

Penentuan Konsentrasi Optimum *Oat Spelts Xylan* pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus niger* dalam Media PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Nies Suci Mulyani^{a*}, Muhammad Asy'ari^a, Heru Prasetyoningsih^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

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

Article Info

Keywords:

Aspergillus niger,
Xilanase, Oat Splet
Xylan

Kata kunci:

Aspergillus niger,
Xilanase, Oat Splet
Xylan

Abstract

The xylanase enzyme can hydrolyze xylan into xylose which can be utilized for the manufacture of xylose sugar. The xylanase enzyme can be isolated from *Aspergillus niger* and the increased production of xylanase requires an inducer of oat spelts xylan. This study aim was to determine optimum concentration of oat spelts xylan on xylanase production and character of xylanase isolation result. Production of xylanase on PDB (*Potato Dextrose Broth*) medium with addition of oat spelts xylan concentration variation of 0.0%; 0.8%; 1.0%; 1.2% and 1.4% to determine the optimum concentration of oat spelled xylan. Furthermore, xylanase production with optimum concentration of oat spelts xylan was conducted in which xylanase was purified by fractionation method of ammonium sulfate stratified and dialysis and activity test using DNS method and the protein content was tested by using Lowry method. The characterization of xylanase enzyme was including temperature, pH and incubation time. It was obtained that the optimum concentration of oat spelts xylan was 1,2%, the xylanase enzyme activity was 469,49 unit/mg protein. The highest activity of the isolated xylanase enzyme in F5 was 10280,840 unit/mg protein and worked optimally at 40 ° C, pH 4,5, incubation time 28 min and specific activity at optimum condition was 11829,159 units/mg protrein

Abstrak

Enzim xilanase dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan gula xilosa. Enzim xilanase dapat diisolasi dari *Aspergillus niger* dan peningkatan produksi xilanase membutuhkan suatu inducer yaitu *oat spelts xylan*. Penelitian bertujuan untuk menentukan konsentrasi optimum *oat spelts xylan* terhadap produksi xilanase dan karakter xilanase hasil isolasi. Produksi xilanase pada media PDB (*Potato Dextrose Broth*) dengan penambahan variasi konsentrasi *oat spelts xylan* yaitu 0,0%; 0,8%; 1,0%; 1,2% dan 1,4% untuk mengetahui konsentrasi optimum *oat spelts xylan*. Selanjutnya dilakukan produksi xilanase dengan konsentrasi optimum *oat spelts xylan*, xilanase dimurnikan dengan metode fraksinasi amonium sulfat bertingkat dan dialisis dan uji aktivitas menggunakan metode DNS dan uji kadar protein dengan menggunakan metode Lowry. Karakterisasi enzim xilanase meliputi suhu, pH dan waktu inkubasi. Hasil penelitian diperoleh konsentrasi optimum oat splet xylan yaitu 1,2% dengan aktivitas enzim xilanase sebesar 469,490 Unit/mg protein. Diperoleh aktivitas tertinggi enzim xilanase hasil isolasi pada F5 yaitu sebesar 10280,840 Unit/mg protein dan bekerja optimum pada kondisi suhu 40°C, pH 4,5, waktu inkubasi 28 menit dan aktivitas spesifik pada kondisi optimum sebesar 11829,159 Unit/mg Protrein.

1. Pendahuluan

Aspergillus niger merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim xilanase secara ekstraseluler dengan berat molekul 22,0-46,5 kDa, aktif pada suhu 24-30°C dan pH 4,5-6 [1]. Xilanase merupakan enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa.

Xilosa dapat diaplikasikan ke beberapa proses industri, salah satunya produksi gula xilosa. Gula xilosa banyak digunakan untuk konsumsi penderita diabetes dan untuk campuran pasta gigi yang berfungsi memperkuat gusi. Beragamnya kegunaan gula xilosa tersebut, maka perlu dilakukan inovasi produksi xilosa dengan mengoptimalkan produksi enzim xilanase [2]. Enzim xilanase bersifat induktif, sehingga untuk memperoleh produk yang maksimal, dibutuhkan suatu induser sebagai pemicu produksi enzim xilanase. Induser yang digunakan adalah *oat spelts xylan*.

Berdasarkan penelitian Raghukumar, dkk. [3] yang telah melakukan isolasi enzim xilanase dari *Aspergillus niger* menggunakan media pertumbuhan dengan penambahan induser yang berbeda-beda yaitu bagas tebu, ampas gandum dan *oat spelts xylan* sehingga diperoleh data unit aktifitas dari masing-masing sumber induser sebagai berikut bagas tebu 1356, ampas gandum 958 dan *oat spelts xylan* 1624 Unit/Liter.

Penelitian tersebut menunjukkan bahwa unit aktivitas xilanase terbesar pada penambahan induser *oat spelts xylan* namun tidak dilakukan penentuan konsentrasi optimum penambahan *oat spelts xylan*, sehingga diharapkan dengan dilakukannya variasi konsentrasi induser *oat spelts xylan* diperoleh konsentrasi optimum pada produksi enzim xilanase.

2. Metode Penelitian

Bahan

Aspergillus niger diperoleh dari Jurusan Biokimia Universitas Diponegoro, Semarang. Media pertumbuhan *Aspergillus niger* yaitu PDB (*Potato Dextrose Broth*) (g/L-1): 200-kentang, 10-dekstroza. Isolat jamur sebanyak 1 jarum ose diinokulasi ke dalam 100 mL media PDB, dan difermentasikan selama 72 jam dengan kecepatan shaker 250 rpm pada suhu ruang. Induser *oat spelts xylan* (SIGMA), xilosa, larutan DNS (*Dinitrosalicylic acid*), natrium hidroksida, sodium potassium tartrat, BSA (*Bovine Serum Albumin*), *Folin-ciocalteau*, TCA (*Trichloroacetic Acid*), amonium sulfat, Barium (II) klorida, larutan bufer asetat, reagen *Lowry*.

Metode Penelitian Penentuan Kurva Pertumbuhan

Isolat *Aspergillus niger* sebanyak 10 mL diinokulasikan ke dalam 100 mL media PDB dan difermentasikan dalam shaker dengan kecepatan 250 rpm pada suhu ruang, kemudian sampel diambil setiap 24 jam sekali. Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* diukur dengan metode berat kering. Penentuan waktu fermentasi optimum dilakukan dengan mengkorelasikan

perubahan berat kering dengan waktu pertumbuhan *Aspergillus niger*.

Produksi Xilanase dengan Variasi Konsentrasi *Oat spelts xylan*

Sebanyak 5 mL starter diinokulasikan ke dalam 50 mL media PDB lalu difermentasi dalam shaker dengan kecepatan 250 rpm pada suhu ruang. Setelah jam ke-24 (berdasarkan kurva pertumbuhan), fermentasi dihentikan untuk penambahan induser *oat spelts xylan* sebanyak 5 mL dari konsentrasi (0,0%; 0,8%; 1%; 1,2%; dan 1,4%) w/v, kemudian difermentasi lagi di dalam shaker pada suhu ruang sampai jam ke-72.

Hasil fermentasi kemudian disaring dan diperoleh biomassa dan filtrat. Biomassa dikeringkan dengan oven pada suhu \pm 80°C sedangkan filtrat disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, kemudian dipisahkan antara supernatan dan endapan [4]. Supernatan merupakan enzim ekstrak kasar untuk penentuan aktivitas spesifik xilanase sehingga diperoleh konsentrasi optimum *oat spelts xylan* yang dapat menghasilkan enzim xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi.

Produksi Xilanase dengan Konsentrasi Optimum *Oat spelts xylan*

Sebanyak 10 mL starter diinokulasikan ke dalam 100 mL media PDB, kemudian difermentasi ke dalam shaker dengan kecepatan agitasi 250 rpm pada suhu ruang. Setelah jam ke-24 (berdasarkan kurva pertumbuhan), fermentasi dihentikan untuk penambahan 10 mL konsentrasi optimum *oat spelts xylan* 1,2%, fermentasi dilanjutkan sampai waktu optimum. Kontrol negatif diperlakukan sama dengan tidak ada penambahan *oat spelts xylan*.

Isolasi dan Pemurnian Xilanase Ekstraksi

Hasil fermentasi disaring hingga diperoleh biomassa dan filtrat. Filtrat disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Kemudian dipisahkan antara supernatan dan endapan [4]. Supernatan yang merupakan enzim ekstrak kasar untuk penentuan aktivitas spesifik xilanase.

Fraksinasi Bertingkat dengan Garam Amonium Sulfat

Enzim ekstrak kasar yang diperoleh dilakukan pemurnian dengan fraksinasi bertingkat amonium sulfat. Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan kebutuhan untuk masing-masing tingkat kejenuhan : 0-20% (F1), 20-40% (F2), 40-60% (F3), 60-80% (F4), dan 80-100% (F5) dapat dilihat pada tabel amonium sulfat.

Amonium sulfat untuk tingkat kejenuhan 0-20% dimasukkan kedalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit, sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan magnetic stirer dalam penangas es. Campuran kemudian didiamkan selama 2 jam dalam keadaan dingin (dimasukkan dalam lemari es), kemudian disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh endapan dalam fraksi 0-20% dan filtratnya. Endapan yang diperoleh disuspensi dengan 10

mL bufer asetat 0,1 M pH 5. Masing-masing endapan yang disuspensi tersebut merupakan larutan protein enzim F1. Filtrat yang diperoleh untuk tingkat kejenuhan 0–20%, difraksinasi kembali untuk tingkat kejenuhan 20–40%, diperlakukan sama untuk tingkat kejenuhan 40–60%, 60–80% dan 80–100%. Endapan yang diperoleh dari tiap-tiap fraksi merupakan F1, F2, F3, F4 dan F5 [4].

Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang telah direbus selama 30 menit. Selofan berisi suspensi hasil akhir fraksinasi sebanyak 10 mL direndam dalam bufer asetat 0,001 M pH 5 dalam keadaan dingin dan tiap 2 jam sekali bufer diganti serta diuji kandungan amonium sulfat pada larutan diluar selofan dengan menggunakan barium klorida, dialisis dilanjutkan hingga tidak terbentuk endapan putih.

Penentuan Aktivitas Xilanase

Sebanyak 0,1 ml enzim hasil fraksinasi ditambah 0,4 mL bufer asetat 0,1 M dan 0,5 ml substrat *oat spelts xylan*, diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit, kemudian ditambah larutan DNS sebanyak 1 mL, dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit, selanjutnya dibiarkan sampai dingin. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang optimum xilosa dengan spektrofotometer UV-Vis [5].

Penentuan Kadar Protein

Sebanyak 0,1 mL larutan protein enzim hasil fraksinasi (EK, F1, F2, F3, F4 dan F5) ditambah dengan 2 mL larutan Lowry C, diinkubasi pada suhu optimum (40°C) selama 30 menit sambil sesekali dikocok. Selanjutnya ditambah dengan 0,2 mL Lowry D dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian diukur absorbansinya dengan spectrophotometer UV-VIS [6].

Karakterisasi Enzim Penentuan suhu optimum

Uji aktivitas enzim xilanase dilakukan pada pH 5, waktu inkubasi 30 menit dan variasi suhu, yaitu 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C dan 45°C.

Penentuan waktu inkubasi optimum

Uji aktivitas enzim xilanase dilakukan pada suhu optimum, pH 5 dan variasi waktu inkubasi, yaitu 24, 26, 28, 30, 32, 34 dan 36 menit.

Penentuan pH Optimum

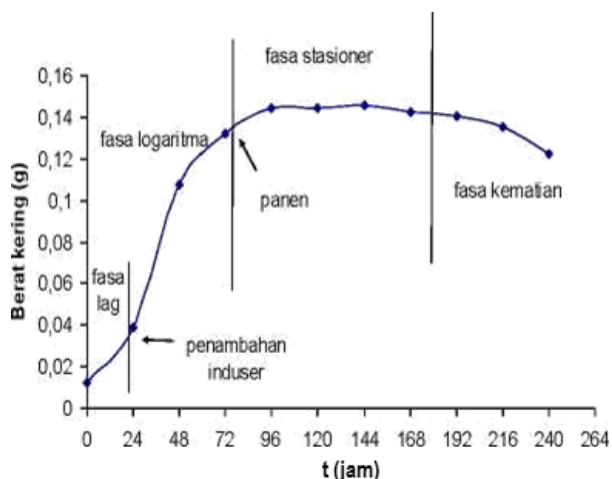
Uji aktivitas enzim xilanase dilakukan pada suhu optimum, waktu inkubasi optimum dan variasi pH bufer, yaitu pH 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 dan 6,5.

3. Hasil dan Pembahasan

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* adalah kurva yang memberikan informasi mengenai fase-fase pertumbuhan yang terjadi pada *Aspergillus niger* yang

selanjutnya akan digunakan untuk menentukan waktu penambahan induser dan produksi xilanase (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik kurva pertumbuhan *Aspergillus niger*

Berdasarkan grafik, jam 0–24 adalah fasa lag, *Aspergillus niger* lebih berusaha menyesuaikan diri dengan lingkungan dan medium baru agar dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Jam ke-24 merupakan awal fasa logaritmik dan selama fasa logaritmik sel membelah diri dengan maksimal, karena nutrisi makanan yang tersedia masih sangat banyak.

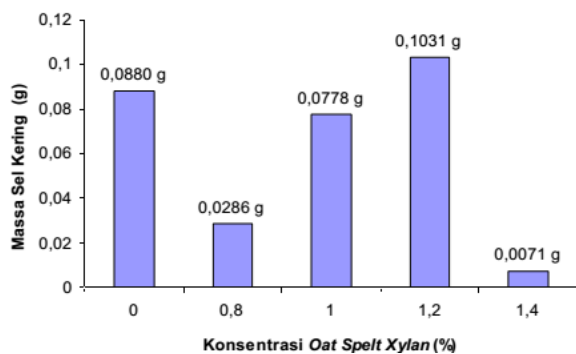
Setelah jam ke-72 *Aspergillus niger* mengalami fasa stasioner dan fasa kematian, hal ini terjadi karena nutrisi makanan sudah mulai berkurang dan adanya metabolit-metabolit lain yang bersifat racun dapat menghambat pertumbuhan sel sehingga kecepatan pertumbuhan sel *Aspergillus niger* mulai menurun.

Dari data yang diperoleh, diketahui waktu yang tepat saat pemanenan sel *Aspergillus niger* adalah jam ke-72 dan waktu penambahan induser *oat spelts xylan* yaitu jam ke-24.

Produksi Xilanase dengan Variasi Konsentrasi *Oat spelts xylan*

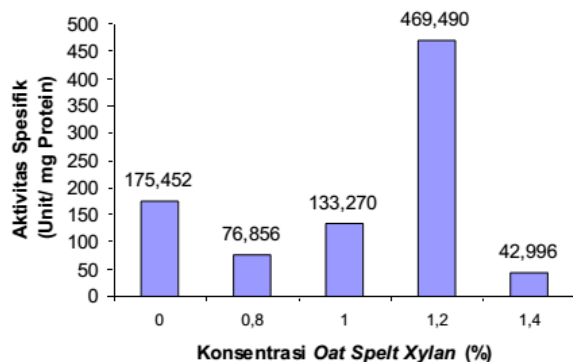
Produksi enzim xilanase pada variasi konsentrasi *oat spelts xylan* 0,0%; 0,8%; 1,0%; 1,2% dan 1,4% bertujuan untuk mengetahui konsentrasi induser *oat spelts xylan* optimum dalam memproduksi enzim xilanase.

Starter diinokulasikan ke dalam media PDB (*Potato Dextrose Broth*), difermentasi dan setelah jam ke-24 fermentasi dihentikan untuk penambahan induser *oat spelts xylan*. Kemudian difermentasi kembali sampai jam ke-72. Hasil fermentasi disaring untuk memisahkan biomassa dengan filtrat. Biomassa dikeringkan dengan oven pada suhu $\pm 80^\circ\text{C}$ dan filtrat yang dihasilkan disentrifus untuk memisahkan enzim ekstrak kasar dari sel dan medianya agar dapat ditentukan aktivitas spesifik enzim xilanase [4].



Gambar 2. Grafik penentuan sel kering pada berbagai variasi konsentrasi oat spelts xylan.

Enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat induktif, sehingga untuk memperoleh produk yang maksimal, dibutuhkan suatu induser oat spelts xylan sebagai pemicu produksi enzim xilanase agar produksi enzim xilanase meningkat [2].



Gambar 3. Grafik penentuan aktivitas spesifik enzim xilanase pada berbagai variasi konsentrasi oat spelts xylan.

Konsentrasi 0,0% (tidak ada penambahan oat spelts xylan) sel *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan baik, ini menunjukkan bahwa sel tersebut mampu memanfaatkan sumber karbon glukosa dan nutrisi-nutrisi yang terdapat dalam media dengan maksimal. Karena tidak ada penambahan oat spelts xylan pada jam ke-24, sel tetap memanfaatkan nutrisi yang ada untuk pertumbuhannya.

Konsentrasi oat spelts xylan 0,8%, sel *Aspergillus niger* mengalami penurunan jumlah biomassa sel, karena penambahan oat spelts xylan pada jam ke-24 sel harus beradaptasi dengan oat spelts xylan, sehingga sel harus mengeluarkan enzim xilanase agar dapat menghidrolisis oat spelts xylan menjadi monomer-monomernya untuk dapat dimakan oleh sel. Karena sel harus memproduksi enzim xilanase, pertumbuhan sel mengalami perlambatan sehingga jumlah sel sedikit dan aktivitas xilanase juga kecil, yaitu 76,314 Unit/mg protein.

Konsentrasi oat spelts xylan 1,0% dan 1,2% mengalami peningkatan sehingga jumlah sel yang terbentuk juga meningkat dan aktivitas spesifik juga meningkat. Pada konsentrasi 1,4% jumlah sel mengalami penurunan yang sangat drastis, hal ini terjadi karena

konsentrasi yang tinggi dalam media mengharuskan sel sejak awal bekerja keras mengeluarkan enzim xilanase untuk digunakan menghidrolisis oat spelts xylan agar dapat dicerna oleh sel, sehingga sel mengalami perlambatan pertumbuhan.

Aktivitas spesifik xilanase tertinggi pada berbagai variasi konsentrasi oat spelts xylan terdapat pada penambahan konsentrasi 1,2% yaitu 469,490 Unit/mg protein. Hal ini terjadi karena semakin banyak konsentrasi oat spelts xylan yang ditambahkan maka *Aspergillus niger* akan mensekresikan xilanase lebih banyak untuk menghidrolisis xilan menjadi xilosa agar dapat digunakan untuk metabolisme sel.

Produksi Xilanase dengan Konsentrasi Optimum Xilan

Produksi xilanase dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan enzim xilanase dalam jumlah yang cukup banyak. Produksi dilakukan dengan menumbuhkan starter pada media PDB dan menambahkan induser oat spelts xylan 1,2% pada jam ke- 24 dan pemanenan dilakukan pada jam ke- 72. Tahap ini diperoleh xilanase ekstraseluler yang masih bercampur dengan protein-protein lain sehingga perlu dilakukan isolasi dan pemurnian untuk mendapatkan enzim xilanase murni.

Isolasi dan Pemurnian Enzim Xilanase Ekstraksi

Isolasi xilanase dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim xilanase dari protein-protein lain. Karena xilanase merupakan enzim ekstraseluler maka untuk mendapatkannya enzim disentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan adanya gaya sentrifugal pada partikel, dimana pada kecepatan sentrifugasi sama molekul dengan berat molekul yang lebih besar akan mengendap terlebih dahulu [7]. Endapan merupakan sisa komponen-komponen media dan sel *Aspergillus niger*, sedangkan supernatan merupakan enzim ekstrak kasar yang terdiri dari protein enzim dan protein non enzim. Enzim ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemurnian untuk mendapatkan enzim xilanase murni dengan proses fraksinasi bertingkat.

Fraksinasi Bertingkat dengan Garam Amonium Sulfat

Fraksinasi bertingkat amonium sulfat merupakan salah satu cara pengendapan protein menggunakan tingkat kejenuhan garam amonium sulfat yang berbeda-beda, sehingga akan diperoleh endapan protein yang berbeda-beda terhadap konsentrasi garam [8].

Fraksinasi diikuti dengan sentrifugasi untuk memisahkan endapan dengan supernatan. Endapan yang diperoleh merupakan protein enzim. Pada tahap fraksinasi amonium sulfat bertingkat diperoleh fraksi-fraksi enzim dengan tingkat kejenuhan F1 (0-20%), F2(20- 40%), F3(40-60%), F4(60-80%), F5(80- 100%) yang kemudian diikuti pemurnian lebih lanjut.

Dialisis

Dialisis yaitu proses pemisahan partikel-partikel protein dengan ukuran besar dari partikel amonium sulfat yang berukuran kecil melalui membran selofan. Proses dialisis berdasarkan pada prinsip difusi, yaitu

adanya perbedaan konsentrasi larutan bufer asetat antara di dalam (0,1 M) dan di luar membran (0,001 M). Molekul yang berukuran kecil yaitu garam amonium sulfat bersama bufer asetat akan keluar melalui pori-pori membran selofan sedangkan protein yang berukuran lebih besar akan tetap berada di dalam membran.

Adanya kandungan amonium sulfat pada larutan bufer di luar membran pada proses dialisis dapat diidentifikasi dengan barium klorida. Jika dengan penambahan barium klorida pada larutan bufer diluar membran masih menghasilkan endapan putih, maka larutan tersebut masih mengandung amonium sulfat yaitu endapan berwarna putih [9].

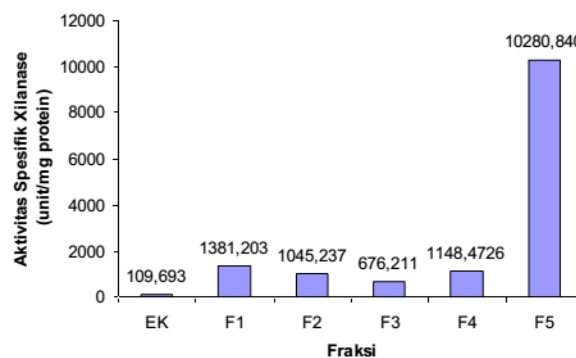
Penentuan Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Xilanase

Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim per mg protein pada kondisi optimum. Aktivitas enzim biasanya digunakan untuk menunjukkan banyaknya enzim yang berperan dalam suatu reaksi enzimatik. Untuk mengetahui aktivitas spesifik xilanase dilakukan penentuan unit aktivitas dan kadar protein xilanase.

Definisi satu unit aktivitas xilanase adalah aktivitas xilanase yang dapat menghasilkan 1 mg xilosa pada kondisi optimum [10]. Penentuan unit aktivitas xilanase dengan mereaksikan enzim hasil isolasi dengan *oat spelts xylan* sebagai substrat dan bufer asetat, yang selanjutnya diinkubasi menghasilkan produk xilosa yang dapat dihitung dengan menggunakan metode DNS (Dinitrosalicylic acid). Absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum xilosa. Absorbansi yang diperoleh kemudian diplotkan terhadap kurva standar xilosa untuk mengetahui besarnya unit aktivitas yang terdapat pada ekstrak kasar dan tiap fraksi.

Penentuan kadar protein pada tiap-tiap fraksi diukur dengan menggunakan metode *Lowry* yaitu analisa kuantitatif berdasarkan pembentukan kompleks berwarna biru hasil reaksi antara ion Cu^{2+} dengan nitrogen dari rantai peptida dalam suasana basa dan reduksi fosfomolibdat fosfotungstat pada reagen Folin Ciocalteu oleh rantai samping asam amino dan triptofan menjadi heteropolimolibdenum berwarna biru [11] yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum BSA dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Gambar 4. menunjukkan bahwa aktivitas spesifik xilanase tertinggi pada F5, yaitu sebesar 10280,840 Unit/mg protein.



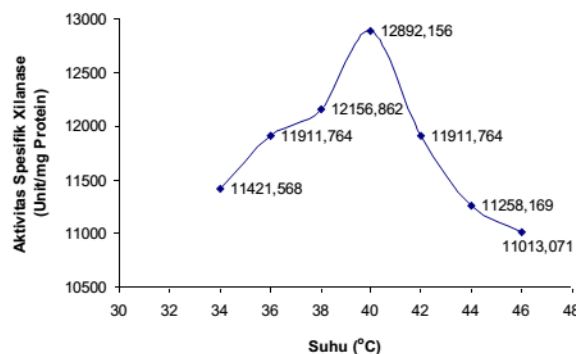
Gambar 4. Grafik Aktivitas Spesifik Xilanase dari Hasil Isolasi *Aspergillus niger* pada Tiap Fraksi

Karakterisasi Xilanase

Karakterisasi enzim xilanase meliputi suhu, waktu inkubasi dan pH. Fraksi yang digunakan untuk karakterisasi adalah F5 dengan aktivitas terbesar.

Penentuan Suhu Optimum

Suhu optimum yaitu suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim tertentu untuk menghasilkan suatu produk [8].



Gambar 5. Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase dari *Aspergillus niger*

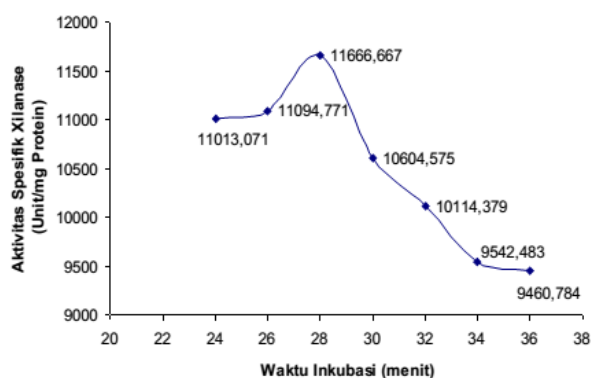
Dari hasil penelitian, diperoleh bahwa aktivitas spesifik xilanase tertinggi diperoleh pada suhu optimum 40°C. Bertambahnya suhu sampai dengan suhu optimum menyebabkan terjadinya kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak enzim dan substrat. Energi tersebut akan menaikkan benturan antara molekul-molekul sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi membentuk kompleks enzim substrat yang lebih stabil dan produk yang terbentuk juga akan semakin banyak sehingga aktivitas enzim bertambah.

Suhu di bawah suhu optimum aktivitas spesifik xilanase kecil karena kurangnya energi untuk bereaksi menyebabkan kemampuan gerak enzim dan substrat menjadi kecil sehingga kompleks enzim- substrat yang terbentuk hanya sedikit dan produk xilosa yang dihasilkan sedikit.

Suhu di atas suhu optimum, kenaikan suhu menyebabkan turunnya aktivitas spesifik xilanase hal ini terjadi karena enzim merupakan suatu protein yang dapat terdenaturasi pada suhu tinggi. Denaturasi adalah perubahan konformasi enzim akibat adanya perenggangan ikatan hidrogen yang bersifat reversibel pada struktur tersier xilanase. Perenggangan tersebut akan mempengaruhi sisi aktif enzim xilanase untuk berikatan dengan substrat, sehingga kompleks enzim substrat yang terbentuk sedikit dan produk xilosa yang dihasilkan sedikit.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi adalah waktu kontak antara enzim dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat yang akhirnya terbentuk produk. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik diperoleh waktu inkubasi optimum yaitu 28 menit dengan aktivitas sebesar 11666,667 Unit/mg protein.



Gambar 6. Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase dari *Aspergillus niger*.

Waktu inkubasi di bawah waktu inkubasi optimum, aktivitas spesifik xilanase rendah, hal ini disebabkan belum semua sisi aktif enzim berikatan dengan substrat, sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk masih sedikit dan produk xilosa yang dihasilkan sedikit.

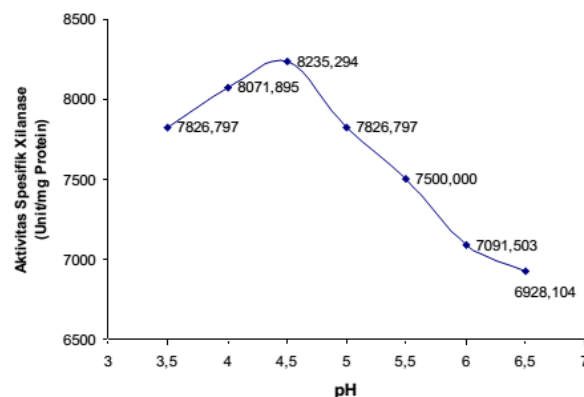
Waktu inkubasi di atas waktu inkubasi optimum terjadi penurunan aktivitas spesifik xilanase. Hal ini disebabkan karena adanya inhibisi reaksi enzimatik oleh produk yang terbentuk yaitu P-D xilosa yang memiliki kemiripan bentuk dengan substrat (xilan). Inhibisi produk dapat terjadi dengan cara inhibitor akan berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor. Adanya reaksi inhibisi ini menyebabkan produk P-D xilosa yang terbentuk sedikit sehingga aktivitas spesifik xilanase menjadi turun.

Penentuan pH Optimum

pH optimum adalah pH yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim tertentu untuk menghasilkan produk [8]. Aktivitas spesifik xilanase terbesar pada pH 4,5 yaitu 8235,294 Unit/mg protein.

Pada pH 4,5, OH⁻ dari lingkungan akan menarik H⁺ dari gugus -COOH sehingga bersifat nukleofilik. Enzim

mengalami penurunan aktivitas pada saat pH di atas maupun di bawah pH optimum.



Gambar 7. Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase dari *Aspergillus niger*

pH lebih rendah dari pH optimumnya, suasana lingkungan enzim berubah sangat asam (kadar H⁺ meningkat), maka terlalu banyak ion-ion H⁺ yang akan mengelilingi xilanase dan kemudian ion-ion H⁺ tersebut akan tertarik pada gugus -NH₂ pada xilanase dan membentuk NH₃⁺, akibatnya xilanase dalam keadaan kation. Xilanase dalam keadaan ini disebut mengalami protonasi. Selain itu, ion H⁺ dari gugus -COOH pada sisi aktif Glu106 akan lebih sukar lepas karena lingkungan enzim bersifat sangat asam, sehingga kompleks enzim substrat tidak terbentuk.

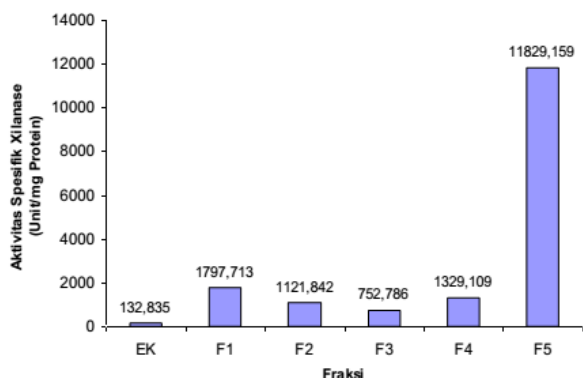
pH lebih tinggi dari keadaan optimumnya, suasana lingkungan enzim akan menjadi sedikit basa (ada sedikit kadar OH⁻), ion-ion OH⁻ yang mengelilingi enzim xilanase tersebut akan berinteraksi dengan daerah-daerah positif yang terdapat dalam enzim xilanase yaitu ion-ion H⁺ pada gugus -COOH yang merupakan sisi aktif xilanase, akibatnya enzim xilanase dalam keadaan anion. Enzim xilanase dalam keadaan ini mengalami deprotonasi [12]. Selain itu banyaknya ion - OH⁻ dalam lingkungan dapat mengganggu reaksi enzimatik karena ion OH⁻ merupakan nukleofil yang dapat berinteraksi dengan substrat. Jika ion OH⁻ dari lingkungan yang bereaksi dengan substrat maka produk yang diharapkan tidak terbentuk.

Aktivitas Xilanase pada Kondisi Optimum (Suhu 40°C, pH 4,5 dan Waktu Inkubasi 28 menit)

Penentuan aktivitas spesifik enzim xilanase pada kondisi optimum menunjukkan ada peningkatan dibanding aktivitas spesifik sebelum optimum. Aktivitas spesifik xilanase tertinggi tetap pada F5 yaitu 11829 Unit/mg protein dan sebelum kondisi optimum yaitu sebesar 10280,840 Unit/mg protein pada F5.

Peningkatan nilai aktivitas spesifik xilanase pada kondisi optimum ini disebabkan karena konformasi enzim terbentuk sedemikian rupa sehingga sisi aktif dari xilanase tepat dan mampu mengadakan kontak dengan substrat. Akibatnya, kompleks enzim-substrat yang terbentuk menjadi maksimal, sehingga produk yang

dihasilkan menjadi banyak dan aktivitas spesifiknya menjadi lebih besar [13].



Gambar 8. Grafik Aktivitas Spesifik Xilanase dari Hasil Isolasi *Aspergillus niger* Tiap Fraksi pada Kondisi Optimum

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian diperoleh konsentrasi optimum oat spelts xylan 1,2% dengan aktivitas spesifik xilanase sebesar 469,490 Unit/mg protein dan hasil isolasi enzim xilanase diperoleh aktivitas spesifik xilanase tertinggi pada F5 sebesar 10280,840 Unit/mg protein. Karakterisasi xilanase hasil isolasi diperoleh kondisi optimum pada suhu 40°C, waktu inkubasi 28 menit, pH 4,5 dan aktivitas spesifik F5 pada kondisi optimum sebesar 11829,159 Unit/mg protein.

5. Daftar Pustaka

- [1] A. Sunna, G. Antranikian, Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17 (1997) 39-67.
- [2] Nur Richana, Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia, *Buletin AgroBio*, 5 (2002) 29-36.
- [3] Chandralata Raghukumar, Usha Muraleedharan, V. R. Gaud, R. Mishra, Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31 (2004) 433-441.
- [4] S.P. Colowick, C. Guthrie, G.R. Fink, M.I. Simon, J.N. Abelson, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1991.
- [5] JH Paul, Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* L-asparaginase, *Biochemical Journal*, 203 (1982) 109-115.
- [6] Robert A. Copeland, *Methods for Protein Analysis: A Practical Guide for Laboratory Protocols*, Springer US, 2013.
- [7] Yuehai Song, Gang Wei, Rongchun Xiong, Structure and properties of PbO₂-CeO₂ anodes on stainless steel, *Electrochimica Acta*, 52 (2007) 7022-7027.
- [8] M. Wirahadikusumah, *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*, Penerbit ITB, Bandung, 1989.

- [9] G. Svehla, Vogel - Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro, edisi 5 ed., PT. Kalman Media Pusaka, Jakarta, 1985.
- [10] UA Okafor, VI Okochi, BM Onyegeme-Okerenta, S Nwodo-Chinedu, Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes, *African Journal of Biotechnology*, 6 (2007).
- [11] John Magruder Clark, Robert L. Switzer, *Experimental Biochemistry*, W. H. Freeman, 1977.
- [12] Frédéric de Lemos Esteves, Virginie Ruelle, Josette Lamotte-Brasseur, Birgit Quinting, Jean-Marie Frère, Acidophilic adaptation of family 11 endo-β-1,4-xylanases: Modeling and mutational analysis, *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 13 (2004) 1209-1218.
- [13] Albert L Lehninger, *Dasar-dasar biokimia*, Erlangga, Jakarta, 1990.