

JRL	Vol.7	No.3	Hal. 205 - 215	Jakarta, November 2011	ISSN : 2085.3866 No.376/AU1/P2MBI/07/2011
-----	-------	------	----------------	---------------------------	--

XILANASE PEMUTIH PULP DAN KERTAS RAMAH LINGKUNGAN: Karakterisasi Dan Stabilisasi *Xilanase Bacillus licheniformis* I-5

Budiasih Wahyuntari¹ , Wibowo Mangunwardoyo²

¹. LAPTIAB, Pusat Ilmu Pengetahuan dan Teknologi–BPPT, Serpong, Tangerang 15314.

²Departmen Biologi, Fakultas Matematik dan Ilmu Pengetahuan Alam-UI Depok 16424.

email: budiasih.wahyuntari@bppt.go.id; solichin.budiasih@gmail.com

Abstrak

Isolat I-5 diisolasi dari Sumber air panas Ciseeng, Jawa Barat dan telah diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* I-5. Isolat tersebut memproduksi enzim xilanolitik ekstrasel pada medium Luria Bertani yang mengandung xilan oat spelt. Hasil penagamatan menunjukkan bahwa aktivitas optimum larutan enzim kasar pada suhu 50°C dan pH 7. Pengaruh sodium dodesil sulfat, merkaptotetanol dan Triton X-100 juga diamati. Inkubasi larutan enzim kasar dalam larutan *buffer* yang mengandung SDS 1.5% dan β merkaptotetanol pada 50°C selama 90 menit emudian ditambah Triton X-100 dengan konsentrasi akhir 3.5% selama 45 menit hanya menurunkan aktivitas enzim sebanyak 5.57% dari aktivitas awal. Analisis SDS/PAGE dan zimogram menunjukkan bahwa sedikitnya dalam larutan enzim kasar terdapat dua enzimxilanolitik. Berat molekul enzim diperkirakan 127 dan 20kD. Enzim xilanolitik yang diamati mampu menghidrolisis xilan menjadi xilobiosa, xilotriosa dan xilooligosakarida yang lebih panjang lainnya. Uji stabilitas termal larutan enzim kasar menunjukkan bahwa waktu paruh enzim yang diinkubasi pada 50, 60 dan 70°C pada pH 7 masing-masing 2 jam 55 menit, 2 jam 33 menit dan 1 jam 15 menit. Waktu paruh pada 50, 60 dan 70°C pada pH 8 masing-masing 2 jam 48 menit, 1 jam 22 menit dan 1 jam 9 menit.

kata kunci: Xilanase, *Bacillus licheniformis* I-5, stabilitas termal

XYLANASE, AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY BLEACHING AGENT FOR PULP AND PAPER: Characterization And Stabilization Study Of *Bacillus* *licheniformis* I-5 CRUDE Xylanase

Abstract

Isolate I-5 was isolated from Ciseeng hot spring, West Java and was identified as Bacillus licheniformis I-5. The isolate produces extracellular xylanolytic enzymes on Oatspelt containing Luria broth agar medium. Optimal activity of the crude enzyme was

observed at 50°C and pH 7. The effect of sodium dodecyl sulphate, β -mercaptoethanol and Triton-X100 were observed. Incubating the crude enzyme in 1.5% SDS and 1.5% β -mercaptoethanol at 50°C for 90 minutes then adding Triton-X100 at final concentration of 3.5% for 45 minutes only reduced 5.75% of the initial enzyme activity. SDS/PAGE and zymogram analysis showed that at least two xylanolytic enzymes presence in the crude enzyme. The molecular weight of the enzyme was estimated about 127 and 20kD. The enzyme hydrolysed xylan into xylobiose, xylotriose and other longer xylooligosaccharides. Thermal stability of the crude enzyme was observed at 50, 60, and 70°C and pH 7 and 8. The results showed that the half time of the crude enzyme incubated at 50, 60, and 70°C pH 7 was 2 hours 55 minutes; 2 hours 33 minutes and 1 hour 15 minutes respectively. The half time at 50, 60 and 70°C, pH 8 was 2 hours 48 minutes; 1 hour 22 minutes and 1 hour 9 minutes respectively.

keywords: Xylanase, *Bacillus licheniformis* I-5, thermal stability

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Xilan adalah suatu polisakarida kompleks dengan rantai utamanya tersusun atas rangka residu xilose dengan ikatan β -1,4 glikosida (Beg *et al*, 2001). Xilan merupakan polisakarida hemiselulosa yang paling umum terdapat pada dinding sel tanaman dengan kandungan 30-35% dari berat kering totalnya (Joseleau *et al*, 1992). Kebanyakan xilan merupakan heteropolisakarida dengan berbagai macam substitusi pada rantai utama dan cabang (Biely, 1985). Substitusi yang umum terdapat pada rantai utama adalah residu asetil, arabinosil, dan glukuronisil (Whistler dan Richards, 1970). Kandungan xilan dalam kayu keras lebih banyak (15-30%) dibandingkan dalam kayu lunak (7-12%) (Whistler dan Richards, 1970 dan Wong *et al*, 1988). Xilan dalam kayu keras adalah 0-acetyl-4-O-metilglukuronoxilan, yang paling sedikit terdiri atas 70 residu β -xilopiranosida dengan rata-rata derajat polimerisasi (DP) antara 150 and 200 dengan ikatan β -1,4-glikosida. Xilan dari kayu lunak terdiri atas arabino-4-O-metilglukuroxilan dan mengandung lebih banyak asam 4-O-metilglukuronat daripada xilan kayu keras.

Gugus asetil tidak terdapat pada xilan kayu lunak sedangkan xilan dari kayu keras banyak mengandung gugus asetil. Gugus tersebut yang menentukan tingkat kelarutan xilan dalam air. Gugus asetil dalam xilan dapat dengan mudah dihilangkan dengan menggunakan alkali. Polimer xilan kayu lunak lebih pendek daripada kayu keras dengan derajat polimerisasi 70-130 dan juga memiliki cabang lebih sedikit (Sunna dan Antranikian, 1997)

Berdasarkan komposisi xilan yang merupakan heteropolimer maka untuk menghidrolisis secara sempurna memerlukan beberapa jenis enzim hidrolisis dengan berbagai spesifisitas dan model reaksi yang berbeda-beda. Sistem enzim xilanolitik terdiri

atas β -1,4-endoxylanase, β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetyl xylan esterase, dan asam fenolat (asam ferulat dan *p*-kumarat) esterase (Beg *et al*, 2001). Sistem enzim multifungsi dapat ditemui dalam fungi (Belancic *et al*, 1995 dan Biely *et al*, 1985), aktinomisetes (Elegir *et al*, 1995), dan bacteria (Dey *et al*, 1992).

Selama dekade terakhir ini pemanfaatan enzim microbial telah lama menarik perhatian mengingat potensi penggunaannya di dalam berbagai proses industri bioteknologi seperti industri pangan, pakan, pulp dan kertas (Bajpai, 1999; Kuhad dan Singh, 1993; Niehaus *et al*, 1999; Wong dan Saddler, 1992). Untuk saat ini yang paling menjanjikan adalah penggunaan xilanase untuk *prebleaching* pulp sehingga akan sangat mengurangi penggunaan *bleaching* kimiawi yang tidak ramah lingkungan. Alasan penggunaan enzim ini karena selain limbahnya ramah lingkungan juga dapat meningkatkan kualitas kertas dari segi kecerahan (*brightness*) (Kulkarni *et al*, 1999; Ragauskas *et al*, 1994). Dalam unit pengolahan pulp, proses *prebleaching* dilakukan dalam tangki stok pulp dengan suhu 60°C dan bersifat alkalin, oleh karena itu xilanase yang digunakan harus stabil dan aktif pada suhu dan pH tersebut (Beg *et al*, 2001).

1.2 Tujuan dan Sasaran

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik dan stabilitas enzim kasar (*crude enzyme*) yang diproduksi oleh *B.licheniformis* I-5. Adapun sifat yang diamati adalah suhu dan pH optimum enzim, stabilitas enzim terhadap deterjen Sodium Dodesil Sulfat (SDS), Triton X-100 dan pendenatauran β -merkaptotanol, suhu diatas optimum dan pH alkalin serta mengamati produk hidrolisis xilanase terhadap xilan.

Sasaran penelitian ini adalah pemanfaatan enzim sebagai reagen pemutih pulp dan kertas ramah lingkungan.

II. METODOLOGI

2.1 BAHAN

Isolat bakteri. Isolat bakteri I-5 digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari sumber air panas Ciseeng, Jawa Barat. Berdasarkan uji morfologi, fisiologi, biokimia dan deret 16sRNA, isolat tersebut diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* I-5 (Helianti *et al*, 2008).

2.2 METODE

1) Produksi enzim

Produksi enzim xilanase dilakukan menggunakan medium cair berdasarkan metode Nakamura *et al* (1995). Didalam 100 ml medium mengandung 5 g xilosa, 5 g yeast extract, 10 g bactopecton, 1 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ dan 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, larutan medium diatur pH nya menjadi pH 7 menggunakan 10% HCl. Produksi enzim sebanyak 500 ml menggunakan Erlenmeyer 2500 ml dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 150 rpm, 50°C selama 20 jam. Larutan enzim kasar dipisahkan dari sel menggunakan sentrifus berpendingin pada 4°C dengan kecepatan 4000 X g selama 15 menit. Larutan enzim kasar bebas sel dimasukkan ke dalam membrane dialisis dan di timbuni dengan Kristal polietilen glicol 6000 dalam gelas beaker dan disimpan dalam ruang berpendingin pada 4°C hingga volume akhir larutan 20 ml. Larutan enzim pekat ini disimpan pada suhu 4°C selama digunakan untuk percobaan.

2) Penentuan kadar protein dan aktivitas enzim.

Kandungan protein dalam larutan enzim kasar ditentukan berdasarkan metode Bradford (1976) menggunakan bovine serum albumin fraksi V (Sigma) sebagai standard. Aktivitas enzim diukur berdasarkan Bailey (1992). Dua ratus µl larutan enzim bebas sel di tambahkan ke dalam 800 µl suspensi 1 gram xilan oat spelt dalam 100 ml bufer fosfat (pH 7). Campuran reaksi tersebut di inkubasi

pada suhu pengamatan selama 5 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1500 µl 3,5- asam Di Nitro Salisilat (DNS) dan kemudian disentrifugasi pada 4°C, 1100 x g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dipanaskan pada 100°C selama 5 menit. Absorbansi supernatan diukur pada λ 540 nm terhadap reagen blanko. Satu unit aktivitas xilanase di definisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan gula pereduksi yang setara dengan 1 µmol xilosa per menit pada kondisi pengujian.

3) Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim.

Aktivitas xilanase diukur pada berbagai pH dengan kisaran dari 4 sampai 10 pada suhu 50°C (suhu produksi enzim) menggunakan substrat suspensi 1 gram xilan oat spelt dalam 100 ml larutan bufer fosfat. Pengamatan pada pH 4, 5, and 6 menggunakan bufer sitrat-fosfat 0.05 M, pH 7 dan 8 menggunakan bufer fosfat 0.05 M, pH 9 menggunakan bufer Tris-HCl 0.05 M, dan pH 10 menggunakan bufer glisin-NaOH 0.05 M. Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanas diamati pada berbagai suhu berkisar dari 30 s/d 100°C dengan interval 10°C pada pH optimum yang didapatkan dari percobaan sebelumnya.

4) Pengaruh Sodium Dodesil Sulfat, β merkaptotetanol dan Triton X-100 terhadap aktivitas xilanase.

Sodium Dodesil Sulfat (SDS), β merkaptotetanol adalah pendenaturasi protein yang digunakan dalam sistem elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE). Triton X-100 digunakan untuk renaturasi protein yang terdenaturasi dalam sistem. Tujuan percobaan ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi SDS dan β -merkaptotetanol tertinggi bagi enzim tetapi enzim masih tetap dapat di renaturasi selama analisis zymogram. Larutan enzim di inkubasi dalam bufer Tris HCl 15mM pH 6.8 yang mengandung SDS 0.0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5%

selama 90 menit kemudian campuran reaksi tersebut ditambah Triton X-100 dengan konsentrasi akhir 0.0; 0.5; 1.5; 2.5; 3.5% selama 45 menit. Aktivitas residu enzim diukur menggunakan metode DNS sebagaimana disebutkan diatas. Pengaruh β mercaptoethanol terhadap aktivitas diamati dengan menginkubasi enzim selama 90 menit dalam larutan buffer Tris HCl 1.5mM pH 6.8 yang mengandung SDS pada konsentrasi dimana enzim dapat mempertahankan aktivitasnya. Konsentrasi β mercaptoethanol yang diamati 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5%. Setelah inkubasi, campuran reaksi ditambah Triton X-100 dan diinkubasi selama 45 menit pada konsentrasi dimana enzim menunjukkan aktivitas tertinggi. Aktivitas enzim tersisa diukur dengan menggunakan metode DNS sebagaimana disebutkan diatas.

5) Elektroforesis gel dan analisis zimogram.

Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel elektroforesis (SDS-PAGE) dan zimogram digunakan untuk memperkirakan berat molekul enzim xilanolitik berdasarkan metode yang dimodifikasi. Sunna *et al* (1997) Konsentrasi gel pemisah 10% dengan kondisi operasi elektroforesis pada 100 V, 100 mA selama 1,5 jam dengan menggunakan *water cooler* suhu 4°C. Penanda protein yang digunakan adalah *Low Molecular Weight* (LMW) marker dan *High Molecular Weight* dari Amersham Bioscience. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan Triton-x 100 selama 45 menit dengan konsentrasi optimum, kemudian gel diinkubasi dalam larutan substrat xilan *oat spelt* dan xilan *beech wood* 1% pada suhu dan pH optimum xilanase selama 15 menit. Gel yang telah diinkubasi kemudian diletakkan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 1 jam, kemudian direndam dalam larutan *congo red* 1% selama 20 menit dan dicuci menggunakan larutan NaCl 1 M hingga

terlihat pita yang berwarna lebih muda (bening). Gel yang telah dicuci kemudian direndam dalam larutan HCl 1N. Gel yang berisi penanda protein diwarnai dengan larutan *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

6) Aktivitas hidrolisis xilanase *B. licheniformis* I-5 terhadap xilan.

Reaksi hidrolisis enzim terhadap xilan dilakukan dengan 1% oat spelt xilan. Larutan enzim kasar xilanase sebanyak 50 μ l (20U/ml) di campur dengan 50 μ l xilan oat spelt 1% dalam buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 5/mM pH 7 dan diinkubasi pada 50°C selama 3 jam. Hasil hidrolisis dianalisa secara kualitatif dengan metode *Thin-layer Chromatography* (TLC) berdasarkan modifikasi metode Ratanakhanokchai *et al* (1999) menggunakan lempeng gel silica 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany). Pelarut yang digunakan adalah butanol-Asetat 0.1M -air dengan perbandingan 2:1:1. Spot yang terbentuk pada lempeng TLC dideteksi dengan menyemprotkan campuran 4 ml aniline-4g α -difenilamin -200 ml aseton-30 ml H₃PO₄ 80%. Standar yang digunakan adalah xilosa, xilobiosa, xilotriosa, dan xilotetraosa (Megazyme, Wicklow, Ireland).

7) Stabilitas xilanase *B. licheniformis* I-5 terhadap suhu dan pH.

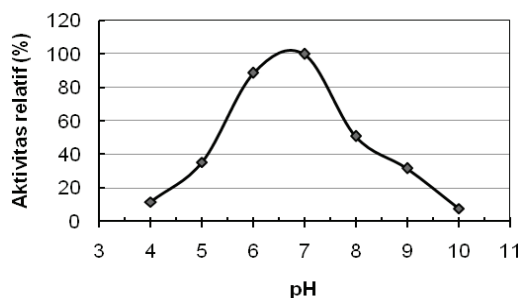
Stabilitas aktivitas xilanase *B. licheniformis* I-5 diuji dengan menggunakan kisaran suhu dan pH optimum yang didapat pada percobaan pengaruh pH dan pada suhu 60 dan 70°C dengan variasi pH 7 dan 8. Uji dilakukan dengan menginkubasi 0,2 ml xilanase pada kondisi suhu serta pH pengamatan tersebut diatas, kemudian aktivitasnya diukur setiap selang waktu 15 menit selama 120 menit. Untuk menentukan stabilitas enzim digunakan parameter waktu paruh. Waktu paruh didefinisikan sebagai waktu yang dibutuhkan hingga aktivitas enzim tinggal setengah dari aktivitas semula pada kondisi (pH dan suhu) pengamatan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Xilanase.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim kasar pada pH 7 (Gambar 1) dan suhu 50°C (Gambar 2). Beberapa penelitian yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim xilanolitik dari *Bacillus* sp. berkisar antara 5-10, dengan suhu optimum berkisar 50-75°C tergantung pada spesiesnya. Aktivitas optimum xilanase dari *Bacillus* sp. K-1 pada pH 5.5, dan suhu 60°C (Ratanakhanokchai et al, 1999), *Bacillus* sp. AR-009 pada pH 9-10, 60-75°C (Gessesse, 1998), *Bacillus* sp. NCIM pada pH 6, 50-60°C (Dey et al, 1992). Sebagian besar aktivitas optimum xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp adalah berkisar pada pH netral dan suhu 50-60°C.

Mengingat percobaan ini masih menggunakan larutan enzim kasar, sehingga kemungkinan dalam larutan tersebut terdapat lebih dari satu jenis enzim xilanolitik, sehingga untuk mengetahui kondisi pH dan suhu optimum masing-masing enzim diperlukan proses pemurnian.

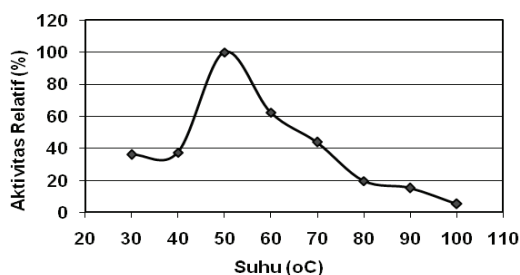


Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase *Bacillus licheniformis* 1-5 pada 50°C

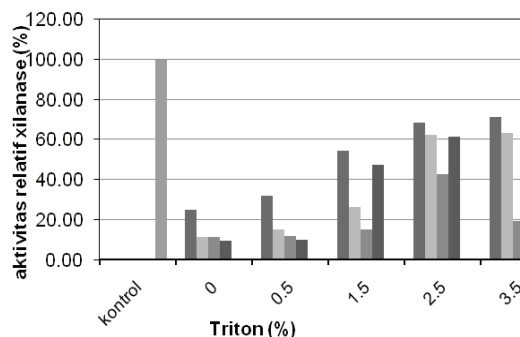
3.2 Pengaruh Sodium Dodesil Sulfat, β merkaptotanol dan Triton X-100 terhadap aktivitas xilanase.

Hasil percobaan (Gambar 3) menunjukkan bahwa perlakuan penambahan denaturan SDS 0.1% tanpa perlakuan renaturasi dengan Triton X-100

menyebabkan penurunan aktivitas enzim hingga lebih rendah dari 20%. Perlakuan dengan Triton X-100 0.5-1.5% juga tidak cukup untuk merenaturasi enzim yang telah terdenaturasi oleh SDS. Perlakuan Penambahan Triton X-100 3.5% mampu mengembalikan 60% aktivitas enzim yang telah mendapat perlakuan SDS 1.5%.



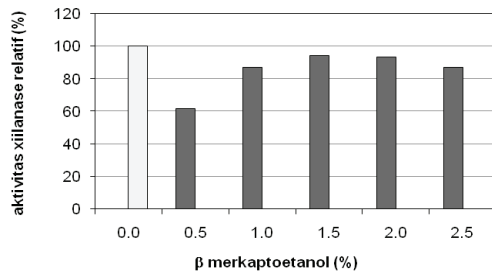
Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase *Bacillus licheniformis* 1-5 pada pH 7



Gambar 3. Pengaruh SDS dan Trinitron-X 100 terhadap aktivitas xilanase *Bacillus licheniformis* 1-5 pada pH 7

■ SDS 0.1 % ■ SDS 0.5 %
■ SDS 1.0 % ■ SDS 1.5 % = kontrol

Berdasarkan data tersebut maka konsentrasi SDS yang dapat digunakan dalam prosedur zimogram adalah 1.5% dan Triton X-100 3.5%. Untuk mengamati pengaruh SDS dan β merkaptotanol terhadap aktivitas xilanase, larutan enzim diinkubasi selama 90 menit dalam *buffer* yang mengandung SDS 1.5% dan berbagai konsentrasi β merkaptotanol, kemudian ditambahkan larutan Triton X-100 3.5% selama 45 menit.



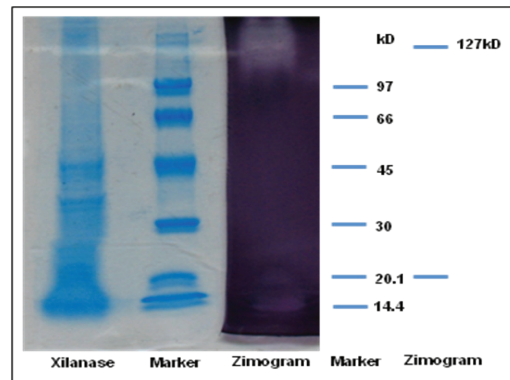
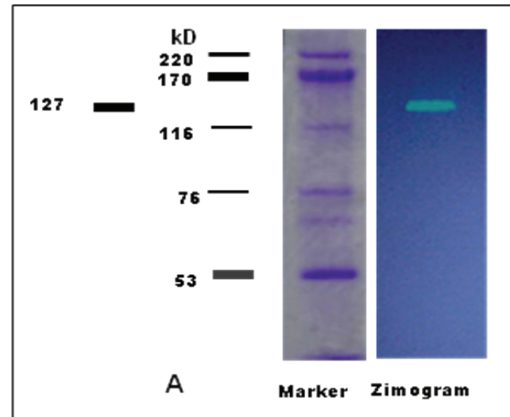
Gambar 4. Pengaruh SDS 1.5 %, β merkaptotanol dan triton x-100 3.5 % terhadap aktivitas aktivitas xilanase *B. licheniformis* I-5

Hasil pengujian (Gambar 4) menunjukkan bahwa aktivitas enzim tersisa yang tertinggi setelah direnaturasi dengan Triton X-100 3.5% adalah larutan enzim yang didenaturasi menggunakan SDS 1.5% dan β merkaptotanol 1.5% yaitu 94.25%. Oleh karena itu dalam memperkirakan berat molekul enzim menggunakan metode zimografi, konsentrasi SDS, β merkaptotanol dan Triton X-100 berturut-turut masing-masing 1.5; 1.5 dan 3.5%.

3.3 Elektroforesis Gel dan Analisis Zimogram.

Analisis sodium dodesil sulfat-elektroforesis gel akrilamida (SDS-PAGE) dan zimogram dengan menggunakan penanda protein dengan berat molekul besar (*High Molecular Weight*) terdapat satu pita bening yang menunjukkan adanya aktivitas xilanolitik dengan perkiraan berat molekul 127kD (Gambar 5A). Sedangkan analisis elektroforesis gel dan zimogram dengan menggunakan penanda protein dengan berat molekul kecil (*Low Molecular Weight*) menunjukkan bahwa *B. licheniformis* I-5 memproduksi sedikitnya 2 (dua) enzim xilanolitik dengan perkiraan berat molekul 127 dan 20 kD (Gambar 5B). Beberapa spesies dari *Bacillus* dilaporkan memproduksi dua enzim xilanolitik. Berat molekul xilanase *Bacillus thermoleovorans* K-3d, 49 dan 69kD; *Bacillus flavothermus* LB3A, 80 dan 130kD Ratanakhanokchai 2t al, 1999), *Bacillus* sp

C-125 adalah 16 dan 43 kD (Honda et al, 1985), *Bacillus circulans* WL-12, 15 dan 85 kD (Esteban et al, 1982) *Bacillus* sp W-1, 21.5 dan 49.5 kD dan *Bacillus* sp W-2, 22.5 dan 50 kD (Okazaki et al, 1985).



Gambar 5. Gel elektroforesis dan zimogram xilanase *Bacillus licheniformis* I-5: dengan penanda protein *High Molecular Weight* (A), dan dengan penanda protein *Low Molecular Weight* (B).

Mengingat xilan sebagai substrat xilanase merupakan suatu senyawa kompleks sehingga untuk menghidrolisis secara enzimatis dibutuhkan beberapa jenis enzim xilanolitik, antara lain endoxilanase, arabinofuranosidase, β -xilidase (Kulkarni et al, 1999). Dalam percobaan ini larutan enzim yang digunakan berupa larutan kasar enzim sehingga kemungkinan besar masih

merupakan campuran beberapa jenis enzim xilanolitik dan yang menunjukkan zona bening paling intensif pada uji zimogram adalah enzim dengan berat molekul 20 dan 127kD. Untuk mengetahui kedua jenis enzim dalam larutan enzim kasar *B. licheniformis* I-5 tersebut perlu dilakukan pemurnian dan karakterisasi masing-masing enzim.

3.4 Analisis Produk Hidrolisis Xilanase.

Hasil hidrolisis xilan oat spelt oleh xilanase selama 3 jam menghasilkan xilobiosa, dan spot diantara xilotriosa dan xilotetraosa serta xilooligomer yang lebih panjang lainnya (Gambar 6).



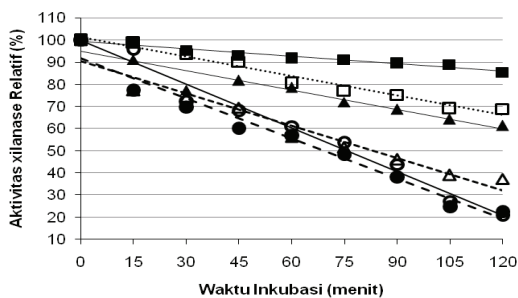
Gambar 6. Thin Layer Chromatogram, 1. Standards: X1-xylose; X2-xylobiose; X3-xylotriose; X4-xylotetraose, 2. Hidrolisat xilan (50°C, pH 7, 3 jam)

Intensitas spot yang tinggi antara lain xilobiose dan xilooligomer yang lebih besar daripada xilotetraosa. Hidrolisat tersebut serupa dengan hasil hidrolisis oleh *Bacillus* sp strain TAR-1 seperti yang dilaporkan oleh Nakamura et al, (1995), yang menyatakan bahwa produk yang dihasilkan merupakan akibat kegiatan endoxilanase yang menghidrolisis substrat

xilan secara acak. Berdasarkan data diatas, kemungkinan besar salah satu enzim xilanolitik yang terdapat dalam larutan enzim kasar yang digunakan dalam percobaan adalah kelompok enzim endoxilanase

3.5 Stabilitas Xilanase *B. Licheniformis* I-5 terhadap Suhu dan pH.

Pengamatan stabilitas larutan enzim xilanase kasar tanpa substrat pada berbagai suhu dan pH disajikan pada Gambar 7. Waktu paruh enzim yang diinkubasi pada suhu dan pH optimum (50°C, pH 7) hampir 3 jam (2 jam 55 menit). Inkubasi enzim dalam buffer pH 7 pada suhu 60 dan 70°C, waktu paruh enzim masing-masing 2 jam 33 menit dan 1 jam 15 menit, sedangkan pada pH 8, suhu 60 dan 70°C, waktu paruhnya masing-masing 1 jam 22 menit dan 1 jam 9 menit (Tabel 1). Xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus thermoleovorans* K-3d dan *B. flavothermus* LB3A dilaporkan stabil selama 2 jam pada pH 7, suhu 70°C, tetapi waktu paruhnya masing-masing hanya tinggal 18 dan 10 menit pada suhu 80°C (Sunna et al, 1997).



Gambar 7. Stabilitas xilanase *Bacillus licheniformis* 1-5 pada berbagai suhu pH 7

■ pH 7-50C □ pH 8-50C ▲ pH 7-60C
△ pH 8-60C ● pH 7-70C ○ pH 8-70C

Beberapa peneliti mempelajari stabilitas enzim dengan cara menginkubasi enzim pada pH dan suhu tertentu tanpa substrat selama 30 menit, kemudian mengukur sisa aktivitasnya. Morales et al, 1995 mengamati stabilitas 3 enzim xilanolitik yang diproduksi oleh *B. polymyxa* yaitu

xilanase X34C, X34E dan X22. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada 55°C, pH 7, aktivitas X34C tinggal 30%, X22: 40% sedangkan X34E hanya kehilangan 12% dari aktivitasnya setelah diinkubasi pada suhu yang sama selama 4 jam. Berdasarkan persamaan regresi (Gambar 7), maka inkubasi xilanase *B. licheniformis* I-5 pada pH 7 selama 30 menit pada 50, 60 dan 70°C, aktivitas yang tersisa adalah masing-masing 95.97; 85.97 dan 80.17% dan pada pH 8, aktivitas yang tersisa masing-masing 92.44; 75.86 dan 73.54%. Berdasarkan data tersebut maka xilanase yang diproduksi oleh *B. licheniformis* I-5 pada pH 7 memiliki stabilitas lebih baik daripada enzim serupa yang diproduksi oleh *B. polymyxa* hasil pengamatan Morales et al, (1995).

Tabel 1. Waktu paruh ($t_{1/2}$) xilanase *B. licheniformis* I-5

Waktu paruh (jam:menit)			
	50°C	60°C	70°C
pH 7	2:55	2:33	1:15
pH 8	2:49	1:22	1:09

Beberapa laporan mengenai penggunaan Xilanase untuk *prebleaching* pulp menghendaki enzim yang stabil pada suhu 55-70°C dengan pH alkalin antara 9-10 (Kulkarni dan Rao, 1996; Zheng et al, 2000; Dwivedi, et. al, 2010). Sedangkan xilanase untuk menghilangkan tinta pada kertas bekas memerlukan kondisi proses pada suhu 50°C, pH 7 dengan pengadukan kontinyu selama 30 menit (Pala et al, 2006). Berdasarkan hasil laporan diatas, xilanase yang digunakan dalam penelitian ini akan lebih sesuai digunakan untuk deinking kertas bekas karena enzim tersebut pada kondisi operasi deinking (suhu 50°C, pH 7) memiliki stabilitas cukup baik dengan waktu paruh 2 jam 55 menit.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hidrolisis xilan dan uji

stabilitas xilanase yang diuji sesuai untuk *biobleaching* (deinking) kertas bekas. Adapun karakter tersebut adalah sebagai:

1) Xilanase yang diuji mampu menghidrolisis xilan yang tidak larut menjadi xilosa, xilobiosa, xilotriosa yang larut dalam air sehingga memudahkan pemucatan.

2) Pada uji stabilitas enzim, waktu paruh pada pH 8, suhu 50, 60, 70°C masing-masing adalah 2 jam 48 menit, 1 jam 22 menit dan 1 jam 9 menit. Kondisi yang diperlukan untuk *biobleaching* yaitu suhu 60°C pH 8.

4.2 Saran

Untuk meningkatkan daya simpan xilanase perlu dilakukan pemekatan enzim dan penambahan penstabil.

Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Robby Anzil Firdaus dan Rita Rahmawati yang telah membantu percobaan di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, M.J., 1992. *Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase activity*. Journal of Biotechnology. 23: 257—270
- Bajpai, P., 1999 *Application of enzymes In the Pulp and Paper Industry*. Biotechnol Prog 15:147—157
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS., 2001, *Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review*, Appl Microbiol Biotechnol, 56:326—338 (DOI 10.1007/s002530100704)
- Belancic, A, Scarpa, J, Peirano, A, Diaz, R, Steiner, J, Eyzaguirre, J., (1995) *Penicillium Purpurogenum* Produces Several Xylanases: Purification and Properties of Two of the Enzymes. J Biotechnol 41:71—79
- Biely P, Puls J, Schneider H., 1985. *Acetyl Xylan Esterases in Fungal Cellulolytic*

- Systems. *FEBS Lett* 186:80–84
- Biely, P., 1985, *Microbial Xylanolytic Systems*, Trends Biotechnol 3: 286-290
- Bradford, M., 1976, *A rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding*, Ann Biochem 72:284-254
- Dey, D., Hinge J, Shendye, A, Rao, M., 1992 *Purification and Properties of Extracellular Endo-xylanases from Alkalophilic Thermophilic Bacillus sp.* Can J Microbiol 38:436–442
- Dwivedi, P, Vivekanand, V, Pareek, N, Sharma, A, Singh, RP., 2010, *Bleach Enhancement of Mixed Wood Pulp by Xylanase–Laccase Concoction Derived Through Co-culture Strategy*, Appl Biochem Biotechnol, 160:255–268 (DOI 10.1007/s12010-009-8654-4)
- Elegir, G, Sykes, M, Jeffries, TW 1995 *Differential and Synergistic Action of Streptomyces Endoxylanases in Prebleaching of Kraft Pulp*. Enzyme Microb Technol 17:954–959
- Esteban, R, Villnueva JR, Villa TG. 1982. β -D-xylanase of *Bacillus Circulans* WL-12. Can. J. Microbiol. 28: 733-739
- Gessesse, A., 1998 *Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkalophilic Bacillus sp.* Appl Environ Microbiol 64:3533–3535
- Gupta, N, Reedy, VS, Maiti, S, Ghosh, A., 2000. *Cloning, Expression, and Sequence Analysis of the gene Encoding the Alkali-stable, Thermostable Endoxylanase from Alcalophilic, Mesophilic Bacillus sp.* Strain NG-27. Appl and Environ Microbiol 66:2631-2635
- Helianti, I, Nurhayati, N, Wahyuntari, B., 2008, *Cloning, Sequencing and Expression of a-xylanase Gene from Indonesian Bacillus licheniformis strain I-5 in Escherichia coli*, World J Microbiol Biotechnol 24: 1273-1279
- Honda, H., T. Kudo, Y. Ikura, and K. Horikoshi., 1985. *Two Types of Xylanases of Alkalophilic Bacillus sp.* no. C-125. Can. J. Microbiol. 31:538-542.
- Joseleau, JP, Comtat, J, Ruel, K., 1992, *Chemical Structure Xylans and Their Interactions in the plant cell walls*. In: Visser, J., Beldman, G., van Someren, M.A.K., Voragen, A. G. J., (eds) Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, hal. 1-15
- Kuhad, Rc, Singh A., 1993, *Lignocellulosic Biotechnology: Current And Future Prospects*. Crit Rev Biotechnol 13:151–172.
- Kulkarni, N, M. Rao., 1996, *Application of Xylanase from Alkaliphilic Thermophilic Bacillus Sp Nicm 59 In Biobleaching of Bagasse Pulp*, J. Biotechnol, 51: 167-173
- Kulkarni, N, Shendye, A, Rao M., 1999. *Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases*. Fems Microbiol Rev. 23:411-456
- Morales, P, Madrarro, A, Flors, A, Sendra ,Jm, Gonzalez, Jap., 1995 *Purification and Characterization of A Xylanase and Arabinofuranosidase from Bacillus Polymyxa*. Enzyme Microb Technol 17:424–429
- Nakamura, S, Ishiguro, Y, Nakai R, Wakabayashi, K, Aono, R, Horikoshi, K., 1995, *Purification and Characterization of A Thermophilic Alkaline Xylanase from Thermoalkaliphilic Bacillus Sp.* Strain Tar-1. Journal of Molecular Catalysis. 1: 7–15.
- Niehaus, F, Bertoldo, C, Kahler, M, Antranikian, G., 1999, *Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Applications*, Appl Microbiol Biotechnol 51:711–729
- Okazaki, W., T. Akiba, K. Horikoshi, and R. Akahoshi., 1985. *Purification And Characterization of Xylanases from Alkalophilic Thermophilic Bacillus sp.* Agric. Biol. Chem. 49:2033-2039.

- Pala, H, M. Mota, F.M. Gama., 2006, *Factors Influencing Mow Deinking: Laboratory Studies*, *Enz Microbial Technol* 38: 81–87
- Ragauskas Aj, Poll Kn, Cesternino A, 1994, *Effects of Xylanase Pretreatment Procedures on Non-Chlorine Bleaching*. *Enzyme Microb Technol* 16:492–495
- Ratanakhanokchai K, Kyu KI, Tanticharoen M, 1999, *Purification And Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkalophilic Bacillus sp. Strain K-1*. *Appl Environ Microbiol*. 65:694-697
- Sunna A, Antranikian G, 1997, *Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria*, *Crit Rev Biotechnol* 17: 37-67.
- Sunna As, Prowe G, Stoffregen T, Antranikian G. 1997, *Characterization of The Xylanase from the New Isolated Thermophilic Xylan-Degrading Bacillus Thermoleovorans Strain K-3D and Bacillus Flavothermus Strain Lb3a*. *Fems Microbiology Letters*. 148: 209—216.
- Whistler, RI, Richards EI, 1970, *Hemicelluloses*. In: *Pigman, W., Horton, D. (Eds) The Carbohydrates*, Academic Press, New York, Hal. 447-469.
- Wong Kky, Saddler Jn., 1992, *Trichoderma Xylanases, Their Properties and Purification*. *Crit Rev Biotechnol* 12:413–435
- Wong Kky, Tan Lul, Saddler, Jn., 1988, *Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: Function and Applications*, *Microbiol Rev* 52: 305-317
- Zheng L, Du Y, Zhang, J., 2000, *Biobleaching Effect Of Xylanase Preparation From An Alkalophilic Bacillus Sp. On Ramie Fibers*, *Biotechnol Lett*. 22: 1363–1367.