

## Hidrolisis Xilan Bagas Menggunakan Xilanase *Bacillus subtilis* XJ28 dan Karakterisasi Enzimnya (Hydrolysis of Xylan Bagas using Xylanase *Bacillus subtilis* XJ28 and Characterization the Enzyme)

Gading Wilda A<sup>1</sup>, Yopi<sup>2</sup> & Anja Meryandini<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana IPB, Dramaga Bogor 16680,

<sup>2</sup>Lab. Biokatalis dan Fermentasi (LBF), Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor 16911,

<sup>3</sup>Dept. Biologi FMIPA IPB, Gedung Fapet Lt. 5 Wing 1, Dramaga Bogor 16680,

<sup>4</sup>Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) IPB.

Email: ameryandini@ipb.ac.id

Memasukkan: Juni 2014 Diterima: September 2014

### ABSTRACT

Xylanase extracellular enzyme is produced by various microbes. Hydrolysis of bagasse xylan can produced xylooligosaccharide. The main components of hemicellulose was xylan at bagasse. Identification *Bacillus subtilis* XJ28 using primer 16S RNA. The qualitative test used Congo-Red staining, whereas quantitative test used Dinitrosalicylic Acid (DNS) methode. The hydrolyzing product was analysed used TLC (Thin Layer Chromatography). This research aims were to characterized xylanase from isolate XJ28 and analyzing the hydrolyzing product from xylan bagasse. *Pretreatment* process included delignification using sodium hypochlorite 1% and xylans extraction using alkaline (NaOH 15%) as the solvent. The result of the xylans extracted from bagasse was 9,9% xylan and after purification was obtained 3,4% soluble xylan. Xylanase activity has the highest activity at 96 h of incubation time with activity 11,3 U/mL. Xylanase *Bacillus subtilis* XJ28 has the optimum condition at pH 7 and 50 °C and stable up to 72 hr of incubation time at room temperature and 4 °C. The hydrolysis product using xylanase crude enzyme was reducing sugar with molecular weight around of sucrose and oligosaccharide.

**Keywords:** xylanase, xylan bagasse, hydrolysis, TLC.

### ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dihasilkan oleh mikroba. Hidrolisis xilan bagas tebu dapat menghasilkan produk xilooligosakarida. Xilan merupakan komponen hemiselulosa pada bagas. Identifikasi *Bacillus subtilis* XJ28 dilakukan secara molekular dengan 16S rDNA. Penapisan bakteri secara kualitatif menggunakan pewarnaan merah-kongo, sedangkan uji kuantitatif menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi xilanase *Bacillus subtilis* XJ28 dan menghidrolisis xilan bagas. Proses *pretreatment* bagas meliputi delignifikasi menggunakan sodium hipoklorit (NaOCl) 1% dan ekstraksi xilan menggunakan metode alkalin (NaOH 15%) sebagai pelarut. Hasil ekstraksi xilan dari bagas diperoleh 9,9% xilan dari bagas dan setelah pemurnian diperoleh 3,4 % xilan larut. Aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada jam ke-96 masa inkubasi dengan aktivitas 11,3 ± 0,6 U/mL. *Bacillus subtilis* XJ28 memiliki karakter xilanase optimum pada pH 7 dengan suhu 50 °C dan stabil sampai inkubasi jam ke-72 pada suhu ruang maupun pada suhu 4 °C. Melalui KLT Jangan disingkat diketahui produk hidrolisis xilan bagas oleh xilanase ekstrak kasar menghasilkan gula reduksi dengan BM yang sama dengan sukrosa.

**Kata kunci:** xilanase, xilan bagas, hidrolisis, KLT.

## PENDAHULUAN

Xilanase merupakan jenis enzim yang digunakan secara luas, misalnya pada peternakan sebagai campuran pakan ternak (Richana 2002). Enzim xilanase dikombinasikan dengan selulase dan pektinase dapat digunakan untuk menjernihkan *juice sari buah* dan likuifikasi buah dan sayur (Beg *et al.* 2001), pada proses pemutihan kertas (Wang *et al.* 2010), untuk meningkatkan kualitas roti (Zheng *et al.* 2011), dan produksi bioenergi seperti etanol (Samsuri *et al.* 2009). Untuk memproduksi enzim, bakteri memiliki beberapa kelebihan memiliki beberapa kelebihan seperti laju pertumbuhan yang cepat, dan dapat tumbuh pada substrat yang murah.

Terbatasnya ketersediaan xilan sebagai bahan baku dan proses purifikasi enzim menyebabkan enzim xilase relatif mahal ketersediaan xilanase tersebut mahal dan jumlahnya terbatas sebagai katalis reaksi. Mahalnya harga xilanase dikarenakan bahan dasar dan pengolahannya, dalam hal ini adalah xilan untuk pembuatan xilanase. Salah satu cara untuk menekan biaya produksi xilanase adalah dengan memanfaatkan bahan dasar limbah lignoselulosa sebagai medium tumbuh bakteri dan proses hidrolisis. Selain ketersediaannya yang melimpah bahan lignoselulosa juga tidak bersaing dengan bahan dasar pangan. Beberapa contoh bahan lignoselulosa yang dapat digunakan antara lain limbah pertanian misalnyarumput, alang-alang, sekam padi, jerami, batang gandum, tongkol jagung dan limbah hasil samping industri fermentasi seperti molase dan bagasmolase, bagas) Iranmahboob *et al.* 2002. Menurut Lavarack *et al.* (2002) bagas merupakan hasil samping proses pembuatan gula tebu (*sugarcane*) yang mengandung residu berupa serat. Komponen kimia dari serat bagas secara rinci meliputi 37,35 % glukukan (selulosa), 23,66 % xilan (hemiselulosa), 2,1 % lignin, 3,25 % senyawa ekstraktif lain, dan 1,79 % senyawa abu (Sandra *et al.* 2007). Sedikitnya 50% serat bagas diperlukan sebagai bahan bakar (ketel) sedangkan 50% sisanya hanya ditimbun sebagai

buangan yang memiliki nilai ekonomi rendah.

Biomassa yang tidak dipretreatment akan bersifat *recalcitrant* bagi mikroba, karena kandungan lignin yang akan menghambat penetrasi enzim (Himmel 2008). Dalam penelitian ini bagas tebu akan didelignifikasi dan digunakan sebagai substrat bagi pertumbuhan bakteri xilanolitik.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bagas diperoleh dari limbah restoran dan pedagang minuman. Limbah biomassa dikeringkan pada suhu 80 °C selama 48 jam dan dihaluskan sampai lolos mesh 40. Delignifikasi menggunakan NaOCl 1% selama 5 jam lalu dikeringkan dan ekstraksi xilan menggunakan NaOH 15% selama 24 jam pada suhu ruang (modifikasi dari Richana *et al.* 2007). Supernatan mengandung ekstrak xilan dan dipresipitasi dengan etanol 95% (1:3). Hasil ekstraksi dimurnikan dengan NaOH 4%. Xilan larut didapatkan dari endapan yang sudah dikeringkan pada suhu 50 °C selama 72 jam.

Bakteri xilanolitik (isolat XJ28) merupakan hasil isolasi dari tanah Hutan di Jambi Sumatra Selatan yang telah lolos uji kualitatif pada substrat xilan komersial. Identifikasi dilakukan secara molekular dengan 16S rDNA. Analisis molekuler dilakukan berupa ekstraksi DNA menggunakan kit DNA (Geneid).

Media pertumbuhan dan produksi mengandung 0,5 % xilan bagas; 0,5 % Dibuat sub bab tentang media dan produksi xylase ekstrak khamir; 0,02 % MgSO<sub>4</sub>; 0,1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 % bakto pepton dan agar-agar 1,5 % (untuk media padat). Penentuan zona bening dilakukan dengan pewarnaan merah kongo 2%. Metode belum sistematis, sebaiknya dibuat lebih runtu Enzim ekstrak kasar didapatkan dengan menginokulasikan prekulturr 10%v/v pada media. Aktivitas enzim dilakukan berdasarkan metode DNS (Miller 1959). Substrat uji aktivitas xilanase menggunakan xilan Beechwood (Sigma) 0,5 % dengan kondisi uji dalam bufer fosfat 0,02 M (pH 7). Menentukan xilanase yang bebas-selulase, sebaiknya dijelaskan

kenapa xilanase harus bebas selulase. Metodenya kurang bisa dipahami isolat XJ28 diuji aktivitas selulase menggunakan metode DNS. Substrat uji aktivitas selulase menggunakan CMC 0,5 %.

Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase dengan kisaran pH 4,0-5,0 sebaiknya dipaparkan terlebih dahulu media untuk optimasi pH (sitrat fosfat), untuk pH 6,0-7 (fosfat) dan untuk pH 8-11 (glisin NaOH). Untuk optimasi suhu dilakukan pada medium apa? Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase dilakukan dengan mereaksikan enzim pada pH optimum di suhu 30 sampai 100 °C. Uji stabilitas enzim dilakukan pada tiga kondisi yaitu pada suhu optimum enzim, suhu ruang dan suhu 4 °C. Enzim xilanase ekstrak kasar didialisis dalam bufer fosfat 0,02 M pH 7 selama 6 jam dalam suhu refrigerator 4 °C. Aktivitas xilanase dan gula reduksi (Miller 1959) diuji sebelum dan sesudah dialisis.

Enzim didialisis dalam bufer optimum enzim selama 5 jam pada suhu 4°C. Hidrolisis dilakukan dengan mereaksikan 10 mL enzim ekstrak kasar dengan aktivitas 6,4 U/mL dalam xilan bagas 0,5 % (b/v) dalam bufer fosfat 0,02 M pH 7, sampling dilakukan pada jam ke-0, 2,5 dan 5. Data visualisasi produk hidrolisis dilakukan dengan metode KLT. Sampel dan standart ditotolkan sebanyak 4 µL. Standar yang digunakan adalah xilosa, glukosa, sukrosa, arabinosa, dan selobiosa. Standart dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan eluen dibuat dengan komposisi 12 mL n- butanol: 6 mL asam asetat: 6 mL akuades, kemudian dijenuhkan selama 30 menit. Pewarnaan visualisasi dilakukan dengan larutan DAP diperjelas tentang DAP yang terdiri atas 0,2 g difenilamin, 0,2 mL aniline, 10 mL aseton, dan 1,5 mL asam fosfat. Kertas silika dikeringkan dengan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit.

## HASIL

*Pretreatment* limbah tebu (bagas) dapat dilihat pada Tabel 1, 2, dan Gambar 1)

## Identifikasi isolat bakteri XJ28

Isolat XJ28 mampu mendegradasi substrat xilan bagas dibuktikan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni. Berdasarkan analisis penjabaran urutan nukleotida parsial pengkode 16S rDNA menggunakan program BLAST bakteri menghasilkan xylanase dengan kode XJ28 memiliki kesamaan dengan tertinggi dengan *Bacillus Subtilis* strain D8 dengan presentasi tingkat kesamaan 100% (Gambar 3). Dijelaskan juga hasil pohon filogeninya.

## Aktivitas xilanase

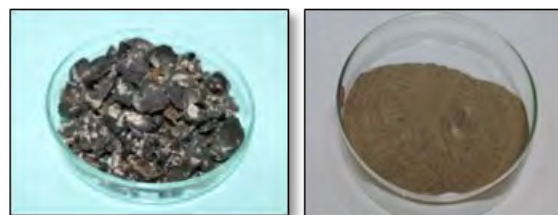
Aktivitas xilanase dari xilan bagas sebesar  $11,301 \pm 0,691$  U/mL pada jam ke 96 dengan jumlah total bakteri 2,870 CFU/mL (Gambar 4). Aktivitas xilanase dari xilan beechwood sebesar

Tabel 1. Hasil dari neraca massa tahapan *pretreatment* substrat.

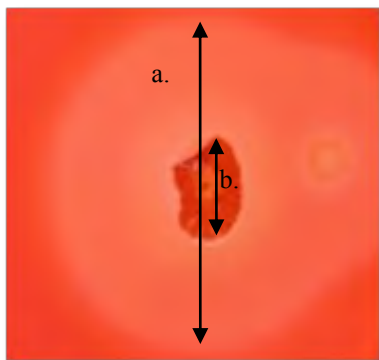
Tahap perlakuan	Hasil	
	Berat (g)	Penurunan persentase (%)
Bagas	1000	100
Delignifikasi	704,74	29,52
Ekstraksi xilan	98,8	9,9
Purifikasi xilan	34	3,4

Tabel 2. Perbandingan komponen hemiselulosa, selulosa dan lignin sebelum dan sesudah delignifikasi (%).

Tahap perlakuan	Hasil	
	Berat (g)	Penurunan persentase (%)
Bagas	1000	100
Delignifikasi	704,74	29,52
Ekstraksi xilan	98,8	9,9
Purifikasi xilan	34	3,4



Gambar 1. Ekstraksi bagas tebu menggunakan metode alkali. (a) xilan bagas dan (b) xilan larut lolos mesh 40.



**Gambar 2.** Hasil pewarnaan merah kongo 2 % *B. subtilis*XJ28 diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam pada media xilan bagas padat 0,5%. (a) diameter zona bening dan (b) diameter koloni.

11,553 ± 0,241 U/mL pada jam ke-48 dengan jumlah total bakteri 3,XJ28 CFU/mL. Aktivitas maksimum keduanya didapatkan pada akhir fase stasioner (Gambar 4, 5). Berdasarkan pengujian (Tabel 6), *Bacillus subtilis* XJ28 tidak menghasilkan selulase dibuktikan dengan aktivitas selulase 0 U/mL.

**Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase**

Berdasarkan hasil pengujian yang disajikan pada Gambar 5, aktivitas tertinggi diperoleh pada bufer fosfat pH 7 dengan aktivitas sebesar 2,229 U/mL. Aktivitas tertinggi didapat pula pada

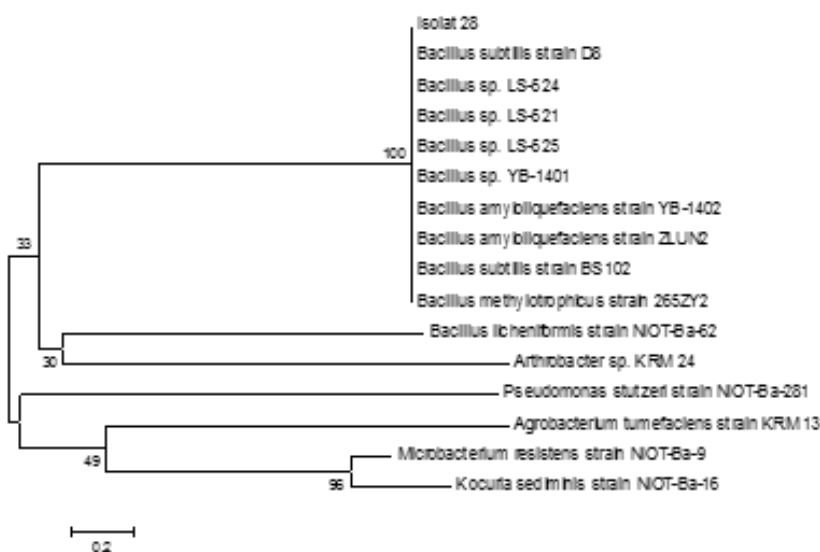
kisaran pH 5.5, 7.5, 9, dan 10. Aktivitas tertinggi bila dilihat dari Gambar 6 yaitu pada pH 7

**Pengaruh suhu**

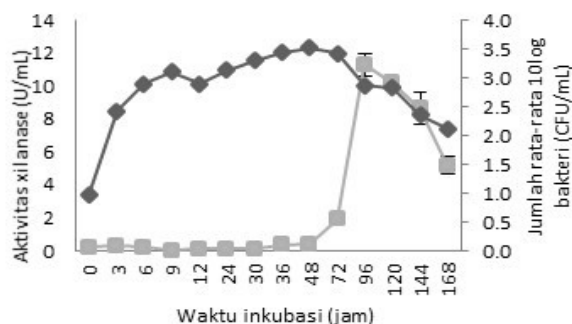
Aktivitas xilanase mengalami kenaikan seiring dengan suhu yang bertambah hingga mencapai suhu optimum 50 °C (6,802 U/mL), kemudian mengalami penurunan aktivitas sampai suhu 100 °C (Gambar 7). Pengamatan pengaruh suhu juga dilakukan pada pH 9 (Gambar 8). Maksud dari tidak ada perubahan suhu optimum? Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perubahan suhu optimum (50 °C) pada reaksi di bufer alkali pH 9, namun memiliki aktifitas yang lebih kecil yaitu sebesar 1,683 U/mL. Mohon dijelaskan pada pembahasan Pada reaksi enzim di pH 9, reaksi pada suhu 70 °C memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibanding pada pada suhu 60° C, dibandingkan rekasi pada pH 7.

**Stabilitas xilanase ada dihasil tapi tidak ada dalam metode.**

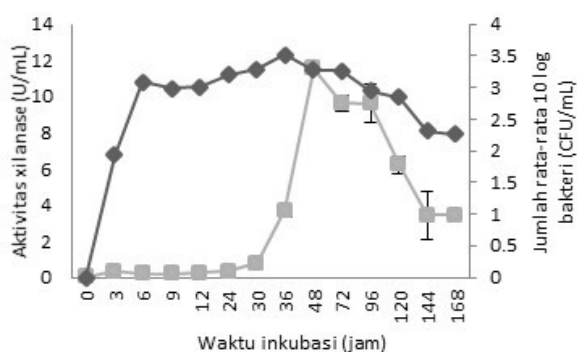
Xilanase dikatakan tidak stabil apabila aktivitas enzimnya turun hingga 50 %. Hal tersebut terjadi pada penyimpanan suhu optimum (50 °C) yang mengalami penurunan aktivitas mencapai 1,51 U/mL pada jam ke-2 dan terus



**Gambar 3.** Pohon filogenetik gen 16S rRNA Isolat XJ28 menggunakan metode Neighbor Joinin dengan bootstap 1000x ulangan pada program MEGA 5.05.



Gambar 4. Hubungan antara jumlah total *B. subtilis*XJ28 dengan aktivitas xilanase dalam medium xilan bagas 0,5 % pada pH 7 inkubasi pada suhu 30 °C dengan agitasi 150 rpm (■=Aktivitas xilanase, (◇ =TPC)

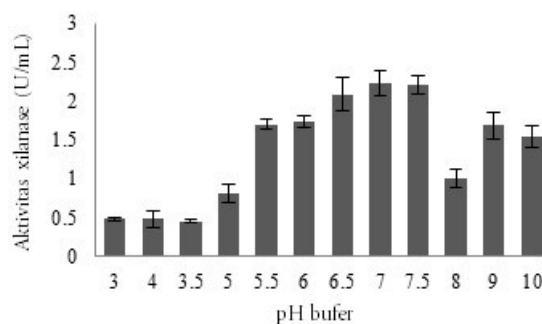


Gambar 5. Hubungan antara jumlah total TPC *B. subtilis* XJ28 dengan aktivitas xilanase dalam medium xilan beechwood (Sigma) 0,5 % pada pH 7 inkubasi pada suhu 30 °C dengan agitasi 150 rpm (■=Aktivitas xilanase, (◇ =TPC)

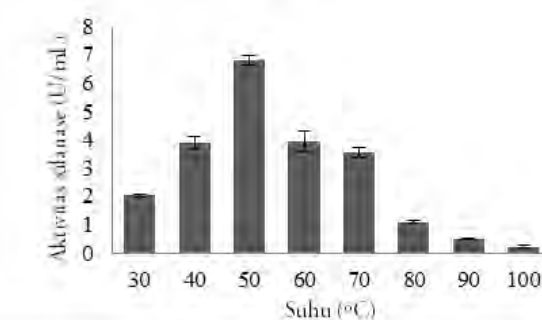
Tabel 6. Aktivitas xilanase dan selulase *B. subtilis*XJ28 pada substrat xilan bagas.

Tahap perlakuan	Hasil	
	Berat (g)	Penurunan
Bagas	1000	100
Delignifikasi	704,74	29,52
Ekstraksi xilan	98,8	9,9
Purifikasi xilan	34	3,4

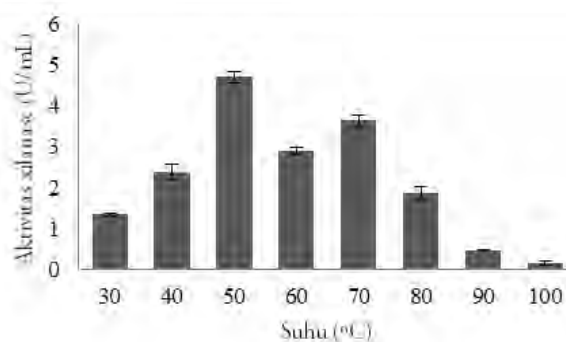
mengalami penurunan mencapai jam ke-72. Penyimpanan xilanase pada suhu refrigerator (4 °C) dan suhu ruang (XJ28 °C) masih stabil sampai jam ke-72 (Gambar 9). Pada suhu ruang cenderung fluktuatif sehingga penyimpanan paling stabil yaitu pada suhu refrigerator. Untuk menghilangkan pengaruh gula reduksi maupun garam pada larutan enzim maka dilakukan dialisis. Aktivitas xilanase sebelum dilakukan



Gambar 6. Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase (U/mL). Kondisi uji pada bufer sitrat fosfat (3-5,5), bufer fosfat (6-7,5) dan bufer glisin NaOH (8-10) pada suhu ruang selama 30 menit.



Gambar 7. Pengaruh suhu (°C) terhadap aktivitas xilanase (U/mL). Kondisi uji pada bufer fosfat 0,02 M pH 7 selama 30 menit.



Gambar 8. Pengaruh berbagai suhu (°C) terhadap aktivitas xilanase (U/mL). Kondisi uji pada bufer glisin NaOH 0,02 M pH 9 selama 30 menit

dialisis sebesar 8,0 U/mL, dan setelah proses mengalami penurunan aktivitas mencapai 6,44 U/mL. Hasil visualisasi KLT pada enzim sebelum didialisis (E1) dan sesudah dialisis (E2) menunjukkan masih adanya spot yang samar. Perubahan warna spot dari E1 ke E2 menunjukkan adanya gula reduksi yang terdialisis (Gambar 10), hal tersebut

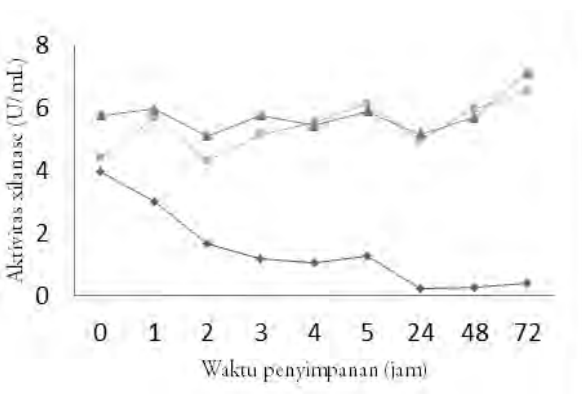
didukung oleh hasil uji gula reduksi yang turun dari 0,727 mg.mL menjadi 0,633 mg/mL (Tabel 7).

**Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hasil hidrolisis xilan bagas**

Proses hidrolisis yang dilakukan selama 5 jam menunjukkan peningkatan produk hasil hidrolisis. Adanya produk hidrolisis ditunjukkan dari adanya spot yang mengalami perubahan semakin jelas dari waktu reaksi 0 jam sampai 5 jam, jika dibandingkan dengan kontrol substrat dan enzim tanpa direaksikan. Hasil hidrolisis jam ke 2,5 dan 5 tidak berbeda nyata, artinya reaksi optimum dicapai oleh waktu terpendek yaitu jam ke-2,5. Jika dibandingkan dengan standar gula, hidrolisis xilan bagas menghasilkan gula dengan berat molekul seperti sukrosa. Adanya beberapa spot sampel yang muncul dibawah standar merupakan gula jenis xilooligosakarida (Gambar 10).

**PEMBAHASAN**

Gray *et al.* (2006) menyatakan bahwa biomassa yang tidak ditreatment akan bersifat *recalcitrant* pada proses pemecahan oleh enzim. *Pretreatment* akan merusak dinding sel tanaman dan akan mempermudah akses enzim pada polisakarida tanaman. Proses *pretreatment* pada penelitian ini bertujuan untuk mempermudah



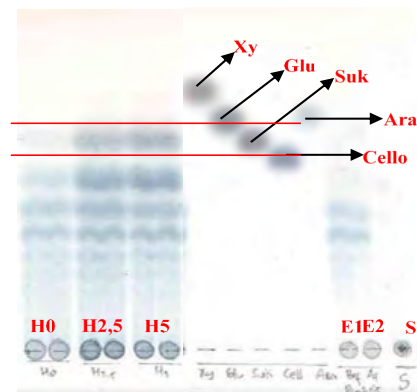
**Gambar 9.** Perbandingan lama waktu penyimpanan terhadap aktivitas xilanase pada berbagai kisaran suhu. (◊) suhu optimum 50 °C, (■) suhu ruang XJ28 °C dan (Δ) suhu refrigerator 4 °C

**Tabel 7.** Aktivitas xilanase sebelum dan sesudah proses dialisis.

Tahap perlakuan	Hasil	
	Berat (g)	Penurunan persentase (%)
Bagas	1000	100
Delignifikasi	704,74	29,52
Ekstraksi xilan	98,8	9,9
Purifikasi xilan	34	3,4

proses hidrolisis menggunakan enzim. Hasil analisis proksimat bagas berbeda dengan hasil analisis proksimat oleh Sandra *et al.* (2007). Perbedaan proksimatnya bagaimana? Perbedaan tersebut dipengaruhi beberapa faktor seperti perbedaan varietas tebu dan pengaruh pengambilan sampel acak di tempat yang berbeda. Faktor yang mempengaruhi tersebut tidak dapat dikontrol dan diseragamkan.

Xilan atau hemiselulosa berada diantara lignin dan kumpulan serat selulosa. Lapisan xilan berikatan secara kovalen dengan lignin dan non-kovalen dengan selulosa melalui ikatan hidrogen (Beg *et al.* 2001). Apabila delignifikasi dapat mengurangi jumlah lignin, maka secara otomatis ikatan xilan dengan selulosa akan mudah terputus. Pemecahan rantai polisakarida tersebut dengan lignin



**Gambar 10.** Visualisasi KLT hasil hidrolisis xilanase pada xilan bagas. (H0) jam ke-0; (H2,5) jam ke 2,5; (H5) jam ke-5. Dengan konsentrasi standar gula masing-masing 1000 ppm, (Xy) xilosa, (Glu) glukosa, (Suk) sukrosa, (Cello) selobiosa, dan (Ara) arabinosa, (E1) xilanase sebelum dialisis, (E2) xilanase setelah dialisis, dan (S) substrat xilan bagas 0,5 %.

akan memberikan peningkatan jumlah hemiselulosa yang dihasilkan. Fengel dan Wegener (1995) menyatakan bahwa untuk mendapatkan produk hemiselulosa, dalam proses delignifikasi terjadi kehilangan selulosa yang diakibatkan oleh degradasi oksidatif maupun hidrolitik. Penurunan jumlah selulosa maupun lignin dikarenakan terlarut di dalam NaOCl, sedangkan polisakarida yang mengendap adalah xilan. Kehilangan selulosa terjadi kemungkinan karena terlarut sebagai kompleks lignin-polisakarida.

Downie *et al.* (1994) pewarna merah-kongo dapat mengikat polisakarida dan akan memperjelas adanya zona bening. Adanya zona bening terjadi karena tidak adanya ikatan yang terbentuk antara pewarna dengan substrat. Data gambar 3, menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi pada waktu optimum tidak didukung oleh jumlah total bakteri di jam yang sama. Menurut Suhartono (1989) produksi dan peningkatan aktivitas enzim tidak selalu sejalan dengan tingkat pertumbuhan mikroba, ada aktivitas enzim yang meningkat pada saat sel mengalami fase stasioner. Coba di cek kembali pada penelitian Meryandini *et al.* (2009), aktivitas selulase isolat bakteri C5-3 tertinggi sebesar 0,026 nkat/mL pada inkubasi hari ke-2 tidak sejalan dengan pertumbuhan sel (log sel) yang mengalami penurunan jumlah dari hari pertama. Hal ini terjadi karena sel memproduksi enzim untuk mendapatkan nutrisi bagi pertumbuhannya. Setelah enzim diproduksi maka substrat dapat digunakan oleh sel bakteri untuk berkembangbiak. Perbedaan aktivitas xilanase dari xilan bagas dan xilan beechwood disebabkan karena struktur xilan. Struktur apa yang berbeda? coba dijelaskan yang berbeda antara keduanya. Xilan beechwood lebih cepat menginduksi xilanase. Selain perbedaan strukturnya hal tersebut diduga karena kandungan media produksi. Penggunaan ekstrak khamir dan bakto pepton sebagai sumber nitrogen terlebih dahulu digunakan oleh bakteri sebagai media pertumbuhannya. Konsentrasi nutrisi dalam medium pertumbuhan berpengaruh terhadap produksi xilanase oleh bakteri.

Penelitian Subramaniyan *et al.* (2001), *Bacillus* SSP-34 memproduksi aktivitas xilanase maksimum (380 U/mL) saat pertumbuhan mencapai 96 jam inkubasi dengan kandungan sumber nitrogen medium ekstrak khamir dan pepton 0,5 %.

Xilanase *Bacillus subtilis* XJ28 memiliki kondisi pH optimum yang sama dengan xilanase *Bacillus firmus* hasil penelitian Tseng *et al.* (2002). Xilanase yang telah diisolasi dari *Bacillus licheniformis* A99 (Archana dan Satyanarayana 1997) optimum pada pH 7. Hal serupa terjadi pula pada xilanase yang diisolasi dari *Bacillus coagulans* BL69 yang tumbuh pada sisa susu kedelai dan penurunan aktivitas yang drastis terjadi pada pH 8 (Heck *et al.* 2005). Adanya beberapa *peak* dalam penelitian ini dapat menunjukkan adanya lebih dari satu enzim atau isoenzim. Suhu berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Peningkatan aktivitas yang terjadi bisa dikarenakan enzim bekerja semakin reaktif pada suhu di atas suhu ruang. Hasil penelitian ini serupa dengan yang dilakukan Xilanase yang dihasilkan *Streptomyces actuosus* A-151 yang tumbuh dalam dedak padi memperlihatkan suhu optimumnya pada 60-70 °C (Wang *et al.* 2003). Kondisi optimum dibutuhkan xilanase untuk membentuk kompleks enzim-substrat pada sisi aktif enzim sehingga mengaktifkan seluruh enzim untuk mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Penyimpanan dalam suhu kulkas memiliki aktivitas xilanase terstabil selama 72 jam, hal tersebut di perkuat oleh pernyataan Suhartono (1989) bahwa dalam suhu dingin enzim tidak akan mengalami perubahan konformasi, sehingga daya katalitik dalam mengikat substrat masih reaktif menurunnya aktivitas enzim dari pH optimum bisa disebabkan oleh berubahnya keadaan ion enzim dan seringkali juga keadaan ion substrat.

Namun dalam bufer pH alkali 9, xilanase menunjukkan aktivitas yang tinggi kembali. Berdasarkan penelitian Wang *et al.* (2010), *Bacillus pumilis* BYG optimum pada pH alkali 8-9 dalam reaksi suhu 50 °C, menyimpulkan bahwa xilanase yang dihasilkan merupakan alkalin xilanase yang termostabil. Hasil

pengujian pengaruh enzim pada pH 9 didapatkan suhu optimum yang sama dengan pengujian pada suhu 50 °C. Xilanase yang dihasilkan *Bacillus* sp XJ28 merupakan penghasil xilanase bebas selulase yang dapat diaplikasikan dalam proses pembuatan kertas, karena pada proses tersebut terjadi secara alkali dan suhu panas yang stabil. Wang *et al.* (2010) menjelaskan bahwa dalam industri kertas proses kondisi pemutihan kertas umumnya enzim yang aktif pada nilai pH yang tinggi. Proses dialisis xilanase bertujuan untuk menghilangkan adanya garam dan beberapa ion dari larutan enzim. Endo- $\beta$ -xilanase pada penelitian Yamani *et al.* (2012) setelah dialisis dalam bufer fosfat pH 5 selama kurang lebih satu jam xilanase mengalami penurunan sebesar 0,199 U/mL. Setelah dialisis diharapkan kandungan gula reduksi banyak berkurang. Hal tersebut didukung oleh hasil visualisasi TLC yang menunjukkan mudarnya spot yang dihasilkan enzim setelah dialisis.

Gula hasil hidrolisis xilan bagas memiliki BM kurang lebih dari BM sukrosa. Xilanase yang dapat memecah xilan menjadi dua satuan monosakarida adalah endo-1,4- $\beta$ -xilanase yang dapat memecah rantai utama xilan bagian tengah secara acak namun hasilnya tidak sempurna yaitu berupa dimer dan yang masih memiliki rantai samping atau xilo-oligosakarida (Himmel 2008). Hidrolisis sempurna akan mengubah suatu polisakarida menjadi monosakarida, hidrolisis sempurna xilan menjadi xilosa masih membutuhkan peran  $\beta$ -xilosidase. Hasil analisa sequencing dan filogenik tidak dibahas dalam pembahasan

## KESIMPULAN DAN SARAN

Xilan hasil *pretreatment* bagas menghasilkan xilan yang dapat menginduksi *Bacillus subtilis* XJ28 yang hampir sama dengan birchwood (Sigma). Karakteristik xilanase terbaik didapatkan pada pH 7 dan 9 dengan suhu optimum 50 °C dan stabilitas terbaik pada suhu refrigerator 4 °C selama 72 jam. Hasil KLT hidrolisis xilan 0,5 %

oleh xilanase ekstrak kasar menghasilkan gula berberat molekul mirip sukrosa. Produk hidrolisis berupa disakarida maupun oligosakarida dapat digunakan sebagai bahan dasar dalam beberapa aplikasi bioteknologi. Namun, masih perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan penelitian ini dapat terlaksana atas bantuan berbagai pihak. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Puslit Bioteknologi-LIPI dan Kepala Bidang Bioproses, Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi LIPI yang telah memberikan izin dan tempat untuk melaksanakan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Archana, A. & T. Satyanarayana. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzym Microbial Technology*. 21:12-17.
- Beg, QK., M. Kapoor, L. Mahajan, & GS. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 326–338.
- Downie, B., HWM. Hilhorst, & JD. Bewley. 1994. A new assay for quantifying endo- $\alpha$ -D-mannanase activity using congo-red dye. *Pythochemistry* 36:829-835.
- Fengel, D. & G. Wegener. 1995. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter and Co, Berlin.
- Gray, KA., L. Zhao, & M. Emptage. 2006. Bioethanol. *Chemical Biology Journal* 10: 141-146.
- Heck, J., S. Flore, P. Hertz, & M. Ayub. 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Progress in Biochemical Journal*. 40:107-112.
- Himmel, ME. 2008. *Biomass recalcitrance; deconstructing the plant cell wall for*



- bioenergy*. Blackwell Publishing. Singapore.
- Iranmahboob, J., F. Nadim, & S. Monemi. 2002. Optimizing acid-hydrlysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy*. 22: 401-404.
- Lavarack, BP.,GJ. Griffin, &D. Rodman. 2002. The acid hydrolysis of sugarcane bagas hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose & other products. *Biomass Bioenergy*. 23:367-380.
- Meryandini, A., W. Widosari, B. Maranatha, TC. Sunarti, N. Rachmania, & H. Satria. 2009. Isolasi bakteri selulotik dan karakteristik enzimnya. *Makara Sains*. 13(1):33-38.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- Richana, N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio*. 1:29-36.
- Richana, N., TT. Irawadi, MA Nur, MA., Sailah, I., Syamsu, K., & Arkenan, Y. 2007. Ekstraksi xilan dari tongkol jagung. *Jurnal Pascapanen*. 4(1):38-43.
- Samsuri, M., M. Gozan, A. Wijanarko, H. Hermansyah,PPDK. Wulan, S. Dianur, M. Nasikin, & B. Prasetya. 2009. Hydrolysis of bagas by cellulase and xylanase for bioethanol production in simultaneous saccharification & fermentation. *Journal of Applied and Industrial Biotechnology*. 2 (2):1979-9784.
- Sandra, GMR., AR. Rafael, SG. Carlos, CC. Alin, & R. Filho. 2007. Pretreatmentof sugarcane bagas with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. School of Chemical Engineering, UNICAMP, Brazil.
- Subramaniyan, S., GS. Sandhia, & P. Prema. 2001. Biotech control of xylanase production without protease activity in *Bacillus* sp. by selection of nitrogen source. *Biotechnology Letter*. 23:369-371.
- Suhartono, MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Tseng MJ, MN. Yap, K. Ratanakhanokchai, KL. Khin, & ST. Chen. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzymes and Microbial Technology*. 30: 590-595.
- Wang, J., W. Zhang, J. Liu, Y. Cao, X. Bai, Y. Gong, P. Cen, & M. Yang. 2010. An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. *Molecular Biology Report*. 37:3297-3302.
- Wang, SL., YH. Yen, IL. Shih, AC. Chang, WT. Chang, WC. Wu, & YD. Chai. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus*A-151. *Enzymes and Microbial Technology*. 33:917-925.
- Yamani, LN., AF. Kristanti, & NNT. Pusaningsih. 2012. The preliminary study of antioxidant activity from xylooligosaccharide of corncob (*Zea mays*) hydrolysis product with endo-xylanase enzyme. *Indonesian Journal of Tropical & Infectious Disease*. 3(2).
- Zheng, H., B. Guo, XL. Chen, SJ. Fan, & YZ. Zhang. 2011. Improvement of the quality of whet bread by addition of glycoside hydrolase family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90: 509-515.