum serta menentukan aktivitas spesifik enzim xilanase pada kondisi optimumnya.

2. Metode Penelitian

Isolasi Xilan dari Jerami Padi

Xilan dari jerami padi digunakan sebagai sumber karbon, substrat dan *inducer* pada media pertumbuhan *Bacillus subtilis* untuk dapat menghasilkan xilanase. Xilan dari jerami padi diekstrak menggunakan NaOCl, disaring kemudian residunya ditambahkan NaOH 10% selama 24 jam. Setelah disaring filtratnya dinetralkan dengan CH_3COOH selanjutnya ditambahkan etanol berlebih hingga terbentuk endapan.

Peremajaan (Refreshing) *Bacillus subtilis*

Komposisi media untuk peremajaan (g/L): Pepton 5,0; Yeast Ekstrak 1,0; K_2HPO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2. Media diatur pada pH 7 dengan inkubasi pada kecepatan 250 rpm, suhu 40°C selama 24 jam.

Penentuan Kurva Pertumbuhan

Kurva tumbuh ditentukan dengan mengukur absorbansi kultur bakteri setiap 2 jam sekali dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Produksi Xilanase

Komposisi media untuk produksi xilanase (g/L): Xilan 10,0 1% (w/v); Pepton 5,0; Yeast Ekstrak 1,0; K_2HPO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2. Penambahan xilan dilakukan pada awal fase log. Media diatur pada pH 7 dengan inkubasi

pada kecepatan 250 rpm, suhu 40°C. Proses fermentasi dihentikan sampai akhir fase log.

Isolasi dan Pemurnian Xilanase

Isolasi dan pemurnian xilanase dilakukan dengan pemisahan (sentrifugasi), supernatan yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan ammonium sulfat. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda, yaitu untuk kejenuhan 0-20% (F1), 20-40% (F2), 40-60% (F3), 60-80% (F4) dan 80-100% (F5). Endapan hasil fraksinasi selanjutnya didialisis. Selama proses dialisis kandungan ammonium sulfat diuji dengan BaCl_2 . Dialisis dihentikan hingga tidak terbentuk endapan BaSO_4 .

Uji Aktivitas Xilanase

Uji aktivitas xilanase dilakukan dengan menggunakan reagen DNS (*Dinitrosalicylic acid*). Sebanyak 0,1 mL enzim; 0,4 mL 0,05 M buffer fosfat (pH 7); 0,5 mL *oat spelt xylan* 1% (w/v). Campuran diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit, kemudian ditambah 1 mL reagen DNS dan dipanaskan selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran pada λ_{446} dengan spektrofotometer UV-Vis.

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry dan digunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Sebanyak 0,1 mL enzim ditambah 2 mL larutan Lowry C (50 mL Lowry A (Na_2CO_3 ; NaOH; K-Na Tartrat) + 1 mL Lowry B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)), diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,2 mL Lowry D (reagen *folin-ciocalteau*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.

Karakterisasi Xilanase

Karakterisasi xilanase dilakukan dengan penentuan suhu optimum, dengan variasi: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C. Penentuan pH optimum dengan variasi pH: 5, 6, 7, 8 dan pH 9. Penentuan waktu inkubasi optimum dengan variasi waktu: 20, 25, 30, 35 dan 40 menit.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Xilan dari Jerami Padi

Xilan yang diperoleh dari jerami padi hasil isolasi berupa serbuk berwarna putih. Selanjutnya diuji kemampuannya secara kualitatif sebagai substrat untuk menghasilkan xilosa dibandingkan dengan *oat spelt xylan*.

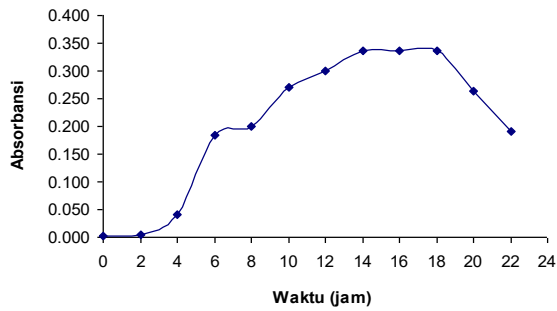
Peremajaan (Refreshing) *Bacillus subtilis*

Hasil peremajaan antara kultur dan kontrol negatif menunjukkan pada kultur *Bacillus subtilis* dapat tumbuh pada media, ditunjukkan dengan terjadinya kekeruhan pada media. Sedangkan pada kontrol negatif media tetap jernih.

Penentuan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan yang diperoleh dapat memberikan informasi mengenai fase-fase

pertumbuhan *Bacillus subtilis*. Sehingga dapat diketahui waktu penambahan *inducer* dan waktu penghentian fermentasi.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Data kurva pertumbuhan (Gambar 1) dapat menunjukkan pada jam ke-0 sampai jam ke-2 *Bacillus subtilis* mengalami fase pertumbuhan awal (fase lag). Mulai jam ke-2 sampai jam ke-12 merupakan fase eksponensial (fase logaritmik), Pada jam ke-12 sampai jam ke-14 sel *Bacillus subtilis* telah mencapai akhir fase eksponensial sehingga kecepatan pertumbuhan mulai menurun (lambat), Pada jam ke-14 sampai jam ke-18 *Bacillus subtilis* mulai memasuki fase stasioner, Setelah jam ke-18 *Bacillus subtilis* mengalami fase kematian.

Produksi Xilanase

Produksi xilanase dilakukan dengan menambahkan xilan 1% (w/v) ke dalam media produksi pada jam ke-4 (awal fase log) sesuai kurva pertumbuhan. Penambahan xilan bertujuan untuk menginduksi sintesis xilanase sehingga diharapkan xilanase yang dihasilkan maksimal. Proses fermentasi dihentikan pada jam ke-10 (akhir fase log) karena pada fase ini jumlah sel *Bacillus subtilis* maksimal dan metabolit sekunder yang terbentuk masih sedikit sehingga diharapkan xilanase yang dihasilkan optimal.

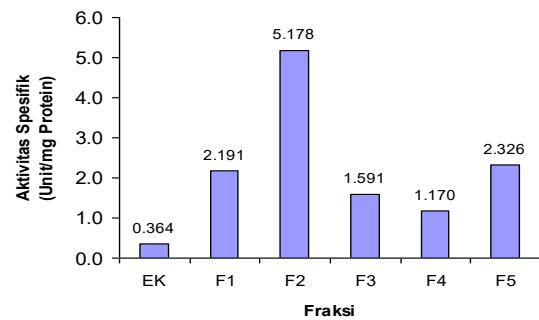
Isolasi dan Pemurnian Xilanase

Pemisahan xilanase dilakukan dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm. Tahap ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari komponen media dan sel-sel bakteri. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase (*crude enzyme*). Selanjutnya ekstrak kasar yang diperoleh difraksinasi menggunakan amonium sulfat, yang bertujuan untuk memisahkan protein enzim xilanase dengan protein lainnya. Endapan yang diperoleh dari hasil fraksinasi merupakan protein enzim dengan tingkat kejenuhan yang berbeda yaitu, F1, F2, F3, F4 dan F5. Fraksi tersebut selanjutnya didialisis yang merupakan proses pemurnian lanjutan terhadap protein enzim [5]. Dimana amonium sulfat yang masih terdapat dalam endapan protein enzim harus dipisahkan, dengan demikian hanya protein enzim saja yang diperoleh. Dialisis dihentikan jika tidak lagi terbentuk endapan $BaSO_4$, hal ini berarti protein enzim telah terbebas dari ion sulfat.

Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Xilanase

Definisi 1 unit aktivitas xilanase dalam penelitian ini adalah aktivitas xilanase yang dapat membentuk 1 μ mol xilosa per menit pada kondisi optimum [6]. Aktivitas xilanase ditentukan melalui identifikasi produk xilosa yang terbentuk akibat adanya aktivitas sejumlah enzim yang diuji dengan DNS [7].

Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Aktivitas spesifik adalah unit aktivitas per miligram protein [8].



Gambar 2. Penentuan Aktivitas Spesifik Xilanase

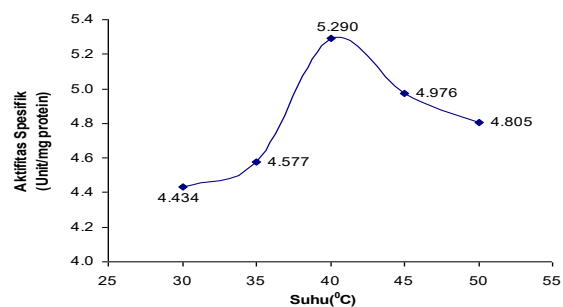
Hasil penentuan aktivitas spesifik (gambar 2) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi xilanase pada fraksi 2 (F2) sebesar 5,178 Unit/mg protein. Hasil ini dapat menunjukkan bahwa sebagian besar protein enzim pada F2 adalah xilanase, sehingga tingkat kemurnian xilanase yang tertinggi adalah pada F2 dibandingkan fraksi lainnya.

Karakterisasi Xilanase

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum xilanase yang meliputi suhu, pH dan waktu inkubasi.

Penentuan Suhu Optimum

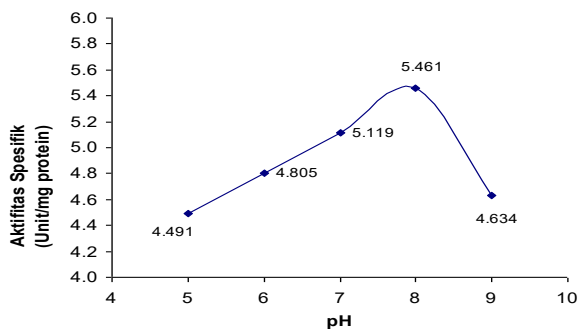
Hasil penentuan suhu optimum menunjukkan aktivitas xilanase meningkat dengan meningkatnya suhu sampai 40°C, selanjutnya pada suhu yang lebih tinggi aktivitasnya menurun (Gambar 3). Suhu optimum adalah suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi enzimatik berlangsung untuk dapat menghasilkan produk [9]. Aktivitas xilanase pada suhu 40°C adalah 5,290 Unit/mg protein.



Gambar 3. Hubungan Antara Suhu Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase

Penentuan pH Optimum

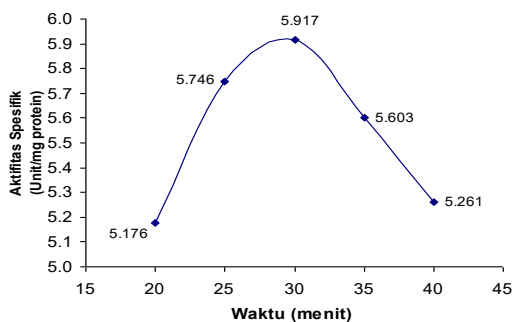
Hasil penentuan pH optimum menunjukkan aktivitas xilanase meningkat dengan meningkatnya pH sampai pH 8, pada pH yang lebih tinggi aktivitasnya menurun (Gambar 4). pH optimum adalah pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimum [8]. Aktivitas spesifik xilanase pada pH 8 adalah 5,461 Unit/mg protein. pH akan berpengaruh terhadap sisi aktif xilanase yang berupa Glu-78 dan Glu-172. Pada kondisi pH di bawah atau di atas pH optimum, konsentrasi H⁺ dan OH⁻ dapat mempengaruhi gugus karboksil (-COOH) dari Glu-78 sebagai nukleofil dan gugus karboksil (-COOH) dari Glu-172 sebagai elektrofili. Sisi aktif xilanase tidak dapat tepat berikatan dengan substrat, sehingga kompleks Enzim-Substrat yang terbentuk tidak optimal dan produk yang dihasilkan rendah.



Gambar 4. Hubungan Antara pH Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Hasil penentuan waktu inkubasi optimum menunjukkan aktivitas xilanase meningkat sampai waktu inkubasi 30 menit, pada waktu inkubasi lebih dari waktu inkubasi optimum aktivitasnya akan menurun (Gambar 5). Waktu inkubasi merupakan waktu kontak antara enzim dengan substrat untuk membentuk produk. Aktivitas spesifik xilanase pada 30 menit inkubasi adalah sebesar 5,917 Unit/mg protein.

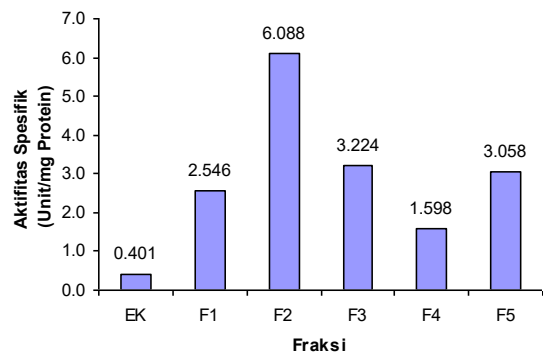


Gambar 5. Hubungan Antara Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase

Penentuan Aktivitas Spesifik Xilanase Pada Kondisi Optimum

Penentuan aktivitas spesifik xilanase pada kondisi optimum (suhu 40°C, pH 8 dan waktu inkubasi 30 menit) dilakukan pada semua fraksi, bertujuan untuk mengetahui aktivitas xilanase yang bekerja pada kondisi

optimum untuk dapat menghasilkan produk yang maksimum.



Gambar 6. Penentuan Aktivitas Spesifik Xilanase Pada Kondisi Optimum

Hasil penentuan aktivitas spesifik xilanase pada kondisi optimum (Gambar 6) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik xilanase tertinggi pada fraksi 2 (F2) mengalami peningkatan menjadi 6,088 Unit/mg protein.

4. Kesimpulan

Xilan hasil isolasi dari jerami padi dapat digunakan sebagai pengganti xilan murni (*oat spelt xylan*) yang merupakan sumber karbon, substrat dan inducer pada media pertumbuhan dengan menggunakan *Bacillus subtilis* untuk menghasilkan xilanase. Berdasarkan penelitian diperoleh hasil aktivitas spesifik tertinggi sebesar 5,178 Unit/mg protein pada fraksi F2. Dari hasil karakterisasi diperoleh kondisi optimum xilanase pada suhu 40°C, pH 8, dan waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas spesifik F2 pada kondisi optimum sebesar 6,088 Unit/mg protein.

5. Daftar Pustaka

- [1] Nur Richana, Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia, *Buletin AgroBio*, 5, 1, (2002) 29-36
- [2] Saurabh Sudha Dhiman, Jitender Sharma, Bindu Battan, Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review, *BioResources*, 3, 4, (2008) 1377-1402
- [3] R Bourbonnais, MG Paice, B Freiermuth, E Bodie, S Borneman, Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds, *Applied and environmental microbiology*, 63, 12, (1997) 4627-4632
- [4] Alberto Ruiz-Arribas, Jose M Fernández-Abalos, Pilar Sanchez, Ana Lila Garda, Ramon I Santamariá, Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8, *Applied and environmental microbiology*, 61, 6, (1995) 2414-2419
- [5] Tim Bugg, Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, John Wiley & Sons, 2004.
- [6] Kilunga Bruno Kubata, Hiroyuki Horitsu, Keiichi Kawai, Kazuhiro Takamizawa, Tohru Suzuki, Xylanase I of *Aeromonas caviae* ME-1 isolated from the intestine of a herbivorous insect (*Samia cynthia pryeri*), *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*,

- 56, 9, (1992) 1463-1464
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.56.1463>
- [7] Gail Lorenz Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, 31, 3, (1959) 426-428
<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- [8] Albert L Lehninger, *Dasar-Dasar Biokimia*, M. Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta, 1990.
- [9] R Raswil, M Wirahadikusumah, Isolation and identification of phospholipid of ribbed smoke sheet, *Buletin Perkebunan Rakyat (Indonesia)*, (1989)