



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PRODUKSI DAN PENENTUAN
KONDISI OPTIMUM ENZIM XILANASE \BACILUS
AMYLOLIQUEFACIENS FUKUMOTO
PADA SUBTRA XILAM JERAMI**

TESIS



**WIDIYANTI SEKATRESNA
06207009**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2008**

Produksi dan penentuan kondisi optimum enzim xilanase *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto pada substrat xilan jerami

Oleh : Widiyanti Sekatresna

(Di bawah bimbingan : Abdi Dharma dan Periadnadi)

RINGKASAN

Enzim xilanase telah dikenal memiliki manfaat yang luas dalam bidang industri, termasuk peranannya dalam biokonversi limbah berlignoselulosa menjadi produk bermanfaat seperti gula xilosa, substrat penghasil enzim dan bahan berguna lainnya. Melimpahnya limbah pertanian yang merupakan limbah berlignoselulosa membuka peluang bagi ketersediaan bahan baku industri yang lebih murah.

Berbagai penelitian telah diarahkan untuk menghasilkan enzim xilanase. Untuk maksud tersebut pengembangan dilakukan dengan mencari mikroorganisme yang efektif menghasilkan enzim, serta melakukan percobaan terhadap berbagai substrat yang berasal dari limbah pertanian. Salah satu mikroorganisme yang dikenal dapat menghasilkan enzim adalah *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto. Anwarali (2006) melaporkan, bakteri ini cukup efektif menghasilkan enzim α -amilase (aktivitas 14,19 U/mL) dan selulase (aktivitas 13,15 U/mL). Enzim xilanase dari *Bacillus amyloliquefaciens* dilaporkan merupakan enzim thermostabil (Breccia, 1998). Untuk mengetahui kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* dalam menghasilkan enzim xilanase pada substrat xilan jerami maka dilakukan penelitian ini.

Tujuan penelitian : 1) Menentukan kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* memproduksi enzim xilanase pada substrat xilan jerami. 2) Menentukan kondisi optimum enzim xilanase yang dihasilkan *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat xilan jerami 3) Membandingkan aktivitas enzim dari media produksi xilan jerami terhadap enzim dari media produksi xilan murni (birchwood).

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universita Andalas Padang sejak bulan Oktober 2007 sampai April 2008. Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat gelas,

pHmeter, autoklaf, vorteks, waterbath, hot plate, inkubator, timbangan analitik dan spektrofotometer. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah biakan *Bacillus amyloliquefaciens*, jerami, xilan (birchwood), media nutrien agar, larutan standar glukosa dan BSA, berbagai reagen untuk uji gula reduksi dengan metode Somogyi Nelson, larutan phosphomolibdat dan reagen Lowry untuk uji protein enzim.

Penelitian dimulai dengan mempersiapkan substrat jerami. Jerami yang telah dikeringkan dipotong dengan ukuran 1 cm, Setelah pemanasan lebih lanjut dalam oven pada 121⁰C selama 1 jam, jerami direndam dalam alkohol 96 % selama 12 jam. Endapan yang didapat adalah substrat jerami yang merupakan xilan kasar. Tahap berikutnya adalah tahap utama penelitian yang terdiri dari dua tahap. Tahap I merupakan penentuan kondisi optimum produksi enzim xilanase dilanjutkan dengan memproduksi enzim dengan kondisi optimum yang didapat. Tahap II adalah tahap penentuan kondisi optimum enzim yang dihasilkan.

Pada tahap I dibuat 6 sampel dengan kombinasi A₁B₁, A₂B₁, A₃B₁, A₁B₂, A₂B₂ dan A₃B₂. A₁, A₂ dan A₃ masing-masing mewakili kondisi pH 7, 8 dan 9. Sedangkan B₁ dan B₂ merupakan variasi temperatur yang mewakili temperatur kamar (27⁰C) dan temperatur 40⁰C. Masing-masing sampel dicuplik setiap hari sejak hari ke 3 sampai hari ke 8. Kondisi produksi optimum yang didapat adalah sampel dengan kombinasi A₁B₁ (pH 7, suhu kamar) pada waktu inkubasi hari ke 6. Berdasarkan hasil ini dibuat media produksi enzim dengan kondisi pH 7, temperatur inkubasi 27⁰C dan lama inkubasi 6 hari untuk menghasilkan enzim yang akan ditetapkan kondisi optimum aktivitas enzimatisnya. Sebagai pembanding enzim dari media produksi jerami, dipersiapkan pula enzim dari media produksi xilan (birchwood).

Tahap II adalah penentuan kondisi optimum enzim baik enzim dari media produksi jerami maupun enzim dari media produksi xilan. Parameter yang ditentukan meliputi pH, temperatur, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat. Metode yang digunakan adalah dengan mengukur gula hasil reaksi yang dikatalis dengan metode Somogyi Nelson, yaitu mereaksikan gula reduksi yang dihasilkan oleh reaksi enzimatis dengan ion Cu²⁺ dari pereaksi Nelson. Endapan Cu₂O merah bata yang terbentuk ditambah dengan reagen phosphomolibdat sehingga terbentuk larutan kompleks

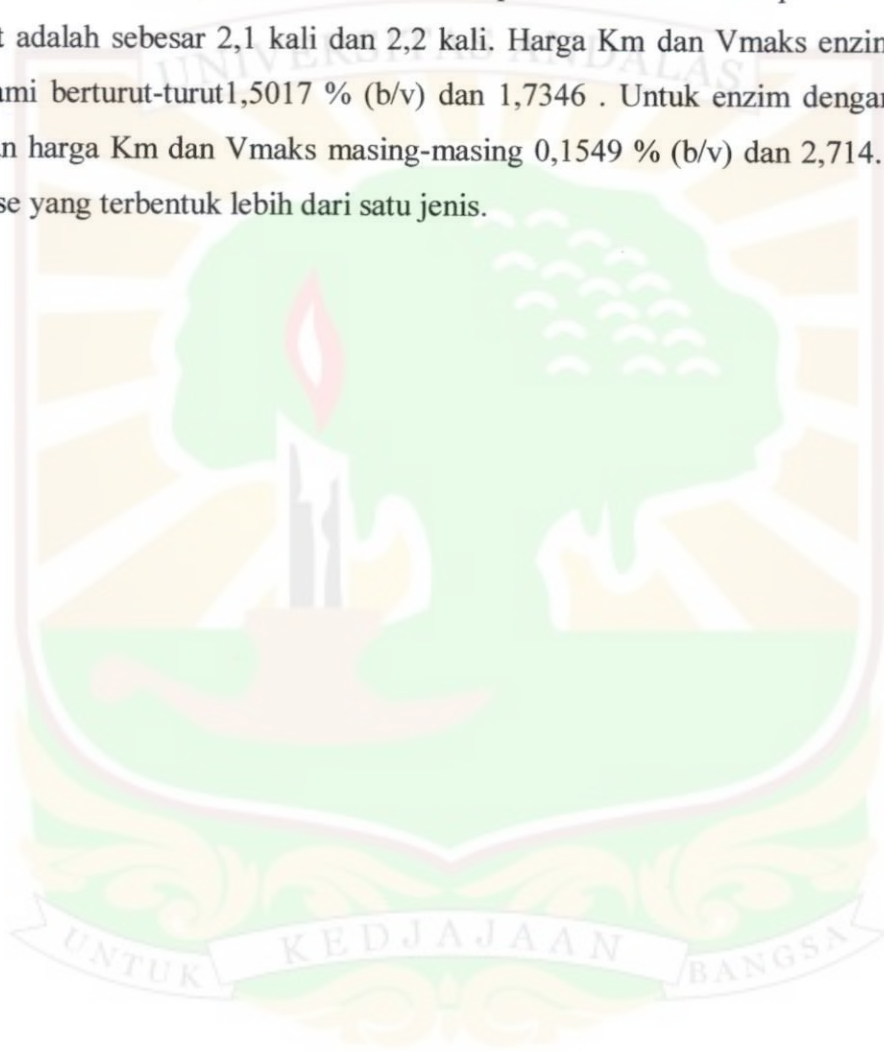
molibdenum berwarna biru. Larutan ini diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapat dihitung aktivitasnya.

Penentuan kondisi optimum dimulai dari pH optimum. pH optimum enzim yang didapat adalah pH 8,2 dengan aktivitas 0,573 U/mL untuk enzim dari media produksi jerami dan pH 8,0 dengan aktivitas 1,228 U/mL untuk enzim dari media produksi xilan. Pada penentuan temperatur optimum, enzim dari media produksi jerami mencapai optimum pada temperatur 45⁰C dengan aktivitas 0,682 U/mL. Sementara enzim dari media produksi xilan optimum pada temperatur 40⁰C dengan aktivitas 1,243 U/mL. Penentuan waktu inkubasi optimum menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum untuk enzim dengan kedua jenis media produksi tersebut adalah pada inkubasi selama 15 menit, dengan aktivitas masing-masing 1,077 U/mL dan 2,482 U/mL. Penentuan kondisi optimum terakhir adalah penentuan konsentrasi substrat optimum. Enzim dari media produksi jerami optimum pada konsentrasi substrat 3,5 % dengan aktivitas 1,285 U/mL, sedangkan konsentrasi substrat optimum untuk enzim dari media produksi xilan adalah 2,5 % dengan aktivitas 2,701 U/mL. Kemudian dilakukan penentuan konsentrasi protein enzim dengan metode Lowry. Konsentrasi protein enzim dari media produksi jerami adalah 1,740 mg/mL, sementara enzim dari media produksi xilan adalah 1,629 mg/mL.

Selain itu dilakukan pula uji kestabilan enzim terhadap pengaruh suhu dengan memanaskan enzim selama 10 menit pada berbagai suhu sebelum diuji aktivitas enzimatis xilanase. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa kedua enzim masih cukup stabil sampai suhu 80⁰C. Hal ini dibuktikan dengan nilai aktivitas yang tidak berubah secara signifikan pada pemanasan enzim dari temperatur 50⁰C sampai 80⁰C sedangkan dengan pemanasan pada 90⁰C dan 100⁰C aktivitas enzim mulai menurun. Selanjutnya dilakukan uji serapan selulase. Hasil uji aktivitas enzimatis selulase menunjukkan bahwa enzim dari media produksi jerami juga mengandung selulase dengan aktivitas 0,094 U/mL. Sedangkan enzim dari media produksi xilan tidak mengandung selulase, yang dibuktikan dengan tidak terbentuknya gula reduksi sebagai hasil hidrolisa CMC yang dikatalis enzim ini.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* dapat menghasilkan enzim xilanase. Kondisi optimum *B. amyloliquefaciens* menghasilkan enzim xilanase adalah pada pH 7, temperatur 27⁰C (suhu kamar) dan

waktu inkubasi 6 hari. Kondisi optimum enzim xilanase yang dihasilkan dalam melakukan reaksi enzimatik adalah pH 8,0 – 8,2, temperatur 40°C – 45°C , waktu inkubasi 15 menit dan konsentrasi substrat 3,5% untuk enzim dengan media produksi jerami, serta 2,5% untuk enzim dengan media produksi xilan. Aktivitas enzim media produksi jerami adalah 1,285 U/mL dengan aktivitas spesifik 0,738 U/mg. Sementara aktivitas enzim media produksi xilan adalah 2,701 U/mL, dengan aktivitas spesifik 1,658 U/mg . Dengan perhitungan dapat diketahui bahwa perbandingan nilai aktivitas dan aktivitas spesifik enzim dari media produksi xilan terhadap enzim dari media produksi jerami berturut-turut adalah sebesar 2,1 kali dan 2,2 kali. Harga K_m dan V_{maks} enzim media produksi jerami berturut-turut 1,5017 % (b/v) dan 1,7346 . Untuk enzim dengan media produksi xilan harga K_m dan V_{maks} masing-masing 0,1549 % (b/v) dan 2,714. Diduga enzim xilanase yang terbentuk lebih dari satu jenis.



SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa pernyataan dalam tesis saya yang berjudul :


**“PRODUKSI DAN PENENTUAN KONDISI OPTIMUM ENZIM
XILANASE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* FUKUMOTO
PADA SUBSTRAT XILAN JERAMI”**

adalah hasil kerja saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil kerja/karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan.

Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, 20 Juni 2008

Yang membuat pernyataan



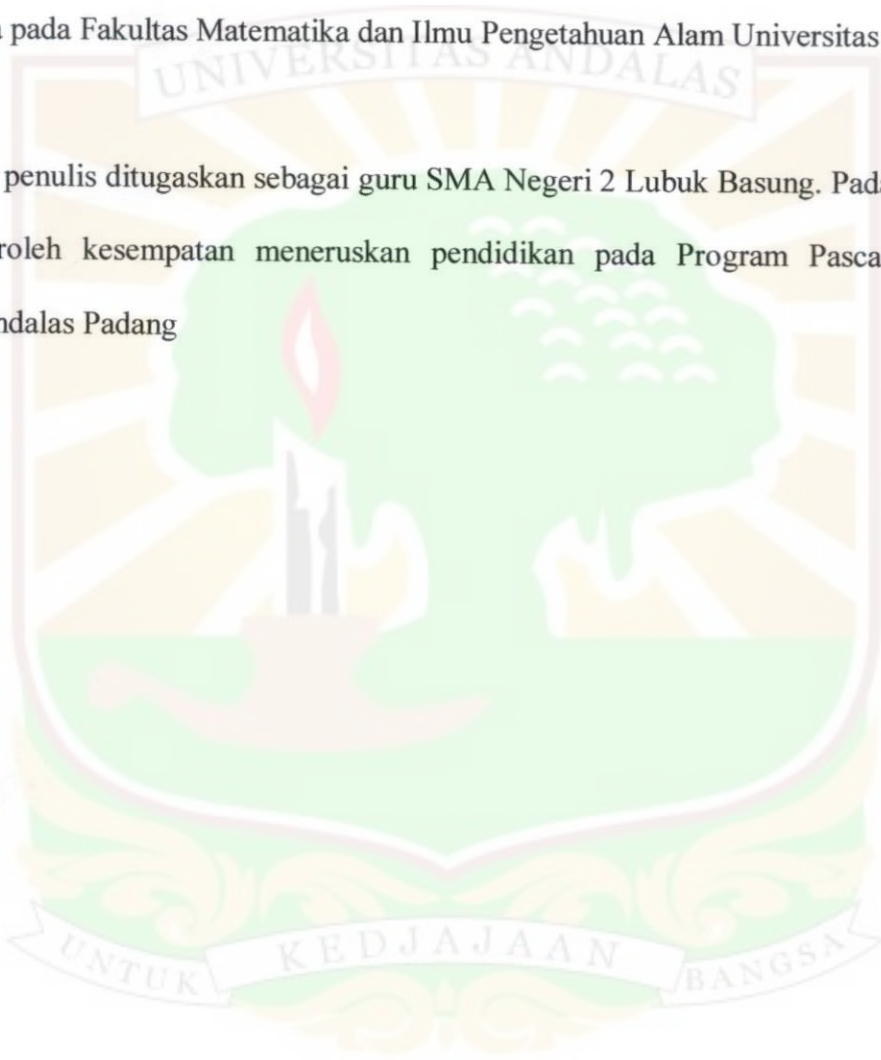
WIDIYANTI SEKATRESNA

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 21 Oktober 1964 di Bandung, sebagai anak pertama dari ayah Ir.Khairuddin Siman dan ibu Nursiam Nur, BA. Penulis menamatkan SD pada tahun 1977, SMP tahun 1981 dan SMA pada tahun 1984, serta Diploma III pada Akademi Kimia Analisis Bogor tahun 1987. Pada tahun 2003 penulis memperoleh gelar Sarjana Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang

Saat ini penulis ditugaskan sebagai guru SMA Negeri 2 Lubuk Basung. Pada tahun 2006 memperoleh kesempatan meneruskan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini didasarkan pada hasil penelitian yang berjudul “Produksi dan Penentuan Kondisi Optimum Enzim Xilanase *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto pada Substrat Xilan Jerami”

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Bapak Prof.Dr. Abdi Dharma sebagai ketua komisi pembimbing atas bimbingan, arahan dan saran selama penelitian dan penulisan tesis ini. Selanjutnya ucapan terima kasih penulis tujukan kepada Bapak Dr.phil.nat. Periadnadi sebagai anggota komisi pembimbing yang telah memberikan saran, masukan dan kritik , sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan moril selama menyelesaikan penelitian ini.

Akhirnya penulis berharap semoga hasil penelitian ini akan bermanfaat dan dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam menemukan mikroba yang efektif dalam menghasilkan enzim xilanase.

Padang, Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Reaksi Enzimatik.....	5
2.2. Enzim Xilanase.....	12
2.3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17
2.4. Jerami.....	17
III. BAHAN DAN METODE.....	19
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
3.2. Alat dan Bahan.....	19
3.3. Metode Penelitian.....	19
3.3.1. Optimasi Produksi Enzim oleh <i>Bacillus amyloliquefacies</i>	19
3.3.2. Produksi Enzim dan Uji Aktivitas Enzim.....	20
3.3.3. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Xilanase.....	21
3.4. Cara Kerja.....	21
3.4.1. Persiapan Substrat.....	21
3.4.2. Pembuatan Reagen.....	21
3.4.3. Pembuatan Suspensi Bakteri.....	23
3.4.4. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim.....	24
3.4.5. Produksi Enzim Xilanase.....	24
3.4.6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	24
3.4.7. Pembuatan Kurva Standar Protein.....	25
3.4.8. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Xilanase.....	26
3.4.9. Penentuan Kestabilan terhadap Pemanasan.....	28
3.4.10. Pengujian Serapan Selulase.....	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1. Kurva Standar.....	29
4.2. Produksi Enzim Xilanase.....	29
4.3. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Xilanase.....	32

4.3.1. Penentuan pH Optimum.....	32
4.3.2. Penentuan Temperatur Optimum.....	36
4.3.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	38
4.3.4. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.....	40
4.4. Nilai Km dan Vmaks.....	41
4.5. Uji Serapan Selulasa.....	43
4.6. Penentuan Kestabilan Enzim Terhadap Pemanasan.....	43
V. KESIMPULAN.....	45
5.1. Kesimpulan.....	45
5.2. Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	50



DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1	Beberapa mikroorganisme penghasil enzim xilanase..... 15
2	Kondisi awal produksi enzim xilanase..... 29
3	Data standar glukosa dengan pengukuran absorban pada panjang gelombang 540 nm 50
4	Data standar Bovin Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein dengan pengukuran absorban pada panjang gelombang 660 nm..... 51
5	Data aktivitas sampel pada penentuan kondisi optimum produksi enzim xilanase 52
6	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan pH optimum..... 53
7	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan temperatur optimum 54
8	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan waktu inkubasi optimum..... 55
9	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan konsentrasi substrat optimum..... 56
10	Data $1/S$ dan $1/V$ pada penentuan nilai K_m dan V_{maks} 57
11	Data Aktivitas enzim selulase pada uji serapan selulase..... 58
12	Data aktivitas enzim xilanase pada uji kestabilan terhadap pengaruh pemanasan..... 59

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1	Kurva reaksi tanpa katalis (a), dan reaksi dengan katalis..... 6
2	Kurva hubungan kecepatan reaksi dengan pH (a), dan hubungan kecepatan reaksi dengan temperatur (b)..... 10
3	Kurva pengaruh konsentrasi substrat..... 11
4	Kurva transformasi Lineweaver Burk..... 12
5	Struktur xilan..... 16
6	Kurva optimasi produksi enzim xilanase..... 30
7	Pembentukan endapan merah bata sampel setelah penambahan reagen Nelson 32
8	Pembentukan kompleks biru sampel setelah penambahan reagen phosphomolibdat..... 33
9	Kurva penentuan pH optimum enzim xilanase..... 34
10	Kurva penentuan temperatur optimum enzim xilanase..... 36
11	Kurva penentuan waktu inkubasi optimum enzim xilanase..... 38
12	Kurva penentuan konsentrasi substrat optimum..... 39
13	Kurva Lineweaver Burk enzim dari media produksi jerami..... 41
14	Kurva Lineweaver Burk enzim dari media produksi xilan..... 41
15	Kurva standar glukosa..... 50
16	Kurva standar protein..... 51

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1	Skema Kerja..... 49
2	Data standar glukosa dengan pengukuran absorban pada panjang gelombang 540 nm 50
3	Data standar Bovin Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein dengan pengukuran absorban pada panjang gelombang 660 nm..... 51
4	Data aktivitas sampel pada penentuan kondisi optimum produksi enzim xilanase 52
5	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan pH optimum..... 53
6	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan temperatur optimum 54
7	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan waktu inkubasi optimum..... 55
8	Data aktivitas enzim xilanase pada penentuan konsentrasi substrat optimum..... 56
9	Data $1/S$ dan $1/V$ pada penentuan nilai K_m dan V_{maks} 57
10	Data Aktivitas enzim selulase pada uji serapan selulase..... 58
11	Data aktivitas enzim xilanase pada uji kestabilan terhadap pengaruh pemanasan..... 59
11	Contoh perhitungan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim..... 60

I. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Kemajuan teknologi telah memberikan kesempatan kepada manusia untuk hidup dengan kualitas yang lebih baik. Namun selain memberikan manfaat, konsekwensi dari berbagai kegiatan industri tersebut juga berdampak negatif terhadap lingkungan. Oleh karena itu para ahli senantiasa berupaya mencari alternatif berupa bahan ramah lingkungan sebagai pengganti bahan-bahan kimia berbahaya. Salah satu alternatif tersebut adalah pemanfaatan enzim dalam berbagai proses industri.

Limbah pertanian yang dihasilkan selama kegiatan pertanian sebagian besar merupakan limbah lignoselulosa. Bahan lignoselulosa terdiri atas komponen utama yang meliputi hemiselulosa, selulosa dan lignin. Salah satu tipe hemiselulosa adalah xilan yang dapat menjadi substrat penghasil enzim xilanase. Limbah lignoselulosa yang tinggi potensinya di Indonesia antara lain jerami, ampas tapioka, sabut serta tandan kosong kelapa sawit dan bagas tebu (Richana, 2002). Jerami dengan komposisi hemiselulosa berkisar 26 % sampai 35 % (Weber *et al.*, 2000) berpeluang menjadi salah satu sumber xilan.

Berbagai mikroorganisme, meliputi bakteri, jamur dan ragi menghasilkan enzim pada proses metabolismenya, termasuk enzim xilanase. Enzim xilanase berperan dalam biokonversi lignoselulosa menjadi gula (Reis *et al.*, 2003). Seyiz dan Aksoz (2005) melaporkan, mikroorganisme yang telah dikenal sebagai penghasil xilanase antara lain *Trichoderma*, *Bacilus*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Schizophyllum*, *Aureobasidium*, *Talaromyces sp* dan sebagainya. Beberapa penelitian yang telah dilakukan antara lain, produksi xilanase dari *Aspergillus nidulans* dengan aktivitas 220 U/mL

(Reis *et al.*, 2003), xilanase dari *Bacillus sp* (VI-4) dengan aktivitas 49 U/mL (Yang *et al.*, 1995) dan xilanase dari *Trichoderma harzianum* 1073 D3 dengan aktivitas spesifik 26,5 U/mg protein (Seyis dan Azkoz 2005). Mikroorganismme lain yang juga dapat menghasilkan enzim adalah *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto. Anwarali Khan dan Husaini (2006) melaporkan, bakteri ini cukup efektif menghasilkan enzim α -amilase (aktivitas 14,19 U/mL) dan selulase (aktivitas 13,15 U/mL). Enzim xilanase dari *Bacillus amyloliquefaciens* dilaporkan merupakan enzim termostabil (Breccia *et al.*, 1998), namun belum ditemukan informasi yang menyatakan berapa besar aktivitas enzim xilanase dari *Bacillus amyloliquefaciens*. Untuk mengetahui sejauh mana *Bacillus amyloliquefaciens* dapat menghasilkan enzim xilanase maka dilakukanlah penelitian ini.

Dari berbagai laporan diketahui bahwa enzim xilanase telah dimanfaatkan secara luas dalam berbagai industri. Namun enzim ini relatif baru di Indonesia. Xilanase belum banyak dikenal oleh pengusaha dan pelaku industri. Pemanfaatan enzim xilanase antara lain untuk pemutihan kertas, pembuatan gula xilosa, campuran makanan ternak, produksi juice, ekstrak kopi, peningkatan kualitas roti dan sebagainya (Richana, 2002).

Menurut Trismillah *et al.*, (2005), proses produksi enzim menggunakan mikroorganismme sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, sehingga untuk memproduksi enzim yang maksimal harus dilakukan optimalisasi terhadap faktor-faktor yang berperan, antara lain media fermentasi, suhu, aerasi, agitasi, pH serta strain yang digunakan dalam fermentasi. Anwarali Khan dan Husaini (2006) menambahkan, dalam aplikasi suatu mikroorganismme pada proses skala industri, perlu dilakukan optimalisasi parameter proses. Enzim yang dihasilkan dari mikroorganisma yang berbeda akan memiliki karakter berbeda pula. Agar kerja enzim dalam suatu proses industri berlangsung optimal maka

harus digunakan enzim dengan kondisi optimum yang sesuai dengan proses industri tersebut.

1.2 Perumusan Masalah

Masalah yang hendak dipecahkan adalah :

1. Berapa kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* menghasilkan enzim xilanase pada substrat xilan jerami.
2. Bagaimanakah kondisi optimum (pH, temperatur, masa inkubasi dan konsentrasi substrat) dari enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat xilan jerami.
3. Bagaimanakah perbandingan aktivitas enzim dari media produksi xilan jerami dengan enzim dari media produksi xilan (*birchwood*)

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

1. Mengetahui kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* memproduksi enzim xilanase pada substrat xilan jerami.
2. Menentukan kondisi optimum enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat xilan jerami.
3. Membandingkan aktivitas enzim xilanase dari media produksi xilan jerami dengan enzim xilanase dari media produksi xilan murni.
4. Menentukan kondisi optimum aktifitas enzimatik xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* didalam substrat xilan jerami dan xilan *Birchwood*

1.4 Manfaat penelitian

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran mengenai kondisi optimum enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*, sehingga dapat memberikan sumbangan informasi bagi pihak yang ingin mengembangkan penelitian dan mengaplikasikan enzim xilanase.



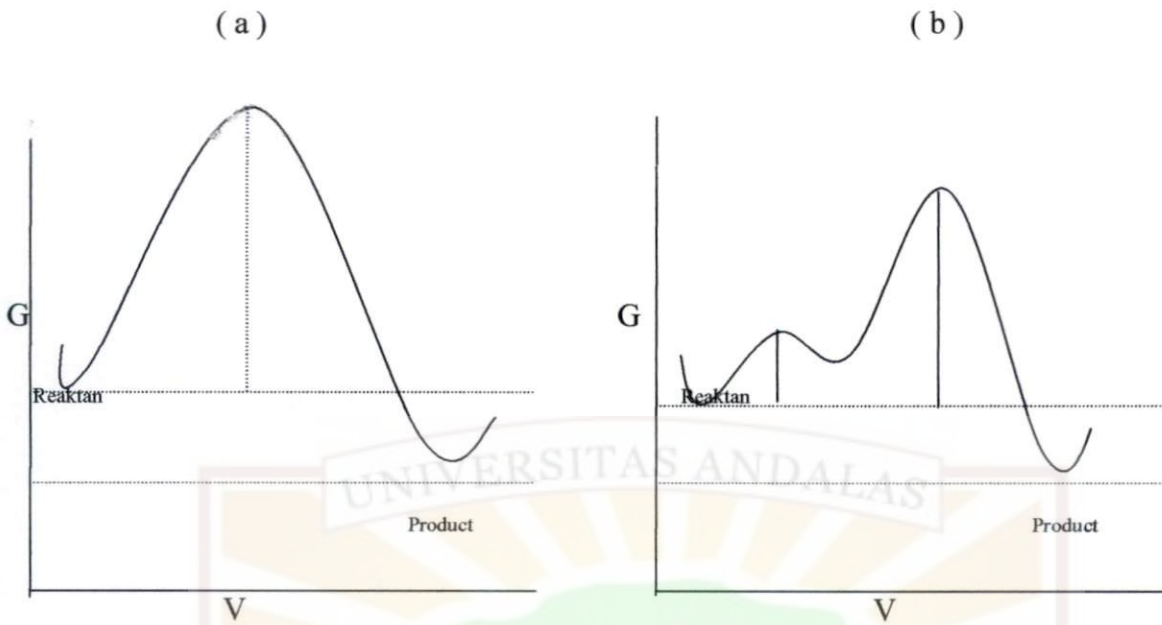
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Reaksi Enzimatis

Semua reaksi metabolik diatur oleh suatu protein yang disebut enzim. Enzim berfungsi mengkatalisis dan mempercepat suatu reaksi (Belk dan Borden, 1999). Pada proses yang dikatalisis oleh enzim, diakhir reaksi enzim akan dibebaskan ke dalam bentuk semula. Enzim bersifat spesifik, artinya hanya dapat bekerja pada substrat tertentu. Sebagai contoh, enzim tripsin mengkatalisis reaksi hidrolisa ikatan peptida dalam protein dan polipeptida. Dengan demikian polipeptida merupakan substrat yang tepat bagi tripsin. (Mathews *et al.*, 2000).

Enzim memiliki suatu permukaan yang mengandung suatu wilayah yang disebut pusat aktif. Umumnya pusat aktif enzim hanya terdiri dari 5 % total permukaan molekul enzim (Bohinski, 1987). Komponen enzim meliputi bagian yang terdiri dari protein yang disebut apoenzim dan komponen nonprotein yang disebut kofaktor. Ion-ion seperti ion besi, magnesium dan kalsium merupakan contoh kofaktor. Bila kofaktor terdiri dari molekul-molekul organik, maka disebut koenzim. Apoenzim dan kofaktor atau koenzim bergabung membentuk haloenzim yang merupakan kesatuan enzim yang aktif. Bila kofaktor dipisahkan maka apoenzim tidak akan berfungsi (Tortora *et al.*, 2004).

Pada reaksi biokimia, enzim mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Dalam hal ini enzim bergabung dengan reaktan sedemikian rupa sehingga dihasilkan keadaan transisi yang mempunyai energi bebas yang lebih rendah dari pada keadaan transisi pada reaksi tanpa enzim (Stryer, 1999). Gambar 1 memperlihatkan kurva reaksi dengan katalis maupun tanpa katalis.



Gambar 1 : Reaksi tanpa katalis (a), dan reaksi dengan katalis (b)

2.1.1. Mekanisme kerja enzim

Secara umum reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat dituliskan sebagai berikut :



Dimana : E = Enzim

S = Substrat

ES = kompleks enzim-substrat (keadaan transisi)

P = Produk

Enzim sebagai biokatalis bekerja melalui beberapa tahapan mekanisme, meliputi:

1. Terjadinya kontak antara permukaan substrat dengan permukaan molekul enzim yang disebut pusat aktif
2. Perbentukan senyawa intermediet yang bersifat sementara berupa kompleks yang disebut kompleks enzim-substrat

3. Molekul substrat ditransformasi melalui pengaturan kembali atom atom yang ada, pemutusan molekul-molekul substrat atau penggabungan dengan molekul substrat lain
4. Molekul-molekul substrat yang telah ditransformasi yaitu produk yang merupakan hasil reaksi dibebaskan dari molekul enzim karena produk yang terbentuk tidak lagi sesuai dengan pusat aktif enzim.
5. Enzim didapat kembali dan siap bereaksi dengan molekul substrat yang lain.

Tahapan paling menentukan pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim adalah pembentukan kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan keadaan transisi dengan energi aktivasi lebih rendah dibandingkan dengan reaksi tanpa enzim. Ada beberapa model interaksi enzim dan substrat dalam membentuk kompleks enzim-substrat, beberapa diantaranya adalah model kunci dan anak kunci, model kesesuaian terinduksi (*induced fit*) serta model analog keadaan transisi. Pada model kunci dan anak kunci, enzim akan mengikat substrat sebagaimana halnya sebuah kunci yang hanya cocok dengan satu anak kunci. Sedangkan pada model kesesuaian terinduksi, baik enzim maupun substrat harus saling menyesuaikan satu sama lain agar dapat membentuk suatu konfigurasi untuk menstabilkan keadaan transisi. Pada model analog keadaan transisi, daerah pusat aktif enzim tidak hanya mengenali substrat, tetapi juga menempatkan substrat sedemikian rupa sehingga mendorong ke arah terjadinya reaksi. Menurut model ini, saat substrat terikat membentuk kompleks enzim-substrat, didalam substrat sudah terjadi penegangan dan sebagian ikatan antar atom-atom sudah terputus (Boyer, 2002).

2.1.2.Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yang menentukan aktivitasnya. Faktor-faktor tersebut adalah pH, temperatur, konsentrasi substrat dan inhibitor (Tortora *et al.*, 2004).

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Setiap enzim memiliki kondisi pH optimum tertentu agar dapat beraktivitas secara optimal. Pada pH dibawah maupun diatas pH optimum kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan berkurang. Bila keasaman (pH) medium berubah secara drastis, struktur tiga dimensi protein pada enzim akan berubah dan akan menyebabkan terjadinya denaturasi. Hal ini disebabkan karena perubahan pH atau konsentrasi ion hidrogen berakibat langsung terhadap sifat gugus asam amino dan gugus karboksilat enzim. Berubahnya muatan gugus ini, menyebabkan protein enzim akan lebih rapuh atau terjadi pemutusan rantai sehingga enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya.

Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim

Kecepatan suatu reaksi kimia pada umumnya akan meningkat dengan bertambahnya temperatur. Molekul-molekul akan bergerak lebih cepat pada temperatur tinggi dibandingkan pada temperatur rendah. Aktifitas tertinggi suatu enzim pada reaksi enzimatik dicapai bila bekerja pada temperatur optimum. Kecepatan reaksi akan berkurang bila enzim bekerja pada temperatur dibawah maupun diatas temperatur optimum. Pada temperatur dibawah temperatur optimumnya, molekul enzim bergerak lebih lambat karena tidak memiliki energi yang cukup untuk berlangsungnya reaksi.

Sementara pada temperatur tinggi, berkurangnya kecepatan reaksi disebabkan karena terjadinya denaturasi. Denaturasi protein melibatkan putusnya ikatan hidrogen dan ikatan kovalen lainnya pada enzim yang dapat merubah struktur tiga dimensi protein. Perubahan ini mengakibatkan berubahnya susunan asam amino pada pusat aktif enzim sehingga enzim kehilangan kemampuan katalitiknya.

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

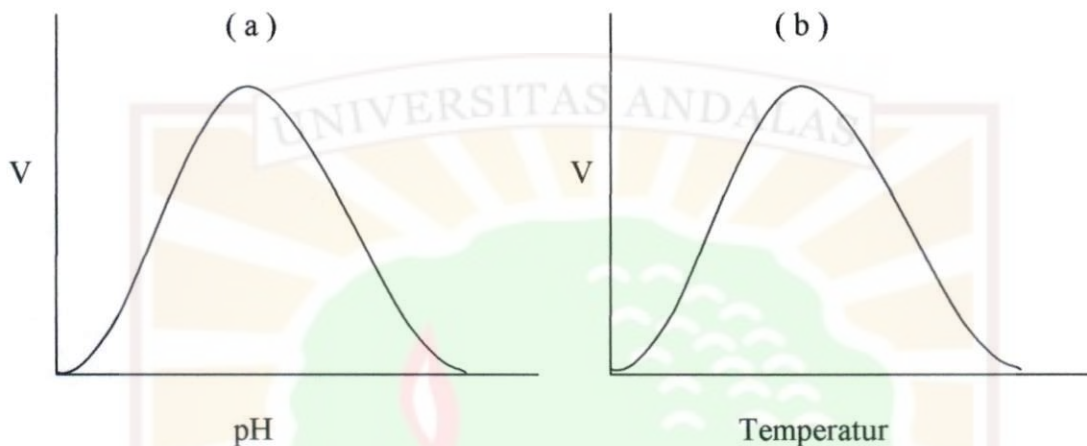
Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik. Pada kebanyakan enzim, kecepatan reaksi bertambah sejalan bertambahnya konsentrasi substrat. Hal ini berlangsung sampai penambahan konsentrasi substrat tidak lagi merubah kecepatan reaksi. Pada kondisi ini dikatakan enzim telah jenuh, karena semua pusat aktif enzim telah terisi oleh substrat. Dengan demikian kecepatan reaksinya mencapai maksimum.. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, kecepatan akan berkurang karena enzim sudah berada dalam keadaan jenuh dan adanya substrat dalam jumlah berlebih dapat menghambat kerja enzim. Sebaliknya pada konsentrasi substrat yang lebih rendah, jumlah substrat yang tersedia tidak memadai dengan jumlah enzim yang ada sehingga masih banyak pusat aktif enzim yang tidak terisi oleh substrat. Hal ini dapat mengakibatkan molekul-molekul enzim menjadi tidak aktif

Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim

Inhibitor adalah zat yang bersifat menghambat kerja enzim. Inhibitor diklasifikasikan sebagai kompetitif inhibitor dan nonkompetitif inhibitor. Pada inhibitor kompetitif, inhibitor mengisi pusat aktif enzim dan berkompetisi dengan substrat sehingga enzim

tidak dapat mengikat substrat. Pada kasus ini dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Sedangkan pada inhibitor nonkompetitif, inhibitor berikatan pada bagian lain selain pusat aktif enzim sehingga struktur enzim berubah dan kecepatan reaksi berkurang.

Gambar 2 menunjukkan perubahan kecepatan reaksi terhadap fungsi pH dan temperatur.



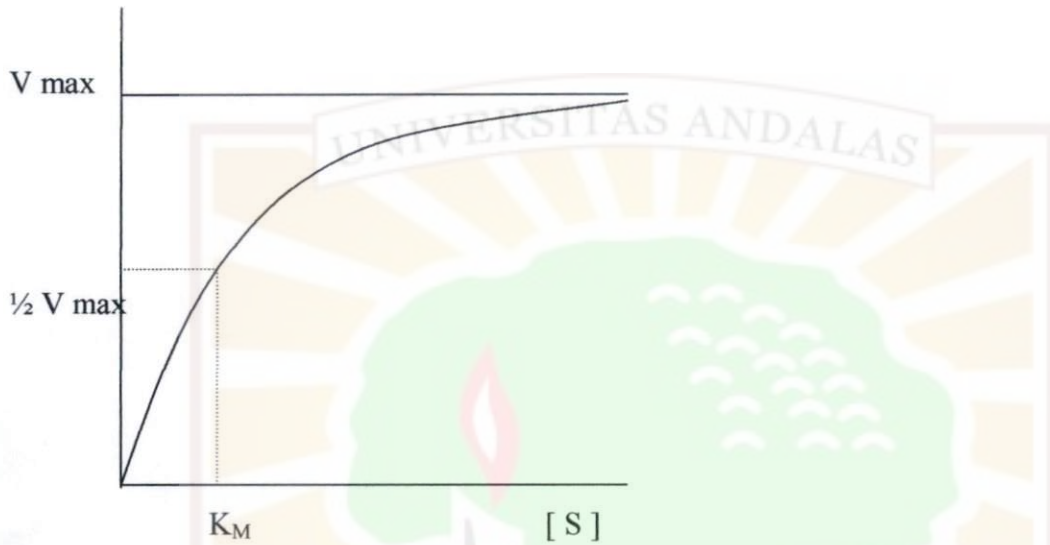
Gambar 2. Kurva hubungan kecepatan reaksi dengan pH (a), dan kurva hubungan kecepatan reaksi dengan temperatur (b)

2.1.3. Konstanta Michaelis-Menten

Mathews (2000) menyatakan bahwa kinetika reaksi enzim dapat dijelaskan melalui model Michaelis-Menten, yang menunjukkan hubungan antara kecepatan reaksi dengan konsentrasi substrat. Michaelis-Menten mengemukakan suatu tetapan yang disebut Konstanta Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M dapat dihitung dengan menentukan harga aktivitas enzim melalui percobaan pada berbagai konsentrasi substrat. Persamaan Michaelis-Menten untuk reaksi enzimatik terdapat pada halaman berikut.

$$V_o = \frac{V_{maks}}{[S]} + \frac{[S]}{K_M}$$

Gambar 3 berikut menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi.



Gambar 3. Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Kecepatan Reaksi Enzimatis

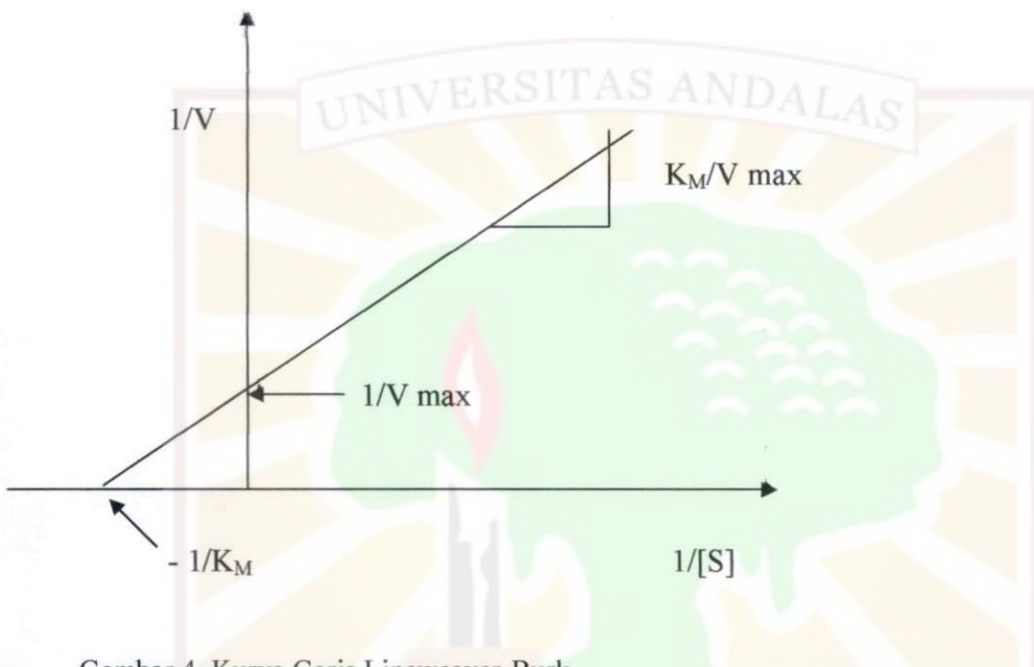
K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan kecepatan reaksi sama dengan setengah dari kecepatan maksimumnya.

Lebih lanjut, menurut Mathews (2000), Lineweaver dan Burk telah melakukan transformasi terhadap persamaan Michaelis-Menten yang berbentuk parabola menjadi bentuk yang lebih sederhana. Persamaan tersebut adalah :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Hasil plot $1/V_0$ sebagai y terhadap $1/[S]$ sebagai x menghasilkan grafik berbentuk garis lurus yang memenuhi persamaan garis $y = mx + b$, dengan kemiringan (slope) m yang merupakan nilai K_M/V_{maks} (Stryer, 1999).

Gambar 4 menunjukkan hasil transformasi oleh Lineweaver-Burk.



Gambar 4. Kurva Garis Lineweaver-Burk

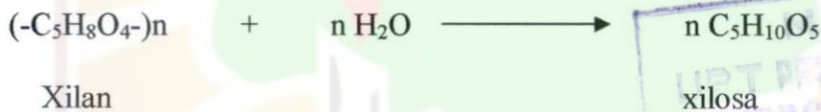
Dengan demikian nilai K_M dan V_{maks} dapat ditentukan. Nilai K_M dan V_{maks} berkaitan erat dengan aktifitas suatu enzim.

2.2. Enzim Xilanase

Reis *et al.* (2003) menuliskan, xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini xilan (polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida) menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Hemiselulosa umumnya terdapat dalam dinding sel tumbuh-tumbuhan dan merupakan suatu polisakarida.

Sementara menurut Coultate (2001) tiga tipe hemiselulosa yang dikenal adalah xilan, manan/glukomanan dan galaktan/arabinogalaktan. Dalam hal ini xilan merupakan komponen utama hemiselulosa.

Menurut Richana (2002) berdasarkan substrat yang dihidrolisis, xilanase diklasifikasikan menjadi β -xilosidase, eksoxilase dan endoxilase. β -xilosidase merupakan xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksoxilase memiliki kemampuan untuk memutus rantai polimer xilosa (xilan), menghasilkan xilosa. Sedangkan endoxilase mampu memutus ikatan β -1,4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur menjadi xilosa. Xilan dengan aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh mikroorganismen akan terhidrolisis menjadi xilosa menurut reaksi :



Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000 – 30.000 dalton, aktif pada suhu 55⁰C dengan pH 9. Pada suhu 60⁰C dan pH normal, xilanase lebih stabil

Xilan sebagai substrat untuk produksi xilanase banyak terdapat dalam berbagai sampah pertanian yang mengandung hemiselulosa dan merupakan sumber yang potensial dan penting bagi biokonversi lignoselulosa menjadi produk-produk yang bermanfaat seperti xilose, bahan bakar, pelarut, dan sebagainya (Jeffries, 1996). Pemanfaatan bahan-bahan buangan ini akan meminimalkan sampah yang akan dibuang, sehingga biaya pengolahan limbah berkurang dan pencemaran lingkungan dapat ditekan.

Aplikasi enzim xilanase dalam industri kertas cukup berkembang, seperti yang dilaporkan Yang *et al.* (1995), bahwa berbagai studi terus dilakukan untuk mendapatkan enzim xilanase yang sesuai dengan kondisi proses. Proses pulping pada industri kertas berlangsung pada kondisi sangat alkalis, sehingga penelitian lebih diarahkan pada pencarian xilanase yang stabil pada kondisi alkalis. Pada industri ini xilanase digunakan dalam proses *bleaching* (pemutihan). Dalam Dyadic (2005) dilaporkan, lignin merupakan komponen utama didalam pulp yang mengandung gugus kromofor, yaitu gugus penyebab warna yang dapat mengurangi tingkat keputihan kertas pada produk akhir. Fungsi xilanase pada proses ini untuk memutuskan ikatan antara hemiselulosa dan lignin, sehingga efektifitas *bleaching* meningkat. Penggunaan xilanase untuk delignifikasi atau penarikan lignin dari pulp dikenal sebagai *biobleaching*.

Pada kebanyakan industri pulp dan kertas, proses *bleaching* menggunakan senyawa kimia yang mengandung klorin. Penggunaan air dalam jumlah besar untuk membilas zat kimia atau senyawa yang tidak diinginkan dari pulp menyebabkan air limbah tercemari zat kimia berbahaya termasuk dioksin. Meskipun konsentrasi dioksin sangat kecil dalam air limbah, tetapi pabrik terus beroperasi menghasilkan dioksin sehingga konsentrasinya didalam air akan terus bertambah. Hal ini dapat membahayakan bagi hewan air dan mahluk hidup disekitarnya karena dioksin akan masuk kedalam rantai makanan. Dengan demikian aplikasi enzim xilanase, selain mengurangi biaya operasi juga memberikan solusi terhadap masalah lingkungan. (Rini, 2002)

Berbagai mikroorganisma seperti bakteri, ragi dan jamur dapat menghasilkan xilanase. Enzim xilanase yang dihasilkan dari berbagai mikroorganisma akan memiliki karakter yang berbeda, terutama terkait suhu dan pH optimal. Enzim xilanase pada proses

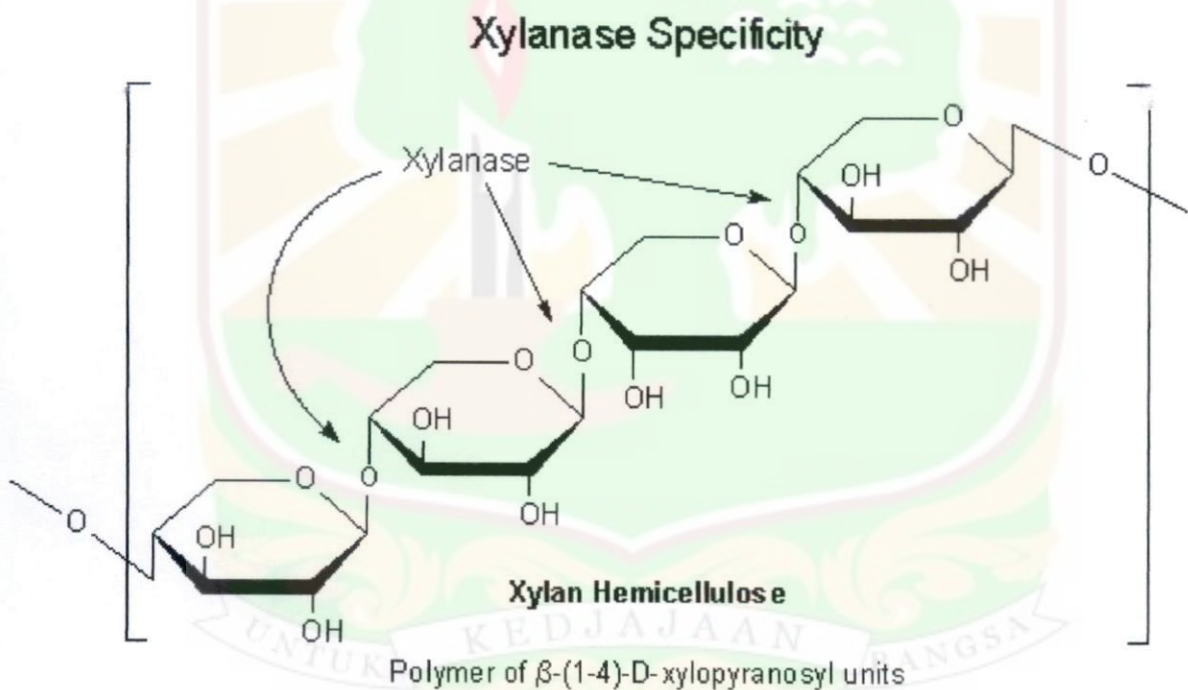
bleaching mempunyai suhu optimum 50-60⁰C dan pH alkalis, karena proses bleaching beroperasi pada suhu dan pH tersebut (Yang et al., 1995). Beberapa mikroorganisma yang telah dikenal dapat menghasilkan enzim xilanase tertera pada tabel 1.

Tabel 1. Beberapa mikroorganisme penghasil enzim xilanase

Mikroorganisme	Suhu tumbuh(⁰ C)	Suhu optimum	pH	Berat Molekul (kDalton)
Jamur				
<i>Aspergillus sp.</i>	24-30	45 - 60	4,5 - 6	22,0 - 46,5
<i>Aerobasidium sp.</i>	28	45 - 54	4,5 - 4,8	20,0 - 25,0
<i>Bipolaris sorokinana</i>	28	70	5,5	30,0
<i>Criptococus flavus</i>	20	55	4,5	25,0
<i>Fusarium oxysporium</i>	26	50	5,0	80,0
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	22	80	4,0	39,0
<i>Humicola grisea</i>	40	70	5,5	25,5
<i>Myrothecium verrucaria</i>	30	45	5,5	15,9
<i>Neurospora crassa</i>	28	50	4,8	33,0
<i>Penicillium sp.</i>	25	40	6,0	35,0
<i>Trichoderma sp.</i>	25- 30	50-60	3,5 - 6,5	1,8 - 32
Bakteri				
<i>Aeromonas sp.</i>	30	30 - 35	5,0 - 7,0	22,0 - 58,0
<i>Bacillus sp</i>	37 - 50	50 - 70	6,0 - 10,0	16,0 - 43,0
<i>Clostridium</i>	37 - 65	50 - 75	5,5 - 7,0	29,0 - 72,0
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	37	39	7,0	53,7
<i>Streptomyces sp</i>	36 - 50	50 - 72	4,5 - 8,0	21,0 - 50,0
<i>Thermoa naerobacterium</i>	60	80	6,2	24,0 - 35,0
<i>Thermomonospora curvata</i>	55	75	6,8 - 7,8	15,0 - 36,0
<i>Thermotoga sp.</i>	77 - 80	80 - 105	5,4 - 6,2	40,0 - 120,0

Usaha untuk mendapatkan enzim dengan kondisi tertentu, sebelum bioteknologi ditemukan, dilakukan melalui pencarian terhadap organisme maupun enzim baru. Saat ini dengan bioteknologi, memungkinkan dilakukannya rekombinan DNA yang menghasilkan kloning enzim dari mikroorganisme yang ada, atau dari mikroorganisme yang sukar untuk dikulturkan. Enzim hasil rekayasa genetika ini dapat dimodifikasi terhadap suhu, pH dan kestabilan yang diinginkan yang disesuaikan dengan teknik yang sudah ada pada sebuah industri. Hal ini merupakan penghematan biaya produksi (Kenealy dan Jeffris, 2003).

Gambar 5 berikut adalah struktur xilan disertai dengan posisi enzim xilanase saat mendegradasi ikatan yang terdapat pada molekul-molekul xilan (SigmaAldrig, 2007)



Gambar 5. Struktur Xilan

2.3. *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto

Bacillus amyloliquefaciens ditemukan pertama kali oleh peneliti Jepang, Fukumoto pada tahun 1943. Mikroorganisme ini merupakan bakteri Gram positif, bersifat aerobik, dan banyak terdapat dalam tanah. Seperti halnya anggota famili *Bacillaceae* yang lain, *Bacillus amyloliquefaciens* dapat membentuk endospora yang kokoh yang berguna saat keadaan tidak menguntungkan dan dapat berdispersi kedalam debu, yang kemudian masuk melalui suplai air kedalam tumbuh-tumbuhan dan hewan.

Bacillus amyloliquefaciens dikenal karena sifat kataboliknya dan kemampuannya untuk mendegradasi makromolekul yang kompleks, seperti degradasi pada protein secara ekstraseluler. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh *B. amyloliquefaciens* adalah subtilin, yaitu enzim yang mengkatalisis pemecahan protein menjadi tripsin. Enzim ini telah digunakan dalam detergen dan pembersih lensa kontak. *B. amyloliquefaciens* juga merupakan spesies yang telah dimanfaatkan untuk enzim restriksi *BamHI* (Sather, 1998).

2.4. Jerami

Jerami merupakan salah satu limbah pertanian yang berasal dari tanaman padi. Pada umumnya penanganan terhadap jerami padi paska panen baru sebatas membakar jerami setelah kering yang pada prinsipnya juga sebagai penyediaan sumber karbon bagi lahan yang akan ditanami kembali. Selain itu sebagian masyarakat peternak sapi juga memanfaatkan jerami padi segar sebagai makanan ternak. Weber *et al.* (2000) menyatakan jerami merupakan substrat utama penghasil gas metana pada sawah yang berair. Meningkatnya emisi metana akan meningkatkan efek rumah kaca yang dapat

memicu terhadap pemanasan global pada atmosfer. Masih menurut Weber *et al.* (2000), komponen utama jerami meliputi hemiselulosa (26 % - 35 %), selulosa (38 % - 41 %), lignin (15%) serta polisakarida yang larut dalam air (8 %). Dengan bantuan mikroorganisme, polimer-polimer ini dapat didegradasi.



III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan tempat penelitian.

Penelitian dimulai pada awal bulan Agustus 2007 di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Andalas Padang.

3.2. Alat dan Bahan.

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer, cawan petri, gelas piala, dan alat-alat gelas lainnya, magnetic stirrer, hotplate, jarum ose, autoklaf, lampu spiritus, timbangan analitik, inkubator (Max Q 4000), spektrofotometer (Genesys 20), pHmeter (pHep Family) dan vorteks. .

Bahan-bahan yang digunakan adalah biakan murni *Bacillus amyloliquefaciens* (dari laboratorium Teknologi Industri Pakan Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang), jerami, xilan murni (birchwood) medium Nutrien Agar (NA), larutan BSA (Bovine Serum Albumin), glukosa, buffer phosphat, alkohol, aquades, NaOH, reagen Nelson, phosphomolibdat dan reagen Lowry.

3.3. Metode Penelitian.

Penelitian dibagi atas 3 tahap penelitian :

3.3.1. Optimasi Produksi Enzim oleh *Bacillus amyloliquefaciens*

Tahap ini dilakukan dengan metode eksperimen dalam rancang acak lengkap faktorial dengan 2 faktor.

Faktor A. pH :

1. pH 7
2. pH 8
3. pH 9

Faktor B. Temperatur

1. Temperatur kamar (27°C)
2. Temperatur 40°C

Kombinasi perlakuan :

A_1B_1 A_2B_1 A_3B_1 A_1B_2 A_2B_2 dan A_3B_2

Variasi waktu inkubasi :

Variasi waktu inkubasi meliputi 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 hari.

3.3.2. Produksi Enzim dan Uji Aktivitas Enzim Xilanase

Produksi enzim dilakukan dengan mempersiapkan dua media produksi (fermentasi) dengan substrat masing-masing xilan jerami dan xilan murni (birchwood). Kondisi produksi diatur berdasarkan kondisi optimum produksi enzim dari hasil optimasi produksi pada tahap 1.

3.3.3. Penentuan Kondisi Optimum Enzim xilanase

Kondisi optimum enzim xilanase meliputi pH, temperatur, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat optimum. Uji aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan langkah-langkah yang meliputi :

1. Persiapan campuran reaksi yang terdiri dari buffer fosfat dan substrat.

2. Ke dalam campuran reaksi dimasukkan enzim. Lama reaksi diukur mulai saat enzim di masukkan.
3. Inkubasi dilakukan selama selama 30 menit.
4. Enzim diinaktifkan dengan pemanasan.

Aktivitas enzimatik xilanase ditentukan dengan mengukur jumlah (mol) gula reduksi yang terbentuk sebagai hasil reaksi hidrolisa enzimatik substrat xilan dengan metode Somogyi Nelson. Reaksi gula reduksi yang terbentuk dengan pereaksi Nelson menghasilkan senyawa berwarna dan ditentukan konsentrasinya dengan mengukur absorban sampel dengan alat Spektrofotometer.

3.4. Cara Kerja.

3.4.1. Persiapan Substrat

Sebagai bahan dasar substrat fermentasi digunakan jerami. Jerami yang telah dikumpulkan dikeringkan dan dipotong-potong sampai ukuran 10 mm. Pengeringan dilanjutkan sampai temperatur 121°C selama 1 jam dalam oven. Ditambahkan larutan etanol 96% dan diblender ± 2 menit. Kemudian dibiarkan selama 12 jam. Selanjutnya akan didapat endapan yang merupakan xilan kasar.

3.4.2. Pembuatan Reagen.

3.4.2.1. Reagen Somogyi-Nelson :

Larutan Nelson A:

Nelson A dibuat dengan mencampur 2,5 g Na_2CO_3 ; 2,5 g NaHCO_3 2 g Na-K-tartrat; 20 g Na_2SO_4 dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Larutan Nelson B :

Nelson B dibuat dengan melarutkan 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 mL akuades, kemudian tambahkan 1 tetes H_2SO_4 pekat.

Reagen Nelson yang digunakan adalah campuran 25 volume larutan Nelson A dan 1 volume larutan Nelson B (dibuat segar).

3.4.2.2. Reagen Phosphomolibdat.

Dibuat dengan melarutkan 7 g asam molibdat dalam 1 g Na tungstat dalam 70 mL NaOH 5 % dan dididihkan selama kira-kira 5 menit untuk menghilangkan amoniak. Kemudian didinginkan dan ditambahkan 25 mL asam fosfat 85 %. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga volume 100 mL.

3.4.2.3. Reagen Lowry.

- Reagen Lowry A dibuat dengan melarutkan 2 g Na_2CO_3 dalam 0,1 N NaOH sampai volume 100 mL
- Reagen Lowry B dibuat dengan mencampur larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (b/v) dengan Na-Ktartarat 1% (b/v) dengan perbandingan 1 : 1 .
- Reagen C dibuat dengan mencampur 50 mL reagen A dan 1 mL reagen B dalam keadaan segar.

Reagen D adalah reagen Folin ciocalteu 2 N yang diencerkan dengan akuades sampai konsentrasi menjadi 1N.

3.4.2.4. Larutan standar BSA (Bovin Serum Albumin).

Larutan standar BSA dibuat dengan melarutkan 1 g BSA dalam 1000 mL akuades yang merupakan larutan induk. Kemudian dibuat variasi konsentrasi menjadi 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 dan 600 mg/mL.

3.4.2.5. Larutan NaOH (1 mol/L)

Larutan NaOH 1 mol/L dibuat dengan cara melarutkan 4 g NaOH dalam 100 mL akuades.

3.4.2.6. Buffer fosfat

Larutan Buffer fosfat dibuat dengan mencampur larutan A yang berupa 0,05 M KH_2PO_4 (6,8 g/L akuades) dan larutan B yang berupa 0,05 M K_2HPO_4 (8,7 g/L akuades) dengan perbandingan 1 : 1

3.4.2.7. Larutan Standar Glukosa.

Larutan induk glukosa 1000 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan melarutkan 1 g glukosa dalam 1000 mL akuades. Selanjutnya divariasikan konsentrasi menjadi : 0 ; 10; 20 ; 30 ; 40; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 dan 100 $\mu\text{g/mL}$

3.4.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Untuk starter digunakan bakteri yang berumur 6 hari pada media miring NA. Ditambahkan masing-masing 5 mL akuades kedalam media miring tersebut. Koloni bakteri dilepaskan dengan bantuan jarum ose, sehingga terbentuk suspensi bakteri.

3.4.4. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim

Kondisi optimum produksi enzim ditentukan dengan mempersiapkan 6 buah Erlenmeyer untuk 6 buah sampel sesuai kombinasi pH (A₁, A₂ dan A₃ masing-masing untuk pH 7, 8 dan 9) dan temperatur (B₁ dan B₂ untuk temperatur kamar dan 40⁰C). Kedalam sebuah gelas piala dimasukkan 12 g xilan kasar (substrat xilan jerami), 6 g urea sebagai sumber nitrogen serta suspensi bakteri yang sudah dihomogenkan. Selanjutnya ditambah akuades sampai volume 600 mL. Kemudian dibagikan kedalam 6 buah Erlenmeyer dengan kombinasi A₁B₁, A₂B₁, A₃B₁, A₁B₂, A₂B₂ dan A₃B₂. pH diatur dengan menambahkan larutan NaOH.

Masing-masing sampel dicuplik pada hari ke 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 pada jam yang sama. Masing-masing cuplikan diuji aktivitas enzimatik xilanase. Dari data yang didapat, dibuat kurva untuk mengetahui kondisi optimum bagi *Bacillus amyloliquefaciens* dalam menghasilkan enzim xilanase.

3.4.5. Produksi Enzim Xilanase

Sampel enzim dengan kondisi produksi optimum diperbanyak dengan cara melarutkan 2 g substrat xilan jerami, 1 g urea sebagai sumber nitrogen dalam akuades 100 mL. Kedalam campuran tersebut ditambahkan 1 mL suspensi bakteri. pH, temperatur dan waktu inkubasi diatur sesuai kondisi optimum produksi enzim dari optimasi sebelumnya.

3.4.6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dengan variasi konsentrasi 0 ; 10; 20 ; 30 ; 40; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 dan 100 µg/mL diperlakukan dengan metoda Somogyi-Nelson. Sebanyak 1 mL

masing-masing larutan standar ditambah 1 mL reagen Nelson. Kemudian diletakkan sampel larutan standar dalam waterbath yang berisi air yang telah dididihkan sebelumnya selama 20 menit. Selanjutnya didinginkan dengan segera dalam wadah berisi air dingin sampai suhu 26°C . Setelah penambahan 1 mL reagen phosphomolibdat dan divorteks, cukupkan volume larutan menjadi 10 mL dengan penambahan akuades. Dibiarkan larutan sampel selama 30 menit untuk menyempurnakan reaksi. Absorban masing-masing larutan standar diukur dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Absorban dialurkan terhadap konsentrasi masing-masing larutan standar untuk membuat kurva standar glukosa.

3.4.7. Pembuatan Kurva Standar Protein.

Kurva standar protein dibuat dengan jalan mempersiapkan sederetan larutan standar dengan konsentrasi 0, 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan induk BSA 1000 $\mu\text{g/mL}$

Masing-masing larutan standar dipipet sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL reagen Lowry, dikocok dan dibiarkan dengan suhu yang sesuai dengan suhu saat inkubasi selama 20 menit. Selanjutnya kedalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Ciocalteu (reagen D) dan segera dikocok, didiamkan campuran pada suhu yang sama dengan sebelumnya selama 30 menit, lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang serapan maksimum standar BSA, yaitu 660 nm. Sebagai blanko, larutan BSA diganti dengan akuades. Selanjutnya dibuat kurva standar protein dengan mengalurkan absorban hasil pengukuran terhadap konsentrasi masing-masing larutan standar.

Untuk menentukan kadar protein enzim, larutan standar protein diganti dengan enzim baik enzim hasil fermentasi dari substrat xilan jerami maupun xilan murni, yang diperlakukan sama dengan perlakuan terhadap larutan standar. Dengan memasukkan pada persamaan regresi yang dihasilkan kadar protein enzim dapat ditentukan.

3.4.8. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Xilanase

3.4.8.1 Penentuan pH Optimum.

Pada sederetan tabung reaksi diisi 1 mL substrat (xilan murni) 2% dan 1 mL buffer fosfat dengan variasi pH 7,2 – 8,6. Selanjutnya tambahkan 1 mL enzim dan inkubasi dilakukan pada suhu 35⁰C selama 30 menit. Selanjutnya enzim diinaktifkan dengan mencelupkan pada air mendidih selama 20 menit. Tahap berikutnya 1 mL reagen Nelson ditambahkan pada masing-masing tabung dan dipanaskan selama 20 menit, kemudian didinginkan dengan segera pada gelas piala yang berisi air dingin hingga suhu 26⁰C. Larutan 1 mL phosphomolibdat ditambahkan dan dikocok hingga sempurna. Volume dicukupkan sampai 10 mL dengan menambah akuades dan selanjutnya didiamkan selama 30 menit untuk menyempurnakan reaksi. Absorban masing-masing larutan diukur pada panjang gelombang serapan maksimum yaitu 540 nm, pH optimum aktifitas enzim ditentukan berdasarkan hasil yang didapat setelah mengkalurkan aktivitas enzim xilanase terhadap nilai pH.

3.4.8.2 Penentuan Suhu Optimum.

Untuk penentuan suhu optimum dilakukan pada suhu inkubasi yang bervariasi dengan menggunakan buffer pH optimum. Kedalam sederetan tabung reaksi ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH optimum, 1 mL substrat (xilan murni) 2% dan 1 mL enzim. Larutan diinkubasi dengan variasi suhu inkubasi 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 dan 55⁰C selama 30 menit. Kemudian enzim diinaktifkan dengan mencelupkan pada air mendidih selama 20 menit. Untuk perlakuan selanjutnya sama dengan prosedur penentuan pH optimum.

3.4.8.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Untuk penentuan waktu inkubasi optimum, 1 mL enzim ditambah 1 mL buffer fosfat pH optimum dan 1 mL substrat (xilan murni) 2%. Larutan diinkubasi pada suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi 5, 10, 15, 20; 25; 30;40; 45 dan 50 menit. Enzim diinaktifkan dengan mencelupkan pada air mendidih selama 20 menit. Untuk perlakuan selanjutnya sama dengan prosedur penentuan pH optimum.

3.4.8.4 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.

Penentuan konsentrasi substrat optimum dilakukan dengan menggunakan 1 mL enzim ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH optimum dan variasi konsentrasi substrat 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 dan 4,0 %. Inkubasikan sampel pada suhu optimum dan waktu inkubasi optimum. Kemudian enzim diinaktifkan dengan mencelupkan pada air mendidih selama 20 menit. Untuk perlakuan selanjutnya sama dengan prosedur penentuan pH optimum.

3.4.9. Penentuan Kestabilan terhadap Pengaruh Pemanasan

Penentuan stabilitas enzim terhadap pengaruh temperatur dilakukan dengan cara memanaskan enzim pada variasi suhu 50, 60, 70, 80, 90 dan 100^oC selama 10 menit.

Kemudian aktivitas enzimatik xilanase ditentukan sesuai metode pada 3.3.2

3.4.10. Pengujian Serapan Selulase

Produser pengujian serapan selulase sama dengan produser penentuan kondisi optimum konsentrasi substrat. Dalam hal ini untuk uji selulase digunakan substrat CMC dengan variasi konsentrasi 1,5 ; 2 ; 2,5 dan 3 %.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Standar

4.1.1. Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan mempersiapkan larutan standar glukosa dengan metode Somogyi Nelson dan mengukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 540 nm. Dengan menggunakan kurva standar ini dapat ditentukan kadar gula pereduksi yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik. Data hasil pengukuran absorbansi larutan standar glukosa serta kurva standar glukosa terdapat pada lampiran 2.

4.1.2. Kurva Standar Protein Enzim

Kurva standar protein enzim dibuat dengan mengukur absorbansi larutan standar Bovin Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein dengan metode Lowry pada panjang gelombang 660 nm. Dengan menggunakan kurva standar ini dapat ditentukan kadar protein enzim yang digunakan dalam reaksi enzimatik. Data hasil pengukuran absorbansi larutan standar protein serta kurva standar protein terdapat pada lampiran 3.

4.2. Produksi Enzim

4.2.1. Kondisi Awal Produksi

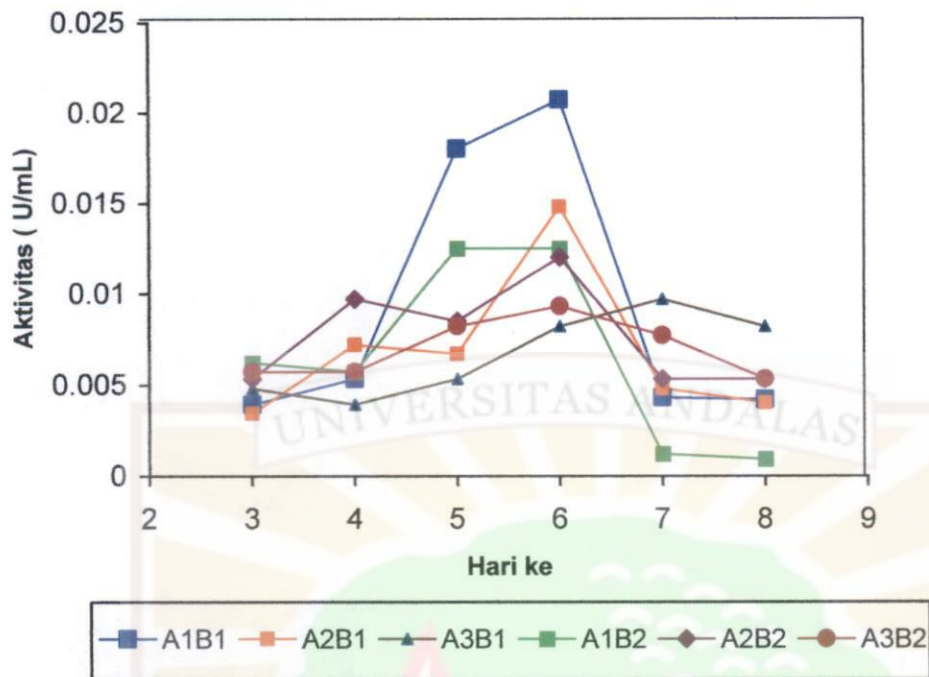
Produksi enzim diawali dengan menetapkan kondisi awal produksi (fermentasi) dengan parameter meliputi populasi bakteri awal, konsentrasi substrat (substrat sebagai sumber karbon), urea sebagai sumber nitrogen, pH, temperatur dan kondisi fermentasi yang merupakan kultur diam. Kondisi awal produksi terdapat pada tabel 2.

Tabel 2. Kondisi awal produksi enzim xilanase

Parameter (perlakuan)	Kondisi
Populasi awal bakteri	615×10^9 cfu/mL
Substrat Xilan Jerami (sumber karbon)	2 % (b/v)
Urea (sumber nitrogen)	1 % (b/v)
pH	8,4
Temperatur	27 ⁰ C
Kondisi Fermentasi	Kultur diam

4.2.2. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim Xilanase

Kondisi optimum yang dibutuhkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dalam menghasilkan enzim xilanase dari substrat xilan jerami ditentukan dengan cara membagi sampel yang dipersiapkan dengan kondisi awal pada pengerjaan sebelumnya menjadi 6 sampel dengan kondisi berbeda. Sampel-sampel tersebut dipersiapkan dengan mengkombinasikan pH dan temperatur. pH divariasikan sebagai A₁, A₂ dan A₃ yang mewakili pH 7, 8 dan 9. Sedangkan temperatur divariasikan sebagai temperatur kamar dan 40⁰C yang diwakili oleh B₁ dan B₂. Kombinasi sampel yang didapat adalah A₁B₁, A₂B₁, A₃B₁, A₁B₂, A₂B₂ dan A₃B₂. Supernatan yang didapat dicuplik pada hari ke 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 untuk ditentukan aktivitas enzimatik xilanase. Data aktivitas enzimatik xilanase sampel terdapat pada lampiran 4. Selanjutnya data aktivitas hasil perhitungan dialurkan terhadap waktu inkubasi dengan kurva yang terdapat pada gambar 6.



Gambar 6. Kurva Optimasi Produksi Enzim Xilanase

Gambar 6 menunjukkan bahwa aktifitas enzim yang diproduksi oleh sampel dengan kombinasi A_1B_1 mencapai maksimum pada hari ke 6. Sampel A_2B_1 , juga mencapai maksimum pada hari ke 6. Sementara sampel A_3B_1 , mencapai maksimum pada hari ke 7, sampel A_1B_2 pada hari ke 5 dan 6 dengan aktifitas yang sama. Dan sampel A_2B_2 maupun A_3B_2 juga mencapai maksimum pada hari ke 6. Jadi ada empat kombinasi sampel yang memiliki waktu inkubasi 6 hari. Sehingga dapat disimpulkan, waktu inkubasi optimum untuk menghasilkan enzim adalah selama enam hari. Dari kurva juga terlihat bahwa sampel enzim dengan kombinasi A_1B_1 menunjukkan aktifitas tertinggi. Dengan demikian kondisi optimum yang dibutuhkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* untuk memproduksi enzim xilanase semaksimal mungkin adalah dengan mengkondisikan sampel pada pH 7, temperatur kamar (27°C) dan waktu inkubasi selama 6 hari. Oleh

karena itu pada tahap ini telah dilakukan produksi enzim dengan kondisi pH 7, temperatur 27°C dan waktu inkubasi 6 hari. Supernatan yang didapat ditentukan kondisi optimumnya (pH, temperatur, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi) pada tahap berikutnya. Sebagai pembanding juga diproduksi enzim dari substrat xilan murni (birchwood) dengan kondisi produksi yang sama.

4.3. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Xilanase

Pada tahap ini dilakukan penentuan kondisi optimum terhadap supernatan yang didapat dari media produksi xilan jerami maupun media produksi xilan murni. Parameter yang diuji adalah pH, temperatur, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi.

4.3.1. Penentuan pH Optimum

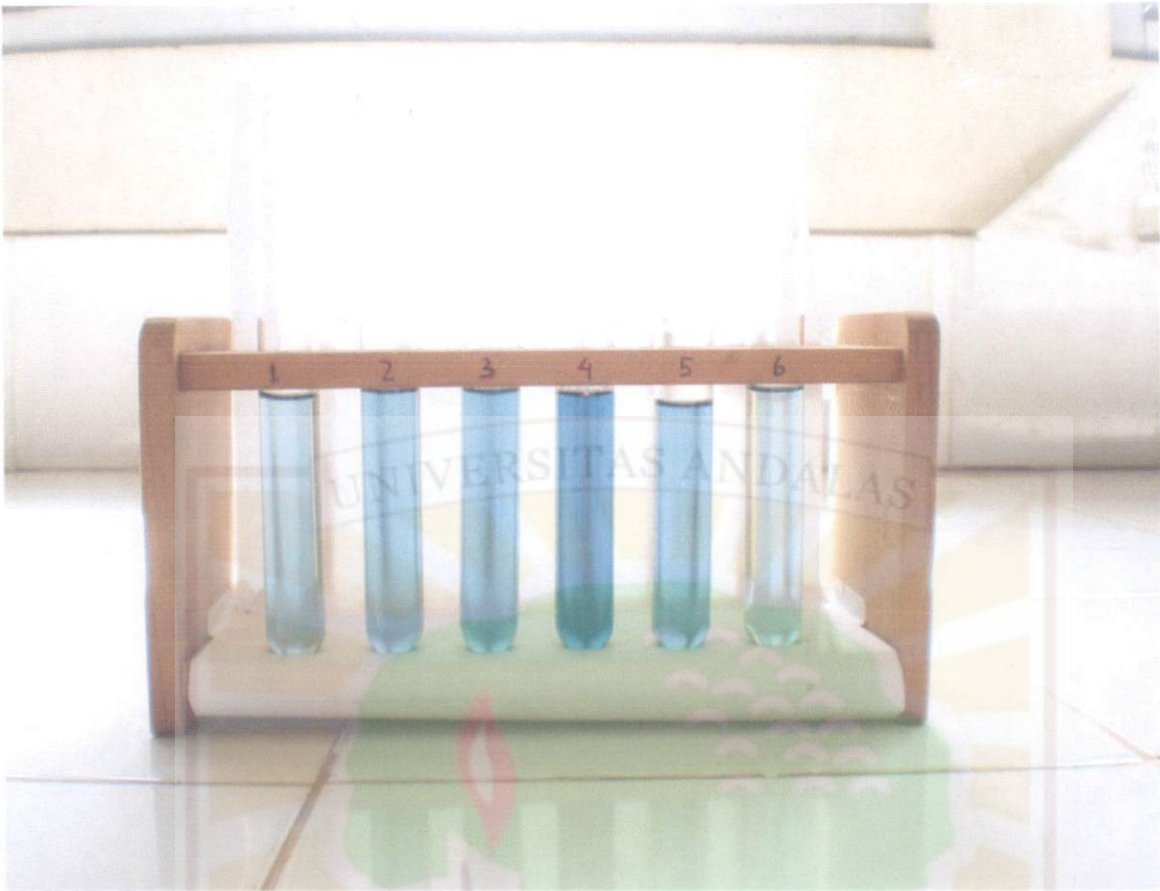
Kondisi pH sangat menentukan aktivitas enzim. Untuk menentukan pH optimum enzim xilanase, dilakukan reaksi enzimatik pada suhu 35°C dan lama inkubasi 30 menit. Konsentrasi substrat xilan (birchwood) yang digunakan adalah 2%. Sedangkan variasi pH dilakukan pada larutan buffer yang ditambahkan. Metode yang digunakan adalah dengan mengukur gula reduksi yang dihasilkan dengan metode Somogyi-Nelson.

Gambar 7 dan 8 menunjukkan perubahan warna selama perlakuan dengan metode Somogyi Nelson, yang membuktikan bahwa gula reduksi terbentuk sebagai hasil reaksi yang dikatalis oleh enzim xilanase. Selanjutnya larutan tersebut ditentukan absorbannya dan dihitung konsentrasinya dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva standar glukosa. Dari konsentrasi gula reduksi yang didapat, aktivitas enzim

masing-masing sampel dapat dihitung. Setelah mengalurkan aktivitas terhadap pH, pH optimum enzim dapat ditentukan.

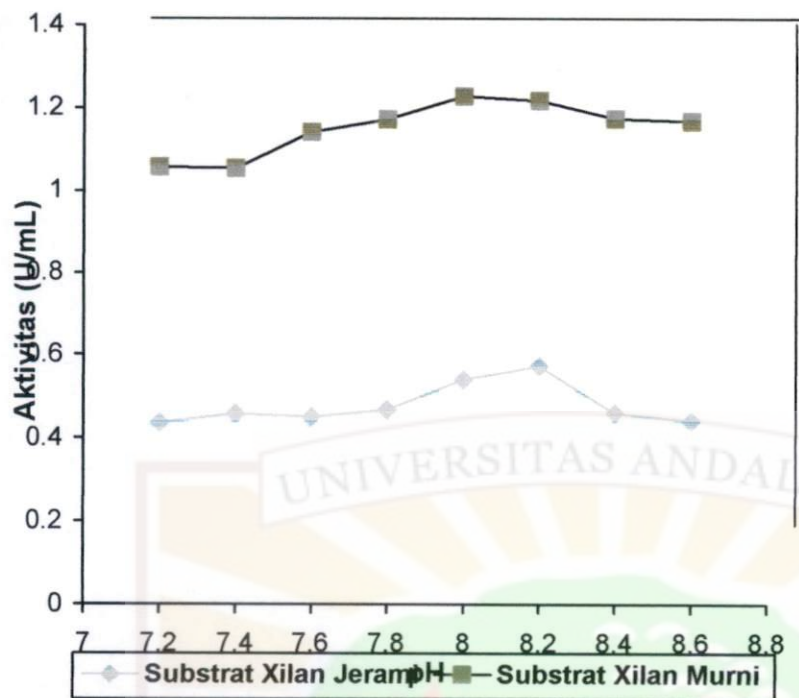


Gambar 7. Pembentukan endapan merah bata setelah penambahan reagen Nelson.



Gambar 8. Pembentukan larutan kompleks biru setelah penambahan reagen phosphomolibdat.

Data hubungan antara pH dengan aktivitas enzim dari media produksi xilan jerami dan media produksi xilan murni dapat dilihat pada lampiran 5. Penentuan aktivitas enzim yang dihasilkan dari xilan murni dimaksudkan untuk mengetahui apakah enzim yang dihasilkan dari media xilan jerami sama dengan xilanase yang diproduksi pada substrat xilan murni. Kurva penentuan pH optimum dari kedua media produksi tersebut terdapat pada gambar 9.



Gambar 9. Kurva penentuan pH optimum enzim xilanase

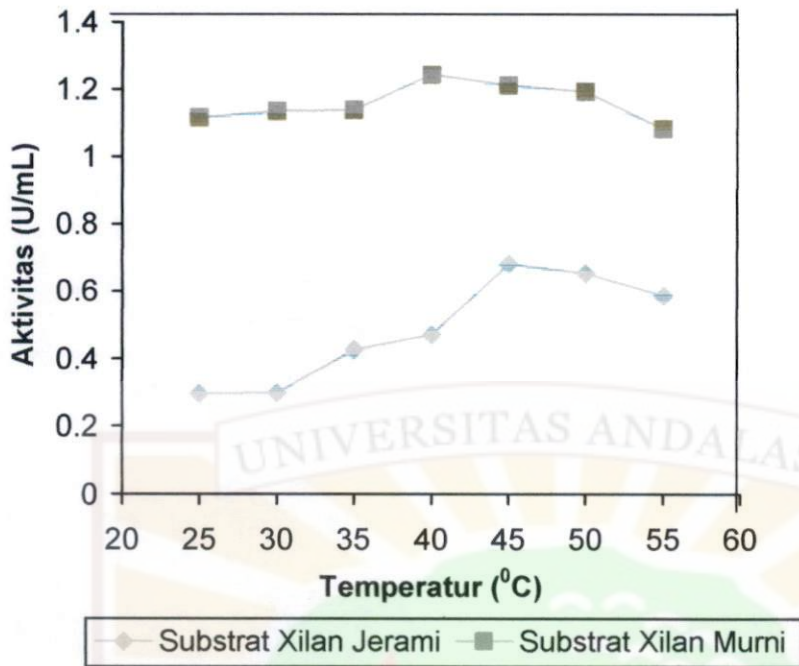
Pada gambar 9 terlihat bahwa pada setiap nilai pH yang diuji, memiliki nilai aktivitas tertentu. Untuk enzim dengan media produksi xilan jerami nilai maksimum dicapai pada pH 8,2 dengan aktivitas sebesar 0,573 U/mL. Aktivitas enzim pada pH dibawah dan diatas 8,2 lebih rendah. Aktivitas enzim rendah pada pH dibawah nilai pH optimum disebabkan karena kondisi keasaman tidak sesuai bagi berlangsungnya reaksi enzimatik, sehingga belum semua substrat dikatalisis oleh enzim. Sedangkan pada pH diatas pH optimum, selain kondisi pH yang tidak sesuai bagi berlangsungnya reaksi enzimatik yang maksimal, pH tinggi dapat juga merubah struktur tiga dimensi protein enzim, yang dapat merusak pusat aktif enzim. Hal ini dapat mengakibatkan kerja enzim tidak optimal (Tortora, 2004).

Enzim yang dihasilkan media produksi xilan murni juga diuji dengan mengukur gula reduksi hasil reaksi menurut metoda Somogyi Nelson. Aktivitas tertinggi enzim adalah sebesar 1,228 U/mL, yang dicapai oleh enzim dengan pH 8,0. pH optimum enzim dari kedua media produksi yang tidak berbeda secara signifikan itu menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan sama pada kedua media produksi tersebut.

Nilai aktivitas enzim dari media produksi xilan murni lebih besar dibandingkan aktivitas enzim dari media produksi xilan jerami. Hal ini disebabkan karena substrat xilan murni menginduksi produksi enzim lebih baik dibandingkan oleh xilan jerami yang masih merupakan xilan kasar.

4.3.2. Penentuan Temperatur Optimum

Penentuan temperatur optimum dilakukan dengan prosedur yang sama dengan penentuan pH optimum. pH larutan yang dipakai adalah pH optimum yang telah ditentukan sebelumnya yaitu pH 8,2 untuk enzim dari substrat xilan jerami dan pH 8,0 untuk enzim dari substrat xilan murni. Waktu inkubasi yang digunakan 30 menit, serta konsentrasi substrat 2 %. Inkubasi dilakukan pada berbagai temperatur yang ditentukan nilai optimumnya. Data aktivitas penentuan temperatur optimum ini terdapat lampiran 6. Gambar 10 memperlihatkan kurva aktivitas enzim pada penentuan temperatur optimum, baik enzim yang dihasilkan dari substrat xilan jerami maupun enzim yang dihasilkan dari substrat xilan murni.



Gambar 10. Kurva penentuan temperatur optimum enzim xilanase

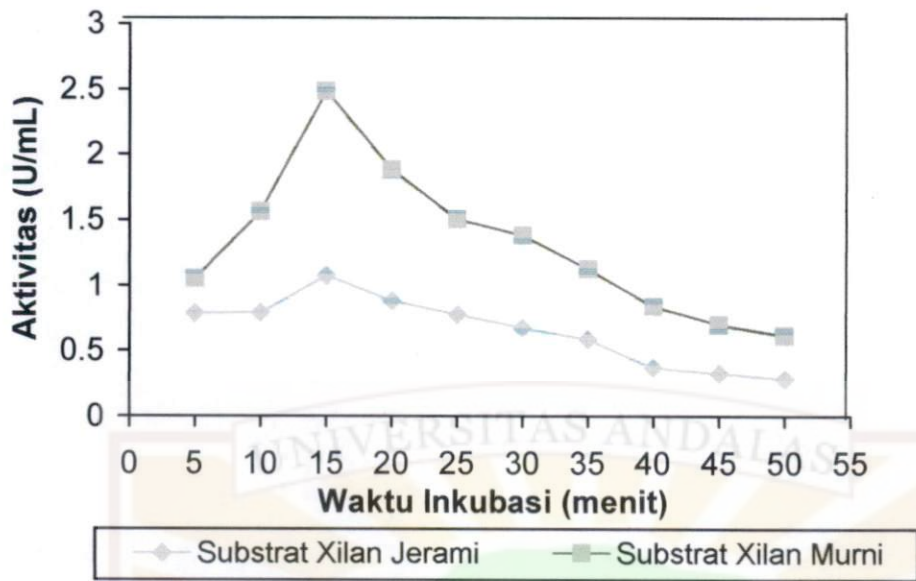
Gambar 10 menunjukkan bahwa aktivitas meningkat dari temperatur 25⁰C dan mencapai puncaknya pada temperatur 45⁰C untuk enzim dari media produksi xilan jerami. Selanjutnya kurva menurun secara bertahap pada temperatur 50⁰C dan 55⁰C. Dengan demikian aktivitas tertinggi enzim dicapai pada saat temperatur inkubasi 45⁰C dengan nilai aktivitas 0,682 U/mL. Rendahnya aktivitas enzim dibawah temperatur optimum disebabkan karena belum semua molekul enzim mendapat energi yang cukup untuk melangsungkan reaksi. Sehingga belum semua substrat yang tersedia dikatalisis oleh enzim. Sedangkan pada temperatur diatas temperatur optimal, berkurangnya nilai aktivitas disebabkan karena sebagian molekul enzim sudah mengalami denaturasi, yang dapat menyebabkan berubahnya struktur tiga dimensi protein serta perubahan susunan

asam amino di pusat aktif enzim. Kondisi ini dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan katalitik enzim (Hein *et al.*, 2000).

Aktivitas enzim yang dihasilkan dari substrat xilan murni menunjukkan bahwa optimum dicapai pada temperatur 40⁰C dengan nilai aktivitas 1,243 U/mL. Dari hasil penentuan temperatur optimum pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa suhu optimum yang dibutuhkan oleh enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* berkisar antara 40⁰C sampai 45⁰C.

4.3.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk bereaksi dengan substrat. Setiap enzim memiliki waktu inkubasi optimum tertentu yang menunjukkan berapa lama enzim tersebut bereaksi dengan substrat untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan prosedur yang sama dengan penentuan pH maupun temperatur optimum. pH larutan yang dipakai adalah pH optimum yang telah ditentukan sebelumnya yaitu pH 8,2 untuk enzim dari substrat xilan jerami dan pH 8,0 untuk enzim dari substrat xilan murni. Dan temperatur yang digunakan selama inkubasi adalah 45⁰C untuk enzim dari media produksi xilan jerami dan 40⁰C untuk enzim dari media produksi xilan murni. Data pengaruh waktu inkubasi terhadap aktifitas enzim baik enzim dari substrat xilan jerami maupun substrat xilan murni terdapat pada lampiran 7. Kurva hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas enzim dari media produksi xilan jerami dan xilan murni terdapat pada gambar 11.



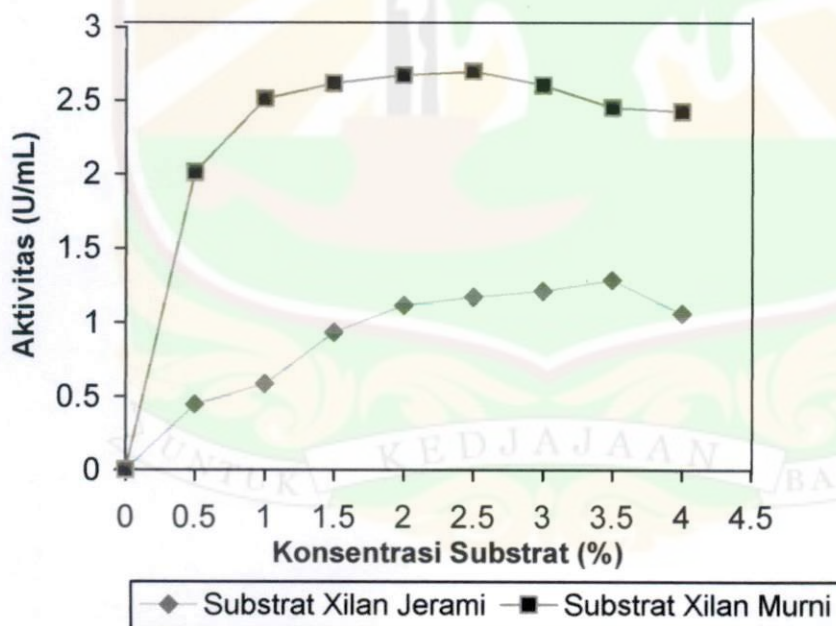
Gambar 11. Kurva penentuan waktu inkubasi optimum enzim xilanase

Pada gambar 11 terlihat bahwa untuk kedua media produksi baik xilan jerami maupun xilan murni aktivitas tertinggi enzim dicapai pada waktu inkubasi 15 menit dengan nilai aktivitas berturut-turut 1,077 U/mL dan 2,482 U/mL. Aktivitas enzim dibawah waktu inkubasi optimumnya memiliki nilai aktivitas yang lebih masih rendah. Hal ini disebabkan belum semua enzim bereaksi dengan substrat, karena waktu yang tersedia tidak mencukupi untuk berlangsungnya reaksi enzimatik yang sempurna. Aktivitas juga menurun diatas waktu inkubasi optimalnya. Pada kondisi ini semua substrat sudah bereaksi dengan enzim. Pertambahan waktu inkubasi tidak lagi meningkatkan nilai aktivitas, karena gula pereduksi tidak terbentuk lagi. Semakin lama waktu inkubasi setelah waktu inkubasi optimumnya, nilai aktivitas enzim akan berkurang secara bertahap.

Dari kurva tersebut juga tergambar bahwa enzim dari substrat xilan murni memiliki nilai aktivitas yang lebih tinggi daripada enzim dengan media produksi xilan jerami. Perbedaan tingkat kemurnian substrat merupakan penyebab berbedanya nilai aktivitas kedua media produksi tersebut.

4.3.4. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.

Substrat yang digunakan pada penentuan konsentrasi substrat optimum adalah xilan murni (birchwood). Baik pH, temperatur maupun waktu inkubasi yang digunakan adalah pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum hasil penentuan sebelumnya. Data aktivitas enzim pada berbagai nilai konsentrasi substrat yang diuji terdapat pada lampiran 8. Sedangkan kurva hasil penentuan konsentrasi substrat optimum dapat dilihat pada gambar 12.

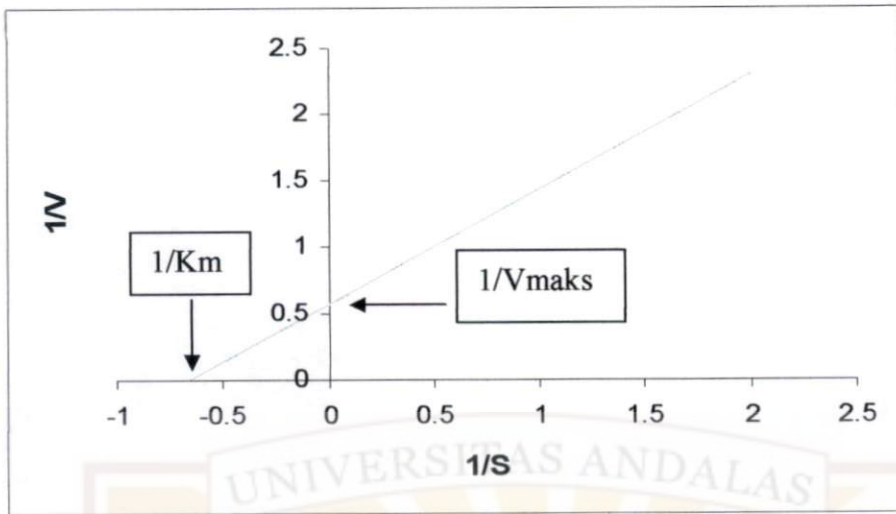


Gambar 12. Kurva penentuan konsentrasi substrat optimum enzim xilanase

Pada gambar 12 terlihat bahwa enzim dengan media produksi xilan jerami, konsentrasi substrat optimumnya adalah 3,5 % dengan nilai aktivitas 1,285 U/mL. Sedangkan enzim dengan media produksi xilan murni, optimum pada konsentrasi 2,5% dengan nilai aktivitas 2,701 U/mL. Perbedaan konsentrasi substrat optimum yang cukup signifikan antara kedua substrat tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi dari kedua substrat tersebut. Xilan dari substrat xilan jerami merupakan xilan kasar yang masih mengandung komponen lain selain xilan. Sehingga untuk mencapai reaksi enzimatik yang maksimal dibutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 3,5 %. Sedangkan substrat xilan murni merupakan xilan yang sudah dimurnikan dari komponen-komponen lain. Dengan demikian pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu 2,5 % sudah memadai untuk berlangsungnya reaksi enzimatik yang maksimal.

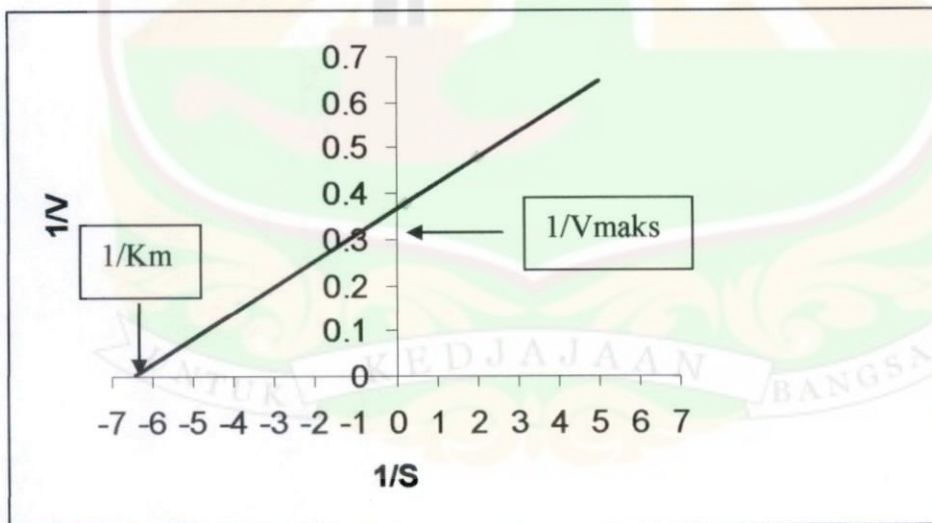
4.4. Nilai K_m dan V_{maks}

Untuk mendapatkan nilai K_m dan V_{maks} digunakan data dari penetapan konsentrasi substrat optimum dengan mengalurkan nilai $1/V$ terhadap $1/S$. $1/V$ adalah nilai yang didapat dengan menghitung $1/aktivitas$ dari penentuan konsentrasi substrat optimum. Sedangkan $1/S$ didapat dengan menghitung nilai $1/konsentrasi$. Dari perpotongan garis lurus dengan sumbu $1/V$ dapat ditentukan nilai V_{maks} , dan dari perpotongan garis lurus dengan $1/S$ diperoleh nilai K_m yang merupakan Konstanta Menten. Data $1/V$ dan $1/S$ terdapat pada lampiran 9. Gambar 13 merupakan kurva garis lurus yang menunjukkan hubungan $1/V$ dan $1/S$ untuk enzim dengan media produksi xilan jerami.



Gambar 13. Kurva Lineweaver – Burk dari enzim xilanase dengan media produksi xilan jerami.

Dari perhitungan didapat nilai K_m sebesar 1,5017 dan V_{maks} sebesar 1,7346. Sementara kurva hubungan $1/V$ dan $1/S$ dari enzim xilanase dengan media produksi xilan murni terdapat pada gambar 14.



Gambar 14. Kurva Lineweaver – Burk dari enzim xilanase dengan media produksi xilan murni

Nilai K_m dan V_{maks} enzim media produksi xilan murni masing-masing adalah 0,1549 dan 2,7419. Dari perhitungan nilai K_m dan V_{maks} enzim dari kedua media produksi tersebut, ternyata terdapat sedikit perbedaan diantara keduanya. Nilai K_m suatu enzim tergantung pada substrat dan faktor lingkungan enzim, seperti pH, temperatur dan kekuatan enzim (Stryer, 1999).

4.5. Penentuan Kestabilan Enzim terhadap Pengaruh Pemanasan

Penentuan kestabilan enzim terhadap pemanasan dilakukan dengan menguji aktivitas enzimatis sampel setelah dipanaskan pada suhu tinggi baik terhadap enzim xilanase dari media produksi xilan jerami maupun media produksi xilan murni. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampai suhu 80°C aktivitas enzim masih konstan, aktivitas baru berkurang pada pemanasan 90°C dan 100°C . Data kestabilan enzim terhadap pemanasan terdapat pada lampiran 10.

4.6. Uji Serapan Selulase

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan untuk mengetahui apakah *Bacillus amyloliquefaciens* menghasilkan enzim selulase pada medium xilan jerami dan xilan murni. Dalam hal ini substrat yang digunakan adalah CMC. Hasil pengujian menunjukkan bahwa dalam preparat enzim yang dihasilkan di dalam substrat xilan jerami juga terdapat enzim selulase yang dapat bereaksi positif dengan CMC. Data aktivitas enzim pada uji serapan selulase terdapat pada lampiran 11.

Sedangkan uji aktivitas enzimatis selulase pada preparat enzim yang dihasilkan oleh mikroba didalam substrat xilan murni memperlihatkan bahwa selulase

tidak terkandung dalam enzim. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya larutan berwarna biru pada pengujian dengan metode Somogyi Nelson, yang menunjukkan gula reduksi tidak terbentuk dalam enzim yang direaksikan dengan substrat CMC.



V.KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa enzim xilanase dapat dihasilkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* baik pada substrat xilan jerami maupun pada substrat xilan murni . Perbedaan enzim dari kedua media produksi tersebut adalah terletak pada tingkat kemurnian enzim. Aktivitas enzim xilanase media produksi xilan jerami adalah 1,285 U/mL dengan aktivitas spesifik 0,739 U/mg. Sedangkan aktivitas enzim xilanase media produksi xilan murni adalah 2,701 U/mL dengan aktivitas spesifik 1,552 U/mg. Kondisi optimum enzim xilanase dari media produksi xilan jerami, pH 8,2 ; temperatur 45⁰C ; waktu inkubasi 15 menit dan konsentrasi substrat 3,5 % Sedangkan kondisi optimum enzim xilanase dari media produksi xilan murni, pH 8,0 ; temperatur 40⁰C ; waktu inkubasi 15 menit dan konsentrasi substrat 2,5 %. Nilai Km dan Vmaks enzim xilanase dari media produksi xilan jerami berturut- turut adalah 1,5017 % (b/v) dan 1,7346 U/mL, sementara nilai Km dan Vmaks enzim xilanase dari media produksi xilan murni berturut- turut adalah 0,1549 % (b/V) dan 2,7419 U/mL.

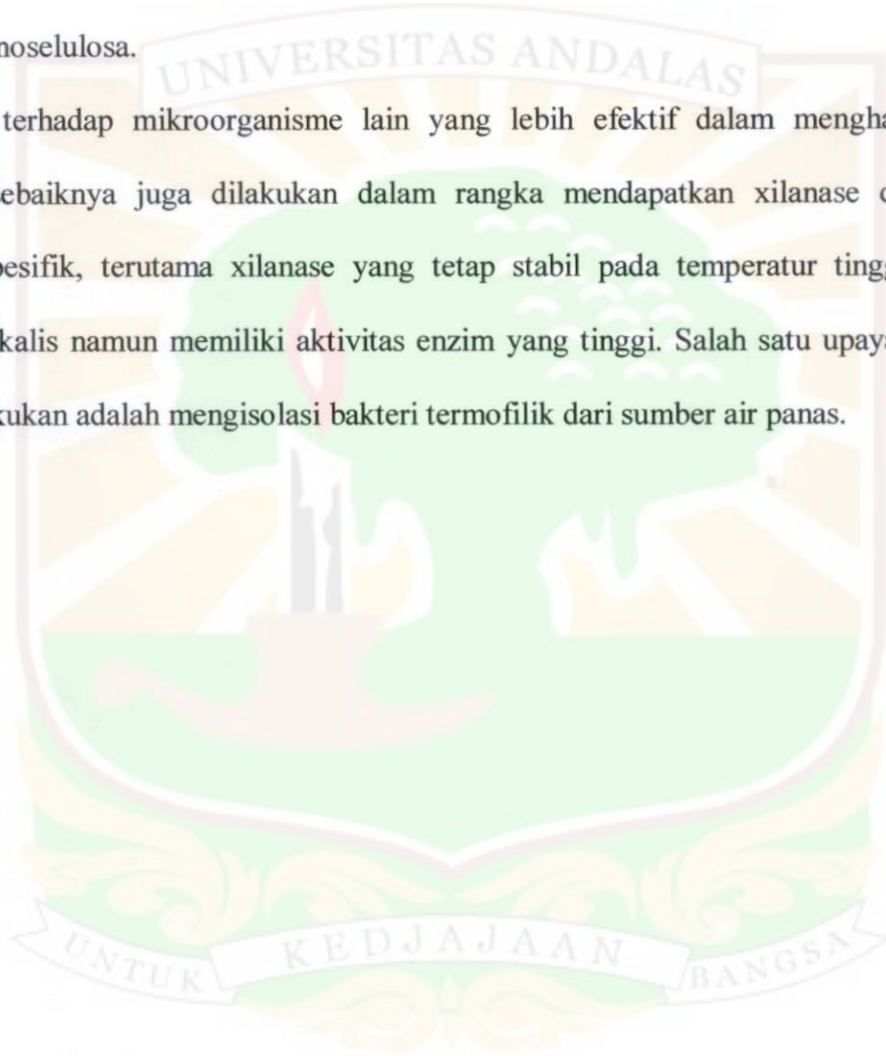
5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, kepada peneliti selanjutnya disarankan beberapa hal.

1. Enzim xilanase dari *Bacillus amyloliquefaciens* merupakan enzim yang stabil pada suhu diatas 50⁰C, sehingga memiliki peluang untuk diterapkan dalam industri. Untuk

mendapatkan aktivitas yang lebih tinggi, hendaknya diupayakan mencari metode yang tepat untuk pemekatan dan pemurnian enzim.

2. Upaya lain yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim xilanase dengan aktifitas yang tinggi adalah dengan menggunakan mikroorganisme dengan strain yang sudah dikenal efektif menghasilkan xilanase. Modifikasi bisa dilakukan terutama pada substrat sebagai sumber karbon yang ketersediaannya cukup melimpah berupa limbah lignoselulosa.
3. Pencarian terhadap mikroorganisme lain yang lebih efektif dalam menghasilkan xilanase sebaiknya juga dilakukan dalam rangka mendapatkan xilanase dengan kondisi spesifik, terutama xilanase yang tetap stabil pada temperatur tinggi dan suasana alkalis namun memiliki aktivitas enzim yang tinggi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah mengisolasi bakteri termofilik dari sumber air panas.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2007. *Enzym for Carbohydrate Analysis and Digestion*.
<http://www.sigmaaldrich.com/Area of Interest/Biochem>
- Anwarali-Kahn, B.A.F. and A.S.A.A.Husaini. 2006. *Enhancing α -Amylase and Cellulase in vivo Enzyme Expressions on Sago Pith Residue Using Bacillus amyloliquefaciens* UMAS. *Biotechnology* 5 (3) : 391-403
- Belk, C. and V, Borden. *Biology Science for Life*. Second Edition. Pearson Prentice Hall : 54 – 55
- Bohinski, C.R. 1987. *Modern Concept in Biochemistry*. Fifth Edition. Allyn and Bacon, Inc. Boston, London, Sydney, Toronto : 185 -195
- Boyer, R. 2002. *Concept in Biochemistry*. Second Edition. Jhon Wiley & Sons, Inc. New York : 130 – 141
- Breccia, J.D., F. Sineriz, M.D. Baigori, G.R. Castro and R. Hatti-Kaul. 1998. *Purification and Characterization of A Thermostabel Xylanase from Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and Microbial Technology. Elsevier Science. Amsterdam
- , N. Torton, L. Gorton, F. Sineriz and R. Hatti-Kaul. 1981. *Specipicity and Mode of Action of A Thermostabel Xylanase from Bacillus amyloliquefaciens on-line monitoring of Hydrolysis Product*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Springer. Heidelberg
- Coultrate. T.P, *Food, The Cchemistry of Its Components*. Fourth Edition. Royal Society of Chemistry : 64 – 65
- Hein, M., R.L.Best, S. Patisson, and S. Arena. 2000. *Introduction to Organik and Biochemistry*. Brooks/Cole Publishing Company. California : 324 – 3357.
- Jeffries, W.T, *Biochemistry and Genetics of Microbial Xylanases*. Institute for Microbial and Biochemical Technology USDA. Wiconsin. (Mei 2007)

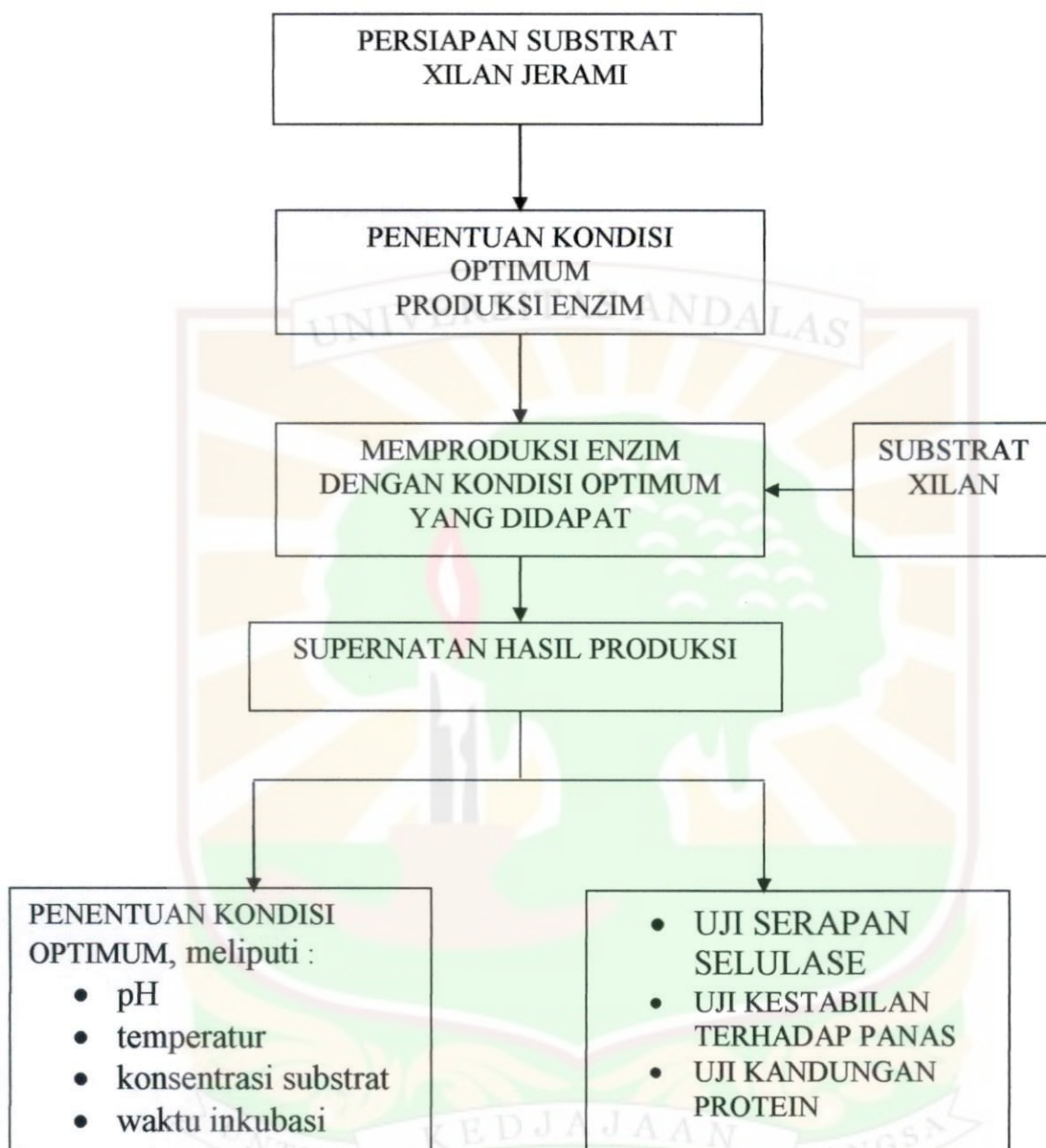
- Kenealy, R.W. and W.T. Jeffries. 2003. *Enzym Processes for Pulp and Paper : A Review of Recent Developments*. Institute for Microbial and Biochemical Technology, U.S. Madison : 210 : 215
- Mathews, K.C., V.E.K Holde., and G.K. Ahem. 2000. *Biochemistry*. Third Edition, An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc. San Francisco : 360 – 378
- Reis, D.S., F.A.M Costa and M.R Peralta. 2003. *Xylanase Production by A wild Strain of Aspergillus Nidulans*. *Acta Scientiarum* : Biological Science, Brazil
- Richana, N., 2002. *Produksi dan Prospek Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*. Buletin Agrobio 5 (1) : 29 – 36
- Rifaat, M.H., A.Z Nagieb, and M.H Ahmed . 2005. *Production of Xylanases by Streptomyces Species and Their Bleaching Effect on Rice Straw Pulp*. *Applied Ecology and Environmental Research*. 4 (1) : 151 -160
- Rini, S.D. 2002. *Minimasi Limbah dalam Industri Pulp dan Paper*. Lembaga Kjian Ekologi dan Konservasi Lahan Basah.
- Sather, C. 1998. *Bacillus amyloliquefaciens*. University of Missouri-Rolla Manito:diwesten@umr.edu
- Seyis, I. and N. Aksoz. 2005. *Xylanase Production from Trichoderma harzianum 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources*. *Food Technology and Biotechnology*. 43 (1) : 37 – 40
- Stryer, L. 1999. *Biochemistry*. Third Edition. W.H. Freeman and Company. New York : 177- 198
- Tortora, J.G., R.B.Funke and L.C.Case. 2004. *Microbiology An Introduction*, Eighth Edition. Pearson Education, Benjamin Cummings. San Franscisco : 112 – 118
- Trismillah., W. Deden. dan Sumaryanto. *Produksi Xilanase, Pengaruh Komposisi Media pada Produksi Xilan, Bacillus stearothermophillus DSM 22 Menggunakan Substrat Kulit Buah Pisang. (Mei 2007)*
- Weber,S., S.Stubner, and R.Conrad. 2000. *Bacterial Population Colonizing and Degrading Rice Straw in Anoxic Paddy Soil*. *Applied and Environmental Microbiology*

Yang, W.V., Z. Zhuang, and W.T. Jeffries. 1995. *Alkaline-active Xylanase Produced by An Alkaliphilic Bacillus sp Isolated from Kraft Pulp*. Journal of Industrial Microbiology.



Lampiran 1

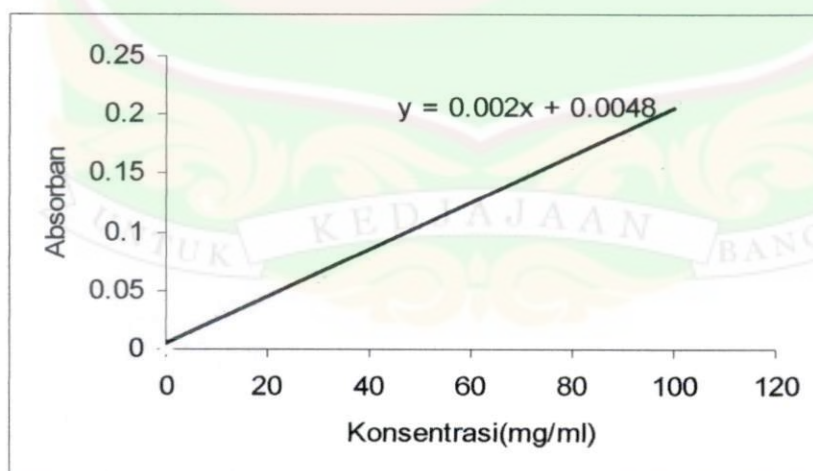
SKEMA KERJA



Lampiran 2 :

Tabel 3. Data Standar Glukosa dengan pengukuran absorban pada 540 nm

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban
0	0
10	0,032
20	0,049
30	0,061
40	0,082
50	0,108
60	0,121
70	0,153
80	0,159
90	0,183
100	0,211

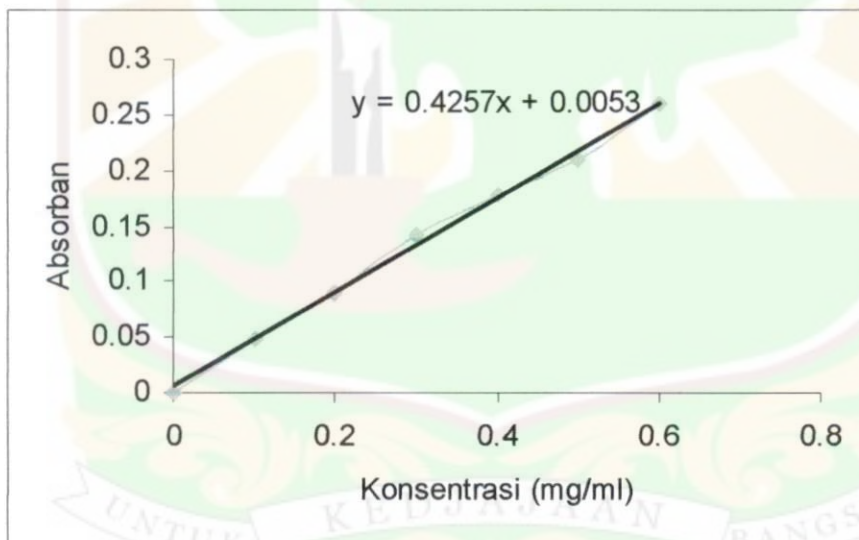


Gambar 13. Kurva Standar Glukosa

Lampiran 3 :

Tabel 4. Data Standar Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai Standar Protein dengan Pengukuran Absorban pada Panjang Gelombang 660 nm

Konsentrasi (mg/ml)	Absorban
0	0
0,1	0,049
0,2	0,091
0,3	0,142
0,4	0,178
0,5	0,210
0,6	0,261



Gambar 14. Kurva Standar Protein

Lampiran 4 :

**Tabel 5. Data Aktivitas Sampel pada Penentuan Kondisi Optimum
Produksi Enzim Xilanase**

Sampel	Aktivitas Hari ke					
	3	4	5	6	7	8
A ₁ B ₁	0,0039	0,0053	0,0180	0,0207	0,0043	0,0042
A ₂ B ₁	0,0034	0,0072	0,0067	0,0148	0,0048	0,0040
A ₃ B ₁	0,0048	0,0039	0,0053	0,0082	0,0097	0,0082
A ₁ B ₂	0,0062	0,0057	0,0125	0,0125	0,0012	0,0009
A ₂ B ₂	0,0053	0,0097	0,0085	0,0120	0,0053	0,0053
A ₃ B ₂	0,0057	0,0057	0,0082	0,0093	0,0077	0,0053

Kondisi Proses :

- pH : 7
- temperatur : 35⁰C
- waktu inkubasi : 30 menit
- konsentrasi substrat : 1 %

Lampiran 5 :

Tabel 6. Data Aktivitas Enzim Xilanase pada Penentuan pH Optimum

pH	Aktivitas	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
7,2	0,437	1,056
7,4	0,459	1,054
7,6	0,452	1,141
7,8	0,468	1,172
8,0	0,540	1,228
8,2	0,573	1,217
8,4	0,461	1,174
8,6	0,442	1,168

Kondisi Proses :

- temperatur : 35⁰C
- waktu inkubasi : 30 menit
- konsentrasi substrat : 2 %

Lampiran 6 :

Tabel 7. Data Aktivitas Enzim Xilanase pada Penentuan Temperatur Optimum

Temperatur	Aktivitas	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
25	0,296	1,117
30	0,297	1,135
35	0,425	1,139
40	0,469	1,243
45	0,682	1,211
50	0,652	1,191
55	0,586	1,082

Kondisi Proses :

- pH : 8,2 (untuk media produksi jerami)
: 8,0 (untuk media produksi xilan)
- waktu inkubasi : 30 menit
- konsentrasi substrat : 2 %

Lampiran 7 :

Tabel 8. Data Aktivitas Enzim Xilanase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
5	0,783	1,053
10	0,791	1,564
15	1,077	2,482
20	0,887	1,886
25	0,773	1,503
30	0,671	1,381
35	0,585	1,126
40	0,371	0,839
45	0,325	0,694
50	0,283	0,612

Kondisi Proses :

- pH : 8,2 (untuk media produksi jerami)
: 8,0 (untuk media produksi xilan)
- temperatur : 45⁰C (untuk media produksi jerami)
: 40⁰C (untuk media produksi xilan)
- konsentrasi substrat : 2 %

Lampiran 8 :

Tabel 9. Data Aktivitas Enzim Xilanase pada Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
0	0	0
0,5	0,446	2,015
1,0	0,587	2,515
1,5	0,934	2,619
2,0	1,117	2,675
2,5	1,172	2,701
3,0	1,212	2,604
3,5	1,285	2,453
4,0	1,059	0,426

Kondisi Proses :

- pH : 8,2 (untuk media produksi jerami)
: 8,0 (untuk media produksi xilan)
- temperatur : 45⁰C (untuk media produksi jerami)
: 40⁰C (untuk media produksi xilan)
- waktu inkubasi : 15 menit (untuk kedua media produksi)

Lampiran 9 :

Tabel 10. Data 1/S da 1/V pada Penentuan Harga Km dan Vmaks

1/S	1/V	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
2	2,240	0,496
1	1,704	0,398
0,67	1,071	0,382
0,5	0,895	0,374
0,4	0,853	0,370
0,33	0,825	0,384
0,28	0,778	0,408
0,25	0,944	0,412

Lampiran 10 :

Tabel 11. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Uji Serapan Selulase dari Substrat Jerami

Temperatur Pemanasan Enzim	Aktivitas	
	Substrat Jerami	Substrat Xilan
50	1,076	2,075
60	1,059	2,119
70	1,102	2,164
80	1,055	2,149
90	0,896	1,308
100	0,818	1,182

Kondisi Proses :

- pH : 5
- temperatur : 35⁰C
- waktu inkubasi : 30 menit

