

**PURIFIKASI ENZIM XILANASE DARI *Bacillus* sp. AQ-1  
DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

**PUJI RAHAYU**

**0606002332**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
2008**

**PURIFIKASI ENZIM XILANASE DARI *Bacillus* sp. AQ-1  
DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk  
memperoleh gelar Magister Sains**

**Oleh :**

**PUJI RAHAYU**

**0606002332**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
2008**

## LEMBAR PENGESAHAN

**JUDUL : PURIFIKASI ENZIM XILANASE DARI *Bacillus* sp. AQ-1  
DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

**Nama : Puji Rahayu  
NPM : 0606002332**

**MENYETUJUI  
1. Komisi Pembimbing**

**Dr. Harmita  
Pembimbing I**

**Dr. Ir. Siswa Setyahadi, M.Sc  
Pembimbing II**

**PENGUJI**

**Dr. Amarila Malik, MS.  
Penguji I**

**Dr. Herman Suryadi, MS.  
Penguji II**

**2. Ketua Program  
Pascasarjana Program  
Farmasi FMIPA-UI**

**3. Ketua Program  
Pascasarjana FMIPA-UI**

**Prof. Dr. Effionora Anwar, MS  
NIP 130 536 769**

**Dr. Adi Basukriadi, M. Sc  
NIP 131 472 297**

**Tanggal lulus: 30 Desember 2008**

**NAME : Puji Rahayu**  
**TITLE : PURIFICATION OF XYLANASE FROM *Bacillus* sp. AQ-1 BY COLUMN CHROMATOGRAPHY**

Thesis Supervisors: Dr. Harmita  
Dr. Ir. Siswa Setyahadi, MSc.

### SUMMARY

Xylanase is the commercial enzyme in industry and agriculture. This enzyme have important application in several biotechnological processes such as in the fuel and chemical production, improvement of bakery product, food and feed industry, cellulose manufacturing as in the textile industry, increasing the brightness of the pulp in pulp and paper industries. The hydrolysis of xylan to xylo-oligosaccharide and xylose is also catalyzed by xylanase. In pharmacy field, the hydrolysis product can be used as tablet coated and natural sweetener. The purity of enzyme is very important to make stability of enzyme in order to prevent enzyme denaturation. Aims of the present study were to purify xylanase from *Bacillus* sp. AQ-1 and immobilization of xylanase. The enzyme was purified by anion exchange and gel filtration chromatography, while immobilization of xylanase on mixed cellulose ester membrane was carry out by covalent methode. The result showed that purification of xylanase produced two type of xylanase (xylanase A and B). The molecular mass of xylanase A and B were 15.7 and 57.7 kDa, respectively. Efficiency of xylanase immobilization is 68.38% at xylanase loading of 0,105 g/m<sup>2</sup>.

*Keywords: xylanase, Bacillus sp., enzyme purification*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT karena Dia penyebab segala kekuatan bagi semua makhluknya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis yang berjudul “Purifikasi enzim xilanase dari *Bacillus* sp. AQ-1 dengan kromatografi kolom”. Tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan guna memperoleh gelar Magister Sains (MSi.) pada Program Pascasarjana Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Ucapan terima kasih yang tulus dan penuh rasa hormat penulis sampaikan kepada Bapak Dr. Harmita dan Bapak Dr. Ir. Siswa Setyahadi, MSc. selaku pembimbing yang telah dengan sabar meluangkan waktu, memberi petunjuk, arahan dan bimbingan kepada penulis selama penelitian dan penulisan tesis. Kepada Ibu Dr. Amarila Malik, MS., Bapak Dr. Herman Suryadi, MS dan Bapak Dr. Arry Yanuar, MS selaku penguji dan moderator yang telah memberikan saran dan masukan yang luar biasa. Kepada Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS selaku Ketua Program Studi Pascasarjana Ilmu Kefarmasian, Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA-UI beserta seluruh staff pengajar atas segala bantuan dan dukungannya selama pendidikan. Kepala Laboratorium Teknologi Bioindustri BPPT-Puspiptek Serpong: Ibu Ir. Trismilah, MSi. yang telah memberikan ijin penelitian beserta staff peneliti laboratorium (Ibu Dr. Budiasih Wahyuntari, Bapak Ir. Achmadin Luthfi, M.Eng., Rita Rahmawati) atas arahan yang diberikan kepada

penulis. Serta kepada Ibu Prof. Dr. Leenawaty Limantara, MSc. beserta rekan-rekan di The Mochtar Riady Institute for Nanotechnology (MRIN), Lippo Karawaci dan Universitas Ma Chung, Malang atas pengertian dan semangat yang tiada henti diberikan kepada penulis.

Terima kasih dan cinta yang mendalam juga penulis haturkan kepada keluarga tercinta: Bapak, Ibu, mbak Rini, mas Agus, dèk Hani dan Wisnu atas doa, perhatian, semangat dan kasih sayang berlimpah yang diberikan kepada penulis. Juga kepada sahabat yang senantiasa memberikan motivasi dan dukungannya: Lina, Sovi, Pramudya dan Andi.

Selesainya tesis ini juga tidak terlepas dari semangat yang selalu diberikan rekan-rekan seperjuangan di Pascasarjana Ilmu Kefarmasian FMIPA-UI, khususnya di Kimia Farmasi: Bapak Drs. Kaptan CKM Gogok Harianto, MSi. Apt., Ibu Dra. Eko Kusumastuti, Ibu Ofa Susanti Beta, SSi. Apt., Bapak Supandi, MSi. Apt., Bapak Armon Fernando, SSi. Apt. serta rekan-rekan semuanya atas dukungan dan kebersamaan yang tidak akan pernah terlupakan. Juga kepada pihak-pihak yang tidak dapat penulis sebutkan atas kontribusinya dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Akhirnya dengan segala keterbatasan yang ada, penulis berharap tesis ini akan memberikan manfaat berarti bagi penulis sendiri, kalangan akademisi, masyarakat umum demi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di Indonesia.

Penulis

2008



## DAFTAR ISI

halaman

<b>SUMMARY .....</b>	<b>i</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>x</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
A. Xilanase.....	5
B. <i>Bacillus</i> sp. AQ-1 .....	7
C. Tandan kosong kelapa sawit .....	8
D. Fermentasi.....	10
E. Purifikasi Enzim .....	11
1. Kromatografi penukar ion .....	13
2. Kromatografi filtrasi gel.....	15
3. Ultrafiltrasi .....	16
F. Identifikasi Xilanase .....	17
1. Elektroforesis.....	17
2. Zimografi .....	18
3. Aktivitas enzim .....	19
4. Kadar protein.....	20
G. Amobilisasi Enzim.....	21

### **BAB III. METODOLOGI PENELITIAN ..... 23**

A. Alat .....	23
B. Bahan .....	23
C. Lokasi .....	24
D. Cara Kerja.....	24
1. Produksi enzim xilanase.....	24
a. Pembuatan inokulum/starter .....	24
b. Fermentasi .....	25
2. Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase.....	25
3. Uji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase.....	25
4. Uji pengaruh bufer terhadap kestabilan enzim xilanase.....	26
5. Purifikasi enzim xilanase .....	26
a. Penyiapan ekstrak kasar enzim xilanase .....	26
b. Kromatografi penukar ion.....	27
c. Kromatografi filtrasi gel .....	27
d. Ultrafiltrasi .....	28
6. Identifikasi enzim xilanase.....	29
a. Elektroforesis .....	29
b. Zimografi.....	30
c. Uji aktivitas enzim xilanase .....	31
d. Analisa kadar protein .....	32
e. Aktivitas spesifik enzim xilanase .....	33
7. Amobilisasi enzim xilanase.....	33

### **BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... 34**

A. Produksi Enzim Xilanase .....	34
B. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase.....	36
C. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase .....	37
D. Pengaruh Bufer Terhadap Kestabilan Enzim Xilanase .....	39
E. Purifikasi Enzim Xilanase .....	40

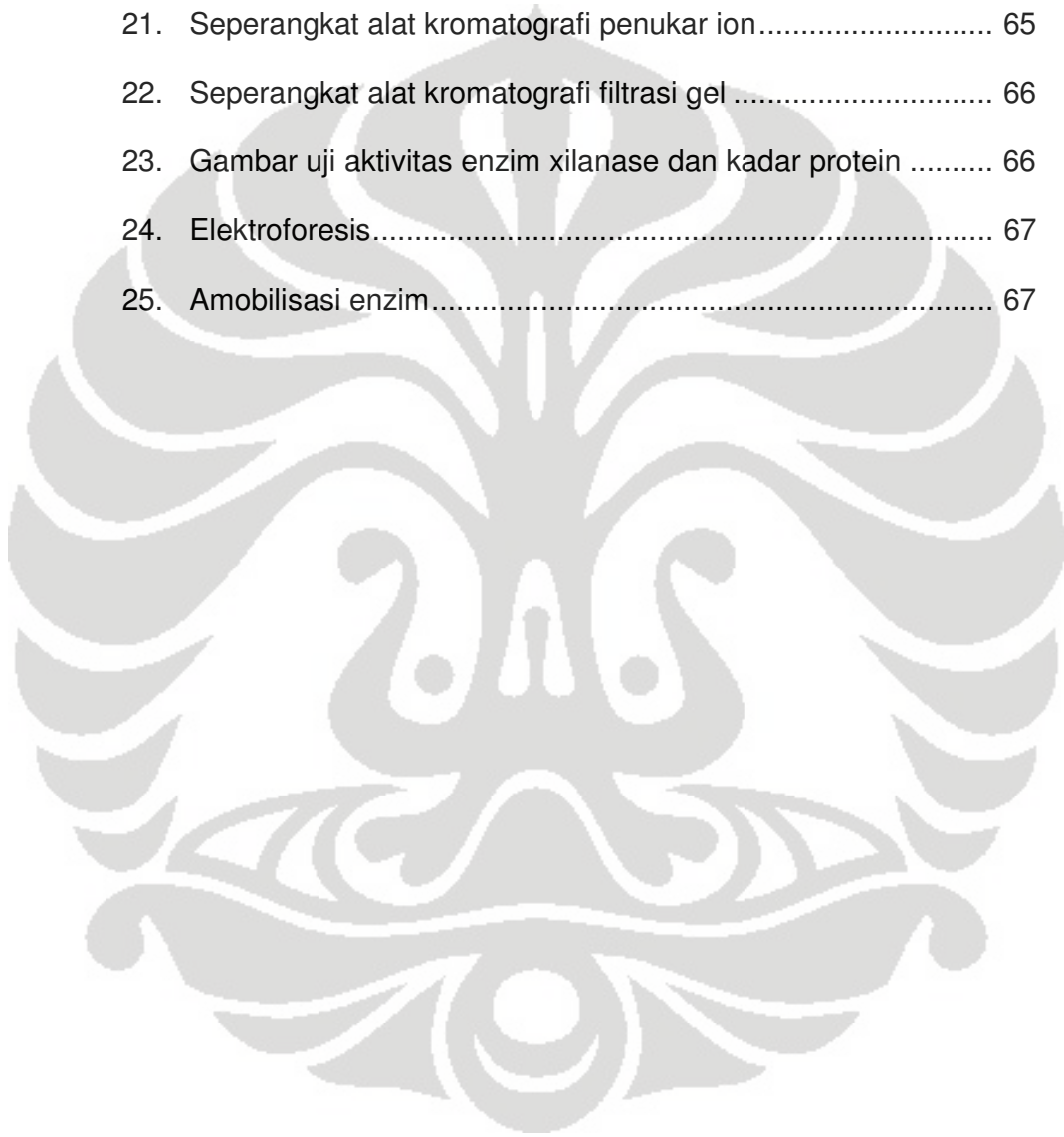


1. Penyiapan ekstrak kasar enzim xilanase.....	41
2. Kromatografi penukar ion .....	41
3. Kromatografi filtrasi gel.....	44
4. Ultrafiltrasi .....	46
F. Identifikasi Enzim Xilanase .....	47
1. Elektroforesis.....	47
2. Zimografi .....	50
G. Amobilisasi Enzim Xilanase.....	53
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>56</b>
A. Kesimpulan.....	56
B. Saran.....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>57</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur xilan .....	6
2. Kelapa sawit .....	8
3. Bagan pertukaran ion .....	14
4. Mekanisme kromatografi filtrasi gel .....	16
5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase .....	36
6. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase.....	38
7. Pengaruh bufer terhadap kestabilan enzim xilanase .....	39
8. Kromatogram purifikasi enzim xilanase dengan kromatografi penukar ion.....	42
9. Aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi kromatografi penukar ion .....	43
10. Kromatogram purifikasi enzim xilanase dengan kromatografi filtrasi gel .....	44
11. Aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi kromatografi filtrasi gel .....	45
12. Pewarnaan protein dengan metode <i>silver staining</i> .....	48
13. Penentuan suhu aktif enzim xilanase dalam gel poliakrilamida.....	50
14. Zimogram enzim xilanase hasil purifikasi .....	51
15. Estimasi berat molekul enzim xilanase .....	53
16. Kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase .....	63

17. Kurva kalibrasi kadar protein .....	63
18. Kurva kalibrasi berat molekul .....	64
19. Fermentor.....	64
20. Spektrofotometer Hitachi UV-Vis U-2001 .....	65
21. Seperangkat alat kromatografi penukar ion.....	65
22. Seperangkat alat kromatografi filtrasi gel .....	66
23. Gambar uji aktivitas enzim xilanase dan kadar protein .....	66
24. Elektroforesis.....	67
25. Amobilisasi enzim.....	67

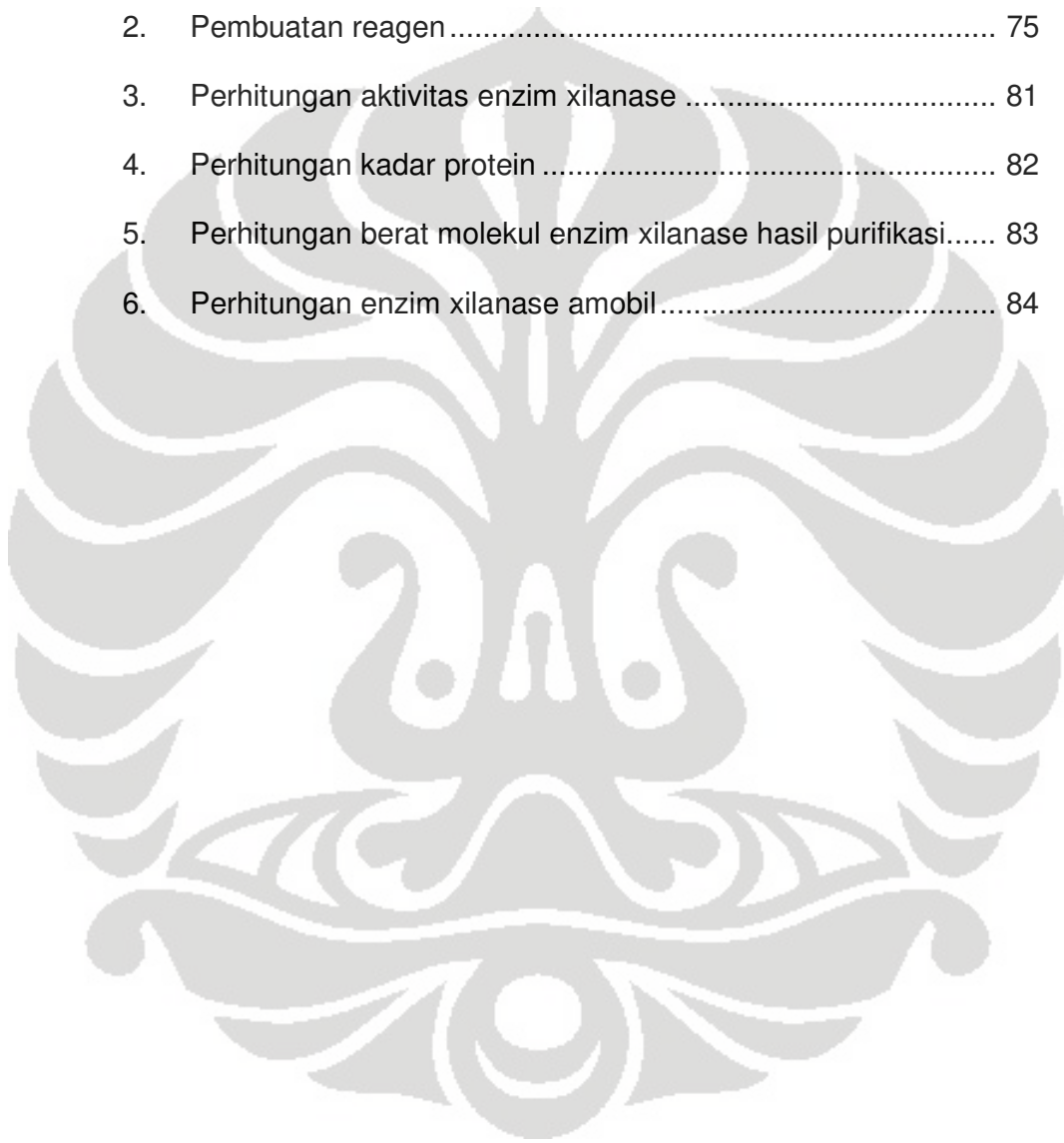


## DAFTAR TABEL

Tabel		halaman
1.	Persentase akrilamida.....	18
2.	Purifikasi enzim xilanase dari <i>Bacillus</i> sp. AQ-1 .....	46
3.	Data absorbansi kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase .....	68
4.	Data absorbansi kurva kalibrasi kadar protein.....	68
5.	Data nilai Rf kurva kalibrasi berat molekul.....	68
6.	Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dari tahap purifikasi .....	69
7.	Data absorbansi kadar protein dari tahap purifikasi .....	69
8.	Data absorbansi uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase.....	69
9.	Data absorbansi uji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase.....	70
10.	Data absorbansi pengaruh bufer terhadap kestabilan enzim xilanase.....	70
11.	Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi hasil kromatografi penukar ion .....	71
12.	Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi hasil kromatografi filtrasi gel .....	72
13.	Data absorbansi aktivitas enzim xilanase amobil .....	73
14.	Data absorbansi kadar protein enzim xilanase amobil .....	73

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	halaman
1. Skema kerja penelitian .....	74
2. Pembuatan reagen .....	75
3. Perhitungan aktivitas enzim xilanase .....	81
4. Perhitungan kadar protein .....	82
5. Perhitungan berat molekul enzim xilanase hasil purifikasi.....	83
6. Perhitungan enzim xilanase amobil.....	84



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. LATAR BELAKANG

Pengembangan dan penelitian teknologi yang tepat guna mutlak diperlukan di kalangan industri, mengingat banyak hasil produksi dari suatu industri dapat diperoleh atau ditingkatkan kualitasnya setelah diterapkannya bioteknologi pada proses produksinya. Bioteknologi telah terbukti mampu melipatgandakan produktivitas, efektifitas dan efisiensi produksi. Sebagian besar ilmuwan dan industrialis dunia meyakini bahwa bioteknologi akan mampu memenuhi kebutuhan manusia terhadap bahan pangan, serat (pakaian), kayu (papan), obat-obatan, kosmetika, energi dan bahan-bahan hayati lainnya (Dahuri, 2004).

Xilanase adalah salah satu enzim produk bioteknologi yang telah dimanfaatkan baik dalam bidang pangan, non pangan dan farmasi. Di bidang pangan, enzim tersebut memiliki nilai komersial yang tinggi (Querido *et al.*, 2006) misalnya pada produksi sereal, roti, teh, coklat, kopi cair, penjernihan sirup atau sari buah-buahan, minyak nabati dan pati (Wong and Saddler, 1993; Poutanen, 1997; Beg *et al.*, 2001; Monti *et al.*, 2003) serta campuran makanan ternak (Paridon *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1999). Kegunaannya di bidang non pangan ialah dalam proses pembuatan bubur kertas (*pulping*) dan pemutihan kertas (*bleaching*) (Senior *et al.*, 1990, Horikoshi 1996). Penggunaan xilanase pada pemutihan kertas ini telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi



dan sekarang telah digunakan pada beberapa pabrik kertas (Bourbonnais *et al.*, 1997; Ruiz-Arribas *et al.*, 1995). Selain itu, xilanase juga berperan pada industri tekstil (Querido *et al.*, 2006; Godfrey and West, 1996), bahan bakar (*fuel*) dan bahan-bahan kimia (Biely, 1985; Woodward, 1984). Xilanase juga diperlukan dalam proses biodegradasi xilan, yaitu suatu biopolimer terbanyak kedua setelah selulosa. Polimer ini merupakan komponen utama hemiselulosa yang ada di alam dalam jumlah besar dan merupakan produk buangan dalam industri pertanian (Simpson *et al.*, 1991).

Xilanase mampu menghidrolisis xilan menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa (Takahashi *et al.*, 2000). Di bidang farmasi, produk hidrolisis xilan tersebut dapat digunakan pada proses pelapisan tablet dan pengganti gula bagi penderita diabetes (Kulkarni *et al.*, 1999). Di Malaysia, gula xilosa juga dimanfaatkan sebagai bahan campuran pada pembuatan pasta gigi karena dapat berfungsi sebagai penguat gigi. Selanjutnya, xilosa dapat dihidrogenasi menjadi xilitol dengan bantuan katalisator nikel, pada suhu 80-140°C dan tekanan 50 atm. Xilitol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) merupakan bahan pemanis alternatif yang memiliki sifat sangat baik bagi pengembangan produk pangan maupun produk farmasi. Beberapa sifat yang dimiliki adalah mudah larut dalam air, tahan terhadap panas/tidak mudah mengalami karamelisasi (cocok untuk pembuatan jenis roti tertentu), memberikan sensasi dingin (*cooling sensation*) seperti mentol, memiliki tingkat kemanisan yang sama dengan sukrosa (gula tebu), menghasilkan energi hanya 2,4 kkal/g (cocok bagi penderita obesitas),

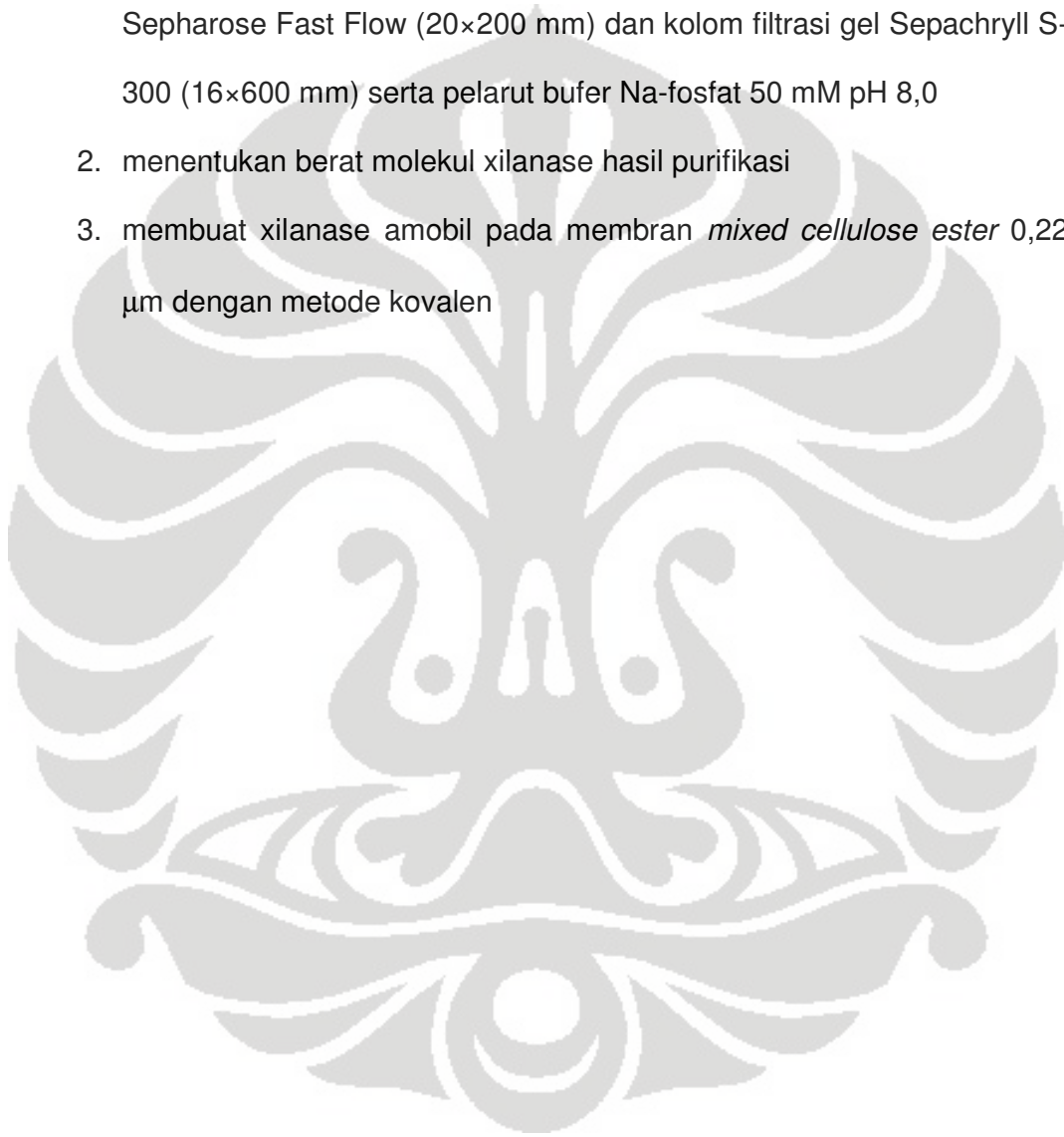
tidak memerlukan insulin pada proses metabolismenya (cocok bagi penderita diabetes), serta bersifat *anticariogenic* (melindungi gigi dari kerusakan) (Suryadi dkk., 2000; Yulianto, 2003).

Beragamnya kegunaan xilanase dan dalam rangka mengurangi ketergantungan impor xilanase untuk kebutuhan industri, maka perlu adanya peningkatan produksi dan inovasi untuk aplikasinya di bidang pangan, non pangan maupun farmasi. Namun, permasalahan yang kemudian muncul adalah ketersediaan dan harga enzim, karena harga enzim ini sangat ditentukan oleh harga substrat pertumbuhan yang dipergunakan (Hinnman, 1994). Penggunaan substrat dengan harga murah untuk industri produksi enzim sangat dianjurkan demi menurunkan harga produksi dan salah satu upaya yang dapat ditempuh adalah dengan memanfaatkan limbah hasil pertanian, seperti tandan kosong kelapa sawit, jerami padi, tongkol jagung dan lain-lain sebagai substrat. Kemurnian enzim juga diperlukan untuk menjaga kestabilan enzim yang ditunjukkan dengan satuan aktivitas spesifik enzim, dimana semakin besar tingkat kemurnian enzim maka semakin besar pula aktivitas spesifiknya. Beberapa metode dapat dilakukan untuk memurnikan enzim, salah satunya adalah dengan kromatografi kolom. Dixon *et al.* (1979) menyatakan bahwa pemurnian enzim dengan metode ini merupakan cara yang paling efektif dibandingkan cara isolasi lainnya. Untuk aplikasinya di bidang industri, xilanase amobil dipandang lebih menguntungkan karena enzim dapat digunakan kembali setelah reaksi selesai, bersifat stabil dan tidak mudah terkontaminasi sehingga lebih ekonomis.

## B. TUJUAN PENELITIAN

Berdasarkan latar belakang tersebut maka tujuan penelitian adalah:

1. memurnikan enzim xilanase dari *Bacillus* sp. AQ-1 dengan kromatografi kolom menggunakan kolom penukar anion DEAE Sepharose Fast Flow (20×200 mm) dan kolom filtrasi gel Sepachryll S-300 (16×600 mm) serta pelarut bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0
2. menentukan berat molekul xilanase hasil purifikasi
3. membuat xilanase amobil pada membran *mixed cellulose ester* 0,22  $\mu\text{m}$  dengan metode kovalen



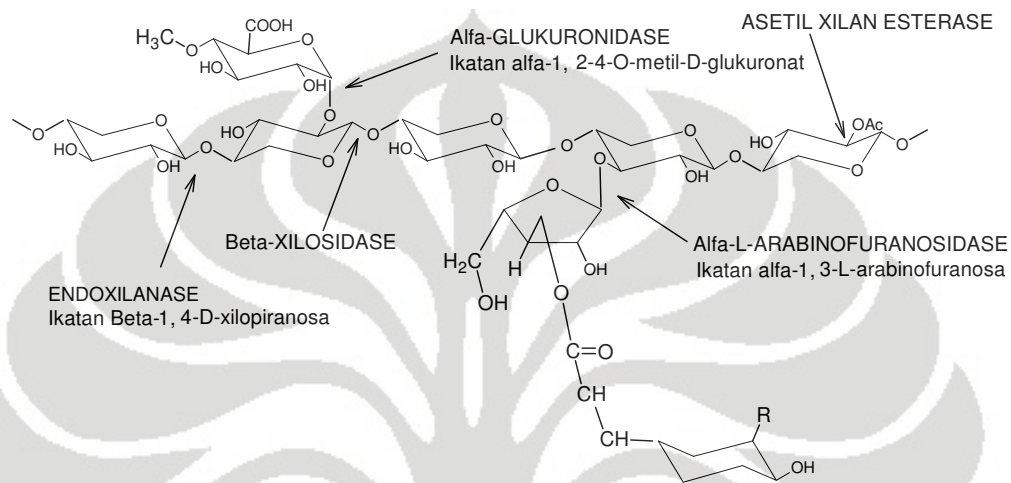
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. XILANASE

Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis hemiselulosa seperti xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Hemiselulosa merupakan biomassa yang disusun oleh xilan, yaitu suatu heteropolimer kompleks yang tersebar luas di alam dalam jumlah melimpah dengan rantai utama gugus D-xilosa yang biasanya tersubstitusi oleh gugus asetil, arabinosil, dan glukuronosil (Whistler and Richards, 1970; Biely, 1985; Takahashy *et al.*, 2000). Karena kekomplekan struktur xilan ini maka hidrolisisnya memerlukan aksi dari sederetan enzim (Rahman *et al.*, 2003; Tuncer and Ball, 2003) yang biasanya tersusun atas  $\beta$ -1,4-endoxilanase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glukuronidase dan asetil xilan esterase (Sunna and Antranikian, 1997). Enzim-enzim ini berperan kooperatif untuk memotong xilan menjadi monomer gula sederhana berupa xilo-oligosakarida, xilobiosa dan xilosa (Rahman *et al.*, 2003; Tuncer and Ball, 2003). Semua enzim tersebut dapat ditemukan dalam berbagai jenis bakteri dan mikroorganisme (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan dan Prema, 2000; Beg *et al.*, 2001) seperti jamur (Coyghlan and Hazlewood, 1993; Sunna and Antranikian, 1997) atau hewan tertentu (Yamaura *et al.*, 1997).  $\beta$ -1,4-Endoxilanase dan  $\beta$ -D-xilosidase adalah enzim yang bertanggung jawab dalam pemotongan xilan.  $\beta$ -1,4-Endoxilanase menghidrolisis xilan yang tidak larut menjadi

xilo-ologosakarida yang larut, sementara  $\beta$ -D-xilosidase menghidrolisis xilo-oligosakarida dan xilobiosa untuk melepaskan D-xilosa (Sunna and Antranikian, 1997).



**Gambar 1.** Struktur xilan dan enzim yang terlibat dalam hidrolisisnya (Kulkarni *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001))

Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis antara lain:  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanasase dan endoxilanase.  $\beta$ -Xilosidase adalah enzim xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim ini akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida (Reilly, 1991). Eksoxilanasase mampu memutus xilan (rantai polimer xilosa) pada ujung reduksi sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Aktivitas transferase tersebut dapat terjadi baik pada gugus yang sama maupun berlainan sehingga proses ini juga mirip dengan polimerisasi. Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$ -1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus



ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan serta ada tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut.

Beberapa jenis bakteri dan jamur dapat digunakan sebagai starter untuk menghasilkan xilanase secara ekstraseluler. Beberapa contohnya adalah *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* dan *B. circulans*. Kulkarni *et al.* (1999) menyatakan bahwa enzim xilanase juga dapat dihasilkan oleh mikroorganisme seperti ganggang, khamir, protozoa, gastropoda dan artropoda. Mikroorganisme-mikroorganisme tersebut dapat memproduksi xilanase apabila tumbuh pada media xilan. Xilan tergolong karbohidrat yang disebut hemiselulosa. Hemiselulosa terdiri atas pentosa (xilosa, arabinosa) atau heksosa (glukosa, manosa, galaktosa) maupun asam uronat (Schlegel, 1994). Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme dengan sumber makanan dari limbah yang mengandung komponen lignoselulosa dan karbohidrat. Zat makanan utama yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba adalah sumber karbon, nitrogen dan mineral. Berbagai macam limbah dapat digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen diantaranya ampas tapioka, jerami padi, tongkol jagung, dedak padi, kulit pisang serta tandan kosong kelapa sawit.

### **B. *Bacillus* sp. AQ-1**

Pada penelitian ini, mikroba yang digunakan untuk menghasilkan enzim xilanase adalah *Bacillus* sp. AQ-1 yang merupakan mikroba koleksi



laboratorium mikrobiologi BPPT (Setyahadi, belum dipublikasikan). Isolat AQ-1 ini mulanya didapatkan dari endapan aquarium yang terbukti mampu membentuk zona bening terang di sekitar koloni pada media padat yang mengandung xilan (Agustin, 2005). Hasil ini menunjukkan bahwa xilan yang ada pada media padat dapat dihidrolisis oleh xilanase. Selanjutnya, isolat xilanolitik ini diidentifikasi lebih lanjut dengan serangkaian uji biokimia. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi dan fisiologi menunjukkan bahwa isolat AQ-1 termasuk golongan *Bacillus* sp. dengan ciri-ciri: Gram positif; endospora sentral; bentuk sel batang; tumbuh pada NaCl 7%, pati 1%, skim 1%; warna koloni putih, bentuk koloni menyebar, masih dapat tumbuh pada suhu 50°C, memberikan hasil positif pada uji katalase dan Voges-Proskauer, memberikan hasil negatif pada uji indol dan *methyl red*, mampu mereduksi nitrat, memproduksi nitrit dan lain-lain (Agustin, 2005).

### C. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT



Gambar 2. Kelapa sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guinensis* JACQS) adalah tanaman berkeping tunggal, termasuk dalam divisi Tracheophyta, sub divisi Pterospida, kelas Angiospermae, sub kelas Monocotyledonae dan suku Palmae (Hartley, 1988). Bagian paling populer untuk diolah dari kelapa sawit adalah buah. Bagian daging buah

menghasilkan minyak kelapa sawit mentah yang diolah menjadi bahan baku minyak goreng. Limbah yang dihasilkan dari proses pengolahan minyak kelapa sawit adalah limbah cair dan limbah padat. Limbah cair merupakan sisa dari proses pembuatan minyak sawit yang berbentuk cair, biasanya digunakan sebagai pupuk alternatif di lahan perkebunan kelapa sawit (*land application*). Limbah ini masih banyak mengandung unsur hara yang dibutuhkan oleh tanaman dan tanah. Limbah padatnya berupa tandan buah kosong dan cangkang sawit. Tandan buah kosong umumnya dimanfaatkan kembali di lahan perkebunan kelapa sawit untuk dijadikan pupuk kompos.

Tandan kosong kelapa sawit merupakan bagian dari pohon kelapa sawit yang berfungsi sebagai tempat buah kelapa sawit. Tandan tersebut merupakan limbah utama dari industri pengolahan kelapa sawit menjadi minyak sawit. Sebesar 23% tandan kosong kelapa sawit dapat dihasilkan dari tandan buah segar, sedangkan untuk limbah seratnya adalah sebesar 13,5% dan cangkang biji 5,5%, dengan komponen utama selulosa, hemiselulosa dan lignin (Darnoko, 1992). Setiap tandan kelapa sawit mengandung 62-70% buah sawit, sedangkan 30-38% sisanya adalah tandan kosong yang belum dimanfaatkan secara optimum (Naibaho, 1992). Tandan kosong kelapa sawit mengandung unsur kimiawi seperti lemak (9,25%); protein (3,52%); air (8,84%); abu (7,13%); serat kasar (41,44%); selulosa (45,95%); lignin (16,49%) dan hemiselulosa (22,84%) (Darnoko, 1992; Hogan and Leche, 1981). Tandan tersebut juga mengandung komponen mineral seperti kalium (2,13%); kalsium (0,18%);

magnesium (0,17%); mangan (0,05%); natrium (0,63%); besi (0,59%) dan  $P_2O_5$  (0,14%) (Irawadi, 1991).

#### **D. FERMENTASI**

Fermentasi adalah proses perubahan molekul kompleks seperti karbohidrat, protein, lemak dan senyawa lain menjadi molekul yang lebih kecil atau lebih sederhana sehingga mudah dimanfaatkan. Teknologi fermentasi umumnya memanfaatkan aktivitas mikroba secara efektif yang bersifat menguntungkan manusia. Sel yang melakukan proses fermentasi memiliki enzim yang akan mengubah hasil reaksi oksidasi menjadi senyawa yang bermuatan lebih positif agar dapat menangkap elektron dan menghasilkan energi (Winarno, 1983). Berdasarkan jenis media yang digunakan, proses fermentasi terdiri dari fermentasi medium padat dan fermentasi medium cair. Fermentasi medium padat adalah fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas, namun cukup mengandung air untuk pertumbuhan mikroba. Sedang fermentasi medium cair adalah fermentasi yang substratnya larut atau tersuspensi dalam fase cair (Chalal, 1985). Media fermentasi berperan penting dalam menunjang pertumbuhan bakteri penghasil enzim, apalagi untuk skala besar diperlukan media yang murah dan mudah diperoleh serta dapat menghasilkan enzim sesuai dengan yang diharapkan.

Beberapa faktor dapat mempengaruhi proses fermentasi enzim, diantaranya pH, suhu, agitasi, aerasi dan komposisi media. Nilai pH mempengaruhi fungsi membran enzim, kelarutan konstituen dan

komponen sel lainnya dalam media fermentasi. Setiap enzim mempunyai pH dan suhu optimum yang berbeda. Suhu yang terlalu tinggi menyebabkan protein terdenaturasi, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menurunkan aktivitas (Mardiah, 1990). Agitasi dan aerasi bertujuan untuk mensuplai oksigen dan mencampur media fermentasi sehingga membentuk suspensi enzim yang seragam. Aerasi diperlukan karena kebutuhan oksigen yang cukup tinggi dalam proses fermentasi (Rahman, 1989). Pemilihan media fermentasi yang tepat juga mempengaruhi mikroba dalam memproduksi enzim, karena mikroba memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi dan faktor esensial pertumbuhan seperti mineral dan vitamin untuk menopang pertumbuhannya.

#### **E. PURIFIKASI ENZIM**

Purifikasi enzim adalah isolasi enzim tertentu dari protein ekstrak kasar enzim yang masih mengandung sel mikroba dan komponen lainnya (Martin *et al.*, 1993). Kemurnian enzim dapat mempengaruhi aktivitas spesifik enzim tersebut. Enzim murni memiliki aktivitas spesifik lebih besar dibandingkan ekstrak kasar enzim, sehingga tingkat kemurnian enzim dapat diukur dari besar kecilnya nilai aktivitas spesifik enzim tersebut.

Beberapa metode pemurnian enzim diantaranya: mikrofiltrasi, ultrafiltrasi, fraksinasi, dialisis, kromatografi kolom dan elektroforesis. Mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi merupakan teknik pemurnian enzim dengan cara mengalirkan enzim melalui membran yang sangat halus. Spora



bakteri dan sel juga dapat dipisahkan dari enzim dengan metode ini. Fraksinasi adalah teknik pemurnian enzim dengan cara menambahkan senyawa tertentu yang berfungsi untuk menggumpalkan bahan-bahan lain. Proses ini diharapkan dapat memisahkan enzim dari protein-protein lainnya. Jenis senyawa yang dapat ditambahkan dalam proses tersebut misalnya pelarut organik atau garam tertentu. Dialisis adalah teknik pemurnian enzim dengan cara memisahkan molekul-molekul kecil (garam) dari molekul-molekul besar (protein). Teknik ini merupakan teknik lanjutan dari teknik fraksinasi yang tidak menghendaki adanya kelebihan garam. Namun teknik ini tidak bisa diterapkan pada skala industri karena memerlukan biaya besar, kecuali untuk enzim tertentu yang memerlukan tingkat kemurnian tinggi dan kestabilan yang harus selalu terjaga. Elektroforesis adalah teknik pemurnian enzim dengan cara memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid bermuatan di bawah pengaruh medan listrik. Beberapa jenis teknik elektroforesis diantaranya: elektroforesis kertas, elektroforesis selulosa/nitrat dan elektroforesis gel. Kromatografi kolom adalah teknik pemurnian enzim dengan mengalirkan suatu cairan (fase gerak) melalui kolom (fase diam) yang mengandung matriks bahan pengisi dan substansi yang akan dipisahkan berdasarkan perbedaan daya ikatnya terhadap bahan pengisi.

Kromatografi kolom dapat digunakan untuk mengisolasi dan memurnikan produk metabolit berkonsentrasi relatif rendah dari hasil fermentasi. Beberapa cara kromatografi kolom diantaranya kromatografi

penukar ion, kromatografi filtrasi gel, kromatografi interaksi hidrofobik, kromatografi afinitas dan kromatografi cair kinerja tinggi. Stanbury dan Whitaker (1984) membagi kromatografi kolom berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu kromatografi adsorpsi, afinitas, penukar ion dan filtrasi gel. Kromatografi adsorpsi bekerja berdasarkan perbedaan polaritas komponen-komponen sampel, biasa digunakan untuk memisahkan senyawa seperti steroid, karotenoid, klorofil dan lipid. Kromatografi afinitas bekerja dengan memisahkan komponen sampel berdasarkan interaksi biokimiawi antara komponen sampel dengan ligan yang terikat pada matriks adsorben; biasa digunakan untuk memurnikan enzim seperti lipoksigenase dan fenolase (Schwimmer, 1981).

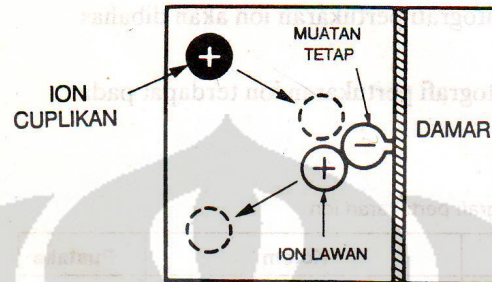
### **1. Kromatografi Penukar Ion**

Kromatografi penukar ion merupakan proses pemisahan dan pemurnian yang paling tua. Cara ini sudah dipakai sejak sekitar 5000 tahun yang lalu. Pada kromatografi modern, penukar ion dapat dipakai untuk memisahkan komponen cuplikan yang bermuatan ion atau dapat menjadikannya bermuatan ion. Contohnya, garam ion seperti NaCl dan senyawa amfoter seperti asam amino dapat dipisahkan atau dimurnikan dengan cara ini. Kromatografi penukar ion dibagi menjadi kromatografi penukar anion dan penukar kation (Johnson and Stevenson, 1978).

Kromatografi penukar ion mampu memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan muatannya terhadap ion pada bahan kolom (Engel, 1996). Pemisahan dapat terjadi karena adanya antaraksi



penyerapan dengan bahan pengisi penukar ion (damar). Proses pertukaran ion disajikan dalam bagan gambar 3.



**Gambar 3.** Bagan pertukaran ion

Matriks penukar ion yang tak bergerak mengandung gugus fungsi yang bermuatan ion tetap. Selain itu juga terdapat ion lawan yang dapat ditukar di dekatnya, agar muatannya netral. Ion cuplikan dapat bertukar dengan ion lawan tersebut dan menjadi pasangan dari ion muatan tetap. Jika ion cuplikan berpasangan dengan ion muatan tetap, ion tersebut tidak keluar dari kolom. Karena afinitas ion muatan selalu berbeda, maka pemisahan senyawa ion dapat terjadi (Johnson and Stevenson, 1978). Proses pertukaran ion dilakukan dalam fase gerak yang biasanya mengandung ion lawan yang muatannya berlawanan dengan muatan gugus ion permukaan. Ion lawan tersebut berkesetimbangan dengan bahan pengisi penukar ion dalam bentuk pasangan ion. Adanya ion linarut yang muatannya sama dengan muatan ion lawan menimbulkan kesetimbangan pula. Pada proses pertukaran kation, ion lawan adalah  $\text{Na}^+$  dan pada pertukaran anion, ion lawan adalah  $\text{Cl}^-$  (Johnson and Stevenson, 1978; Plumer, 1987; Palmer, 1991).

Kromatografi penukar ion sering digunakan untuk memisahkan protein dan enzim (Schwimmer, 1981). Kolom yang biasa digunakan pada kromatografi penukar anion misalnya dietil amino etil (DEAE)-sellulosa, sephadex dan trietil amino etil (TEAE)-selulosa; sedangkan untuk kromatografi penukar kation misalnya karboksi metil (CM)-sellulosa, sulfoetil (SE)-sellulosa, fosfoetil (FE)-sellulosa, Dowex 50 dan IRC 50.

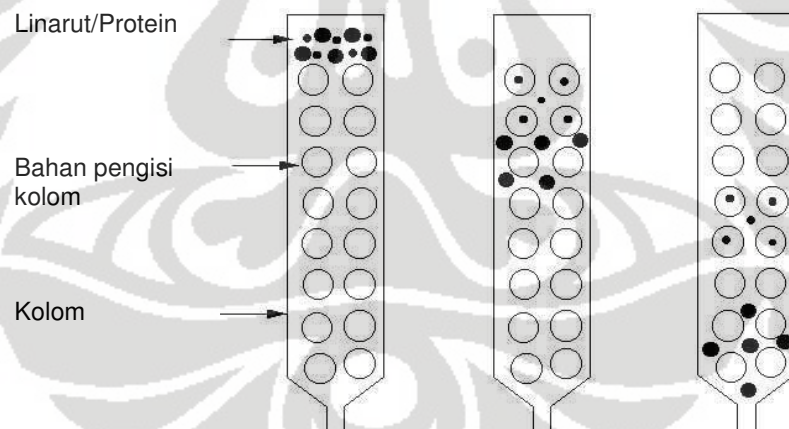
## **2. Kromatografi filtrasi gel**

Kromatografi filtrasi gel adalah ragam kromatografi yang paling mudah dipahami dan dilaksanakan. Cara ini dikenal dengan banyak nama, yaitu: kromatografi eksklusi, permeasi gel, pengayakan molekul, eksklusi ruang dan sebagainya. Cara pemisahan kromatografi ini sangat unik karena didasarkan pada pembatasan fisik linarut yang masuk ke dan keluar dari pori kemasan kolom. Kromatografi filtrasi gel mampu memisahkan komponen sampel berdasarkan ukurannya dan dapat dipakai untuk berbagai jenis senyawa yang berbobot molekul tinggi dan rendah (Johnson and Stevenson, 1978; Engel, 1996).

Kolom eksklusi biasanya mengandung partikel berpori dengan garis tengah pori yang berbeda dengan materi yang ingin dipisahkan (linarut) (gambar 4). Linarut yang diinjeksikan ke dalam kolom filtrasi gel akan berdifusi ke dalam pori yang garis tengahnya lebih besar daripada garis tengah efektif linarut, sehingga walaupun bobot molekulnya sama, garis tengah efektifnya biasanya berbeda dimana komponen dengan garis tengah efektif paling besar akan terelusi lebih dulu. Dengan bertambah

besarnya garis tengah efektif linarut, maka jumlah pori yang dapat dimasukinya dan kemampuannya berdifusi ke dalam pori akan menurun. Linarut yang seperi ini tidak dapat berdifusi ke dalam pori manapun sehingga tidak akan ditahan oleh pori, artinya linarut tersebut terelusi dalam kolom. Linarut yang mampu berdifusi sempurna ke dalam semua pori dikatakan berpermeasi sempurna. Linarut yang seperti ini memerlukan volume pelarut yang lebih besar untuk mengelusnya dari kolom. Pemisahan komponen dapat dicapai jika komponen tersebut terelusi (Johnson and Stevenson, 1978).

Kromatografi filtrasi gel biasa digunakan untuk memurnikan enzim dalam skala industri dan kolom yang biasa digunakan adalah sephadex, sepachryl, agarosa dan poliakrilamida.



**Gambar 4.** Mekanisme kromatografi filtrasi gel

### 3. Ultrafiltrasi

Ultrafiltrasi adalah pemisahan enzim yang menggunakan membran sangat halus sebagai media untuk menyaring. Prinsip pemurnian enzim

dengan teknik ini adalah pemisahan berdasarkan ukuran dan berat partikel. Partikel dengan berat, ukuran dan bentuk berbeda akan mengendap dengan kecepatan berbeda pula. Hasil pemisahan enzim dengan teknik ini adalah retentat dan permeat dengan berat molekul yang sesuai dengan ukuran pori membran yang digunakan. Membran ultrafiltrasi mempunyai ukuran pori 0,002-0,005  $\mu\text{m}$  (Humphrey, 1997).

## **F. IDENTIFIKASI XILANASE**

### **1. Elektroforesis**

Elektroforesis adalah pergerakan molekul-molekul (protein/enzim) dalam suatu larutan yang bergerak ke arah elektroda yang polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul tersebut, dapat terjadi karena adanya perbedaan potensial. Pergerakan tersebut sangat tergantung pada densitas dan distribusi muatan, bentuk dan ukuran molekul serta pH larutan (Martoharsono dan Kuswanto, 1978). Elektroforesis dapat digunakan untuk menentukan berat molekul, mengidentifikasi kemurnian protein, menentukan titik isoelektrik, serta memisahkan spesies molekuler yang berbeda secara kualitatif dan kuantitatif (Copeland, 1994).

Metode elektroforesis dibagi menjadi 2, yaitu elektroforesis bebas batas (*free boundary*) dan elektroforesis berbatas (*zone*). Media penyangga yang digunakan pada elektroforesis bebas batas adalah media larutan berair, sedangkan pada elektroforesis berbatas adalah penyangga berupa padatan seperti selulosa, gel pati dan poliakrilamida. Poliakrilamida ini merupakan polimer yang paling sering digunakan dalam



elektroforesis gel protein. Gel dibentuk melalui polimerisasi akrilamida dengan mekanisme radikal bebas. Besarnya persentase akrilamida yang digunakan tergantung dari kisaran berat molekul yang ingin dipisahkan dalam sampel (tabel 1).

**Tabel 1. Persentase akrilamida yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya melalui SDS-PAGE**

Berat molekul protein (kDa)	Penggunaan akrilamida (%)
200 - 60	5,0
120 - 30	7,5
75 - 18	10,0
60 - 15	12,5
45 - 12	15,0

Sumber: Copeland, 1994

Tahap elektroforesis dilakukan pada saat benzim akan dan telah dimurnikan dengan kromatografi kolom. Tahap ini bertujuan untuk menganalisis kemurnian protein ekstraseluler hasil pemurnian. Profil molekul protein ditunjukkan dengan adanya pita-pita pada gel poliakrilamida. Banyaknya pita menunjukkan banyaknya jenis protein pada sampel. Proses elektroforesis dilakukan menggunakan arus listrik searah dan harus stabil dengan polaritas normal.

## 2. Zimografi

Zimografi adalah analisis untuk memperkirakan bobot molekul suatu enzim. Analisis tersebut dilakukan dengan melihat aktivitas xilanase dalam gel poliakrilamida yang mengandung substrat xilan (Royer and Nakas, 1990). Keberadaan enzim xilanase diketahui dengan terbentuknya

zona bening pada zimogram. Analisis zimografi dilakukan pada gel yang telah dielektroforesis, kemudian direnaturasi dengan merendamnya dalam detergen triton X-100 2,5% selama 1 jam. Selanjutnya, gel direndam dalam bufer enzim pada pH dan suhu optimumnya. Pewarnaan gel dilakukan dengan pewarna kongorot 0,1% (w/v), lalu dicuci dengan NaCl 1M dan HCl 1M (Sunna *et al*, 1997).

### 3. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim adalah kemampuan enzim dalam mempercepat reaksi penguraian substrat. Aktivitas tersebut dilakukan untuk mengetahui besarnya kemampuan enzim dalam menggunakan substrat xilan. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit per mL (U/mL), dimana satu unit aktivitas xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan satu mikromol gula pereduksi yang setara dengan satu mikromol xilosa per menit (Suhartono, 1989; Takahashi *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2005). Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya konsentrasi, substrat, pH, suhu, inhibitor dan aktivator serta kekuatan ion (Pelczar, 1986; Suhartono, 1989; Poedjiadi, 1994). Beberapa metode dapat digunakan untuk mengukur aktivitas enzim, salah satunya adalah metode Bailey *et al.* (1992).

Aktivitas enzim xilanase berdasarkan metode Bailey *et al.* (1992) ditentukan dengan cara mengukur kadar gula pereduksi yang dibebaskan selama reaksi hidrolisis substrat xilan oleh xilanase. Satu unit aktivitas xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan



satu mikromol xilosa per menit. Besarnya gula pereduksi yang dibebaskan diukur berdasarkan metode asam dinitrosalisilat (DNS). Metode tersebut dilakukan dengan mencampurkan xilanase dengan substrat xilan 1% (w/v) kemudian diinkubasi pada suhu dan pH optimum enzim selama 5 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan pereaksi DNS. Campuran selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 5 menit dan didinginkan sampai suhu kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Besarnya kadar gula pereduksi dihitung sebagai xilosa berdasarkan kurva standar hubungan antara absorbansi dan kadar larutan xilosa standar.

#### **4. Kadar Protein**

Penentuan kadar protein perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan total protein dalam suatu enzim. Contoh metode yang dapat digunakan adalah metode Lowry *et al.* (1951). Metode ini dikembangkan oleh Oliver H. Lowry menggunakan pereaksi  $\text{CuSO}_4$  yang dapat mendeteksi adanya ikatan peptida dan pereaksi follin-ciocalteu yang dapat mereduksi kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat. Mekanisme reaksi yang terjadi adalah mulanya protein bereaksi dengan alkalin  $\text{CuSO}_4$  dengan adanya tartrat selama inkubasi 10 menit pada suhu ruang. Selama inkubasi ini kompleks Cu-tetradentat terbentuk dari 4 ikatan peptida dan 1 atom Cu. Komplek Cu-tetradentat ini selanjutnya mentransfer elektron ke kompleks asam fosfomolibdat/fosfotungstat (pereaksi follin-ciocalteu) sehingga tereduksi dan menghasilkan warna biru (Engel, 1996). Inkubasi

larutan selama 30 menit pada suhu ruang menyebabkan terbentuknya warna biru yang stabil.

Metode Lowry dikenal cukup sensitif karena dapat mendeteksi kadar protein yang kecil dalam kisaran mikrogram per mililiter, dengan perubahan warna yang jelas dari kuning menjadi biru kehijauan (Copeland, 1994). Pengukuran kadar protein dengan metode ini dilakukan dengan mereaksikan enzim dengan pereaksi Lowry dan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan pereaksi follin-ciocalteu lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Sebagai standar digunakan bovin serum albumin (BSA) 0,1-1,0 mg/mL.

#### **G. AMOBILISASI ENZIM**

Amobilisasi enzim merupakan suatu cara modifikasi untuk meniru keadaan asalnya di alam yang diyakini berada dalam keadaan terikat pada membran atau partikel-partikel dalam sel. Tujuan utamanya adalah agar enzim dapat memberikan proses katalitik secara berkesinambungan. Enzim teramobilisasi didefinisikan sebagai enzim yang secara spesifik ditempatkan dalam suatu ruang tertentu dengan tetap memiliki aktivitas katalitik dan dapat digunakan secara berulang atau terus menerus. Untuk membuat enzim dalam bentuk amobil, banyak faktor yang harus diperhatikan berhubungan dengan sifat dan bentuk enzim aslinya. Enzim yang bermolekul kecil dapat dibuat dengan cara pengikatan atau dalam bentuk ikatan dengan zat pembawa. Sedang enzim yang bermolekul

besar harus dibuat dengan suatu tangkapan atau jeratan supaya enzim tidak dapat keluar (amobil) tetapi hasil reaksi yang berat molekulnya rendah dapat keluar secara kontinyu tanpa adanya kebocoran enzim.

Amobilisasi enzim dapat dilakukan secara fisik, kimia atau kombinasi keduanya. Metode amobilisasi dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*), pengikatan silang (*cross linking*), pemerangkapan/jeratan (*entrapping*) dan *encapsulation*. Metode pengikatan pada penyangga akan mengikat enzim pada matriks tidak larut air. Metode pengikatan silang didasarkan pada pembentukan ikatan intermolekuler antar molekul enzim menggunakan pereaksi multi atau bifungsional. Sedang metode pemerangkapan didasarkan pada penempatan enzim dalam kisi dari suatu polimer atau dalam membran semi permeabel. Sesuai dengan macam ikatan kimia yang terbentuk, enzim amobil ini diklasifikasikan dalam ikatan karier, ikatan silang dan jeratan. Ikatan karier masih dibagi lagi menjadi adsorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen. Untuk ikatan silang, jenis ikatan yang terjadi adalah ikatan kovalen, sedangkan pada jeratan dibagi menjadi tipe lubang-lubang dan tipe mikrokapsul.

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. ALAT

Peralatan yang dipergunakan adalah *stirred cell* (*Amicon corporation*), membran *mixed cellulose ester* 0,22  $\mu\text{m}$ , membran *polyethersulfone* 30 kDa, High-Speed *Refrigerated Centrifuge* Hitachi CR 21G, Thermomixer Comfort Eppendorf, Kuhner shaker RGH-16, Heidolph shaker UNIMAX 1010, Millipore Simplicity, Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001, Hemasitometer Neubauer, kromatografi Akta Prime, Vilber Lourmat, Canoscan LiDe 25, kolom DEAE Sepharose FF (20×200 mm) dan Sepachryll S-300 (16×600 mm), fermentor kapasitas 2,5 L, perlengkapan elektroforesis, otoklaf dan alat-alat gelas.

#### B. BAHAN

Bahan baku yang digunakan meliputi biakan *Bacillus* sp. AQ-1 koleksi laboratorium mikrobiologi BPPT (Setyahadi, belum dipublikasikan) serta tandan kosong kelapa sawit. Substrat tandan kosong kelapa sawit diperoleh dengan mengeringkannya dengan sinar matahari selama 2 hari kemudian dihaluskan menggunakan gerinda dan diayak dengan ukuran 35 mesh (setara dengan 425  $\mu\text{m}$ ). Bahan lainnya meliputi pepton; ekstrak ragi;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ;  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; *oat spelts xylan*; *beechwood xylan*; *sodium dodecyl sulphate* (SDS); pewarna *Congo Red*; triton-X 100; HCl; DNS;

*bovin serum albumin* (BSA); xilosa; *phosphate buffer saline* (PBS); pereaksi follin ciocalteu; metanol; KCl;  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; NaOH;  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ;  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ;  $\text{CuSO}_4$ ;  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; amonium per sulfat (APS); tetra metilen diamina (TEMED); tris-base; merkaptoetanol; bromfenol biru; formaldehida dan glutaraldehida.

### **C. LOKASI**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (Laptiab), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPIPTEK), Serpong, Banten.

### **D. CARA KERJA**

#### **1. PRODUKSI ENZIM XILANASE**

##### **a. Pembuatan inokulum/starter**

Biakan bakteri *Bacillus* sp. AQ-1 diinokulasikan pada media cair Luria Bertani (LB) kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , pH 7,0 dalam shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm selama 6 jam. Suspensi mikroba dapat digunakan sebagai inokulum apabila jumlah sel mencapai  $10^9$  sel/mL, dihitung dengan Hemasitometer Neubauer.



## **b. Fermentasi (Agustin, 2005)**

Sebanyak 10% inokulum ditambahkan dalam media fermentasi yang dimodifikasi (Nakamura, 1994) yang mengandung 0,5% tandan kosong kelapa sawit sebagai substrat xilan. Fermentasi dilakukan dalam fermentor pada suhu 30°C, kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Enzim yang dihasilkan selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) dan kadar protein pada panjang gelombang 750 nm (Lowry *et al.*, 1951) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001.

### **2. Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase**

Sebanyak 50 µL enzim xilanase ditambahkan dalam 450 µL substrat xilan 1% dalam bufer Na-fosfat 50 mM pH 7,0 lalu diinkubasi pada variasi suhu 30-100°C selama 5 menit. Selanjutnya campuran enzim dilakukan pengukuran aktivitas enzim xilanase pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001.

### **3. Uji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase**

Sebanyak 50 µL enzim xilanase ditambahkan dalam 450 µL substrat xilan 1% dalam bufer variasi pH 4,0-9,0 berkonsentrasi 50 mM. Untuk pH 4,0 digunakan bufer Na-asetat; pH 5,0 digunakan bufer Na-sitrat; pH 6,0-7,0 digunakan bufer Na-fosfat dan pH 8,0-9,0 digunakan

bufer tris-Cl. Selanjutnya campuran enzim diinkubasi pada suhu optimum enzim (hasil penelitian point 2) selama 5 menit lalu dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001.

#### **4. Uji pengaruh bufer terhadap kestabilan enzim xilanase**

Sebanyak 50  $\mu$ L enzim ditambahkan dalam 450  $\mu$ L substrat xilan 1% dalam variasi bufer berkonsentrasi 50 mM. Jenis bufer yang digunakan adalah bufer Na-asetat (pH 4,0-6,0); bufer Na-sitrat (pH 4,0-6,0); bufer Na-fosfat (pH 6,0-8,0) dan bufer tris-Cl (pH 7,0-9,0). Selanjutnya campuran enzim diinkubasi pada suhu optimum enzim (hasil penelitian point 2) selama 5 menit kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001. Pengamatan aktivitas enzim dilakukan pada hari ke-0 sampai hari ke-3 untuk mengetahui kestabilan enzim dalam berbagai jenis bufer yang digunakan.

#### **5. Purifikasi enzim xilanase**

##### **a. Penyiapan ekstrak kasar enzim xilanase**

Enzim xilanase diproduksi oleh *Bacillus* sp. AQ-1 dengan substrat tandan kosong kelapa sawit. Selanjutnya, kultur fermentasi disentrifugasi menggunakan sentrifus berpendingin dengan kecepatan putaran 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C hingga diperoleh

supernatan enzim. Supernatan enzim ini kemudian disebut sebagai ekstrak kasar enzim. Selanjutnya ekstrak kasar enzim bebas sel tersebut diukur aktivitas enzim dengan metode Bailey *et al.* (1992) pada panjang gelombang 540 nm dan kadar protein dengan metode Lowry *et al.* (1951) pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001.

#### **b. Kromatografi penukar ion**

Sebanyak 50 mL ekstrak kasar enzim bebas sel diinjeksikan dalam kolom penukar anion DEAE Sepharose FF (20×200 mm). Equilibrasi dan elusi dilakukan dengan fase gerak bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 dengan kecepatan alir 1 mL/menit dan volume tiap fraksi yang ditampung 2 mL. Seluruh fraksi hasil kromatografi penukar ion ini dikumpulkan dan dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) dan kadar protein pada panjang gelombang 750 nm (Lowry *et al.*, 1951) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001. Selanjutnya fraksi-fraksi yang memiliki aktivitas enzim disebut sebagai fraksi aktif enzim.

#### **c. Kromatografi filtrasi gel**

Sebanyak 50 mL fraksi aktif hasil kromatografi penukar ion diinjeksikan dalam kolom filtrasi gel Sepachryll S-300 (16×600 mm). Equilibrasi dan elusi dilakukan dengan fase gerak bufer Na-fosfat 50

mM pH 8,0 dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit dan volume tiap fraksi yang ditampung 0,5 mL. Selanjutnya seluruh fraksi hasil kromatografi ini dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm (Bailey *et al.*, 1992) dan kadar protein pada panjang gelombang 750 nm (Lowry *et al.*, 1951) menggunakan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001. Fraksi aktif dikumpulkan untuk digunakan pada analisis berikutnya.

#### **d. Ultrafiltrasi**

Fraksi aktif hasil kromatografi filtrasi gel dimasukkan dalam *stirred cell* untuk dilakukan ultrafiltrasi secara bertingkat menggunakan 2 membran *polyethersulfone* 30 kDa. Dari hasil ultrafiltrasi bertingkat ini akan dihasilkan permeat (enzim yang melalui membran) dan retentat (enzim yang tersisa dalam membran). Permeat disisihkan, sedangkan retentat dibilas dengan bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 dan dilakukan ultrafiltrasi bertingkat kembali sebanyak 5 kali. Untuk permeat juga dilakukan ultrafiltrasi bertingkat sebanyak 5 kali dengan cara menuang permeat enzim tersebut dalam *stirred cell* berisi membran yang telah dicuci dengan NaOH 1M dan akuades. Retentat hasil ultrafiltrasi bertingkat akan memiliki berat molekul diatas 30 kDa, sedangkan permeat dibawah 30 kDa.

## 6. Identifikasi enzim xilanase

### a. Elektroforesis (Copeland, 1994)

Elektroforesis dilakukan menggunakan sodium dodecyl sulfat gel poliakrilamida (SDS-PAGE) 12% berdasarkan metode Copeland (1994). Penanda protein yang digunakan adalah *Low Molecular Weight* (Amersham Pharmacia Biotech; Upsala Swedia) yang mengandung *phosphorylase b* (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), *carbonic anhydrase* (30 kDa), *trypsin inhibitor* (21,1 kDa) dan  $\alpha$ -lactalbumin (14,4 kDa). Penanda protein ini disiapkan dengan melarutkan 7,5  $\mu$ L penanda protein dengan 2,5  $\mu$ L bufer sampel.

Elektroforesis dijalankan pada 125 volt, 100 A selama 2 jam. Pewarnaan protein dilakukan menggunakan metode *silver staining* (Copeland, 1994), yaitu gel direndam dalam 100 mL *fixing solution* selama 30 menit, kemudian diganti dengan 100 mL *destaining solution* selama 60 menit. Selanjutnya, *destaining solution* dihilangkan, gel dilapisi dengan glutaraldehida 10% selama 30 menit. Gel dicuci 4 kali dengan 100 mL akuades masing-masing selama 30 menit. Gel diwarnai dengan pewarna silver nitrat 19% selama 15 menit lalu dicuci 5 kali dengan 100 mL akuades masing-masing selama 1 menit. Sebanyak 100 mL *developer* ditambahkan dalam gel kemudian diinkubasi dalam shaker sampai pita protein terlihat nyata.



### **b. Zimografi (Sunna *et al.*, 1997)**

Perkiraan bobot molekul xilanase dilakukan dengan analisis zimografi dalam gel poliakrilamida 12% yang mengandung 0,1% substrat *beechwood xylan*. Sebelum enzim dimasukkan dalam sumur gel pengumpul, enzim yang ditambah bufer sampel harus diinkubasi pada suhu aktifnya. Penentuan suhu aktif ini dilakukan dengan menginkubasi enzim pada kisaran suhu 55-100°C selama 1 menit. Selanjutnya, sebanyak 15 µL sampel dimasukkan dalam sumur pada gel pengumpul, kemudian elektroforesis dijalankan pada 125 volt dan 100 A selama 2 jam. Suhu aktif diketahui dengan terbentuknya zona bening pada gel poliakrilamida yang mengandung substrat *beechwood xylan* 0,1%. Setelah elektroforesis, gel poliakrilamida direnaturasi dengan merendamnya dalam 2,5% triton X-100 (Merck) selama 1 jam. Selanjutnya, gel direndam dalam bufer Na-fosfat 50 mM pH 7,0 pada suhu 60°C selama 30 menit. Untuk menghentikan reaksi enzim, gel diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit. Gel diwarnai dengan pewarna *Congo Red* (Merck) 0,1% (w/v) selama 30 menit, kemudian dicuci dengan NaCl 1M selama kurang lebih 60 menit. Pita xilanase diketahui dengan munculnya zona bening pada gel yang telah dicuci dengan HCl 1M.

Berat molekul xilanase ditentukan dengan mengukur nilai faktor retardasi ( $R_f$ ) dari zona bening xilanase yang terbentuk pada zimogram, kemudian dikonversikan ke dalam persamaan standar berat molekul. Kurva kalibrasi berat molekul dibuat dengan mengukur nilai  $R_f$

dari penanda protein LMW yang mengandung 6 jenis protein standard yang telah diketahui berat molekulnya.

### c. Uji aktivitas enzim xilanase (Bailey *et al.*, 1992)

Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  enzim dan 450  $\mu\text{L}$  substrat xilan 1% dalam bufer pH optimum (hasil penelitian point 3) dimasukkan dalam tabung eppendorf. Sementara itu sebagai blangko hanya digunakan 450  $\mu\text{L}$  substrat xilan 1% yang dimasukkan dalam tabung eppendorf tersendiri. Tabung eppendorf diinkubasi dalam termomixer selama 5 menit pada suhu optimum enzim (hasil penelitian point 2). Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 750  $\mu\text{L}$  3,5-asam dinitrosalisilat (DNS) lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya supernatan diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 100°C, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Selanjutnya, pada tabung eppendorf berisi blangko, ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  enzim. Pengukuran serapan hasil reaksi enzimatik dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001 pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim xilanase diketahui dengan mengkonversikan serapan enzim ke persamaan standar aktivitas xilanase dan rumus aktivitas enzim:

$$\text{Aktivitas xilanase (U/mL)} = \frac{[\text{xilosa}] \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{\text{BM xilosa} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume enzim}}$$

Keterangan:	[xilosa]	= konsentrasi xilosa
	BM xilosa	= 151
	Waktu inkubasi	= 5 menit
	Volume sampel	= 50 $\mu$ L (0,050 mL)

Konsentrasi xilosa dapat diketahui dengan mengkonversikan absorbansi atau serapan enzim ke persamaan standar aktivitas xilanase. Kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase dibuat menggunakan xilosa dengan konsentrasi 0-1,0 mg/mL yang dilarutkan dalam bufer Na fosfat 50 mM pH 7,0 kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim pada panjang gelombang 540 nm menurut metode Bailey *et al.* (1992). Satu unit aktivitas xilanase setara dengan 1  $\mu$ mol xilosa yang dihasilkan setiap menitnya.

#### **d. Analisa kadar protein (Lowry *et al.*, 1951)**

Sebanyak 20  $\mu$ L enzim ditambahkan dalam campuran yang mengandung 2 mL pereaksi Lowry dan 180  $\mu$ L PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dalam tabung reaksi. Campuran dihomogenkan dengan vortex lalu diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 200  $\mu$ L pereaksi follin-ciocalteu, dihomogenkan dengan vortex kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2001 pada panjang gelombang 750 nm. Kadar protein diketahui dengan mengkonversikan serapan enzim ke persamaan standar kadar protein.

Kurva kalibrasi kadar protein dibuat dengan melarutkan bovin serum albumin (BSA) 0,1-1,0 mg/mL dalam bufer Na-fosfat 50 mM pH

7,0. Selanjutnya variasi konsentrasi tersebut dilakukan pengujian kadar protein menurut metode Lowry *et al.* (1951).

#### e. Aktivitas spesifik enzim xilanase

Aktivitas spesifik enzim xilanase dihitung dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein xilanase.

$$\text{Aktivitas spesifik enzim xilanase (U / mg)} = \frac{\text{aktivitas enzim xilanase (U / mL)}}{\text{kadar protein (mg / mL)}}$$

### 7. Amobilisasi Enzim Xilanase

Amobilisasi enzim xilanase dilakukan dengan metode kovalen menggunakan membran *mixed cellulose ester* 0,22  $\mu\text{m}$ . Membran dicuci dengan akuades dalam *stired cell* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya ke dalam membran ditambahkan 20 mL glutaraldehida 8% lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Membran dibilas dengan akuades lalu diisi dengan 20 mL enzim dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Enzim dikeluarkan dan membran diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 4°C. Membran dibilas dengan 20 mL bufer Na-fosfat 50 mM pH 7,0 sebanyak 2 kali, dilanjutkan dengan akuades dan NaCl 3M. Uji keberhasilan amobilisasi diketahui dengan pengukuran aktivitas enzim dan kadar protein pada sisa amobilisasi, bufer Na-fosfat, akuades dan NaCl.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. PRODUKSI ENZIM XILANASE

Enzim yang diproduksi melalui proses fermentasi menggunakan mikroorganisme memiliki beberapa keunggulan dibandingkan enzim yang diproduksi oleh makhluk hidup tingkat tinggi seperti tumbuhan atau hewan. Keunggulan tersebut misalnya dapat digunakannya berbagai jenis substrat yang sesuai dengan jenis mikroorganisme yang digunakan sehingga biaya produksi dapat ditekan. Selain itu, peningkatan jumlah produksi dapat dilakukan dengan cara mengoptimasi kondisi fermentasi. Keunggulan lainnya adalah pemanenan enzim lebih mudah dilakukan, khususnya enzim yang diproduksi secara ekstraseluler, serta proses produksi dapat dikendalikan karena tidak tergantung pada iklim luar dan kondisi geografis.

Pada penelitian ini xilanase diproduksi menggunakan mikroba *Bacillus* sp. AQ-1 dan substrat tandan kosong kelapa sawit. *Bacillus* sp. AQ-1 dapat memproduksi xilanase karena berdasarkan penelitian Agustin (2005), isolat AQ-1 yang merupakan isolat asli Indonesia koleksi laboratorium mikrobiologi BPPT ini terbukti mampu membentuk zona bening terang di sekitar koloni pada media padat yang mengandung xilan. Kulkarni *et al.* (1999) juga mengungkapkan bahwa *Bacillus* merupakan salah satu jenis mikroba yang berpotensi untuk memproduksi enzim xilanase. Pemilihan tandan kosong kelapa sawit sebagai substrat dalam



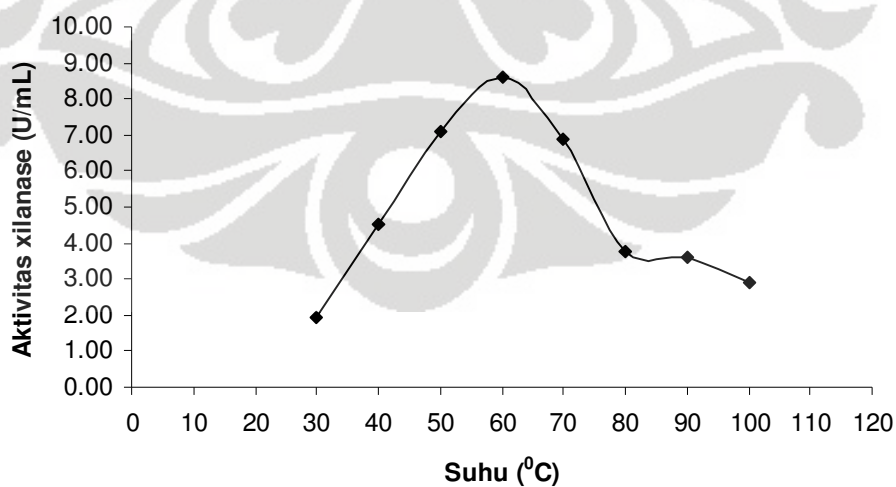
memproduksi xilanase dilakukan karena berdasarkan penelitian Swasono (2005), tandan kosong kelapa sawit tersebut mampu menghasilkan aktivitas xilanase yang lebih baik dibandingkan substrat lainnya. Pelczar (1986) mengungkapkan bahwa jenis substrat turut mempengaruhi besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan. Proses produksi xilanase pada penelitian ini mengacu pada penelitian Agustin (2005) yang telah melakukan optimasi proses produksi xilanase dari mikroba *Bacillus* sp. AQ-1, yaitu suhu 30°C; pH 7,0 ; 150 rpm selama 24 jam dengan media Nakamura.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. AQ-1 yang ditumbuhkan pada media yang mengandung substrat tandan kosong kelapa sawit dengan jumlah sel  $4,5 \times 10^9$  sel/mL, kultur menunjukkan aktivitas xilanase sebesar 65,9 U/mL dengan kadar protein sebesar 0,5 mg/mL. Xilanase tersebut dapat disekresi atau diproduksi secara ekstraseluler oleh *Bacillus* sp. AQ-1 karena adanya sumber makanan dan mineral dalam media fermentasi termasuk sumber karbon dan nitrogen yang terdapat dalam substrat tandan kosong kelapa sawit yang merupakan makanan utama bagi mikroorganisme tersebut untuk pertumbuhannya. Uji aktivitas xilanase pada penelitian ini dilakukan dengan metode Bailey *et al.* (1992) dengan *oat spelt xylan* sebagai substrat. Reaksi enzimatik yang terjadi pada pengujian tersebut muncul karena adanya kontak/interaksi antara enzim dengan substrat xilan yang digunakan. Interaksi terjadi pada bagian sisi aktif enzim dan hanya dapat terjadi apabila sisi aktif enzim ini mempunyai ruang yang tepat dan sesuai

dengan substrat sehingga membentuk kompleks enzim-substrat. Pada akhirnya kompleks enzim-substrat tersebut akan terurai menjadi hasil reaksi atau produk dan membebaskan enzim kembali (Alexander and Grifits, 1993).

## B. PENGARUH SUHU TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE

Suhu adalah salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim (Pelczar, 1986). Aktivitas enzim meningkat dengan naiknya suhu sampai tercapainya aktivitas optimum pada suhu tertentu, kemudian akan terjadi penurunan aktivitas kembali. Pengamatan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan larutan penyangga Na-fosfat 50 mM pada nilai pH yang setara dengan pH media pertumbuhan, yaitu pH 7,0. Kisaran suhu yang diamati adalah 30-100°C. Hasil pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase ini disajikan dalam gambar 5.

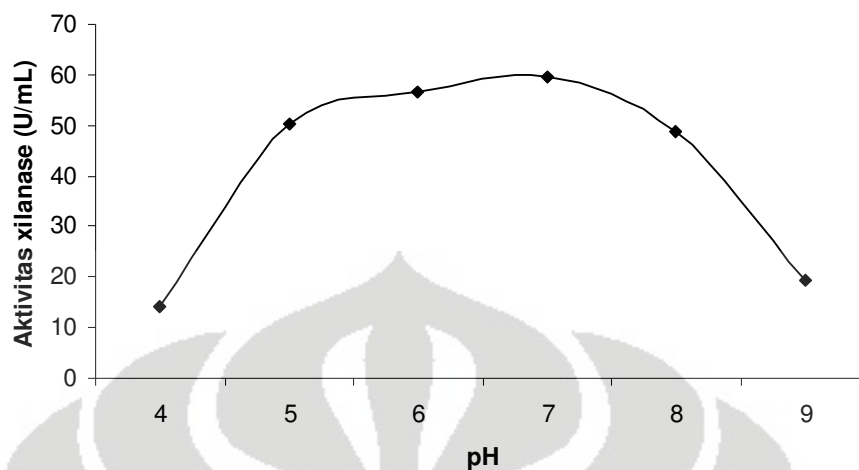


**Gambar 5.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase, diukur dalam bufer Na-fosfat pH 7,0 dengan variasi suhu pengujian 30-100°C.

Gambar 5 menunjukkan bahwa enzim xilanolitik yang diproduksi *Bacillus* sp. AQ-1 memiliki suhu optimum 60°C, ditunjukkan dengan nilai aktivitas paling tinggi. Aktivitas tersebut mencapai 8,6 U/mL, 4 kali lebih besar dibandingkan yang diinkubasi pada suhu 30°C. Gambar 5 juga menunjukkan bahwa pada suhu 30-60°C terjadi kenaikan aktivitas dari 1,9 U/mL menjadi 8,6 U/mL, pada suhu 60-80°C terjadi penurunan aktivitas dari 8,6 U/mL menjadi 3,7 U/mL dan pada suhu 80-100°C aktivitas enzim menjadi lebih stabil. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim (Pelczar, 1986; Haris and Angal, 1990). Denaturasi adalah proses terbentuknya suatu rantai polipeptida yang memanjang (*unfolded*) dari suatu protein yang sebelumnya menggulung-melipat (*folded*) (Lehninger, 1982; Alexander and Grifits, 1993).

### **C. PENGARUH pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM XILANASE**

Selain suhu, pH juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim (Pelczar, 1986). Aktivitas optimum biasanya dicapai pada suatu pH tertentu dimana apabila terjadi penurunan atau kenaikan dari pH optimum akan menyebabkan berkurangnya aktivitas. Perubahan pH enzim juga dapat mempengaruhi bentuk ionik dari gugus-gugus amino dan karboksilat suatu enzim sehingga akan mempengaruhi sisi aktif dan konformasi enzim. Pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dilakukan pada suhu optimum enzim, yaitu 60°C dengan kisaran pH yang diamati adalah pH 4,0-9,0. Hasil pengujian efek pH terhadap aktivitas enzim xilanase disajikan dalam gambar 6.

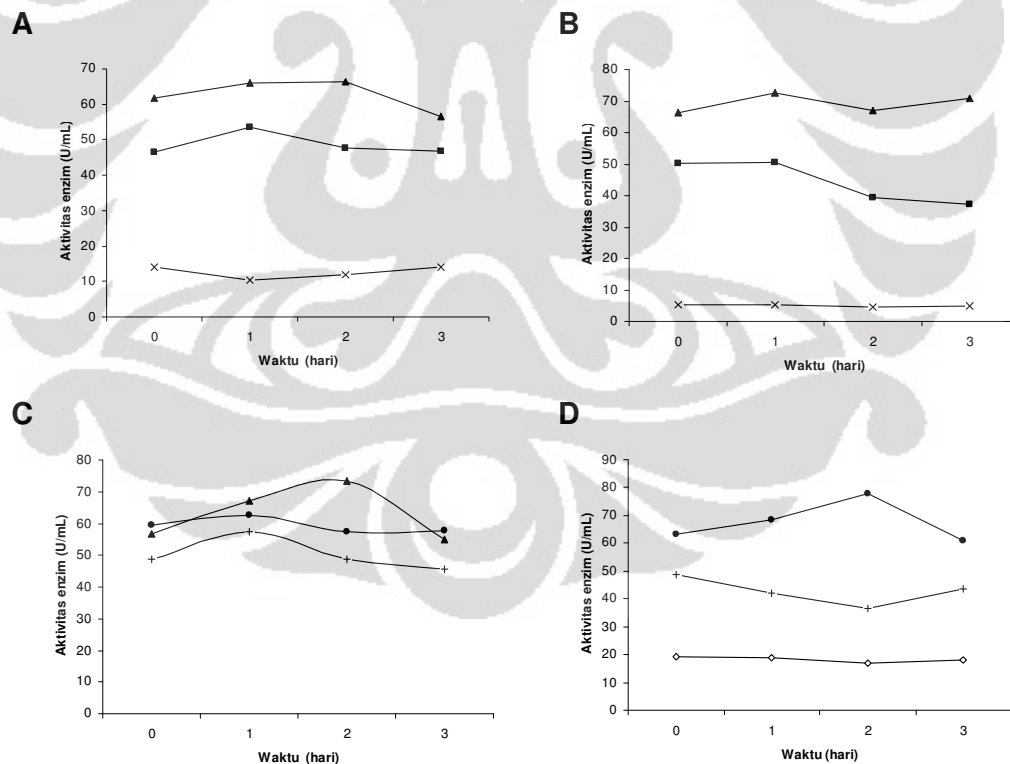


**Gambar 6.** Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase, diukur pada suhu optimum enzim (60°C) pada pH 4,0 (50 mM bufer Na-asetat); pH 5,0 (50 mM bufer Na-sitrat); pH 6,0-7,0 (50 mM bufer Na-fosfat) dan pH 8,0-9,0 (50 mM bufer Tris-HCl).

Gambar 6 menunjukkan bahwa pH optimum enzim yang diproduksi *Bacillus* sp. AQ-1 adalah pH 7,0 yang diukur pada suhu optimum enzim (60°C). Aktivitas enzim tersebut mencapai 59,4 U/mL, hampir 4 kali lipat lebih besar dibandingkan pH 4,0 dan 3 kali lipat lebih besar dibandingkan pH 9,0. Gambar 6 juga menunjukkan bahwa pada pH yang terlalu asam atau terlalu basa, aktivitas enzim menjadi sangat rendah, yaitu 14,1 U/mL pada pH 4,0 dan 19,4 U/mL pada pH 9,0. Ini berarti bahwa enzim xilanase yang diproduksi *Bacillus* sp. AQ-1 tidak tahan dalam kondisi ekstrim baik yang terlalu asam atau terlalu basa sehingga menyebabkan enzim menjadi tidak aktif. Le Maire *et al.* (1991); Illanes (1998) serta Haris dan Angal (1990) mengungkapkan bahwa pH yang terlalu asam atau basa mengakibatkan protein enzim terdenaturasi sehingga enzim menjadi tidak aktif.

## D. PENGARUH BUFER TERHADAP KESTABILAN ENZIM XILANASE

Untuk menjaga kestabilan enzim selama proses purifikasi perlu dilakukan penentuan bufer enzim yang paling tepat agar enzim tidak rusak atau terdenaturasi mengingat purifikasi dilakukan dalam beberapa tahap sehingga memerlukan waktu yang cukup lama. Pengujian dilakukan pada berbagai jenis bufer, diantaranya 50 mM bufer Na-asetat, Na-sitrat, Na-fosfat dan tris-Cl. Inkubasi enzim dalam berbagai jenis bufer tersebut dilakukan pada suhu optimum enzim (60°C) selama 5 menit berdasarkan metode Bailey *et al.* (1992) yang hasil pengamatannya ditunjukkan dalam gambar 7.



**Gambar 7.** Kestabilan enzim xilanase selama 0-3 hari dalam berbagai jenis bufer: (A) Na-asetat, (B) Na-sitrat, (C) Na-fosfat dan (D) Tris-HCl, pada pH 4,0 (x); pH 5,0 (■); pH 6,0 (▲); pH 7,0 (●); pH 8,0 (+) dan pH 9,0 (◇), diukur pada suhu optimum enzim (60°C).



Hasil pengujian menunjukkan bahwa xilanase dalam bufer Na-fosfat (gambar 7c) memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan dalam bufer Na-asetat, Na-sitrat dan tris-Cl (gambar 7a, 7b dan 7d) selama 0-3 hari. Ini terbukti dengan aktivitas enzim yang tetap tinggi dan selalu terjaga kestabilannya dibentuk oleh bufer Na-fosfat baik pada pH 6,0; 7,0 maupun 8,0 selama 0-3 hari. Berbeda dengan jenis bufer lainnya dimana pada pH tertentu atau pH ekstrim aktivitas enzim menjadi rendah selama inkubasi enzim 0-3 hari.

#### **E. PURIFIKASI ENZIM XILANASE**

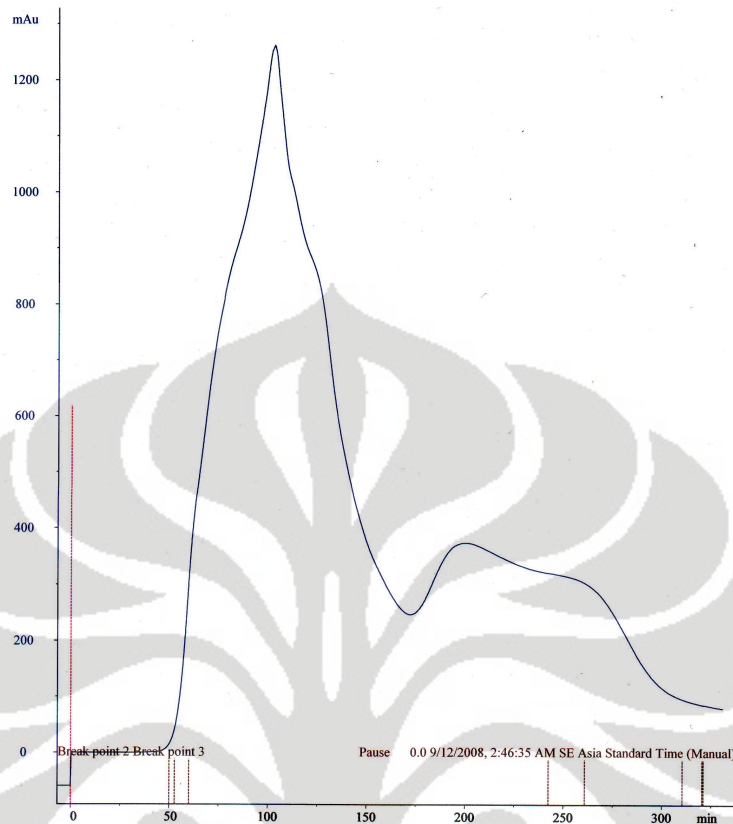
Roe (2001) mengungkapkan bahwa tujuan dilakukannya purifikasi protein adalah untuk mengidentifikasi fungsi dari protein itu sendiri, mengidentifikasi struktur protein serta menghasilkan produk komersial untuk tujuan diagnostik atau terapeutik. Pada purifikasi protein/enzim, jumlah protein yang diperoleh bergantung pada jumlah material awalnya. Untuk memurnikan protein tersebut biasanya diperlukan beberapa tahapan purifikasi sehingga menyebabkan protein dapat hilang/berkurang selama tahapan purifikasi. Oleh karena itu untuk memaksimalkan hasil purifikasi perlu meminimalkan jumlah tahapan purifikasi (Haris and Angal, 1989). Pada penelitian ini, purifikasi enzim xilanase yang diproduksi *Bacillus* sp. AQ-1 dilakukan pada suhu 27°C dengan beberapa tahap, yaitu penyiapan ekstrak kasar enzim, kromatografi penukar ion, kromatografi filtrasi gel dan ultrafiltrasi.

## 1. Penyiapan ekstrak kasar enzim xilanase

Enzim xilanase yang diproduksi *Bacillus* sp. AQ-1 melalui proses fermentasi masih banyak mengandung pengotor seperti spora bakteri, sel, gumpalan non enzim dan partikel pengotor lainnya. Oleh karena itu perlu dilakukan pemisahan cairan enzim dari pengotor-pengotor tersebut, yaitu dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi adalah cara pemisahan berdasarkan ukuran dan berat, dimana partikel dengan berat, ukuran dan bentuk yang berbeda akan mengendap pada kecepatan tertentu. Pada penelitian ini sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 6000 rpm dan suhu 4°C dengan tujuan agar tidak terjadi pengendapan protein yang diinginkan dan mencegah terjadinya denaturasi enzim.

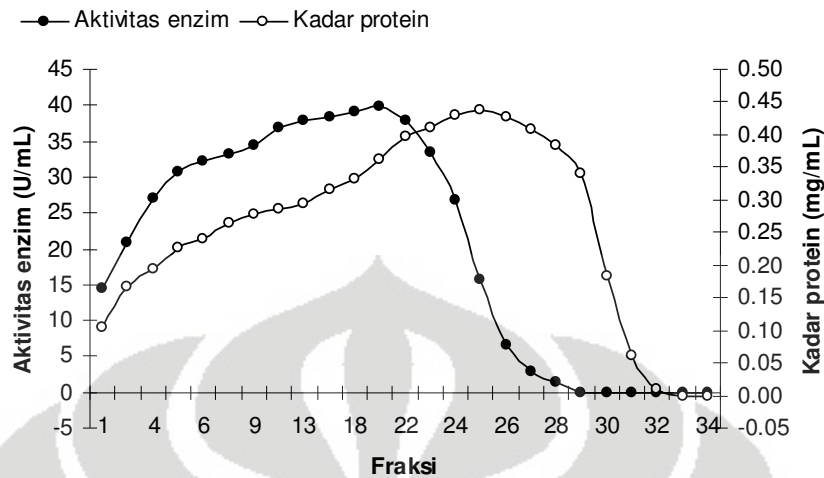
## 2. Kromatografi penukar ion

Purifikasi enzim xilanase dengan kromatografi penukar ion dilakukan menggunakan kolom penukar anion DEAE Sepharose FF (20×200 mm), pelarut bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 dengan kecepatan alir 1 mL/menit dan volume tiap fraksi yang ditampung adalah 2 mL. Dasar pemisahan protein dengan metode ini adalah kompetisi antara ion enzim yang ingin dipisahkan (ion *interest*) serta ion-ion lain yang muatannya berlawanan dengan penukar ion yang digunakan. Interaksi antara molekul-molekul kecil tersebut dengan penukar ion bergantung pada muatan ionnya dan kekuatan ionik medium (Engel, 1996; Janson and Ryden, 1998). Kromatogram pemisahan xilanase dengan metode ini disajikan dalam gambar 8.



**Gambar 8.** Kromatogram purifikasi enzim xilanase dengan kromatografi penukar ion. 50 mL ekstrak enzim bebas sel yang diinjeksikan dalam kolom penukar anion DEAE Sepharose FF (20×200 mm). Kolom dielusi menggunakan bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 dengan kecepatan alir 1 mL/menit

Gambar 8 menunjukkan terbentuknya 2 peak yang merupakan hasil elusi ekstrak kasar enzim dengan kolom penukar anion DEAE Sepharose FF (20×200 mm). Peak yang terelusi pertama terbukti menunjukkan adanya aktivitas enzim xilanase dan kadar protein setelah dilakukan pengujian pada setiap fraksi yang dikumpulkan. Aktivitas xilanase dimiliki oleh fraksi 1 sampai 30, sedangkan peak kedua atau fraksi 31 dan seterusnya tidak menunjukkan adanya aktivitas (gambar 9).

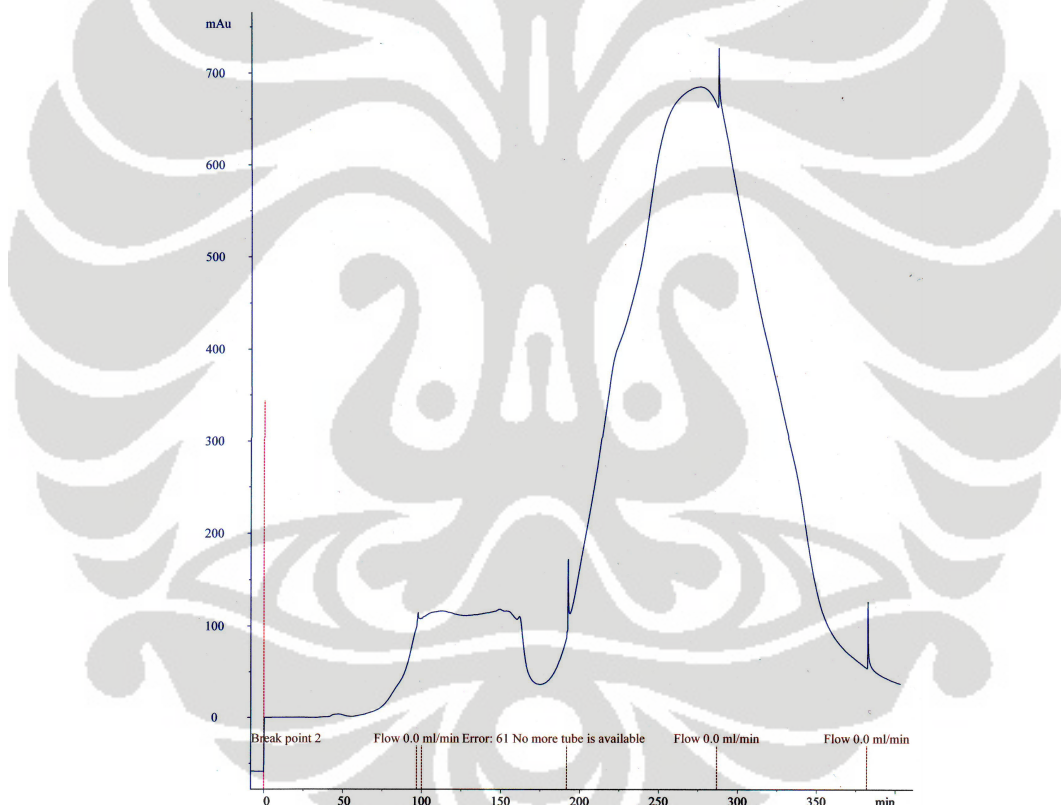


**Gambar 9.** Hasil pengukuran aktivitas enzim xilanase dengan metode Bailey *et al.* (1992) dan kadar protein dengan metode Lowry *et al.* (1951) dari fraksi hasil kromatografi penukar ion

Prinsip pemisahan protein dengan kromatografi penukar ion adalah berdasarkan perbedaan muatannya. Pada penelitian ini, kolom yang digunakan adalah penukar anion DEAE Sepharose FF yang memiliki muatan tetap positif  $[-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2]$ . Mekanisme yang terjadi selama pemisahan adalah spesies/ion enzim yang bermuatan negatif akan terikat pada kolom, sementara yang bermuatan positif akan terelusi lebih dahulu karena bermuatan sama dengan adsorben yang digunakan sehingga tidak ditahan oleh kolom. Selanjutnya, spesies enzim bermuatan negatif yang terikat pada kolom lambat laun akan terelusi selama equilibrasi dengan pelarut bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 yang digunakan. Janson dan Ryden (1998) mengungkapkan adanya beberapa faktor yang mempengaruhi pemisahan protein dengan kromatografi penukar ion, yaitu muatan distribusi protein di permukaan, pH, ion-ion yang ada di dalam pelarut dan sifat penukar ion yang digunakan.

### 3. Kromatografi filtrasi gel

Purifikasi tahap berikutnya dilakukan dengan kromatografi filtrasi gel dimana fraksi aktif hasil kromatografi penukar ion diinjeksikan dalam kolom filtrasi gel Sephacryll S-300 (16×600 mm), dielusi dengan pelarut bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0; kecepatan alir 0,5 mL/menit dan volume tiap fraksi yang ditampung adalah 0,5 mL. Kromatogram pemisahan protein dengan kolom filtrasi gel ini dinyatakan dalam gambar 10.

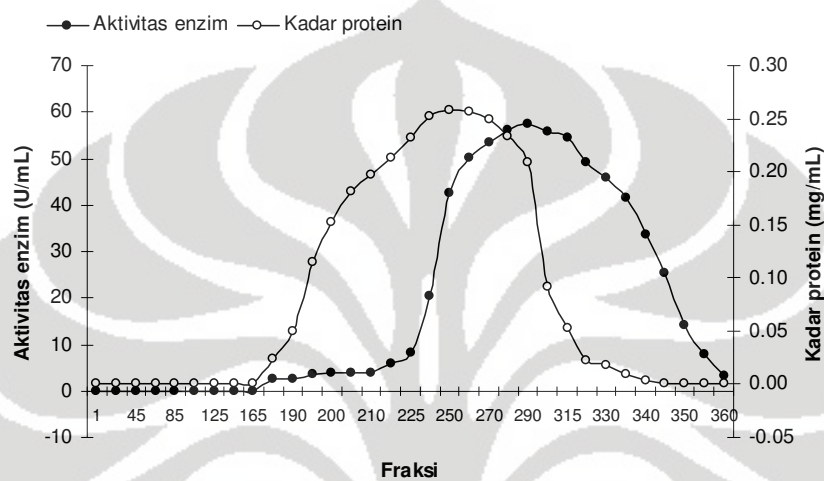


**Gambar 10.** Kromatogram purifikasi enzim xilanase dengan kromatografi filtrasi gel. Fraksi 1-30 hasil kromatografi penukar ion yang diinjeksikan dalam kolom Sephacryll S-300 (16×600 mm), dielusi menggunakan bufer Na-fosfat 50 mM pH 8,0 dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit

Gambar 10 menunjukkan terbentuknya 2 peak (peak 1 dan 2). Dari keseluruhan fraksi yang ditampung, aktivitas enzim xilanase dan kadar



protein hanya dimiliki oleh fraksi 185 sampai 360, yaitu yang terdapat pada peak 2, sedangkan pada peak 1 atau fraksi 93 sampai 163 tidak terdeteksi adanya aktivitas enzim xilanase dan kadar protein (gambar 11).



**Gambar 11.** Hasil pengukuran aktivitas enzim xilanase dengan metode Bailey *et al.* (1992) dan kadar protein dengan metode Lowry *et al.* (1951) dari fraksi hasil kromatografi filtrasi gel

Pada penelitian ini, kolom yang digunakan adalah Sephacryl S-300 dengan ukuran adsorben  $1 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$  dalton. Mekanisme pemisahan yang terjadi pada kromatografi filtrasi gel ini adalah spesies enzim yang berukuran antara  $1 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$  dalton akan terikat dan masuk ke dalam pori adsorben, sementara yang berukuran lebih besar dari adsorben akan terelusi lebih dulu. Lambat laun spesies enzim yang terikat pada kolom akan terelusi berdasarkan ukurannya selama equilibrasi dengan fase gerak yang digunakan, dimulai dengan spesies enzim yang berukuran besar diikuti oleh spesies yang ukurannya lebih kecil (Plumer, 1987; Palmer, 1991).

#### 4. Ultrafiltrasi

Purifikasi tahap terakhir dilakukan dengan ultrafiltrasi secara bertingkat menggunakan 2 membran *polyethersulfone* 30 kDa. Pemilihan jenis membran tersebut sebagai media ultrafiltrasi dikarenakan membran ini memiliki kestabilan yang cukup tinggi yaitu dapat dioperasikan pada kisaran temperatur yang lebar dan nilai pH yang luas (pH 1,0-14,0). Pemisahan enzim dengan membran *polyethersulfone* 30 kDa ini terjadi berdasarkan berat molekulnya. Pada purifikasi tahap ini diperoleh 2 jenis enzim, yaitu permeat enzim dengan berat molekul dibawah 30 kDa (xilanase A) dan retentat enzim dengan berat molekul diatas 30 kDa (xilanase B). Kulkarni (2001) menyatakan bahwa dengan ditumpuknya sejumlah membran pada proses ultrafiltrasi akan menghasilkan enzim yang lebih murni dengan aktivitas enzim spesifik lebih tinggi.

Keberhasilan suatu pemurnian enzim dapat dinilai berdasarkan besarnya aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim. Pemurnian yang ideal seharusnya menunjukkan aktivitas enzim yang mendekati konstan dan aktivitas spesifik enzim meningkat. Analisis aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim xilanase dinyatakan dalam tabel 2.

**Tabel 2. Purifikasi enzim xilanase dari *Bacillus* sp. AQ-1**

Tahap purifikasi enzim	Volume (mL)	Aktivitas enzim total (U)	Kadar protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Purifikasi ( <i>fold</i> )	Recovery (%)
Ekstrak kasar enzim	50	3238,193	26,902	120,370	1,000	100
DEAE Sepharose FF	50	2736,063	13,597	201,225	1,672	84,49
Sephacryll S-300	40	2270,197	10,773	210,730	1,751	70,11
Retentat dan permeat	1	6,141	0,037	165,959	2,063	7,29
Ultrafiltrasi	20	230,078	2,792	82,406		

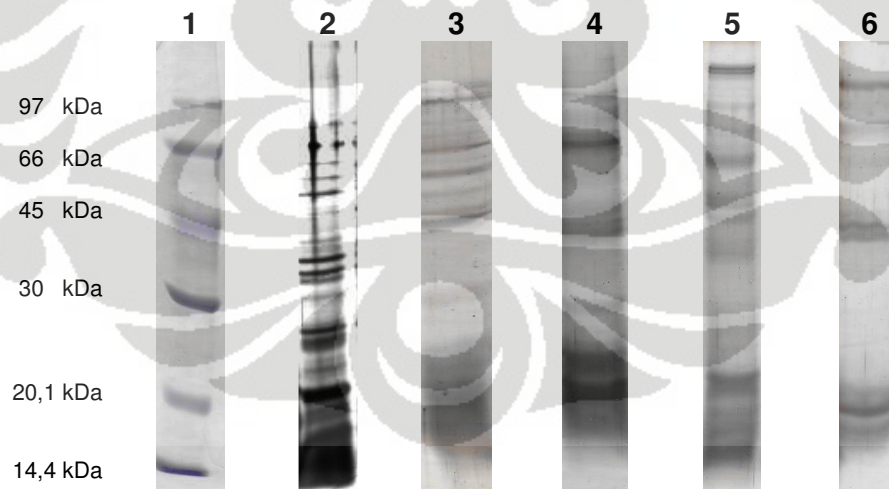
Tabel 2 menunjukkan adanya penurunan aktivitas enzim sejalan dengan tahapan purifikasi, yang juga ditunjukkan dengan menurunnya nilai prosentase perolehan kembali (% *recovery*). Penurunan aktivitas tersebut diduga karena selama tahapan purifikasi terjadi pengenceran enzim oleh fase gerak yang digunakan (bufer Na-fosfat) untuk equilibrasi dan elusi dalam kromatografi kolom. Selain itu, ketika dilakukan kromatografi kolom, fraksi aktif enzim yang dimanfaatkan adalah fraksi dengan aktivitas enzim tinggi, sementara fraksi dengan aktivitas enzim rendah diabaikan. Pada analisis aktivitas spesifik enzim menunjukkan adanya peningkatan pada setiap tahapan purifikasi yang dilakukan (tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa pada setiap tahap purifikasi, enzim yang dihasilkan semakin murni. Xilanase hasil purifikasi juga memiliki faktor purifikasi (*fold*) sebesar 2,063 yang merupakan gabungan antara permeat dan retentat ultrafiltrasi (xilanase A dan B). Nilai tersebut 2 kali lipat lebih murni dibandingkan enzim awal, yang berarti sebagian besar protein non-xilanase dalam ekstrak kasar enzim berhasil dihilangkan melalui beberapa tahap purifikasi yang digunakan, sehingga enzim akhir yang diperoleh banyak mengandung xilanase yang dapat aktif bekerja (tidak terhambat).

## **F. Identifikasi enzim xilanase**

### **1. Elektroforesis**

Identifikasi enzim xilanase dilakukan dengan elektroforesis menggunakan sodium dodecyl sulfat-gel poliakrilamida 12% (SDS-PAGE). Persentase 12% tersebut digunakan karena mampu menyajikan

komposisi protein yang terdapat dalam enzim yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. AQ-1 pada kisaran berat molekul yang ingin dipisahkan. Selanjutnya, visualisasi protein dapat diketahui dengan pewarnaan menggunakan metode *silver staining* (Copeland, 1994). Syarat pewarna yang digunakan adalah dapat bereaksi dengan molekul sampel yang dipisahkan namun tidak bereaksi dengan gel. Ikatan antara pewarna dan gel adalah ikatan non-kovalen sehingga mudah dilepaskan dengan pencucian secara intensif. Metode ini dipilih karena mampu menampilkan komposisi protein penyusun enzim dengan kadar protein rendah walaupun memerlukan mekanisme pengujian yang panjang dengan beragam pereaksi yang digunakan (Copeland, 1994). Hasil pewarnaan protein pada ekstrak kasar enzim dan xilanase hasil purifikasi dengan metode ini disajikan dalam gambar 12.



**Gambar 12.** Pewarnaan protein dengan metode *silver staining*. Kolom 1: penanda protein/marker LMW, kolom 2: ekstrak kasar enzim, kolom 3: hasil elusi dengan DEAE Sepharose FF, kolom 4: hasil elusi dengan Sephacryll S-300, kolom 5: permeat ultrafiltrasi dan kolom 6: retentat ultrafiltrasi



Gambar 12 menunjukkan bahwa pada ekstrak kasar enzim (kolom 2) tersusun atas banyak pita yang menunjukkan banyaknya jenis protein yang dimiliki. Jika dibandingkan dengan protein marker LMW (kolom 1), protein yang tersusun pada ekstrak kasar enzim ini sangat variatif mulai dari protein dengan berat molekul (BM) rendah (14,4 kDa) sampai protein dengan BM tinggi (97 kDa). Dari hasil purifikasi xilanase yang dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim melalui beberapa tahap diharapkan sebagian besar protein yang tersisa adalah protein xilanase yang diinginkan, sedangkan protein non xilanase diharapkan semakin berkurang sejalan dengan tahapan purifikasi. Pada enzim hasil elusi dengan kolom penukar anion DEAE Sepharose FF (kolom 3) jumlah pita protein yang ada sudah berkurang dibandingkan ekstrak kasar enzim, hanya protein dengan BM tertentu terdapat dalam enzim ini. Pada enzim hasil elusi dengan kolom filtrasi gel Sephacryll S-300, komposisi protein juga sudah berkurang. Demikian juga dengan enzim hasil pemisahan dengan ultrafiltrasi bertingkat dimana komposisi proteinnya semakin berkurang. Ini terjadi karena beberapa protein non xilanase yang ada berhasil dipisahkan dengan kolom kromatografi yang digunakan.

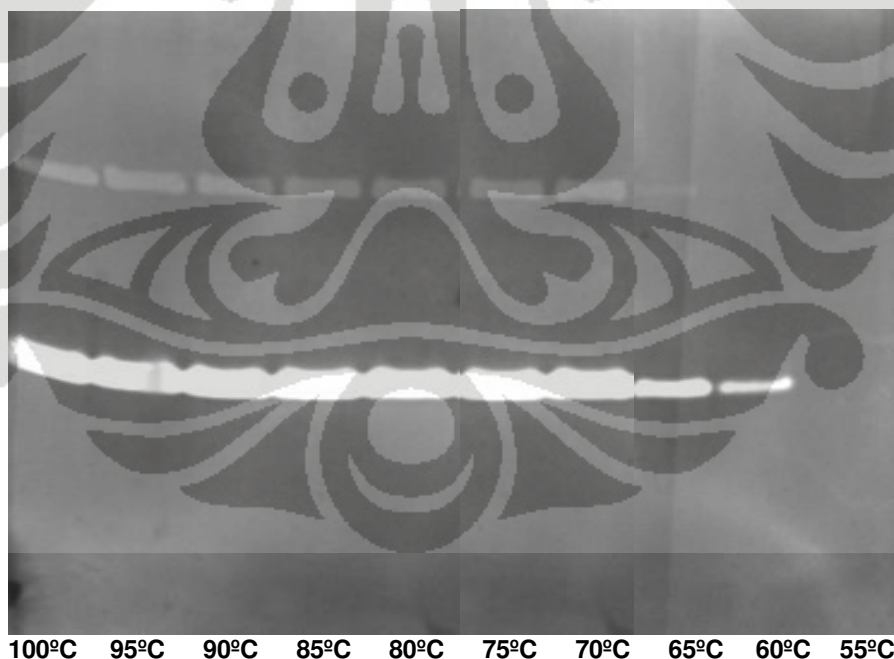
Mekanisme yang terjadi pada elektroforesis ini didasarkan pada mobilitas elektroforetik protein, yaitu kecepatan yang dicapai oleh partikel tersebut pada suatu medan listrik dimana pada kondisi yang sama, besarnya mobilitas selalu sama untuk setiap ion sehingga diperoleh hubungan antara berat molekul dan mobilitasnya (Nur dan Adijuwana, 1988). Dari pergerakan protein tersebut dalam gel poliakrilamida, akan



menunjukkan bahwa semakin ke bawah posisi protein dalam gel memiliki berat molekul yang semakin rendah, demikian juga sebaliknya (Copeland, 1994).

## 2. Zimografi

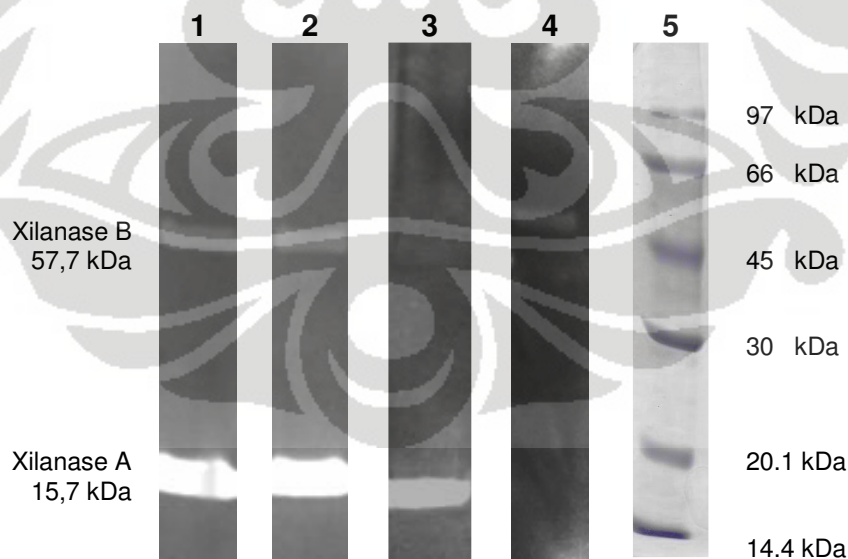
Untuk mengidentifikasi adanya enzim xilanase serta menentukan berat molekul xilanase hasil purifikasi, dilakukan dengan analisis zimografi. Keberadaan xilanase dapat diketahui dengan terbentuknya zona bening pada zimogram. Pada uji penentuan suhu aktif xilanase dalam gel poliakrilamida yang dilakukan dengan metode zimografi, hasil pengamatannya disajikan dalam gambar 13.



**Gambar 13.** Penentuan suhu aktif enzim xilanase pada gel poliakrilamida 12% yang mengandung 0,1% substrat beechwood xilan.

Gambar 13 menunjukkan bahwa zona bening terbentuk pada enzim yang diinkubasi mulai suhu 60°C. Pada suhu 60°C ini hanya terbentuk 1 zona bening, suhu 65°C terbentuk 2 zona bening tipis dan mulai suhu 70-100°C terdapat 2 zona bening terang, namun zona terjelas terdapat pada enzim yang diinkubasi pada suhu 85°C, sehingga untuk analisis zimografi berikutnya selalu dilakukan pada suhu 85°C.

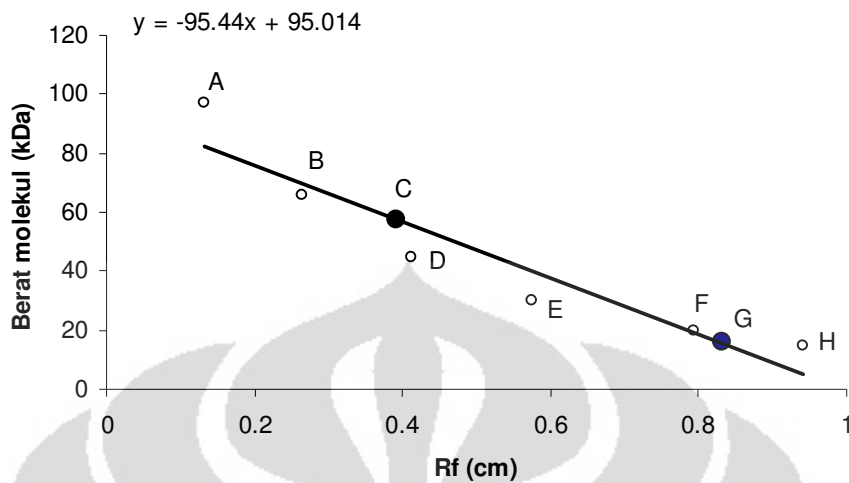
Prinsip dari teknik zimografi adalah reaksi spesifik antara enzim dengan substrat. Scopes (1987) mengungkapkan bahwa teknik ini merupakan teknik pewarnaan spesifik, dimana gel yang digunakan untuk analisis zimografi terbatas pada gel non denaturasi karena pada umumnya enzim akan kehilangan aktivitasnya jika terdenaturasi. Selanjutnya hasil uji zimografi xilanase hasil purifikasi disajikan dalam gambar 14.



**Gambar 14.** Zimogram enzim xilanase hasil purifikasi. Kolom 1: hasil elusi dengan DEAE Sepharose FF, kolom 2: hasil elusi dengan Sephacryll S-300, kolom 3: permeat ultrafiltrasi, kolom 4: retentat ultrafiltrasi dan kolom 5: penanda protein/protein marker LMW

Gambar 14 menyatakan bahwa pada enzim hasil elusi dengan kolom penukar anion DEAE Sepharose FF dan kolom filtrasi gel Sephacryll S-300 menunjukkan terbentuknya 2 zona bening (kolom 1 dan 2), selanjutnya disebut xilanase A dan xilanase B. Dari hasil pemisahan dengan ultrafiltrasi bertingkat menyatakan bahwa pada permeat ultrafiltrasi terbentuk 1 zona bening, disebut xilanase A, sedangkan pada retentat ultrafiltrasi juga terbentuk 1 zona bening, disebut sebagai xilanase B. Hasil tersebut menunjukkan bahwa xilanase A dan B dapat dipisahkan dengan ultrafiltrasi bertingkat menggunakan membran *polyethersulfone* 30 kDa.

Estimasi berat molekul xilanase ditentukan berdasarkan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Plumer, 1987). Cara yang ditempuh adalah dengan mencari hubungan antara mobilitas relatif protein standar dengan nilai Rf yang dibentuk oleh protein standar tersebut, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi yang menghubungkan keduanya. Mobilitas relatif protein adalah perbandingan jarak antara titik awal ke pita protein dengan titik awal ke titik akhir elektroforesis, atau perbandingan jarak migrasi zat warna (Hames and Rickwood, 1987). Estimasi berat molekul xilanase A dan B hasil purifikasi dalam kurva standar tersebut disajikan dalam gambar 15.



**Gambar 15.** Estimasi berat molekul xilanase A dan B berdasarkan SDS-PAGE-zimogram, dengan protein marker A: Phophorylase b (97 kDa), B: Albumin (66 kDa), C: Xilanase B (57,7 kDa), D: Ovalbumin (45 kDa), E: Carbonic anhydrase (30 kDa), F: Trypsin inhibitor (20,1), G: Xilanase A (15,7 kDa), H:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa)

Hasil perhitungan berat molekul xilanase A dan B hasil purifikasi menggunakan kurva kalibrasi berat molekul pada gambar 15 menunjukkan bahwa xilanase A yang terdapat pada permeat enzim hasil ultrafiltrasi memiliki berat molekul 15,7 kDa. Sedang xilanase B yang terdapat pada retentat hasil ultrafiltrasi memiliki berat molekul 57,7 kDa.

## G. AMOBILISASI ENZIM XILANASE

Enzim amobil adalah enzim yang secara biologis terlokalisasi dalam tempat (*ruang*) dengan aktivitas katalitik yang dapat digunakan secara cepat dan kontinyu. Membran *mixed cellulose ester* adalah salah satu karier (*support*) yang dapat digunakan sebagai media amobilisasi dengan metode kovalen. Walaupun memerlukan beberapa tahapan dalam proses penggunaannya, tetapi ikatan yang terbentuk antara molekul enzim

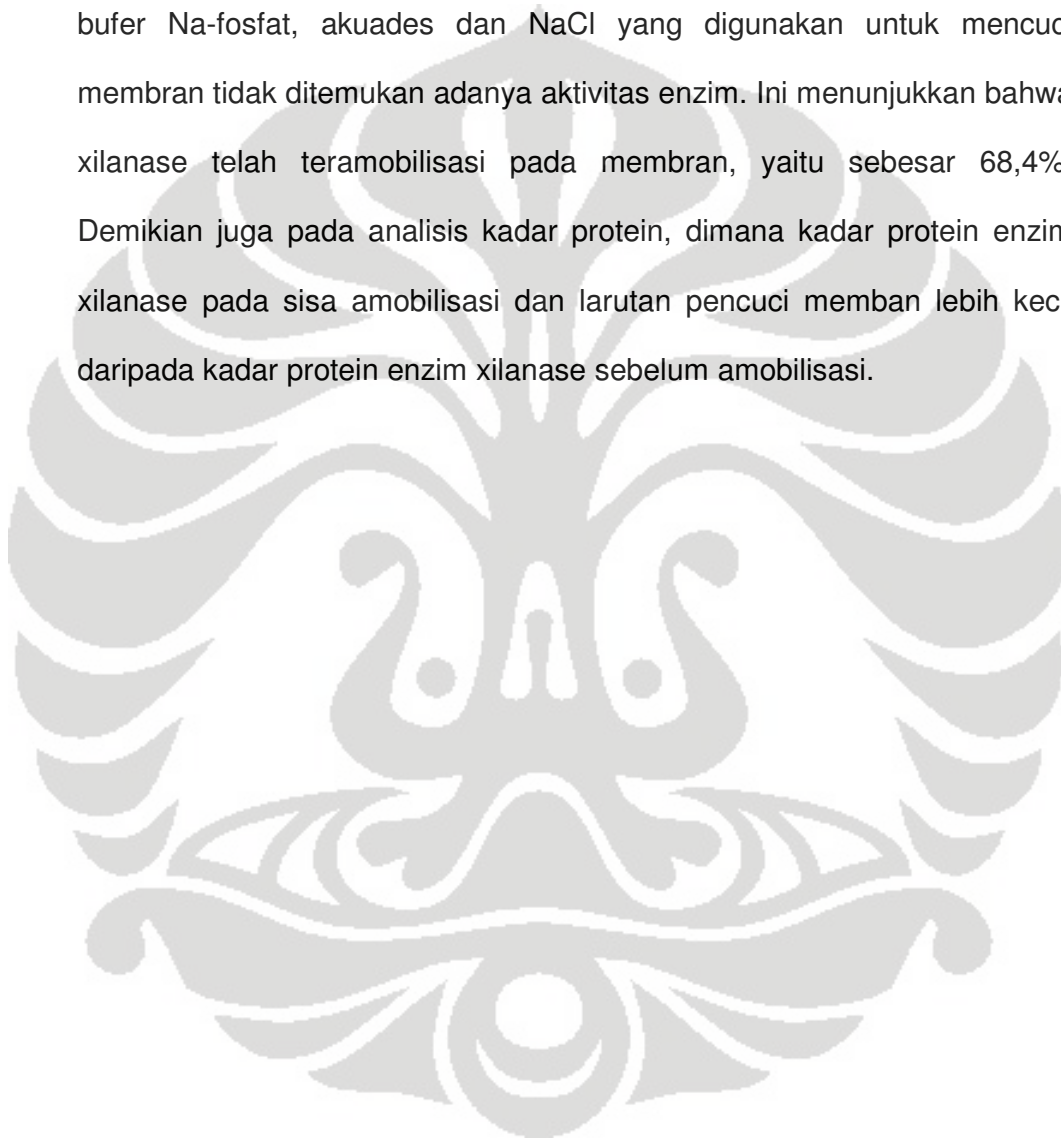
terhadap karier sangat kuat, karena terbentuknya ikatan kovalen antara reagen pembentuk ikatan (glutaraldehida) dengan karier, serta antara reagen pembentuk ikatan dengan enzim. Enzim yang terikat pada karier tersebut diharapkan tidak hanya menempel dengan polimer membran pada bagian permukaan, tetapi juga terserap masuk ke dalam pori membran sehingga dihasilkan persentase efisiensi amobilisasi yang besar. Kelebihan metode ini adalah terpisahnya produk yang dihasilkan dari reaktan atau pereaksi yang digunakan sehingga ketika diaplikasikan dalam industri, pemurnian produk menjadi lebih mudah dan tidak memerlukan energi serta biaya yang tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa efisiensi amobilisasi enzim xilanase dengan metode kovalen diperoleh sebesar 68,4% dengan *protein loading* sebesar 0,105 g/m<sup>2</sup>. Nilai tersebut diperoleh dengan mengukur aktivitas cairan enzim dan kadar protein sebelum amobilisasi dikurangi dengan setelah amobilisasi (perhitungan disajikan dalam lampiran 6). Efisiensi amobilisasi yang lebih dari 50% tersebut menunjukkan bahwa amobilisasi enzim dengan teknik ini sudah bisa diterapkan dalam industri. Banyaknya xilanase yang teramobilisasi pada membran ditentukan oleh ukuran pori membran yang digunakan, semakin kecil ukuran pori membran maka semakin banyak jumlah enzim yang teramobilisasi atau yang tertahan pada permukaan dan pori membran.

Keberhasilan amobilisasi dipengaruhi oleh besarnya aktivitas enzim dan kadar protein yang ada pada sisa amobilisasi serta bufer Na-fosfat, akuades dan NaCl yang digunakan untuk mencuci membran. Semakin



kecil aktivitas enzim dan kadar protein pada larutan-larutan tersebut maka semakin banyak enzim yang teramobilisasi. Pada penelitian ini, aktivitas enzim xilanase pada sisa amobilisasi (7 U/mL) lebih kecil daripada aktivitas enzim xilanase sebelum amobilisasi (23,5 U/mL). Sedang pada bufer Na-fosfat, akuades dan NaCl yang digunakan untuk mencuci membran tidak ditemukan adanya aktivitas enzim. Ini menunjukkan bahwa xilanase telah teramobilisasi pada membran, yaitu sebesar 68,4%. Demikian juga pada analisis kadar protein, dimana kadar protein enzim xilanase pada sisa amobilisasi dan larutan pencuci membran lebih kecil daripada kadar protein enzim xilanase sebelum amobilisasi.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Purifikasi enzim xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. AQ-1 dengan tandan kosong kelapa sawit sebagai substrat xilan menghasilkan 2 jenis xilanase, yaitu xilanase A dan B. Kemurnian xilanase dicapai dengan terbentuknya zona bening tunggal pada gel poliakrilamida.
2. Berat molekul xilanase A dan B yang dianalisis dengan metode SDS-PAGE dan zimografi masing-masing adalah 15,7 dan 57,7 kDa
3. Amobilisasi enzim xilanase yang terikat pada membran *mixed cellulose ester* 0,22  $\mu\text{m}$  adalah sebesar 68,4% dengan *protein loading* sebesar 0,105  $\text{g}/\text{m}^2$

#### B. SARAN

Perlu dilakukan karakterisasi enzim xilanase A dan B untuk lebih mengidentifikasi jenis xilanase hasil purifikasi termasuk endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -glukuronidase atau asetil xilan esterase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustine, W. (2005). *Penentuan kondisi optimum pertumbuhan dan produksi xylanase isolat AQ-1*. [skripsi] FMIPA-IPB, Bogor
- Alexander, R.R. and Griffiths, J.M. (1993). *Basic biochemical methods*. 2nd.ed. Wiley-Liss, New York. 353
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology*, 23:257-270
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 56:326-338
- Biely, P. (1985). Microbiol xylanolytic system. *Trens Biotechnol*, 3:289-290
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. (1997). Reactives of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4632
- Chalal, D.S. (1985). Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(1):205-210
- Copeland, R.A. (1994). *Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols*. Chapman and Hall, New York. 39-59
- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. (1993). B-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17:259-289
- Dahuri, R. (2004). *Industri bioteknologi perairan dan kemakmuran bangsa*. Kompas 22 November 2004
- Darnoko. (1992). Potensi pemanfaatan limbah lignoselulosa kelapa sawit melalui biokonversi. *Berita Perkebunan Medan*, 2:85-97
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M. (1986). *Data for biochemical research*. Clarendon Press, Oxford. 426-448
- Dixon, M., Webb, E.C., Thorne, C.J.R., Tripton, K.F. (1979). *The enzymes*. Academic Press, New York
- Engel, P.C. (1996). *Enzymology*. BIOS Scientific Publisher Academic Press, San Diego USA. 25-38
- Godfrey, T. and West, Sl. (1996). *Introduction to industrial enzymology*. dalam Godfrey, T., West, S. (Eds.). *Industrial enzymology*. 2<sup>nd</sup>. MacMillan Press LTD. 609

- Harris, E.L.V. and Angal, A. (1989). *Protein purification methods*. IRL Press Oxford University Press, New York. 10-64
- Harris, E.L.V. and Angal, A. (1990). *Protein purification applications: a practical approach*. IRL Press Oxford University Press, New York. 5-15
- Hartley, C.W.S. (1988). *The oil palm*. Longman Group Limited, London
- Hogan, J.P. and Leche, T.F. (1981). *Types of fibrous residues and their characteristic*. Australian Publishing Service, Canberra
- Hinnman, R.L. (1994). The changing face of the fermentation industry. *Chem. Technol.*, 24:45-8
- Horikoshi, K. (1996). Alkaliphilic: from an industrial point of view. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18:259-270
- Hames, B.D. and Rickwood, D. (1987). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. IRL Press, Washington DC
- Horikoshi, K. (1996). Alkaliphilic: from an industrial point of view. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18:259-270
- Humphrey, J.L. (1997). *Separation process technology*. McGraw-Hill Companies, USA. 227
- Illanes, A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2(1):1-9
- Irawadi, T.T. (1991). Produksi enzim ekstraseluler (selulase dan xilanase) dari *Neurospora sitophilla* pada substrat limbah padat kelapa sawit. [disertasi] Fakultas Pascasarjana IPB, Bogor
- Janson, J.C. and Ryden, L. (1998). *Protein purification: principle, high-resolution, methods and applications*. John Wiley & Sons, Inc., USA. 3-145
- Johnson, E.L. and Stevenson, R. (1978). *Basic liquid chromatography*. Varian Associates, Inc., USA. 119-154
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23:411-456
- Kulkarni, S.S., Funk, E.W., Li, N.N. (2001). *Ultrafiltration*. dalam Ho, W.S., Sirkar, K.K., eds. *Membrane handbook*, Boston. 393-453
- Le Maire, M., Chabaud, R., Herve, G. (1991). *Laboratory guide to biochemistry, enzymology and protein physical chemistry: A study of aspartate transcarbamylase*. Plenum Press, New York, 169



- Lehninger, A.L. (1982). *Dasar-dasar biokimia*, Jilid 1 terj Principle of biochemistry oleh Maggy, T. Erlangga, Jakarta, 113
- Lowry, O.H., Rosebrough, P.J., Farr, A.L., Randall., R.J. (1951). Protein measurement with the follin phenol reagent. *J. Biochem.*, 193:265-275
- Mardiah, E. (1990). *Pengujian aktivitas dan ekstraksi enzim amilase pada beberapa varietas ubi jalar*. Laporan penelitian Pusat Penelitian Andalas, Padang
- Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (1983). *Harpers review of biochemistry* 19th ed. (Biokimia) diterjemahkan Dharma, A. dan Kurniawan, A. Penerbit kedokteran EGC, Jakarta
- Martoharsono, S. dan Kuswanto, K.R. (1978). *Enzimologi*. Yayasan Pembina Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:424-426
- Monti, R., Cardello, L., Custodio, M., Goulart, A., Sayama, A., Contiero, J. (2003). Production and purification of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Humicola grisea* var. thermoidea by electroelution. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:124-128
- Naibaho, P.M. (1992). Diversifikasi minyak sawit dan inti sawit dalam upaya meningkatkan daya saing dengan minyak nabati lainnya dan minyak hewani. *Buletin Perkebunan*, 21:2
- Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. Horokoshi, K. (1994). Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:78-81
- Nur, M.A. dan Adijuwana, H. (1988). *Teknik separasi dalam analisis pangan*. PAU IPB, Bogor
- Palmer, T. (1991). *Understanding enzymes*. Ellis Horwood Limited. New York. 306-311
- Paridon, P.A., Boonman, J.C.P., Selen, G.C.M., Geerse, C., Barug, D., de Bot, P.H.M., Hemke, G. (1992). *The application of fungal endoxylanase in poultry diets dalam* Visser et al. eds. Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam
- Pelczar, M.J. and Chan, E.C.S. (1986). *Elements of Microbiology*. diterjemahkan Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., Angka, S.L. Dasar-dasar mikrobiologi Volume I. UI Press, Jakarta



- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-dasar biokimia*. Universitas Indonesia, Jakarta
- Poutanen, K. (1997). Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 8:300-306
- Plummer, D.T. (1987). *Practical Biochemistry*. McGraw-Hill Book Company, London. 66-110
- Querido, A.L.A., Coelho, J.L.C., Araujo, E.F., Chaves-Alves, V.M. (2006). Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3):475-480
- Rahman, AK., Sugitani, N., Hatsu, M., Takamizawa, K. (2003). A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and xylanase in xylan degradation. *Can. J. Microbiol.*, 49:58-64
- Reilly, P.J. (1991). *Xylanase: structure and function*. dalam Hollander, A. eds. Proceeding of a symposium on tren in biotechnology of fermentation for fuels and chemicals. Plenum Press, New York
- Roe, S. (2001). *Protein purification techniques*. Oxford University Press, New York. 1-49
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. (1990). Simple, sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1516-1517
- Ruiz-Arribas, A., Fernandez-Abalos, J.M., Sanches, P., Gardu, A.L., Santamaria, R.I. (1995). Over production, purification, and biochemical characterization of xylanase I (xys 1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61(6):2414-2419
- Schlegel, H.G. and Schmidt, K. (1994). *Allgemeine Microbiologie*. diterjemahkan Baskoro, T. Mikrobiologi Umum Edisi ke-6. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Schwimmer, S. (1981). *Source book of food enzymology*. AVI Publishing Co. Inc., Coeecticut
- Scopes, R.K. (1987). *Protein purification*. RR Donnelley and Sons, USA
- Senior, D.J., Mayer, P.R., Saddler, J.N. (1990). The interaction of xylanase with commercial pulps. *Biotechnol. Bioeng.*, 37:274-279
- Simpson, HD., Haufler, UR., Daniel, RM. (1991). An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermatoga*. *Biochem. J.*, 277:413-417
- Soehartono, M.T. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. IPB, Bogor

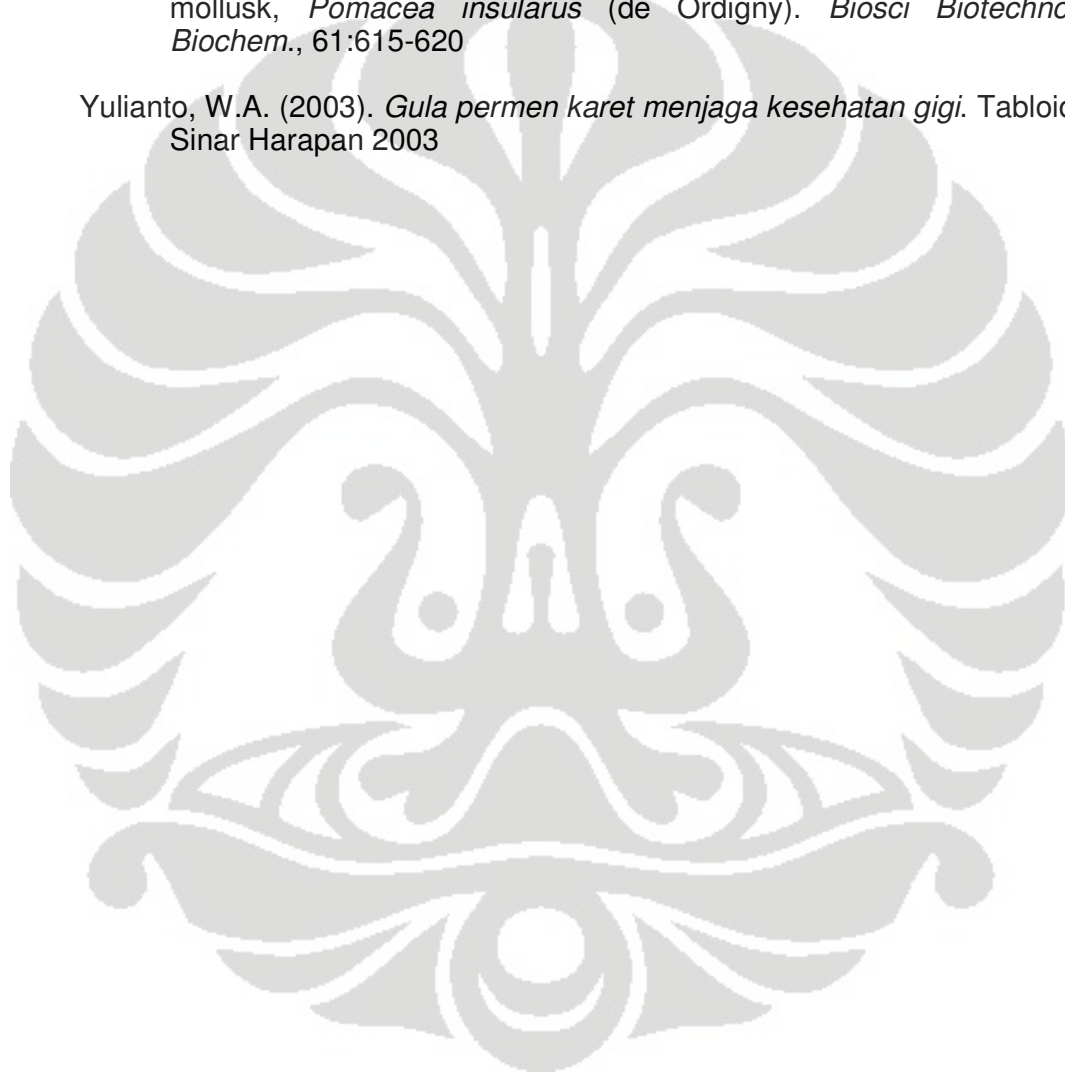
- Stanburry, P.F. and Whittaker, A. (1984). *Principle of fermentation technology*. Pergamon Press. Limited, Oxford
- Subramaniyan, S. and Prema, P. (2000). Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183:1-7
- Sunna, A. and Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 17:39-67
- Sunna, A., Prowe, SG., Stoffregen, F., Antranikian, G. (1997). Characterization of the xylanases from the new isolated thermophilic xylan-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d and *Bacillus flavothermus* strain LB3A. *FEMS Microbiology Letters*, 148:209-216
- Sunna, A., Puls, J., Antranikian, G. (1997). Characterization of the xylanolytic enzyme system of the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermatoga martima*, *T. neapolitana*, *T. thermarum*. *Comp. Biochem. Physiol*, 118A(3):453-461
- Suryadi, H., Katsuragi, T., Yoshida, N., Suzuki, S., Tani, Y. (2000). Polyol production by culture of methanol-utilizing yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, 89(3):236-240
- Swasono, S.B.A. (2005). *Produksi enzim xilanase menggunakan Bacillus licheniformis AQ-1 pada skala laboratorium*. [skripsi] Fakultas Pertanian IPB, Bogor:
- Takahashi, H., Nakai, R., Nakamura, S. (2000). Purification and partial characterization of a basic xylanase produced by thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(4):887-890
- Tanaka, H., Nakamura, T., Hayashi, S. and Ohta, K. (2005). Purification and properties of an extracellular endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(6):623-630
- Tuncer, M. and Ball, AS. (2003). Co-operative actions and degradation analysis of purified xylose-degrading enzymes from *Thermonospora fusca* BD25 on spelt xylan. *J. Apply. Microbiol.*, 94:1030-1105
- Whistler, RL. and Richards, EL. (1970). *Hemicelluloses dalam* Pigman, W., Horton, D. (eds.). The carbohydrates, 2nd edition. Academic Press, New York. 447-469
- Winarno. (1983). *Enzim pangan*. Gramedia, Jakarta

Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. (1993). *Applications of hemicellulases in the food and pulp and paper industries*. dalam Coughlan dan Hazlewood, eds. *Hemicelluloses and hemicellulases*. Portland Press, London

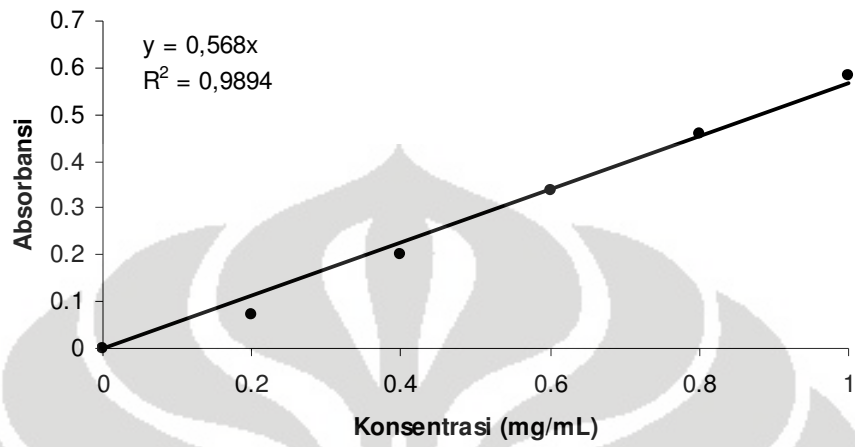
Woodward, J. (1984). Xylanase: function, properties and applications. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.*, 8:9-30

Yamaura, I., Koga, T., Matasumoto, T., Kato, T. (1997). Purification and some properties of endo-1,4-beta-D-xylanase from a fresh-water mollusk, *Pomacea insularis* (de Ordigny). *Biosci Biotechnol Biochem.*, 61:615-620

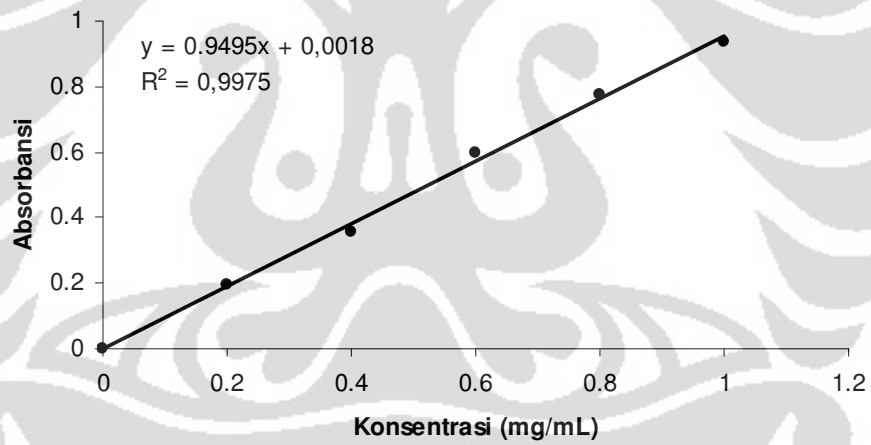
Yulianto, W.A. (2003). *Gula permen karet menjaga kesehatan gigi*. Tabloid Sinar Harapan 2003



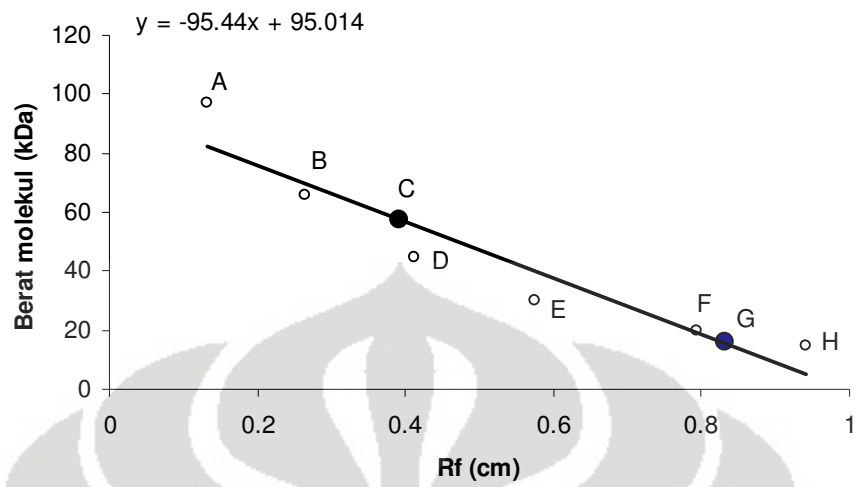
## GAMBAR



Gambar 16. Kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase



Gambar 17. Kurva kalibrasi kadar protein



**Gambar 18. Kurva kalibrasi berat molekul**



**Gambar 19. Fermentor**





**Gambar 20. Spektrofotometer Hitachi UV-Vis U-2001**



**Gambar 21. Seperangkat alat kromatografi penukar ion dengan kolom DEAE Sepharose FF (20×200 mm)**



**Gambar 22. Seperangkat alat kromatografi filtrasi gel dengan kolom Sepachryll S-300 (16×600 mm)**



**Gambar 23. Uji aktivitas xilanase dengan metode Bailey *et al* (1992) dan uji kadar protein dengan metode Lowry *et al* (1951)**



**Gambar 24. Elektroforesis**



**Gambar 25. Amobilisasi enzim xilanase pada membran *mixed cellulose ester* 0,22  $\mu\text{m}$  dengan metode kovalen**

## TABEL

Tabel 3. Data absorbansi kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase

KONSENTRASI ( <sup>mg</sup> / <sub>mL</sub> )	ABSORBANSI		
	1	2	Rata-rata
0	0	0	0
0,2	0,070	0,072	0,071
0,4	0,198	0,207	0,202
0,6	0,317	0,358	0,337
0,8	0,472	0,448	0,460
1	0,602	0,566	0,584

Tabel 4. Data absorbansi kurva kalibrasi kadar protein

KONSENTRASI ( <sup>g</sup> / <sub>mL</sub> )	ABSORBANSI			
	1	2	3	Rata-rata
0	0	0	0	0
0,2	0,149	0,178	0,263	0,197
0,4	0,406	0,432	0,235	0,357
0,6	0,582	0,579	0,625	0,595
0,8	0,832	0,785	0,707	0,775
1	0,909	0,919	0,977	0,935

Tabel 5. Data nilai Rf kurva kalibrasi berat molekul

No	Protein	KODE	Berat Molekul (kDa)	Rf (cm)
1	Phosphorylase b	A	97	0,132
2	Albumin	B	66	0,265
3	<b>Xilanase B</b>	<b>C</b>	<b>57,7</b>	<b>0,391</b>
4	Ovalbumin	D	45	0,412
5	Carbonic anhydrase	E	30	0,574
6	Trypsin inhibitor	F	21,2	0,794
7	<b>Xilanase A</b>	<b>G</b>	<b>15,7</b>	<b>0,831</b>
8	α-Lactalbumin	H	14,4	0,941

**Tabel 6. Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dari tahapan purifikasi**

Sampel	Absorbansi				Aktivitas enzim (U/mL)	Aktivitas enzim total (U)
	1	2	3	Rata-rata		
Ekstrak kasar enzim (50 mL)	1,373	1,394	1,399	1,389	64,764	3238,193
Hasil elusi dengan DEAE Sepharose FF (50 mL)	1,185	1,172	1,163	1,173	54,721	2736,063
Hasil elusi dengan Sepachryll S-300 (40 mL)	1,206	1,230	1,215	1,217	56,773	2270,917
Retentat (1 mL) dan permeat (20 mL)	0,131	0,128	0,136	0,132	6,141	6,141
Ultrafiltrasi	0,248	0,255	0,237	0,247	11,504	230,078

**Tabel 7. Data absorbansi kadar protein dari tahapan purifikasi**

Sampel	Absorbansi				Kadar protein (mg/mL)	Kadar protein total (mg)
	1	2	3	Rata-rata		
Ekstrak kasar enzim (50 mL)	0,508	0,505	0,525	0,513	0,538	26,902
Hasil elusi dengan DEAE Sepharose FF (50 mL)	0,256	0,264	0,260	0,260	0,272	13,597
Hasil elusi dengan Sepachryll S-300 (40 mL)	0,253	0,260	0,258	0,257	0,269	10,773
Retentat (1 mL) dan permeat (20 mL)	0,035	0,039	0,038	0,037	0,037	0,037
Ultrafiltrasi	0,136	0,135	0,132	0,134	0,140	2,792

**Tabel 8. Data absorbansi uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim xilanase**

Suhu inkubasi	Absorbansi				Aktivitas enzim (U/mL)
	1	2	3	Rata-rata	
30	0,043	0,044	0,036	0,041	1,912
40	0,103	0,094	0,092	0,096	4,492
50	0,143	0,156	0,157	0,152	7,088
60	0,18	0,181	0,192	0,184	8,596
70	0,138	0,149	0,156	0,147	6,886
80	0,084	0,083	0,075	0,080	3,762
90	0,075	0,077	0,079	0,077	3,591
100	0,067	0,066	0,055	0,062	2,922



**Tabel 9. Data absorbansi uji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase**

pH analisis	Absorbansi				Aktivitas enzim (U/mL)
	1	2	3	Rata-rata	
4	0,304	0,299	0,307	0,303	14,146
5	1,072	1,073	1,082	1,076	50,166
6	1,219	1,211	1,213	1,214	56,633
7	1,279	1,271	1,274	1,275	59,447
8	1,057	1,057	1,032	1,049	48,907
9	0,419	0,417	0,414	0,417	19,432

**Tabel 10. Data absorbansi pengaruh bufer terhadap kestabilan enzim xilanase**

Jenis bufer	pH	Aktivitas enzim (U/mL) hari ke-			
		0	1	2	3
Na-asetat	4	14,146	10,245	11,986	14,085
	5	46,575	53,415	47,663	46,676
	6	61,623	65,945	66,443	56,571
Na-sitrat	4	5,332	5,177	4,726	4,835
	5	50,166	50,508	39,378	37,123
	6	66,334	72,490	67,189	70,982
Na-fosfat	6	56,633	67,127	73,485	54,830
	7	59,447	62,525	57,302	57,597
	8	48,845	57,535	48,721	45,425
Tris-HCl	7	63,318	68,510	77,620	61,064
	8	48,907	42,005	36,673	43,684
	9	19,432	18,702	17,023	17,943

**Tabel 11. Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi hasil kromatografi penukar ion**

Fraksi	Aktivitas enzim		Kadar protein	
	Absorbansi	Aktivitas enzim (U/mL)	Absorbansi	Kadar protein (mg/mL)
1	0,309	14,411	0,101	0,104
3	0,448	20,916	0,161	0,168
4	0,582	27,139	0,187	0,195
5	0,658	30,687	0,217	0,227
6	0,688	32,087	0,231	0,241
8	0,712	33,206	0,254	0,266
9	0,740	34,512	0,267	0,279
10	0,789	36,792	0,273	0,286
13	0,811	37,828	0,282	0,295
16	0,822	38,336	0,302	0,316
18	0,839	39,149	0,318	0,333
21	0,855	39,875	0,346	0,363
22	0,813	37,916	0,378	0,396
23	0,719	33,532	0,392	0,411
24	0,576	26,863	0,409	0,429
25	0,335	15,624	0,418	0,438
26	0,139	6,483	0,407	0,427
27	0,061	2,845	0,389	0,408
28	0,028	1,306	0,365	0,383
29	0,001	0,047	0,325	0,340
30	0,000	0,000	0,176	0,183
31	0,000	0,000	0,059	0,060
32	0,000	0,000	0,010	0,009
33	0,000	0,000	0,000	0,000
34	0,000	0,000	0,000	0,000

**Tabel 12. Data absorbansi aktivitas enzim xilanase dan kadar protein fraksi hasil kromatografi filtrasi gel**

Fraksi	Aktivitas enzim		Kadar protein	
	Absorbansi	Aktivitas enzim (U/mL)	Absorbansi	Kadar protein (mg/mL)
1-184	0,000	0,000	0,000	0,000
185	0,052	2,425	0,025	0,024
190	0,056	2,612	0,049	0,050
195	0,078	3,638	0,111	0,115
200	0,082	3,824	0,147	0,153
205	0,083	3,871	0,174	0,181
210	0,083	3,871	0,189	0,197
220	0,125	5,830	0,204	0,213
225	0,172	8,022	0,222	0,232
230	0,439	20,488	0,242	0,253
250	0,913	42,580	0,247	0,258
260	1,076	50,182	0,245	0,256
270	1,147	53,488	0,239	0,250
280	1,205	56,198	0,224	0,234
290	1,235	57,603	0,200	0,209
305	1,193	55,638	0,089	0,092
315	1,165	54,333	0,051	0,052
325	1,056	49,233	0,023	0,022
330	0,981	45,736	0,019	0,018
335	0,893	41,647	0,011	0,010
340	0,719	33,532	0,005	0,003
345	0,542	25,262	0,002	0,000
350	0,304	14,158	0,002	0,000
355	0,167	7,788	0,002	0,000
360	0,066	3,078	0,002	0,000

**Tabel 13. Data absorbansi aktivitas enzim xilanase amobil**

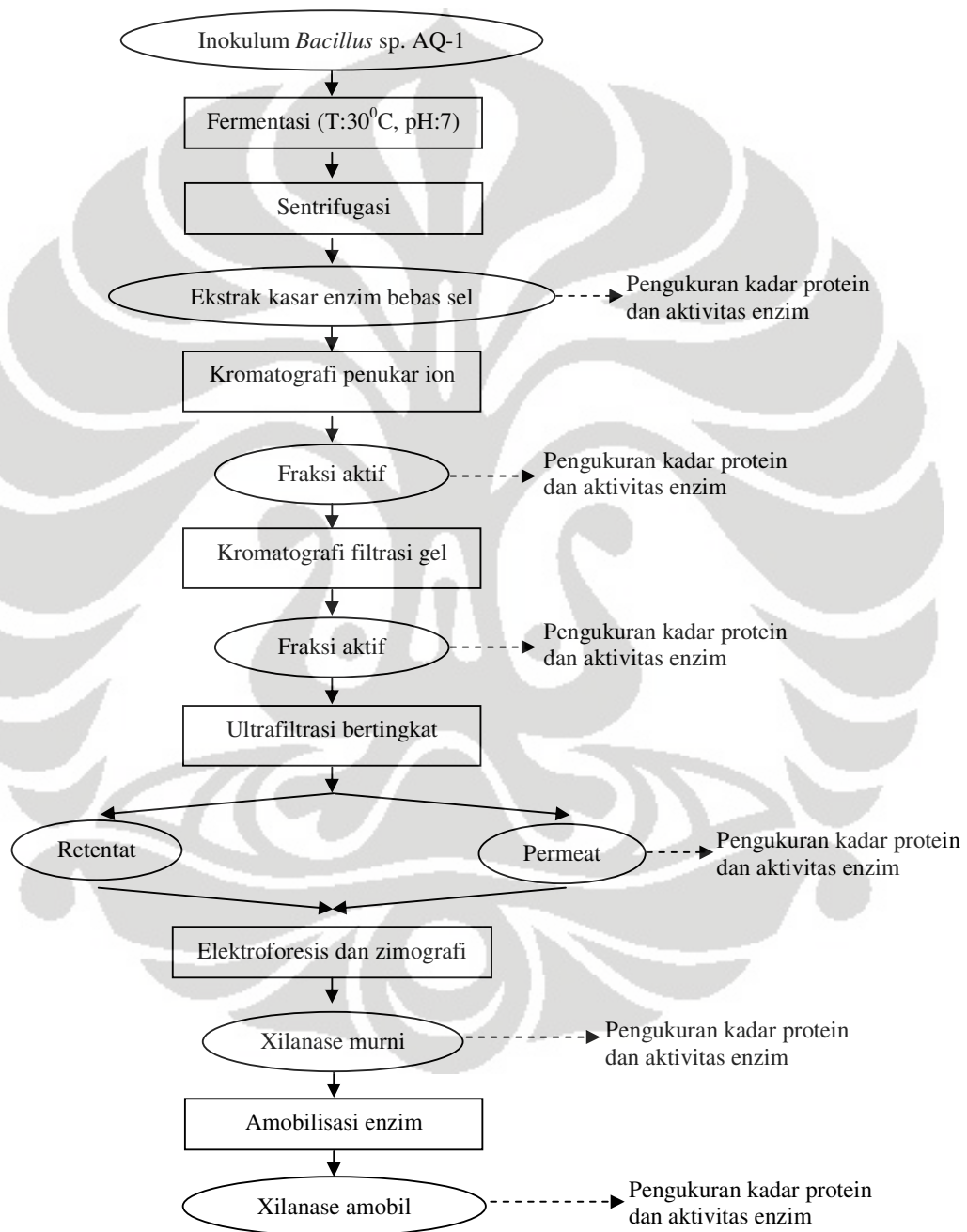
Sampel	Absorbansi				Aktivitas enzim (U/mL)	Efisiensi amobilisasi (%)
	1	2	3	Rata-rata		
Ekstrak kasar enzim	0,508	0,504	0,503	0,505	23,552	
Sisa amobilisasi	0,153	0,159	0,167	0,159	7,446	
Bufer Na-fosfat (pencucian 1)	-	-	-	-	-	68,383
Bufer Na-fosfat (pencucian 2)	-	-	-	-	-	
Akuades	-	-	-	-	-	
NaCl pencucian	-	-	-	-	-	

**Tabel 14. Data absorbansi kadar protein enzim xilanase amobil**

Sampel	Absorbansi				Kadar protein (mg/mL)	Protein loading (g/m <sup>2</sup> )
	1	2	3	Rata-rata		
Ekstrak kasar enzim	0,529	0,506	0,517	0,517	0,543	
Sisa amobilisasi	0,453	0,446	0,453	0,451	0,473	
Bufer Na-fosfat (pencucian 1)	0,032	0,041	0,032	0,035	0,035	0,105
Bufer Na-fosfat (pencucian 2)	0,011	0,018	0,011	0,013	0,013	
Akuades	-	-	-	-	-	
NaCl pencucian	-	-	-	-	-	

## LAMPIRAN

## Lampiran 1 : Skema Kerja Penelitian





## Lampiran 2 : Pembuatan Reagen

### Medium Luria Bertani (LB)

Medium LB dibuat dengan melarutkan 0,5% ekstrak ragi; 1% baktopepton dan 0,5% NaCl dalam akuades, kemudian dihomogenkan dengan pengaduk magnet dan dipanaskan hingga larut. pH larutan ditepatkan menjadi 7,0 dengan NaOH 1M atau HCl 1M, kemudian disterilkan dalam otoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit.

### Medium fermentasi (Nakamura, 1994 modifikasi)

Medium fermentasi dibuat dengan melarutkan 1% baktopepton, 0,5% ekstrak ragi, 0,1%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dan 0,5% substrat tandan kosong kelapa sawit sebagai pengganti substrat xilan. Campuran dihomogenkan dengan pengaduk magnet, ditepatkan pH-nya menjadi 7,0 dengan NaOH 1M atau HCl 1M, kemudian disterilkan dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

### Pereaksi asam 3,5 di-nitro salisilat (DNS) (Miler, 1959)

Pereaksi DNS dibuat dengan mencampurkan 10 g asam 3,5 di-nitro salisilat (DNS) sedikit demi sedikit ke dalam 250 mL NaOH 2N. Ke dalam larutan tersebut selanjutnya ditambahkan 2 g kristal fenol lalu diaduk sampai larut sempurna. Di tempat yang lain, 200 g garam rochel dan 0,5 g  $Na_2SO_3$  dilarutkan dalam 250 mL akuades. Setelah masing-masing bahan larut, larutan garam rochel dimasukkan dalam larutan DNS kemudian

diaduk menggunakan pengaduk magnet dan ditambahkan akuades sampai volumenya mencapai 1000 mL.

#### Reagen Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Untuk pengukuran kadar protein, dipergunakan larutan Lowry yang dibuat dengan mencampurkan 49 bagian larutan Lowry A dengan 0,5 bagian larutan Lowry B dan 0,5 bagian larutan Lowry C. Larutan Lowry A dibuat dengan melarutkan 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan  $\text{NaOH}$  0,1 M dalam akuades. Larutan Lowry B dibuat dengan mencampurkan 1%  $\text{CuSO}_4$  dalam akuades. Sedang Lowry C dibuat dengan melarutkan 2% Kalium-Natrium Tartrat ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dalam akuades.

#### Reagen PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Lowry *et al.*, 1951)

Reagen PBS untuk analisis kadar protein metode Lowry *et al.* (1951) dibuat dengan melarutkan 8 g  $\text{NaCl}$ ; 0,2 g  $\text{KCl}$ ; 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dalam akuades sampai volumenya 1000 mL.

#### Gel SDS-PAGE 12% (Copeland, 1994)

Berdasarkan metode Copeland (1994), gel SDS-PAGE 12% dibuat dengan memasukkan *separating gel* ke dalam kaca elektroforesis diikuti dengan *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan melarutkan 5 bagian akrilamida 30%; 3,75 bagian bufer Tris-Cl/SDS pH 8,8; 3,75 bagian akuades; 0,05 bagian amonium per sulfat (APS) dan 0,01 bagian TEMED. Sedang *stacking gel* dibuat dengan melarutkan 0,65 bagian akrilamida

30%; 1,25 bagian 4x bufer Tris-Cl/SDS pH 6,8; 3,05 bagian akuades; 0,025 bagian APS dan 0,005 bagian TEMED.

Bufer Tris-Cl/SDS pH 8,8 (Copeland, 1994)

Bufer Tris-Cl/SDS pH 8,8 dibuat dengan melarutkan 18,17 g Tris-base dengan 4 mL sodium dodecyl sulfat (SDS) 10% ke dalam 100 mL akuades. pH larutan ditepatkan sampai 8,8 menggunakan HCl 1N kemudian disaring dengan membran diameter 0,45  $\mu\text{m}$  dan larutan disimpan pada suhu 4°C.

4x Bufer Tris-Cl/SDS pH 6,8 (Copeland, 1994)

4x Bufer Tris-Cl/SDS pH 6,8 dibuat dengan melarutkan 6,05 g Tris-base dengan 4 mL SDS 10% ke dalam 100 mL akuades. pH larutan ditepatkan menjadi 6,8 menggunakan HCl 1N kemudian disaring dengan membran diameter 0,45  $\mu\text{m}$  dan larutan disimpan pada suhu 4°C.

5x Bufer elektroforesis/SDS (Copeland, 1994)

5x Bufer elektroforesis/SDS dibuat dengan melarutkan 15,1 g Tris-base; 72 g glisin dan 5 g SDS 10% dalam akuades sampai volumenya 1000 mL. Larutan disaring dengan membran diameter 0,45  $\mu\text{m}$  kemudian disimpan pada suhu 4°C.

2x Bufer sampel/SDS (Copeland, 1994)

2x Bufer sampel/SDS dibuat dengan melarutkan 30 mL SDS 10%; 10 mL gliserol; 5 mL 2-merkaptoetanol; 12,5 mL 4x bufer tris-Cl/SDS pH 6,8 dan 5-10 mg bromfenol biru dalam akuades sampai volumenya 100 mL. Selanjutnya larutan harus disimpan pada suhu 4°C.

Fixing solution (Copeland, 1994)

*Fixing solution* dibuat dengan mencampurkan 50% metanol, 10% asam asetat dan 40% akuades. Percampuran larutan dilakukan dalam almari asam.

Developing solution (Copeland, 1994)

*Developing solution* dibuat dengan melarutkan 0,5 g Na-sitrat dan 0,5 mL formaldehida 37% dalam akuades sampai volumenya 100 mL. Percampuran dilakukan dalam almari asam.

Developer (Copeland, 1994)

*Developer* dibuat dengan melarutkan 1 bagian *developing solution* dalam 20 bagian akuades. Percampuran dilakukan dalam almari asam.

Destaining solution (Copeland, 1994)

*Destaining solution* dibuat dengan mencampurkan 5% metanol; 7% asam asetat dan 88% akuades. Percampuran dilakukan dalam almari asam.

Silver nitrat solution (Copeland, 1994)

*Silver nitrat solution* dibuat dengan mencampurkan 3,5 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  ~ 30% dan 42 mL  $\text{NaOH}$  0,36% dalam akuades sampai volumenya 200 mL. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan secara perlahan dalam 8 mL  $\text{AgNO}_3$  19,4% (1,6 g  $\text{AgNO}_3$  dalam 8 mL akuades). Percampuran dilakukan dalam almari asam secara perlahan. Apabila terbentuk kabut dan larutan berwarna kecoklatan, percampuran dapat dihentikan sementara sampai kabut menghilang dan larutan sudah tidak berwarna coklat lagi kemudian proses percampuran dapat dilanjutkan kembali. Larutan ini harus selalu dibuat baru, maksimum 20 menit sebelum penggunaan.

Bufer Na-fosfat 50 mM (Dawson *et al.*, 1986)

Bufer Na-fosfat dibuat dengan melarutkan larutan A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam akuades) konsentrasi 50 mM ke dalam larutan B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam akuades) konsentrasi 50 mM. Campuran diaduk dengan pengaduk magnet sambil diukur pH larutan hingga mencapai pH yang diinginkan.

Bufer Na-sitrat 50 mM (Dawson *et al.*, 1986)

Bufer Na-sitrat dibuat dengan melarutkan larutan A ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dalam akuades) konsentrasi 50 mM ke dalam larutan B ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dalam akuades) konsentrasi 50 mM. Campuran diaduk dengan pengaduk magnet sambil diukur pH larutan hingga mencapai nilai pH yang diinginkan.



Bufér Na-asetat 50 mM (Dawson *et al.*, 1986)

Bufér Na-asetat dibuat dengan melarutkan larutan A ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dalam akuades) konsentrasi 50 mM ke dalam larutan B ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  dalam akuades) konsentrasi 50 mM. Campuran diaduk dengan pengaduk magnet sambil diukur pH larutan hingga mencapai nilai pH yang diinginkan.

Bufér tris-Cl 50 mM (Dawson *et al.*, 1986)

Bufér tris-Cl dibuat dengan melarutkan tris base konsentrasi 50 mM ke dalam akuades. Selanjutnya pH larutan diukur hingga mencapai nilai pH yang diinginkan menggunakan HCl 1M.

### Lampiran 3 : Perhitungan Aktivitas Enzim Xilanase

Persamaan kurva kalibrasi aktivitas enzim xilanase (gambar 16):

$$y = 0,568x$$

keterangan: y : absorbansi  
x : konsentrasi xilosa

Contoh Absorbansi : 0,303  
Pengenceran : 1x

Perhitungan:

$$\begin{aligned} y &= 0,568x \\ 0,303 &= 0,568x \\ x &= 0,533 \end{aligned}$$

$$\text{Aktivitas xilanase (U/mL)} = \frac{[\text{xilosa}] \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{BM \text{ xilosa} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume ensim}}$$

$$\text{Aktivitas xilanase (U/mL)} = \frac{[0,533] \times 1 \times 1000}{151 \times 5 \times 0,05} = 14,146$$

#### Lampiran 4 : Perhitungan Kadar Protein

Persamaan kurva kalibrasi kadar protein (gambar 17):

$$y = 0,9495x + 0,0018$$

keterangan: y : absorbansi  
x : konsentrasi / kadar protein

Contoh absorbansi : 0,303

Perhitungan:

$$\begin{aligned}y &= 0,9495x + 0,0018 \\0,303 &= 0,9495 \cdot x + 0,0018 \\x &= 0,317\end{aligned}$$

Kadar protein = 0,317 mg/mL

**Lampiran 5 : Perhitungan Berat Molekul Xilanase Hasil Purifikasi**

Persamaan kurva kalibrasi berat molekul (gambar 18):

$$y = -95,44x + 95,014$$

keterangan:     y : berat molekul (kDa)  
                  x : Rf

Misalnya Rf xilanase A : 0,831 cm  
              xilanase B : 0,391 cm

Perhitungan:

Xilanase A :

$$\begin{aligned}y &= -95,44x + 95,014 \\y &= -95,44 \cdot 0,831 + 95,014 \\y &= 15,7 \text{ kDa}\end{aligned}$$

Berat molekul xilanase A = 15,7 kDa

Xilanase B :

$$\begin{aligned}y &= -95,44x + 95,014 \\y &= -95,44 \cdot 0,391 + 95,014 \\y &= 57,7 \text{ kDa}\end{aligned}$$

Berat molekul xilanase B = 57,7 kDa

## Lampiran 6 : Perhitungan Enzim Xilanase Amobil

- Rumus persentase efisiensi amobilisasi :  $\frac{A - Z}{A} \times 100\%$

keterangan      A = aktivitas enzim sebelum amobilisasi  
                          Z = aktivitas enzim pada sisa amobilisasi

Misalnya aktivitas enzim xilanase sebelum amobilisasi = 23,552 U/mL  
 aktivitas enzim xilanase pada sisa amobilisasi = 7,446

Perhitungan :

$$\text{Efisiensi amobilisasi} = \frac{A - Z}{A} \times 100\% = \frac{23,552 - 7,446}{23,552} \times 100\%$$

$$\text{Efisiensi amobilisasi} = 68,383\%$$

- Rumus *protein loading* :  $(A - B) \times \text{volume enzim}$

keterangan      A = kadar protein sebelum amobilisasi  
                          B = total kadar protein pada pelarut pencucian  
                          4180 mm<sup>2</sup> = luas membran

Misalnya kadar protein sebelum amobilisasi = 0,543 mg/mL  
 total kadar protein pada pelarut pencucian = 0,521 mg/mL

Perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{Protein loading (g/mm}^2\text{)} &= (A - B) \times \text{volume enzim} \\ &= (0,543 - 0,521 \text{ mg/mL}) \times 20 \text{ mL} \\ &= \frac{0,44 \text{ mg}}{4180 \text{ mm}^2} \end{aligned}$$

$$\text{Protein loading (g/mm}^2\text{)} = 0,105 \text{ g/m}^2$$