

**PRODUKSI ENZIM XILANASE TERMOSTABIL
DARI *Thermomyces lanuginosus* IFO 150
PADA SUBSTRAT BAGASSE TEBU**

ANNA MUAWANAH



**PROGRAM STUDI ILMU PANGAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2006

ABSTRAK

Anna Muawanah. Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Substrat Bagasse Tebu. Dibimbing oleh Hanny Wijaya dan Tamy Idiyanti.

Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi enzim xilanase termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 yang ditumbuhkan pada fermentasi padat dengan bagasse tebu sebagai substrat. Untuk mencapai tujuan dilakukan optimasi komposisi media bagasse tebu berdasarkan pada proses delignifikasi, kadar air dan waktu fermentasi. Sedangkan untuk mengetahui sifat enzim xilanase yang dihasilkan maka dilakukan penetapan suhu optimum dan pH optimum, stabilitas terhadap perubahan suhu dan pH, pengaruh ion logam dan analisis jenis gula hasil hidrolisis enzim.

Enzim dengan aktivitas tertinggi diperoleh dari komposisi media bagasse tebu yang tanpa proses delignifikasi dan berkadar air awal sebesar 65 %. Dengan medium tersebut menghasilkan aktivitas enzim xilanase sebesar 48,88 U/ml yang dipanen pada hari ke 9. Hasil uji sifat-sifat enzim terhadap enzim kasar menghasilkan aktivitas enzim optimum pada suhu 65°C dan pH sekitar 6,5. Enzim stabil selama 24 jam pada pH 6–11 dan pada suhu 80°C memiliki aktivitas relatif 62,9%. Enzim xilanase meningkat aktivitasnya oleh penambahan 1 mM Fe²⁺ dan Cu²⁺. Hasil hidrolisis enzim xilanase terhadap larutan xilan adalah berupa xilosa.

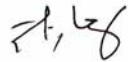
Kata kunci : xilanase, *Thermomyces lanuginosus*, delignifikasi.

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini, saya menyatakan bahwa tesis yang berjudul: "Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Substrat Bagasse Tebu". adalah benar merupakan hasil karya saya sendiri dengan bimbingan pembimbing kecuali dengan jelas ditunjukkan rujukannya. Tesis ini belum pernah dipublikasikan.

Semua sumber data dan informasi yang digunakan telah dinyatakan secara jelas dan dapat diperiksa kebenarannya.

Bogor, 17 Desember 2005



Anna Muawanah
F251020031

**PRODUKSI ENZIM XILANASE TERMOSTABIL
DARI *Thermomyces lanuginosus* IFO 150
PADA SUBSTRAT BAGASSE TEBU**

**ANNA MUAWANAH
F251020031**


**Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Ilmu Pangan**

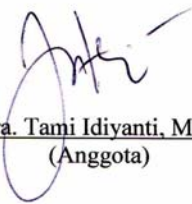
**PROGRAM STUDI ILMU PANGAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2006**

Judul Tesis : Produksi Enzim Xilanase Termotabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 Pada Substrat Bagasse Tebu.
Nama Mahasiswa : Anna Muawanah
Nomor Pokok : F251020031
Program Studi : Ilmu Pangan

Menyetujui,

1. Komisi Pembimbing


Prof. Dr. C. Hanny Wijaya, M.Agr
(Ketua)


Dra. Tami Idiyanti, M.Sc
(Anggota)

Mengetahui,

2. Ketua Program Studi Ilmu Pangan

3. Dekan Sekolah Pascasarjana


Prof. Dr. Ir. Betty Sri Laksmi Jenie, M.S




Prof. Dr. Ir. Syafrida Manuwoto, M.Sc

Tanggal Ujian : 26 Desember 2005

Tanggal Lulus: 18 JAN 2006

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Magetan pada tanggal 8 Mei 1974 sebagai anak kedua dari pasangan M Safari dan Siti Rohmini. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya, lulus pada tahun 1997.

Pada tahun 2002, penulis diterima di Program Studi Ilmu Pangan pada Program Pascasarjana IPB. Beasiswa pendidikan Pascasarjana diperoleh dari Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia.

Penulis bekerja sebagai tenaga pengajar di Fakultas Sain dan Tehnologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta sejak 1999.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan anugerah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan pembuatan tesis ini dengan baik. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah untuk Nabi Muhammad saw dan keluarganya serta para pengikutnya hingga akhir jaman.

Tesis dengan judul “**PRODUKSI ENZIM XILANASE TERMOSTABIL DARI *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 PADA SUBSTRAT BAGASSE TEBU**” disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapat gelas Magister Sain pada Sekolah Pascasarjana IPB, Program studi Ilmu Pangan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Puslitbang Kimia Terapan LIPI kawasan Puspitek Serpong.

Pada Kesempatan ini Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Ir. C. Hanny Wijaya, M.Agr sebagai ketua komisi pembimbing dan Dra. Tami Idiyanti, M.Sc sebagai anggota komisi pembimbing, yang dengan baik hati membimbing penulis selama penelitian dan penulisan tesis ini. Terima kasih kepada Dr Ir. Harsi Dewantari Kusumaningrum, M.Sc selaku dosen penguji luar komisi, yang telah banyak memberikan masukan dan saran untuk perbaikan tesis. Penghargaan juga diberikan kepada laboran di laboratorium Mikrobiologi Puslitbang Kimia Terapan LIPI serpong untuk kebersamaan dan kerja samanya.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada suami, putra tercinta, bapak, ibu dan seluruh keluarga yang telah memberikan semangat dan do'anya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa tesis ini hanya berperan kecil dalam mengembangkan ilmu pengetahuan, karena itu penulis mengharapkan karya-karya yang lain sehingga bersama-sama dapat menghasilkan sesuatu yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang enzim.

Bogor, Desember 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Bagasse tebu	5
Xilan	9
<i>Thermomyces lanuginosus IFO 150</i>	11
Enzim	12
Enzim xilanase	14
Karakter Enzim Xilanase	16
Pengujian Aktivitas Enzim Xilanase	18
Produksi Enzim Xilanase	20
BAHAN DAN METODOLOGI PENELITIAN	
Tempat dan waktu penelitian	28
Bahan dan alat	28
Metode penelitian	29
Tahap Persiapan	30
Pembuatan Media	30
Penyegaran Inokulum	31
Proses Delignifikasi	32
Produksi Enzim Xilanase dengan Variasi Kadar Air Awal Media, Perlakuan Delignifikasi dan Waktu Fermentasi Optimum	33
Karakterisasi Enzim	35
Analisa kimia	36
Rancangan Percobaan	37
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Analisa kimia bagasse tebu	40
Pengaruh delignifikasi.....	41
Pengaruh kadar air awal media fermentasi	45
Penentuan waktu fermentasi	49
Karakterisasi enzim	53
Pengaruh Perubahan Suhu terhadap Aktivitas dan Stabilitas enzim	54
Pengaruh Perubahan pH terhadap Aktivitas dan Stabilitas enzim	57
Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim	58
Hasil Hidrolisis Enzim Xilanase	60

KESIMPULAN DAN SARAN	
Kesimpulan	62
Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	71

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komponen kimia bagasse tebu.	6
Tabel 2. Beberapa macam limbah dengan kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin.	6
Tabel 3. Produksi enzim xilanase dengan substrat bagasse tebu	8
Tabel 4. Komposisi media untuk produksi enzim xilanase.	25
Tabel 5. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim xilanase.	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur kimia xilan	10
Gambar 2. Tempat pemotongan enzim xilanase	15
Gambar 3. Diagram Alir proses delignifikasi	38
Gambar 4. Diagram alir optimasi media fermentasi, produksi dan karakterisasi enzim xilanase	39
Gambar 5. Pengaruh proses delignifikasi terhadap aktivitas spesifik enzim xilanase pada media fermentasi dengan kadar air awal 65 %.	43
Gambar 6. Pengaruh kadar air awal media fermentasi terhadap aktivitas enzim pada media bagasse tebu yang tidak didelignifikasi	46
Gambar 7. Pengaruh kadar air awal media fermentasi terhadap aktivitas enzim pada media bagasse tebu yang didelignifikasi.	47
Gambar 8. Pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim xilanase.	49
Gambar 9. Kadar total gula pereduksi selama fermentasi.	51
Gambar 10. Karakteristik enzim xilanase akibat perubahan suhu	55
Gambar 11. Karakteristik enzim xilanase akibat perubahan pH	58
Gambar 12. Kromatogram hasil analisis xilosa dengan metode HPLC	61

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pembuatan reagen dalam analisis gula dengan metode Somogy-Nelson.	71
Lampiran 2. Pembuatan buffer phospat	72
Lampiran 3. Analisa kimia bagasse tebu	73
Lampiran 4. Pengaruh delignifikasi terhadap aktivitas xilanase pada fermentasi dengan kadar air awal 50% dan 80%	75
Lampiran 5. Hasil pengukuran protein terlarut filtrat enzim xilanase selama fermentasi.	76
Lampiran 6. Hasil analisis statistik	77

BAB I

PENDAHULUAN

Industri tebu di Indonesia telah berkembang cukup pesat pada beberapa tahun terakhir ini. Tanaman tebu dijadikan sebagai bahan utama dalam produksi gula terutama gula pasir. Dalam proses produksi gula ini selain dihasilkan produk utama juga dihasilkan produk samping berupa tetes tebu, blotong dan juga ampas tebu atau bagasse. Di Indonesia pada tahun 2002 tercatat jumlah tebu yang dipanen sebesar 26.785.348 ton. Apabila persentase bagasse dari penggilingan tebu (Gandana 1974) sebesar 30 persen maka jumlah bagasse tebu yang dihasilkan seluruh Indonesia adalah 8.04 juta ton. Bagasse tebu merupakan bahan yang mengandung hemiselulosa 25 – 50 %, lignin 13 – 30 % dan selulosa 25 – 40 % (Hardjo 1989). Bagasse tebu sangat berpotensi untuk digunakan sebagai substrat dalam produksi enzim xilanase karena memiliki kandungan hemiselulose tinggi dan ketersediaannya cukup.

Bagasse tebu dapat dimanfaatkan secara langsung sebagai bahan bakar, bahan baku pembuat pulp dan juga sebagai ransum pada ternak. Pemanfaatan bagasse tebu melalui proses fermentasi diantaranya adalah pembuatan kompos yang digunakan untuk mengembalikan unsur organik tanah (Toharisman 1993). Pembuatan gula rendah kalori xilitol juga menggunakan bagasse tebu sebagai bahan utama. Pada proses tersebut bagasse tebu terhidrolisis selama fermentasi sehingga dihasilkan senyawa xilosa dan dihidrogenasi lebih lanjut menjadi xilitol (Parajo 1998).

Proses hidrolisis hemiselulosa dengan senyawa kimia baik berupa asam maupun basa akan dibutuhkan suhu, pH dan tekanan tinggi serta pada pemurnian hasil hidrolisisnya diperlukan tahapan dengan biaya tinggi. Demikian juga senyawa kimia tersebut juga akan menyebabkan pencemaran lingkungan. Hal ini dapat dihindari dengan memilih proses hidrolisis secara enzimatik. Proses enzimatik dapat berlangsung pada kondisi normal atau tidak diperlukan suhu, pH dan tekanan tinggi. Selain itu pada proses hidrolisis enzimatik akan dihasilkan komponen senyawa yang bersifat lebih spesifik dan senyawa tersebut tidak akan terdekomposisi lebih lanjut. Enzim yang terlibat dalam hidrolisis hemiselulosa adalah enzim xilanase. Proses hidrolisis xilan dengan tujuan spesifik sangat dibutuhkan enzim xilanase, walaupun xilan dapat dihidrolisis secara kimia dengan asam. Sebagai contoh pada produksi xilobiosa dan xilotriosa yang digunakan sebagai bahan aditif pada pangan fungsional (Sasaki 1993).

Fungsi enzim hemiselulose atau xilanase dalam industri adalah beraneka ragam, bahkan kebutuhan akan enzim xilanase pada tahun terakhir ini mengalami peningkatan terutama untuk kebutuhan dalam proses *bleaching* pada pulp (Richana 2002). Perlakuan dengan enzim xilanase dapat mereduksi secara nyata kandungan lignin dan hemiselulosa pada bubur kertas (Shoham *et al.* 1993). Dengan demikian penggunaan enzim xilanase dapat mereduksi pemakaian klorin dalam mengekstrak lignin dan diperoleh kualitas kertas yang tinggi serta pencemaran lingkungan dapat dikurangi. Enzim xilanase juga telah banyak digunakan dalam bidang pangan diantaranya untuk modifikasi produk *baking*, produksi pemanis rendah kalori, pencerah warna jus, *wine* dan ekstraksi minyak

tanaman. Kombinasi dengan selulase dan pektinase dapat digunakan untuk penjernihan dan liquifikasi buah dan sayuran (Beg *et al.* 2001). Sedangkan dibidang pakan ternak enzim xilanase dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan daya cerna pakan ternak (Bedford dan Classen 1992). Dilaporkan bahwa campuran makanan ayam boiler dengan enzim xilanase yang berasal dari *Thermomyces longibrachiatum* ternyata mampu mengurangi viskositas pencernaan, sehingga meningkatkan pencapaian berat badan dan efisiensi konversi makanan.

Mikroorganisme jamur atau kapang yang berbentuk filamen adalah penghasil enzim xilanase yang paling banyak digunakan pada industri enzim. Hal ini dikarenakan jamur *filamentous* mampu mengekskresikan enzim ke dalam media sehingga tidak diperlukan pengrusakan sel dalam isolasi enzim. Haltrich *et al.* pada tahun 1996 telah melaporkan 76 organisme golongan jamur yang dapat digunakan dalam produksi enzim xilanase. Diantara organisme tersebut adalah *Neurospora sitophila*, *Thermoascus aurantiacus*, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus awamori* (Irawadi 1991, Alam *et al.* 1994, Haltrich *et al.* 1994, Gutierrez-corea dan Tengerdy 1998 dan Lemos *et al.* 2002). Enzim xilanase pada penelitian ini diproduksi dari kapang *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada media bagasse tebu. Kapang ini bersifat termofilik dan terbukti mampu memecah komponen lignoselulosa. Produksi xilanase dengan kapang ini pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, tetapi pada substrat yang berbeda, substrat tongkol jagung oleh Purkarthofer *et al.* (1993) dan substrat *Beecwood* xilan oleh Gomes *et al.* (1993).

Penggunaan substrat bagasse tebu dalam produksi enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 disebabkan bagasse tebu memiliki kandungan hemiselulosa tinggi, ketersediaannya berlimpah dan harganya sangat murah.

Berdasarkan potensi limbah bagasse tebu dan manfaat enzim xilanase yang beragam, maka perlu dilakukan pemanfaatan ke arah industri enzim xilanase sehingga enzim ini dapat diproduksi sendiri di Indonesia.

Proses produksi enzim xilanase dalam penelitian ini juga melibatkan mikroorganisme lain yakni jamur pelapuk putih PSM 01. Jamur ini memiliki kemampuan memecah lignin yang terdapat pada bahan lignoselulosa. Perlakuan delignifikasi ini diharapkan dapat membantu *Thermomyces lanuginosus IFO 150* dalam produksi enzim xilanase.

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah mendapatkan enzim xilanase termostabil dari *Thermomyces lanuginosus IFO 150* yang tumbuh pada substrat bagasse tebu, memperoleh kondisi optimum bagasse tebu berdasarkan perlakuan delignifikasi dan kadar air awal media fermentasi dan mengetahui karakter enzim yang dihasilkan. Karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui aktifitas dan stabilitas enzim terhadap perubahan suhu dan pH, mengetahui pengaruh penambahan ion logam dan mengetahui jenis gula hasil reaksi hidrolisis enzim. Apabila enzim xilanase yang dihasilkan memiliki stabilitas tinggi terhadap suhu dan pH, maka penggunaannya di berbagai industri dapat ditingkatkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Bagasse Tebu

Bagasse tebu adalah residu serat dari tanaman tebu setelah proses penggilingan dan ekstraksi niranya. Secara fisik bagasse dibagi menjadi dua bagian yaitu bagian yang halus yang disebut dengan *pith* dan bagian yang kasar yang disebut dengan *koarse bagasse* (Paturau 1982).

Secara kuantitas bagasse tebu yang dihasilkan di Indonesia sangat besar. Di Indonesia pada tahun 2002 tercatat jumlah tebu yang dipanen sebesar 26.785.348 ton. Apabila persentase bagasse tebu dari penggilingan (Gandana 1974) sebesar 30 persen maka jumlah bagasse tebu yang dihasilkan adalah 8.04 juta ton.

Kandungan kimia bagasse tebu adalah selulose, hemiselulose, lignin, silika dan pektin. Komposisinya sangat bervariasi tergantung pada varitas tebu, tingkat kematangan, cara panen dan efisiensi proses pengambilan nira. Adapun komponen kimia bagasse tebu dapat dilihat pada tabel 1.

Bagasse tebu sebagai hasil samping industri gula telah banyak dimanfaatkan secara langsung sebagai bahan bakar dalam pembuatan gula, sebagai bahan pakan ternak, dan bahan pembuat pulp. Pemanfaatan bagasse tebu dengan cara fraksinasi menjadi senyawa komponen penyusun akan lebih meningkatkan pendayagunaan dalam berbagai industri.

Tabel 1. Komponen kimia bagasse tebu (Hardjo 1989).

Komponen	% Berat kering
Protein	3,1
Lemak	1.5
Serat kasar	34,9
Akstrak bebas nitrogen	51,7
Abu	8,8

Sebagai komponen lignoselulosa, bagasse tebu memiliki komposisi hemiselulosa dengan komponen utama berupa xilan yang berikatan dengan selulosa, lignin dan polisakarida yang lain untuk menyusun dinding sel tanaman. Dibandingkan dengan bahan lignoselulosa yang lain bagasse tebu memiliki kandungan hemiselulosa yang tertinggi yaitu 25– 40% (Hardjo 1989). Komponen hemiselulosa dapat didegradasi oleh enzim xilanase menjadi produk xilobiosa, xilotriosa dan xilosa (Gokhale *et al.* 1997). Beberapa macam bahan lignoselulosa dengan kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin disajikan dalam tabel 2.

Tabel 2. Beberapa macam limbah dengan kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin (Hardjo 1989).

Macam limbah	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Serat kapas	90	-	-
Batang kayu keras	40-50	20-40	18-25
Batang kayu lunak	45-50	25-35	25-35
Bagasse tebu	25-40	25-50	13-30
Jerami gandum	40	29.5	19.8

Pemanfataan bagasse tebu melalui fermentasi telah dilakukan oleh para peneliti sebelumnya dengan tujuan utama meningkatkan nilai ekonomi limbah tersebut. Diantaranya adalah untuk bahan kompos (Toharisman 1993), untuk pakan ternak (Supriyadi 1987) dan untuk memproduksi gula rendah kalori xilitol (Carvalho *et al.* 2002).

Bagasse tebu dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi enzim xilanase karena keberadaannya yang berlimpah dan harganya relatif murah. Faktor utama dalam efisiensi produksi enzim xilanolitik adalah pemilihan substrat yang sesuai dan komposisi mediumnya. Biswas *et al.* (1988) menyatakan bahwa xilanase dari *Aspergillus ocraceus* diproduksi dalam media fermentasi yang mengandung xilan yang berasal dari bagasse tebu sebagai sumber karbonnya. Sedangkan Kulkarni *et al.* (1999) menyatakan bahwa hemiselulosa yang relatif murah seperti tongkol jagung, dedak gandum, dedak padi, jerami, tangkai jagung dan ampas tebu telah digunakan untuk produksi xilanase dari *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* dan bakteri alkalofilik *Bacillus sp.* NCIM 59. Berbagai penelitian tentang produksi enzim xilanase yang menggunakan bagasse tebu dapat dilihat pada tabel 3.

Bagasse tebu yang digunakan pada produksi enzim xilanase yang tersebut pada tabel 3 adalah tanpa proses perlakuan awal. Sedangkan perlakuan awal terhadap substrat akan berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan. Menurut Kirk dan Chang (1981) proses delignifikasi merupakan perlakuan pendahuluan terhadap bahan baku sehingga mempermudah pelepasan hemiselulosa. Proses delignifikasi dapat dilakukan secara enzimatik yaitu dengan mikroorganisme dan

secara fisik (penggilingan, pemanasan dengan uap, radiasi) dan kimiawi (proses pelarutan dengan alkali, asam klorat asam asetat, larutan pengembang, atau dengan gas SO₂).

Tabel 3. Produksi enzim endoxilanase dengan substrat bagasse tebu tanpa proses delignifikasi

Nama mikroba	Endoxilanase	Fermentasi	Referensi
<i>Aspergillus ocraceus</i>	8.5 Uml ⁻¹	S (7 hari)	Biswas <i>et al.</i> 1988
	18.6 Uml ⁻¹	SS (16 hari)	
<i>Penicillium janthinellum</i>	38.3 Uml ⁻¹	S (48 jam)	Milagres et al, 1993
<i>Aspergillus sydowii</i>	11.3 Umg ⁻¹	S (4 hari)	Ghosh et al 1994
<i>Aspergillus sp</i>	1.9 Uml ⁻¹	S (5 hari)	Wang et. al 1994
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	824.5 Ug ⁻¹	SS (7 hari)	Alam et al.1994
<i>Apergillus fischeri fxnI</i>	10.7 Uml ⁻¹	S (4 hari)	Raj dan Chandra 1995
<i>Cellulomonas flavigena</i>	18 Umg ⁻¹	S (40 jam)	Perez-avaloz et al 1997
<i>Aspergillus tamarii</i>	16.7 Uml ⁻¹	S (5 hari)	Kadowaki et al 1997
<i>Trichoderma reesei</i> *	1900 Ug ⁻¹	SS (72 jam)	Gutierrez-Correa dan
<i>Aspergillus niger</i> *	1750 Ug ⁻¹	SS (72 jam)	Tengerdy 1998
<i>Aspergillus phoenicis</i> *	0 Ug ⁻¹	SS (72 jam)	
<i>Aspergillus awamori</i>	100 Uml ⁻¹	SS	Lemos dan pereira 2002

S = *Submerged*, SS = *Solid state fermentation*, * perlakuan alkali

Bahan lignosellulosa dapat didelignifikasi secara mikrobiologi dengan jamur pelapuk putih, *Pleurotus ostreotus*. Jamur ini mampu menurunkan kadar lignin 10–40 %. Jamur tersebut menghasilkan enzim laccase (E.C.1.10.3.2) dan peroksidase (E.C.1.11.1.7) yang akan terlibat selama proses degradasi lignin (Supriyadi1987).

Dalam penelitiannya Prasetya (1996) melakukan degradasi lignin dengan menggunakan jamur pelapuk putih PSM 01 yang merupakan isolat jamur yang berasal dari kayu ramih di hutan Pasar Maung, Bogor. Selama degradasi bahan lignoselulosa, jamur ini mampu menurunkan kadar lignin 10 – 20 % dan juga

menurunkan kadar selulosa. Selain itu pada proses pemutihan pulp sulfat kayu *Acacia mangium* menunjukkan bahwa enzim dari isolat tersebut mampu mereduksi kappa sebesar 40%. Kemurnian lakase PSM 01 lebih tinggi dibandingkan dengan lakase komersial *Rhus vericifera* (Sigma) berdasarkan aktivitas spesifiknya (Kamitsuji 2000). Salah satu perlakuan awal yang dipilih pada penelitian ini adalah proses delignifikasi secara mikrobiologi dengan jamur PSM 01.

B. Xilan

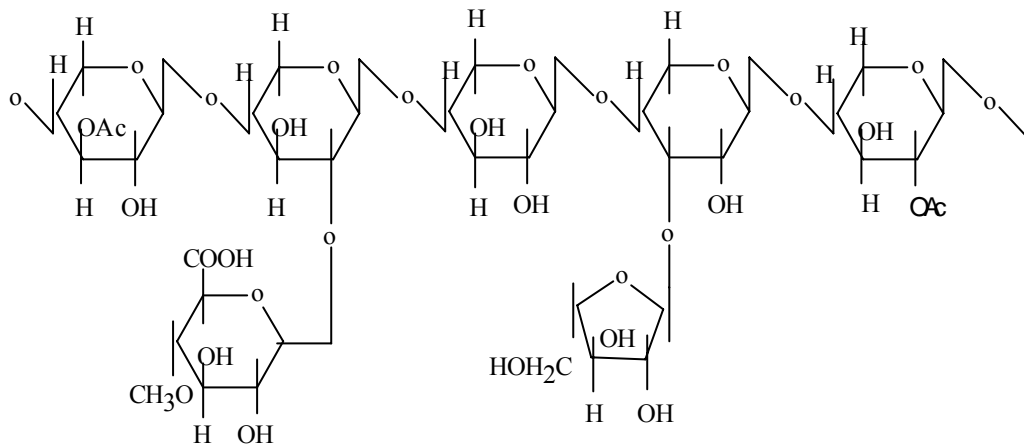
Hemiselulosa merupakan karbohidrat dengan bobot molekul lebih rendah daripada selulose dan tersusun atas satuan-satuan gula pentosa dan heksosa (Richard dan Whistler 1970). Polimer hemiselulosa terdiri dari monomer gula (gula-gula anhidro) penyusun yang dapat dikelompokkan pada hexosa (glukosa, manosa dan galaktosa), pentosa (xilosa, arabinopiranososa, arabinofuranosa), asam heksuronat (glukoronat, metilglukoronat dan galakturonat) dan deoksi heksosa (rhamnosa dan fukosa). Rantai utama hemiselulosa dapat hanya terdapat dari satu macam monomer saja (homopolimer), misalnya xilan atau dapat terdiri dari dua atau lebih monomer (heteropolimer), misalnya glukomanan, (Fengel dan Wegener 1984)

Hemiselulosa yang terdapat pada limbah hasil pertanian, umumnya mengandung hetero-1-4- β -D-xilan (arabino-4-O-metilglukoronoxilan) dan hetero 1-4- β -D—manan (galaktoglukomanan dan glukomanan). Heteroxilan terutama merupakan komponen hemiselulosa yang bersasal dari *graminea* (rumput-rumputan dan biji-bijian) dan *angiospermae* (*hard wood*), sedangkan beta manan terutama terdapat pada *gymnospermae* (*soft wood*), (Fengel dan Wegener 1984)

Menurut Aero (1995) xilan merupakan polimer xilose yang berikatan β -1,4-glikosidik dengan jumlah monomer 150-200 unit. Rantai xilan bercabang dan

strukturnya tidak berbentuk kristal sehingga lebih mudah dilakukan hidrolisis. Struktur asli xilan dapat disubstitusi dengan asetil, L-arabinofuranosil, glucuronosil pada rantai sampingnya.

Untuk mengetahui kandungan xilan dalam suatu bahan dapat diuji dengan identifikasi pendahuluan dengan cara mereaksikan bahan yang diuji dengan seng klorida dan iodium. Bahan yang mengandung xilan dalam pengujian akan membentuk warna biru (Kartasaputra, 1991). Struktur xilan diperlihatkan pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur molekul Xilan

Xilan apabila dilakukan hidrolisis sempurna maka akan menghasilkan xilose. Terdapat berbagai cara hidrolisis xilan diantaranya adalah secara kimia dengan menggunakan asam sulfat dan suhu 100°C (Chen dan Gong 1985). Secara enzimatik depolimerisasi kerangka xilan dapat terjadi oleh aktifitas enzim endoxilanase dan beta xilosidase.

C. Thermomyces Lanuginosus

Thermomyces lanuginosus atau dikenal juga *Humicola lanuginosa* merupakan jamur berbentuk filamen yang bersifat termofilik dan dapat tumbuh secara optimum pada suhu 45 – 50 °C (Maheswari *et.al.* 2000). Mikroorganisme jamur berbentuk filamen merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan pada produksi enzim xilanase. Jamur filamentous mampu mengeksresikan enzim ke dalam media sehingga tidak diperlukan pengrusakan sel dalam isolasi enzim.

Haltrich *et al* pada tahun 1996 melaporkan bahwa terdapat 76 organisme golongan jamur dapat digunakan dalam produksi enzim xilanase. Beberapa jamur yang menghasilkan xilanase dan mampu mendegradasi hemiselulose diantaranya *Aspergillus ochraceu*, *Neurospora sitophila* dan *Thermomyces lanuginosus* (Biswas *et al.* 1988, Irawadi 1991 dan Purkarthofer *et al* 1993).

Kapang *Thermomyces lanuginosus* dilaporkan mampu menghasilkan enzim xilanase yang bebas sellulase (Purkarthofer *et al.* 1993), hal ini berarti komponen lignoselulosa yang dapat didegradasi hanyalah hemiselulosa sedangkan selulosa tidak terurai. Xilanase bebas selulase dapat diketahui dari uji aktivitas sellulase yang negatif. Enzim xilanase yang bebas selulase dapat dimanfaatkan walaupun tanpa pemurnian.

Produksi enzim xilanase dengan kapang *Thermomyces lanuginosus* pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya tetapi substrat yang digunakan berbeda. Substrat *bircwood* xilan oleh Gomes *et al.* (1993) sedangkan Purkarthofer *et al.* (1993) dan Damaso *et al.*(2000) menggunakan tongkol jagung sebagai substrat untuk produksi enzim xilanase.

D. Enzim

Enzim merupakan biopolimer yang berperan sebagai katalis hayati dalam reaksi-reaksi biokimia yang terjadi dalam sel makhluk hidup. Penggunaan enzim di bidang industri, baik industri pangan maupun bukan pangan sudah banyak berkembang. Enzim sebagai biokatalis bekerja secara spesifik dan sangat efisien, umumnya kerja enzim juga tidak membutuhkan pemanasan atau perlakuan tekanan seperti katalis non biologis.

Enzim secara umum dapat dihasilkan dari hewan, tanaman, dan mikroorganisme. Pada penelitian ini dilakukan produksi enzim xilanase dari jenis mikroba yang termasuk kapang. Hal ini dikarenakan kemampuannya menghasilkan enzim xilanase dan mengekskresikan enzim ke media (Haltrich *et al.* 1996) sehingga mempermudah proses produksi dan isolasi enzim.

Enzim merupakan protein yang memiliki sifat-sifat yang sangat khas seperti berat molekul, kondisi reaksi pada aktivitas optimum dan stabilitas enzim. Aktivitas dan stabilitas enzim sangat dipengaruhi oleh modifikasi kondisi fisik dan kimia yang dapat menyebabkan perubahan struktur sekunder, tersier dan kuartener dari molekul enzim.

Pokok utama mekanisme kerja enzim adalah konsepsi aktivasi pemecahan substrat yang didahului pembentukan kompleks enzim substrat. Bentuk kompleks enzim substrat terbentuk karena perbedaan afinitas kimia antara substrat dan enzim pada daerah tertentu yang disebut pusat aktif . Penambahan larutan seperti

pelarut organik dan juga larutan logam akan mempengaruhi mekanisme kerja enzim karena terjadi interaksi molekuler (Cesar dan Vladimir 1996).

Stabilitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya adalah waktu penyimpanan, suhu, pH dan senyawa-senyawa yang dapat menginaktivkan enzim, misalnya protease, dan penyebab denaturasi lainnya.

Reaksi katalisis enzim, seperti halnya reaksi kimia yang lain dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu meningkat, maka laju reaksi juga akan meningkat. Akan tetapi karena enzim adalah protein, maka semakin tinggi suhu akan mengakibatkan proses inaktivasi enzim juga semakin meningkat. Pada kondisi normal, struktur aktif enzim dijaga oleh keseimbangan kekuatan non-kovalen yang berlainan, yaitu ikatan hidrogen, hidrofobik, ionik, dan Van der Waals. Dengan naiknya suhu, semua kekuatan tersebut menurun dan molekul protein enzim akan terbuka. Karena pada pusat aktif enzim selalu terdiri dari beberapa residu asam amino yang terdapat dalam struktur tiga dimensi protein enzim, maka pembukaan rantai molekul protein menyebabkan kerusakan pusat yang aktif sehingga enzim menjadi inaktif. Pada suhu tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki lokasi aktif enzim. Enzim yang stabil dan optimum pada suhu tinggi di atas suhu 55°C dapat dikatakan sebagai enzim termotabil (Yu *et al.* 1987).

Perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas dan stabilitas enzim. Enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum, yang umumnya antara pH 4.5 sampai 8.0. Disekitar pH optimum enzim memiliki stabilitas yang tinggi.

Diperkirakan perubahan pH dapat menyebabkan perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim pada sisi aktifnya atau sisi lain yang akhirnya mempengaruhi sisi aktif.

D.1 Enzim Xilanase

Enzim hemiselulose atau xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dengan komponen utama berupa xilan. Klasifikasi enzim xilanase didasarkan pada jenis substrat yang dihidrolisis. Proses hidrolisis xilan melibatkan endo 1-4,- β xylanase (1,4- β -D-xilan-xilanohidrolase. EC.3.2.1.8) dan β Xylosidase (1,4- β -D-xilosida-xilohidrolase. EC.3.2.1.37) yang juga bekerja sama dengan enzim eksoglikosidase seperti β -D-xilosidase, β -L-arabinosidase dan β -D-glukoronidase. Hidrolisis sempurna dari berbagai hemiselulose inidapat dipantau dari jumlah D-xilosa, L-arabinosa dan asam D-glukoronat yang dihasilkan (Dekker 1983).

Secara umum xilanase dikelompokkan menjadi tiga macam yaitu enzim β -xylosidase, eksoxilanase dan endoxilanase. Enzim β -xylosidase dan eksoxilanase melepaskan residu xilosil dengan serangan arah ke ujung dari xylooligosakarida, sedangkan endoxilanse menyerang rantai xilosidik dan memutus ikatan β -1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur (Cho *et al.* 1996). Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut. Sedangkan Ruiz aribas (1995) menyatakan bahwa pada saat degradasi xilan, sejumlah produk intermediet (xilotetraosa, xilotriosa dan xilobiosa) terbentuk, bahkan pada inkubasi 24 jam xilobiosa yang berlimpah.

biasanya dilakukan dengan menganalisa gula-gula yang dihasilkan melalui HPLC (Misra *et al.* 1984, Gokhale *et al.* 1997)

Gosh (1993) membedakan kedua jenis enzim endoxilanase dan β -xylosidase dengan cara memisahkan sumber enzimnya, endosilanase diperoleh dari ekstraseluler (filtrat bebas sel) sedangkan β -xilosidase berasal dari (intraseluler) ekstrak sel yang dihomogenasi. Produk yang diamati pada xilanase adalah xilosa sedangkan untuk β -xylosidase adalah p-nitrophenol. Aktivitas enzim yang dihasilkan adalah xylanase 9 kali dibandingkan aktivitas β -xilosidase.

D.2. Karakter Enzim Xilanase

Setiap enzim memiliki karakteristik yang berbeda-beda, tergantung dari mana enzim tersebut dihasilkan. Xilanase yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang berbeda akan memiliki karakteristik yang berbeda pula. Pada penelitian sebelumnya oleh Irawadi (1991) aktivitas maksimum xilanase dari *Neurospora sitophila* pada pH 6,0 dan suhu sekitar 55°C. Kemudian Alam *et al.* (1994) menyatakan bahwa enzim xilanase dari *Thermoascus aurantiacus* memiliki kondisi optimum pada pH 5 dan suhu optimum 70 °C. Sedangkan Cesar dan Vladimir (1996) yang menggunakan substrat *wheat brand* memperoleh kondisi optimum pada suhu antara 60 – 70 °C dan pada pH 4.5 sampai 6.5. Produksi xilanase dari *B. stearothermophilus* T-6, *B. thermoalkalophilus* dan *Bacillus sp.* Strain TAR-1 memiliki aktivitas xilanase maksimum pada suhu 70 -75 °C dan pH 6,0 – 7,0. Selain itu produksi xilanase dari mikroba termofilik *B. acidocaldarius* dan *Clostridium thermolacticum* yang masing-masing diproduksi pada suhu 60 dan 65 °C mempunyai aktivitas maksimum pada suhu 80 °C dengan pH 4.0 dan

6.5, (Kulkarni *et al.* 1999). Produksi xilanase dari *Thermotogales* menunjukkan aktivitas maksimum pada suhu antara 9 – 105 °C (Sunna *et al.* 1997).

Xylanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dan dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dipecahnya. Xylanase umumnya merupakan protein kecil dengan bobot molekul antara 15000 – 30000 dalton (Yang *et al.* 1988, Yu *et al.* 1993). Xilanase aktif pada suhu 55 °C dengan pH 9. Pada suhu 60 °C dengan pH normal xilanase diketahui lebih stabil (Tsujiro *et al.* 1992). Sedangkan Nakamura *et al.* (1995) menyatakan pH optimum dari banyak xilanase diketahui turun dengan kenaikan suhu.

Termostabilitas enzim xilanase juga sangat bervariasi misalnya enzim xilanase dari *Dictyoglomus thermophilum* Strain B1 sangat termostabil, pada suhu 70 °C waktu paruhnya 46 jam, pada suhu 80 °C waktu paruhnya 13 jam dan suhu 90 °C aktivitasnya masih baik dengan waktu paruh 1,3 jam (Matharani dan Ahring 1992).

Sifat enzim xilanase dari berbagai penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang berbeda beda pada saat ditambahkan ion logam. Sebuah penelitian yang memproduksi enzim xilanase dari strain berbeda dan substrat ampas gandum menyatakan bahwa penambahan ion logam Mn^{2+} dan Fe^{2+} dapat menghasilkan peningkatan sebesar 137% dan 141% dan penghambatan 59% oleh ion Hg^{+} , sedangkan ion Mg menghasilkan aktivitas 94% (Cesar dan Vladimir 1996). Ghosh *et al.* (1993) menyatakan bahwa hanya penambahan ion Ca^{2+} yang mampu menaikkan aktivitas enzim xilanase sampai tingkat 102 %, sedangkan ion logam

Mg, Zn, menghambat pada 87,5 %, ini dilakukan pada enzim xilanase yang berasal dari *Aspergillus Sydowii* MG 49 pada konsentrasi 5 mM.

Adapun akibat penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim memiliki tiga kategori yaitu menghambat, meningkatkan dan tidak mengakibatkan perubahan. Mekanisme suatu ion logam tertentu yang tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim karena ion tersebut tidak mempengaruhi sisi aktif dari enzim xilanase yang mengikat xilan tetapi pada daerah yang terlibat dalam efisiensi hidrolisis substrat. Sedangkan pengikatan ion logam pada sisi aktif enzim menyebabkan perubahan struktur konformasi enzim sehingga mempengaruhi aktivitas katalitiknya.

D.3. Pengujian Aktivitas Enzim Xilanase

Metode Pengujian aktivitas enzim xilanase (*assay*) ditentukan oleh berbagai hal, tidak hanya meliputi kondisi reaksi enzimatik seperti suhu, lama inkubasi dan jenis substrat yang digunakan tetapi juga pada prinsip kuantifikasi dari aktivitas xilanase.

Metoda kuantifikasi yang dapat digunakan dalam uji aktivitas xilanase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Sebaliknya pengurangan konsentrasi substrat xilan, penurunan viskositas dari larutan xilan yang stabil dan penurunan turbiditas suspensi xilan juga bisa digunakan sebagai dasar pengamatan dalam uji aktivitas xilanase.

Dari berbagai cara uji aktivitas xilanase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan mengamati gula pereduksi hasil hidrolisis

enzim. Metode yang digunakan adalah menggunakan dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy 1952). Kepekaan yang tinggi dari suatu metoda dicapai apabila metoda tersebut akan menghasilkan hubungan linier antara gula pereduksi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi. Metode DNS dibandingkan dengan Somogy-Nelson memiliki tingkat kepekaan lebih rendah sehingga respon warnanya rendah, terutama pada konsentrasi gula yang rendah. Glukosa mudah didestruksi oleh oksidasi pereaksi basa yang digunakan pada pereaksi DNS. Metode Somogy-Nelson memiliki kekurangan pada perlakuan analisis yang lama dan lebih rumit (tidak nyaman) serta tingkat bahaya racunnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan metoda DNS.

Penelitian tentang perbandingan metode analisa gula dalam uji aktivitas xilanase dilakukan oleh Bailey *et al.* (1992) menyatakan bahwa metode DNS yang lebih lebih *reproducible*. Selain itu Jefries pada 1998 membandingkan kedua metode tersebut dengan metoda kromatografi ternyata metode DNS memberikan aktivitas spesifik yang terlalu besar (*overestimate*) sedangkan untuk Somogy-Nelson memberikan hasil yang kurang peka (*underestimate*). Hal ini disebabkan karena arsenomolibdat hanya bereaksi dengan xilosa tetapi kurang bereaksi dengan xilooligosakarida. Sedangkan metode DNS lebih reaktif terhadap xilooligosakarida dan xilosa. Akan tetapi kedua metode tersebut menggunakan senyawa standad berupa xilosa. Untuk metode kromatografi memiliki kepekaan yang tinggi dalam analisis gula hasil hidrolisis enzim tetapi kuantifikasi berbasis

molar lebih sulit dilakukan. Pada penelitian ini dipilih metoda Somogy-Nelson karena sesuai dengan gula standad yang digunakan yaitu xilosa.

D.4. Produksi Enzim xilanase

Fermentasi pada produksi enzim xilanase yang menggunakan kapang atau jamur dapat berupa fermentasi cair maupun fermentasi padat. Fermentasi cair adalah fermentasi yang substratnya larut atau tersuspensi di dalam fase cair. Sedangkan fermentasi padat adalah proses fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas.

Pemilihan Substrat

Pemilihan jenis substrat dan komposisi medium yang sesuai merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan produksi xilanase. Substrat tidak hanya sebagai sumber karbon dan sumber energi tetapi juga penting sebagai prekursor atau penginduksi bagi mikroorganisme dalam mensintesa protein enzim xilanase. Senyawa penginduksi sintesis enzim dibutuhkan pada fase awal fermentasi sehingga jamur dapat mengekskresikan metabolit selnya.

Komponen yang memiliki masa molekular yang rendahlah yang dapat berfungsi sebagai senyawa penginduksi sintesis enzim. Dari beberapa penelitian selektivitas substrat selain ditujukan untuk meningkatkan hasil dalam produksi enzim xilanase juga dipertimbangkan kemungkinan lain disintesisnya enzim lain seperti selulase yang proses sintesisnya dapat terjadi pada substrat yang sama. Biasanya penelitian tentang enzim xilanase selain dilakukan uji aktivitas xilanase juga diuji aktivitas selulasenya (Biswas *et al.* 1990, Yu *et al.* 1993, Gilbert *et.al.*

1992). Ternyata hasilnya menunjukkan bahwa suatu jenis substrat tertentu belum menjamin selektivitas dan keberhasilan dari produksi xilanase.

Jenis substrat yang digunakan dalam komposisi media fermentasi dapat sederhana atau kompleks juga tergantung pada jenis mikrobanya. Substrat (senyawa penginduksi) dapat berupa substrat murni (xilan, xilooligosakarida) atau juga dapat berupa bahan lignoselulosa alami yang memiliki kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin.

Medium dengan substrat murni cocok untuk skala laboratorium dan industri kecil karena mudah dikontrol sehingga pelaksanaan pengamatannya lebih mudah. Dalam produksi enzim xilanase pada skala yang besar penggunaan substrat murni sebagai media fermentasi kurang sesuai. Kriteria sumber nutrisi untuk skala besar menurut Rachman (1989) adalah dapat memproduksi biomassa dengan hasil maksimal untuk tiap gram substrat yang digunakan; Memungkinkan pembentukan produksi fermentasi dengan laju maksimal; Dapat menekan pembentukan produk yang tidak diinginkan sampai serendah mungkin; Mutu konstan, murah, dan tersedia sepanjang tahun dan tidak menimbulkan masalah terhadap aerasi, agitasi, ekstraksi dan pemurnian enzim serta perlakuan limbah.

Penggunaan xilan muni dalam produksi xilanase skala besar sangat mahal. Park *et.al* (1992) telah melakukan penelitian alternatif sumber karbon selain xilan yakni jerami padi, berbagai limbah pertanian dan hutan (Bailey *et al.* 1993) atau xilan yang diisolasi dari limbah industri serat (Gamerith *et.al.* 1992). Hasilnya sangat menarik karena pada konsentrasi substrat yang sama ternyata memberikan hasil yang lebih tinggi pada substrat alami. Akhirnya banyak penelitian dilakukan

untuk identifikasi dan evaluasi efektifitas substrat lignoselulosa terhadap produksi enzim xilanase. Substrat tersebut meliputi kulit ari gandum, tongkol jagung, ampas tebu, jerami padi, jerami gandum dan sebagainya. Hasil penelitian menjelaskan bahwa penggunaan bahan lignoselulosa alami lebih baik dari pada xilan atau selulosa yang murni.

Perlakuan Awal Substrat

Penggunaan serat alami sebagai substrat dalam produksi enzim sangat dipengaruhi oleh proses *pretreatment*. Perlakuan awal tersebut antara lain pengurangan kadar lignin yang terkandung pada substrat, penghilangan asetil dari hemiselulose, depolimerisasi hemiselulose, penurunan ukuran permukaan dan ukuran pori serta proses sterilisasi bahan lignoselulosa.

Gomes *et al* (1994) menyatakan bahwa proses *pretreatment* fisik dengan pemanasan 190 °C selama 10 menit dan penghancuran substrat yang telah disteam dengan ukuran 0,25 mm ditemukan efektif bagi produksi enzim yang menggunakan jerami gandum dengan jamur *Thermoascus aurantiacus*. Sedangkan pada substrat yang tanpa perlakuan memberikan hasil yang lebih rendah hal ini disebabkan oleh akses enzim terhadap substrat kurang optimal.

Ukuran substrat tongkol jagung yang optimum dalam produksi xilanase dengan *T. lanuginosus* adalah 2-7 mm dan pada substrat yang berbentuk serbuk menghasilkan aktivitas xilanase tiga kali lebih kecil (Purkarthofer 1993). Pengecilan ukuran partikel pada jerami gandum yang digunakan dalam produksi xilanase dengan *Sporotrichum thermophile*, dari 2-3 menjadi 0,2-0,25 mm memberikan efek yang negatif pada aktivitas enzim yang dihasilkan tetapi

biomassa yang dihasilkan 50% lebih tinggi (Sugden dan Bhat, 1994). Dari data tersebut menunjukkan bahwa pada ukuran partikel yang tidak terlalu kecil maka pelepasan gula terlarut terjadi secara pelan-pelan, hal tersebut menguntungkan bagi sintesa enzim xilanase. Hal yang serupa sama dilakukan oleh Bailey *et.al* (1993), yang membandingkan dua jenis xilan yang berbeda dalam produksi xilanase dengan *T. reesei*, mereka menemukan bahwa *beech* xilan yang tidak larut yang kurang siap diakses merupakan substrat penginduksi yang lebih baik dari pada glukorono xilan yang larut air dan lebih mudah diakses.

Proses delignifikasi terhadap substrat lignoselulosa dapat berpengaruh terhadap produksi enzim xilanase. Jain (1995) melakukan perlakuan awal dengan alkali dan menghilangkan lignin dengan asam asetat dan klorat. Ternyata pada substrat jerami gandum dan bagasse tebu (kandungan hemiselulosa tinggi) perlakuan tersebut tidak meningkatkan aktivitas enzim xilanase, tetapi pada kulit ari beras dan jerami padi perlakuan tersebut dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase, dimana bahan limbah padi memiliki kandungan lignin dan silika yang tinggi.

Tujuan yang harus dicapai dalam proses perlakuan awal substrat adalah keseimbangan antara pertumbuhan mikroorganisme yang baik dan enzim yang dihasilkan memiliki aktivitas yang tinggi. Pada substrat yang tingkat kristalin lebih tinggi maka mikroba akan sulit tumbuh dan akibatnya sintesa enzim juga menurun, sebaliknya pada substrat yang terlalu rapuh juga mengakibatkan mikroba terlalu mudah mendapatkan sumber karbon sehingga enzim yang disintesa aktivitasnya rendah walaupun biomassa yang dihasilkan tinggi.

Kadar Air Media pada Fermentasi Padat

Pada produksi enzim xilanase dengan fermentasi padat, keberadaan air pada media merupakan hal yang sangat penting dan berpengaruh terhadap aktivitas dan produksi enzim. Mikroba penghasil enzim dapat tumbuh dan mensintesis enzim xilanase pada media dengan kadar air yang optimum. Secara umum jamur dapat tumbuh pada aktivitas air yang lebih rendah bila dibandingkan dengan bakteri dan yeast. Seperti yang dilaporkan oleh Haltrich *et al.* (1996) kadar air awal dalam fermentasi padat berkisar dari 50 – 80 %. Pada substrat tandan sawit dan mikroba *N. sitophila*, kadar air optimum adalah 70% (Irawadi 1991).

Penambahan senyawa nutrisi merupakan faktor yang penting dalam produksi enzim xilanase. Variasi penambahan senyawa nutrisi pada fermentasi padat dilakukan dengan variasi kadar air media. Penambahan nutrisi dikarenakan keberadaan nitrogen dan nutrien esensial lain (asam amino dan vitamin) dalam bahan lignoselulosa sangatlah kecil. Secara umum kebutuhan nutrisi pada media produksi enzim xilanase hampir sama dengan media yang dibutuhkan untuk produksi enzim lainnya. Medium dirancang agar mengandung unsur-unsur karbon, nitrogen, kalsium dan unsur kelumit seperti Fe, Cu, Co, Zn, Mg, Mo yang dibutuhkan untuk mendukung kerja fungsi sel. Komposisi medium yang digunakan dalam produksi enzim telah dikembangkan oleh Mendels dan Reese (1957) dan dimodifikasi oleh Nakamura *et al.* (1993) dapat dilihat pada tabel 4. Beberapa peneliti pada umumnya menggunakan medium dengan komposisi yang hampir sama. Menurut Mendel kalsium dan beberapa mineral lainnya seperti Fe,

Mg, Zn, dan Co pada konsentrasi rendah diperlukan untuk produksi enzim tetapi tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang.

Tabel 4. Komposisi media untuk produksi (Nakamura *et al.* 1993).

Bahan	Komposisi %
(NH ₄) ₂ Cl	0.5
K ₂ PO ₄	1.5
Na ₂ HPO ₄	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.025
NH ₄ Cl	0.5
NaCl	0.25
Ekstrak khamir	0.2
Xilan (sumber karbon)	0.7

Sumber karbon pada produksi enzim xilanase bisa xilan murni atau lignoselulosa alami. Sedangkan sumber nitrogen bisa berasal dari nitrogen anorganik maupun organik. Garam amonium sulfat merupakan nitrogen anorganik yang umum digunakan. Walaupun ion amonium dapat mencukupi kebutuhan nitrogen jamur untuk pertumbuhan, tetapi untuk mendapatkan enzim yang maksimal masih dibutuhkan juga penambahan nitrogen organik. Nitrogen organik yang biasa digunakan dapat berasal dari pepton, ekstrak ragi dan limbah pertanian yang mengandung nitrogen. Aktivitas enzim xilanase sangat dipengaruhi oleh ekstrak ragi yang digunakan. Penelitian dilakukan oleh Haltrich *et al.* (1994) dengan *S. commune* untuk memproduksi enzim xilanase menggunakan yeast ekstrak konsentrasi tinggi, pada saat konsentrasi dinaikkan dari 45 menjadi 90g/l pada media cair ternyata pembentukan xilanase menjadi dua kali lipat. Kemudian

Purkarthofer *et al* (1993) dengan *Thermomyces lanuginosus* menggunakan yeast ekstrak dengan komposisi 1.75, 2.1, 5.7, dan 7.0 % pada fermentasi padat, ternyata hasil terbaik dicapai pada konsentrasi 1,75 % dengan aktivitas enzim sebesar 125 000 nkat/ml. Hasil tersebut terjadi pada substrat tongkol jagung dengan penambahan yeast ekstrak paling sedikit.

Proses Pemisahan Enzim

Pemisahan dan pemurnian produk fermentasi merupakan tahap yang penting dalam bioproses. Beberapa tahap pemurnian enzim antara lain, pemisahan enzim seperti ekstraksi atau isolasi, presipitasi, filtrasi, sentrifugasi dan pemekatan misalnya dengan ultrafiltrasi (Bollag dan Edelstein 1991). Menurut Schmidt-Kastener dan Golker (1987) isolasi dan ekstraksi dapat digunakan sebagai tahap awal proses pemisahan enzim. Proses ekstraksi dan isolasi enzim dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan pelarut harus tepat, baik pH, maupun kekuatan ion pelarut sehingga dapat ditekan jumlah kontaminan yang tercampur dalam enzim.

Enzim xilanase sebagian besar merupakan enzim ekstraseluler sehingga proses pemisahannya dari sel mikroba lebih mudah bila dibandingkan enzim intraseluler dan dapat dilakukan tanpa proses pemecahan dinding sel. Pelepasan enzim dari dinding sel atau sisa polimer substrat umumnya dilakukan dengan cara menambahkan senyawa kimia yang bersifat detergen, seperti Triton-x 100, sodium lauril sulfat dan Tween ke dalam pelarut yang digunakan untuk mengekstrak enzim.

Penggunaan pelarut untuk mengekstrak enzim hanya digunakan pada fermentasi media padat, sedangkan pada fermentasi cair tidak diperlukan. Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak enzim dapat berupa air atau buffer dengan kekuatan ionik rendah. Jumlah pelarut yang digunakan tergantung pada tujuan ekstraksi tersebut. Bila diinginkan untuk mendapatkan filtrat enzim dengan unit aktivitas yang tinggi penggunaan pelarut diusahakan seminimal mungkin. Bila bertujuan untuk mendapatkan enzim semaksimal mungkin maka penggunaan pelarut ditingkatkan jumlahnya.

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan (P3KT)–LIPI, PUSPIPTEK Serpong, pada bulan Maret 2004 sampai maret 2005.

B. Bahan dan Alat

B.1. Bahan

Mikroorganisme yang digunakan dalam produksi enzim xilanase adalah *Thermomyces lanuginosus* IFO 150, kultur ini berasal dari Institut Fermentation of Osaka Jepang, sedangkan untuk proses delignifikasi digunakan Jamur Pelapuk Putih PSM 01, yang merupakan kultur stok di laboratorium Mikrobiologi P3KT LIPI serpong.

Bagasse tebu sebagai media fermentasi diperoleh dari penjaja minuman jus tebu. Pada saat analisa kimia bagasse tebu dibutuhkan bahan antara lain n-heksan, asam sulfat pekat, kation selenium, NaOH, Indikator metil merah dan metil biru dan HCl 0,01 N.

Bahan untuk penyegaran inokulum adalah media PDA (Potatoes Dextrosa agar) dan Bacterial agar. Sedangkan bahan untuk media kultivasi terdiri dari bagasse tebu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl dan air destilasi. Untuk proses delignifikasi juga dibutuhkan Yeast ekstrak, pepton, Bufer laktat, tiamin dan Kirk mineral.

Bahan-bahan kimia untuk ekstraksi enzim adalah buffer phosphat pH 6,0. buffer suksinat 0.2M pH 4,5. Sebagai substrat dalam menguji aktivitas enzim adalah xilan *Birchwood* dan 2-6 dimetoksifenol dari Sigma. Pada analisa dengan metode Somogy-Nelson digunakan Reagen Nelson, Reagen Arsenomolibdad, pembuatan larutan ini dapat dilihat pada lampiran 1. Sebagai larutan standad digunakan xilosa dan glukosa yang diproduksi oleh Sigma. Analisa protein terlarut dengan metode Lowry (1951) menggunakan Serum Bovine Albumin sebagai larutan standad.

B.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer Hitachi tipe U-200, inkubator statis dari Yamato tipe IL-72 dan Sibata tipe SSI 450, *autoclave* dari ALP tipe KT-30L, HPLC Merck Hitachi (UV detector tipe L-400, pompa L-6200, *Degasser* ERC-3312, L-5025 *Collume thermostat* dan *Integrator* D-2500), pH meter dari Ohmmeter penangas air, timbangan analitis, termometer, *stop watch*, desikator, sokhlet, oven, *shaker*, *sentrifuse*. Alat-alat gelas antara lain cawan petri, labu erlenmeyer, gelas ukur, tabung *sentrifuge*, kuvet, tabung reaksi, finnpipette digital 40-200 µl dan 1-5 ml dari Labsystem dan botol sampel. Alat bantu lain seperti kapas, kertas parafilm, aluminium foil, kasa dan lain-lain.

C. Metode Penelitian

Tujuan utama dalam penelitian ini adalah untuk mendapatkan enzim xilanase termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada substrat

bagasse tebu. Untuk mencapai tujuan tersebut di tahap awal penelitian dilakukan pemilihan komposisi media fermentasi yang menghasilkan enzim xilanase dengan aktivitas tertinggi. Parameter yang digunakan dalam pemilihan komposisi media ini adalah proses delignifikasi, kadar air awal media bagasse tebu dan waktu fermentasi. Setelah diperoleh kondisi optimum bagasse tebu maka dilakukan produksi enzim xilanase dan sekaligus dilakukan uji aktivitas dan stabilitas enzim terhadap enzim xilanase yang dihasilkan.

Secara terperinci tahapan metodologi penelitian terdiri dari enam tahap yaitu tahap persiapan, tahap pembuatan media, tahap penyegaran inokulum, tahap delignifikasi, produksi enzim xilanase dengan fermentasi padat dan uji sifat-sifat ekstrak enzim.

C.1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan dilakukan pembuatan media yang disterilisasi dan dilakukan awal terhadap bagasse tebu. Ampas tebu yang telah diambil niranya, dicuci dengan air, kemudian dijemur selama 3 hari sampai kadar air 14 %. Kemudian bagasse tebu digiling dan untuk mendapatkan ukuran yang homogen dilakukan pengayakan. Bagasse tebu yang digunakan sebagai substrat adalah yang lolos saringan 18 mesh. Analisa kimia bagasse tebu meliputi kadar air (Pengeringan, AOAC 1995), abu (AOAC 1995), lemak (AOAC, 1995), dan protein dengan metode Kjeldahl (AOAC 1995) (lampiran 3).

C.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada tiga macam yaitu media agar untuk mempersiapkan inokulum, medium Mendels yang dimodifikasi untuk produksi enzim xilanase dan medium Kirk untuk proses delignifikasi.

Komposisi medium agar untuk penyegaran digunakan *potatoes dextrose agar* 3,9 gr dan *bacteriological agar* 0,5 gr dan air destilasi 100 ml. Bahan-bahan tersebut setelah ditimbang dimasukkan kedalam air destilasi hingga larut. Larutan kemudian disterilisasi di dalam *autoclaf* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, larutan medium dituangkan ke dalam cawan petri 15 ml/petri dalam ruang steril. Medium dibiarkan membeku dan siap digunakan untuk membuat inokulum bagi *Thermomyces lanuginosus* dan Jamur Pelapuk putih PSM 01.

Pada proses delignifikasi media nutrisi yang ditambahkan dalam bagasse tebu adalah media kirk yang terdiri dari Yeast ekstrak 0,02%, pepton 0,62%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, Buffer laktat 5% dengan 0.5 M pH 4,5, dan kirk salt sebanyak 1% dan aquadest 94%. Untuk menumbuhkan jamur pelapuk putih, dalam setiap gram bagasse ditambahkan 5 ml media kirk. Selanjutnya disterilisasi dengan autoclaf.

Media fermentasi yang digunakan dalam produksi enzim adalah bagasse tebu yang ditambah dengan nutrisi berupa medium Mendel yang sudah dimodifikasi, dengan komposisi $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0,05 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 %, $CaCl_2$ 0,1 %, NaCl 0,6 %, Yeas ekstrak 1,75% dan air destilasi. Semua bahan tersebut dilarutkan dalam aquadest dan diaduk sampai merata dan homogen. Pada setiap 3 gram substrat ditambahkan larutan nutrisi dengan volume tertentu sesuai dengan variasi kadar air 50%, 65% dan 80%. Setelah substrat ditambahkan dengan media nutrisi maka dilakukan sterilisasi dengan autoclaf

pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium fermentasi dibiarkan dingin dan siap digunakan dalam produksi enzim xilanase.

C.3. Penyegaran Inokulum

Penyegaran isolat jamur dilakukan dengan memindahkan kultur jamur dari agar miring ke dalam cawan petri dengan media Potatoes dekstrose agar dan Bacteriological Agar, selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu 45 °C untuk *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dan pada suhu kamar selama 5 hari bagi jamur pelapuk putih PSM 01. Dari hasil penyegaran ini dibuat bulatan kecil berdiameter 5 mm dan siap ditanam di substrat bagasse tebu fermentasi media padat untuk delignifikasi dan memproduksi enzim xilanase.

C.4. Proses Delignifikasi

Substrat bagasse tebu dilakukan delignifikasi secara mikrobiologi. dengan jamur Pelapuk putih PSM 01. Dalam setiap 5 gr bagasse tebu dalam labu erlenmeyer 250 ml ditambahkan 15 ml medium Kirk, setelah disterilisasi dengan *autoclaf* diinokulasikan 5 keping jamur pelapuk putih PSM 01 dari tahap penyegaran. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 6 hari. Tanpa dilakukan pencucian, bagasse tebu dikeringkan pada suhu 65°C dan siap digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi produksi enzim xilanase. Waktu inkubasi 6 hari didasarkan pada penelitian yang dilakukan Prasetya (1996), pada waktu inkubasi 6-9 hari pengurangan kadar lignin sudah mendekati konstan.

Untuk mengetahui aktivitas lakase, diambil beberapa sampel dan diekstraksi enzimnya dengan buffer suksinat 0,2M pH 4,5. Aktivitas enzim lakase diuji dengan metode Watanabe (2002) dan kadar protein terlarut diuji dengan metode

Lowry (1951). Analisis lakase diukur secara langsung dengan metode spektrofotometri, substrat yang digunakan adalah 2,6-dimetoksifenol 4 mM dan mediatornya adalah buffer suksinat 0,2 M pH 4,5. Sejumlah enzim (25-50 μ l) ditambahkan pada campuran 3,0 ml buffer suksinat dan 3,0 ml 2,6-dimetoksifenol, dikocok lalu diukur absorbansinya dengan pada panjang gelombang 470 nm. Larutan blangko terdiri dari 3,0 ml buffer suksinat, 3,0 ml 2,6-dimetoksifenol. Larutan kontrol dibuat dari campuran 6,0 ml bufer suksinat dan sejumlah enzim (25-50 μ l). Satu unit lakase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat meningkatkan absorbans pada panjang gelombang 470 nm selama satu menit dalam kondisi standar pH 4,5 dan suhu 25°C.

C.5. Produksi Xilanase Dengan Variasi Kadar Air Awal Media; Perlakuan

Delignifikasi Dan Waktu Fermentasi Optimum

Pada produksi enzim xilanase ini digunakan tiga variabel: kadar air awal media dengan taraf 50%, 65% dan 80%, pengaruh delignifikasi dengan dua taraf yaitu delignifikasi dan tanpa delignifikasi serta variabel waktu dengan taraf 0, 3, 6, 9, dan 12 hari. Inkubasi dilakukan selama 12 hari pada suhu 45°C. Enzim dipanen dengan cara diekstraksi dengan menambahkan 27 ml buffer fosfat 0,2M pada pH 6. Ekstraksi dilakukan dengan *shaker* 120 rpm selama 60 menit. Tahap berikutnya adalah mendapatkan *crude* enzim dengan cara sentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C sehingga diperoleh filtrat yang bebas sel.

Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim dimasukkan ke dalam botol sampel dan siap untuk dianalisis aktivitas xilanase dan kadar gula tereduksi

dengan metode Somogy –Nelson (1952) sedangkan kadar protein terlarut dengan metode Lowry (1951).

Pengukuran analisis aktivitas xilanase dilakukan dengan mencampurkan 1ml buffer fosfat 0,2 M pH 6, 1ml enzim, 1ml substrat xilan *birchwood* 1% dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Selanjutnya diambil 0.1ml larutan campuran tersebut ditambahkan 1ml reagen Nelson dan dipanaskan selama 20 menit pada air mendidih, setelah didinginkan selama 5 menit pada air mengalir, reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat dan ditepatkan sampai 10 ml. Pembacaan dengan *spektrofotometer* dilakukan pada panjang gelombang 520 nm. Kadar xilosa yang terbentuk karena aktivitas enzim merupakan kadar xilosa setelah inkubasi dikurangi kontrol. Sebagai larutan kontrol digunakan enzim yang diinaktivasi (pemanasan 100 °C selama 10 menit) dan diperlakukan sama pada saat analisis xilanase. Sedangkan blangko adalah 2 ml buffer fosfat pH 6 dan 1 ml xilan 1%. Satu unit aktivitas xilanase adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 μ mol xilosa per menit setelah diinkubasi dengan xilan pada suhu 55 °C selama 10 menit.

Analisis kadar protein metode Lowry (1951) merupakan salah satu reaksi warna uji protein yang konsentrasinya rendah (1-300 μ g/ml), ditandai dengan terbentuknya kompleks berwarna biru keunguan. Intensitas warna kompleks sebanding dengan kadar protein. Pereaksi yang digunakan adalah Lowry A, B, C, dan D. Lowry A dibuat dengan melarutkan 2%(b/v) Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N. Lowry B dibuat dengan melarutkan 0,5%(b/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam Na, K tartrat 1%(b/v). Komposisi Lowry C terdiri dari Lowry A dan Lowry B (50:1) dan

komposisi Lowry D adalah pereaksi Folin Ciocalteu dan akuades (1:1). Lowry C dan Lowry D dibuat *in situ*.

Untuk mengukur kadar protein terlarut, sejumlah enzim (50-500 μ l) ditambahkan 5,0 ml Lowry C, dikocok, dan didiamkan selama 10 menit. Lalu Lowry D ditambahkan sebanyak 0.5 ml, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Serapannya diukur pada panjang gelombang 500 nm. Kurva Standard protein dibuat dengan stok Bovine Serum Albumin Fraktion V 300 μ g/ml. Sederetan standard BSA dibuat dengan konsentrasi 0, 30, 60, 90, sampai 300 μ g/ml.

Pada tahapan ini diharapkan dapat diperoleh kondisi fermentasi yang optimal berdasarkan kadar air awal media dan pengaruh delignifikasi substrat, serta waktu inkubasi yang optimum bagi produksi enzim xilanase.

C.6. Karakterisasi Enzim Xilanase

Terhadap enzim kasar yang diperoleh dari media terpilih dan waktu fermentasi optimum dilakukan karakterisasi untuk mengetahui sifat enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada substrat bagasse tebu. Sifat-sifat enzim yang dipelajari adalah pengaruh perubahan pH dan suhu terhadap aktivitas enzim, pengaruh perubahan pH dan suhu terhadap kestabilan enzim xilanase serta pengaruh penambahan larutan ion logam terhadap aktivitas enzim xilanase.

a. Pengaruh pH atau suhu terhadap aktivitas enzim

Penentuan pH optimum xilanase sama halnya dengan analisis aktivitas xilanase, tapi menggunakan berbagai buffer dengan kisaran pH 2,0 sampai 11,0 yaitu buffer sitrat 0,2 M (pH 2,0-5,0), buffer fosfat 0,2M (pH 6,0-11,0).

Suhu optimum xilanase dilakukan dengan menginkubasikan campuran substrat xilan 1%, dan bufer fosfat 0,2M pH 6 pada kisaran suhu 30°C sampai 80 °C selama 10 menit. Lalu diukur aktivitasnya dengan analisis xilanase.

b. Pengaruh perubahan pH dan perubahan suhu terhadap stabilitas enzim.

Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasikan filtrat enzim berbagai bufer dengan kisaran pH 2,0-11,0 (1:4) selama 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah disimpan, enzim diukur aktivitasnya sesuai analisis xilanase. Stabilitas xilanase terhadap suhu, sejumlah filtrat enzim dalam bufer fosfat pH 6 (1:4) diinkubasi pada suhu 30, 40, 60, 70 dan 80°C, selama 24 jam. Setelah penyimpanan diukur aktivitas xilanase sesuai esai enzim.

c. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim

Untuk mengetahui jenis ion logam yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase, campuran larutan ion logam 1.0 mM dan enzim diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C, lalu diuji aktivitasnya dengan essay enzim xilanase. Larutan ion logam yang digunakan Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} dan Zn^{2+}

D. Analisa Kimia

D.1. Analisa kadar total gula tereduksi dengan Metode Somogy-Nelson (1952)

Terhadap 1 ml sampel filtrat hasil fermentasi ditambahkan 1 ml reagen Nelson C, kemudian dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100 °C. Selanjutnya didinginkan dan ditambah 1 ml reagen Arsenomolibdat, dikocok dan diencerkan dengan air destilasi hingga volumenya menjadi 10 ml. Absorbansinya dibaca pada

spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm, sebagai blanko digunakan air destilasi pengganti sampel.

D.2. Analisa jenis gula hasil hidrolisis enzim dengan metode HPLC

Hidrolisis substrat oleh enzim kasar yang telah dihasilkan dilakukan dengan cara menginkubasi substrat xilan birchwood (Sigma) 1% dan enzim dalam erlenmeyer pada inkubator bergoyang selama 10 menit, pada pH dan suhu inkubasi yang memberikan hasil hidrolisis maksimum. Filtrat hasil hidrolisis dianalisa jenis gulanya dengan menggunakan metode HPLC.

Larutan sampel yang akan dianalisis komponen gulanya disaring terlebih dahulu dengan kertas saring *millipore* yang memiliki ukuran pori-pori sebesar 0,2 mikrometer. Contoh yang telah disaring kemudian disuntikkan sebanyak 10 µl pada HPLC yang menggunakan kolom LiChrocart liChropher dan suhu 60 °C. Elusi contoh dari kolom menggunakan pengelusi Acetonitril dan air bebas ion (75 :25) dengan laju alir 0,5 ml/menit. Gula yang telah keluar dari kolom dideteksi oleh pendeteksi (*UV detector*) dan dihubungkan dengan *integrator chromatopack*.

E. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan penelitian produksi enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus IFO 150* pada substrat bagasse tebu adalah menggunakan Rancangan acak lengkap faktorial 3 faktor dengan 2 kali ulangan. Rancangan ini dipilih karena ingin melihat pengaruh-pengaruh utama, interaksi derajat ketelitian dan kepentingan setara.

Nilai pengamatan hasil percobaan (Y) secara umum dinyatakan dalam model matematika:

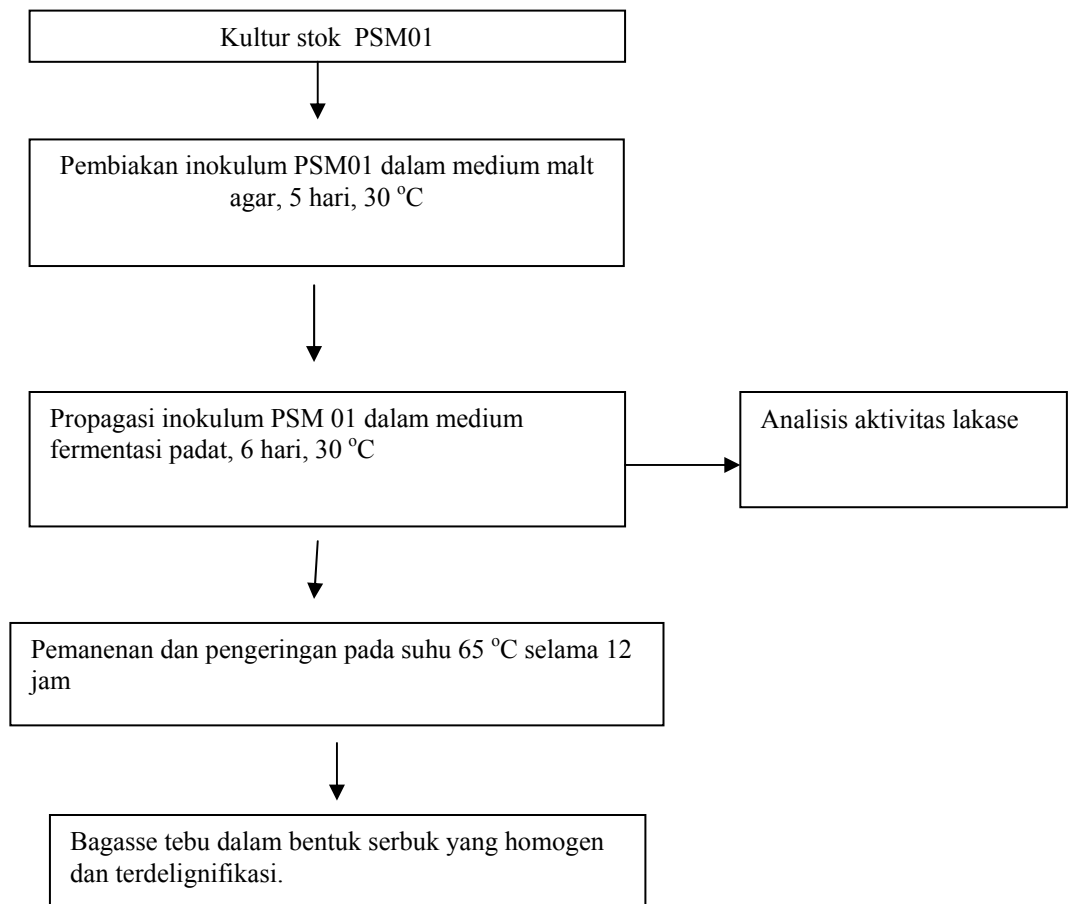
$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Dimana: Y = Nilai –nilai pengamatan hasil percobaan

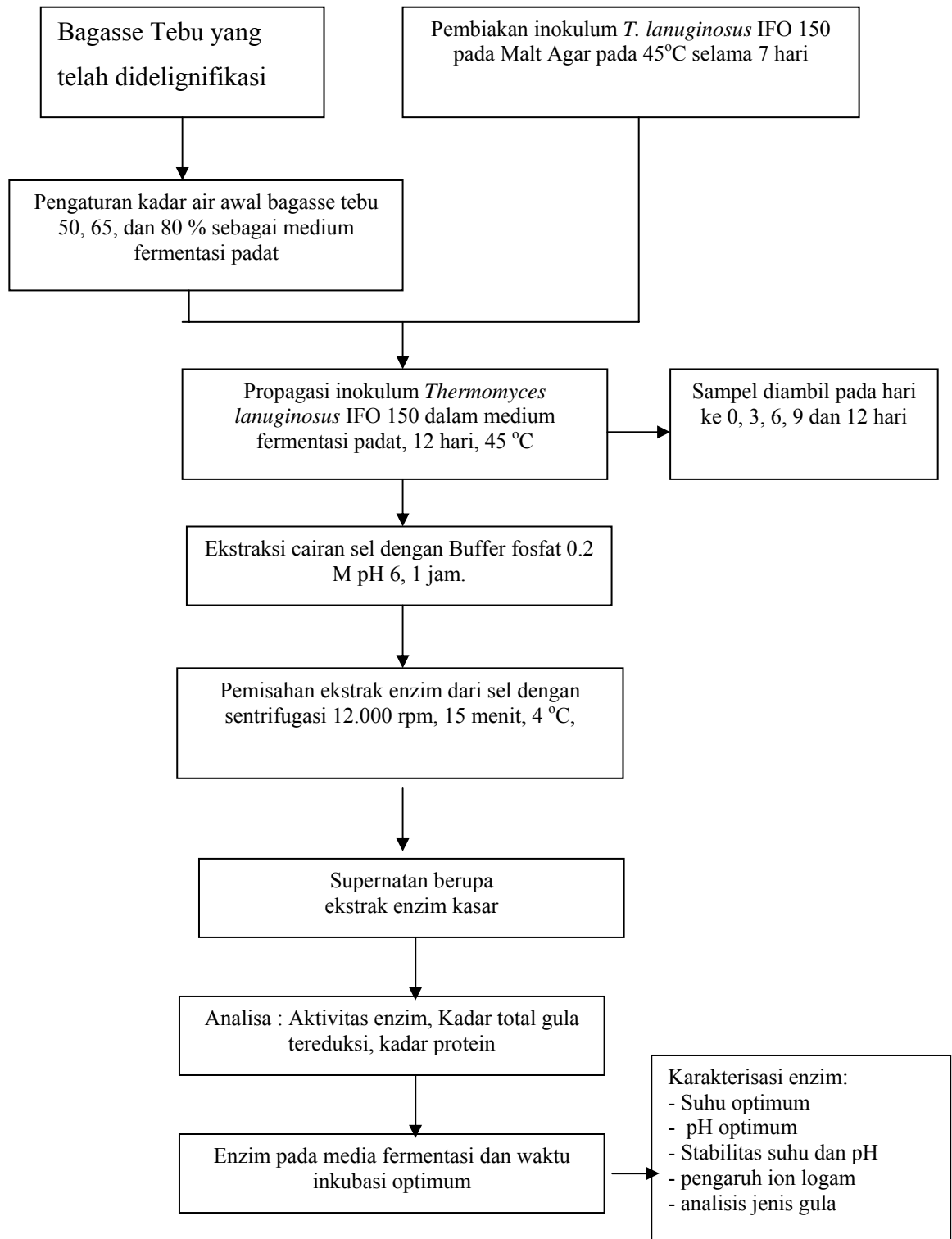
μ = Rataan umum

τ = Pengaruh perlakuan (delignifikasi, kadar air awal dan waktu fermentasi)

ε = Pengaruh acak



Gambar 3. Diagram alir proses delignifikasi bagasse tebu dengan jamur Pelapuk Putih PSM 01.



Gambar 4. Optimasi media fermentasi, produksi dan karakterisasi enzim xilanase

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Kimia Bagasse Tebu

Bagasse tebu merupakan limbah lignoselulosa yang keberadaannya melimpah dan sangat potensial digunakan sebagai substrat dalam produksi enzim xilanase. Bagasse tebu sebelum digunakan sebagai substrat pada media fermentasi padat sangatlah perlu diketahui kandungan bahan kimianya. Hasil analisis kimia bagasse tebu yang digunakan sebagai substrat pada penelitian ini adalah berkadar air 7.35 %, protein kasar 2.18%, lemak kasar 1.64% dan kadar abu 3.57%, dimana hasil tersebut merupakan % berat kering dan rata-rata dari dua kali ulangan.

Analisa kandungan kimia bagasse tebu telah dilakukan oleh Tim Industri Pertanian IPB (1984) menghasilkan protein kasar 2,04%, lemak kasar 1.78% dan kadar abu 3,62%. Hasil analisa kimia pada penelitian ini dibandingkan dengan hasil analisa kimia pada penelitian tersebut, adalah hampir sama. Bagasse tebu yang megandung protein dapat digunakan sebagai media fermentasi produksi enzim xilanase. Hal ini dikarenakan protein dapat digunakan sebagai sumber nitrogen.

Produksi enzim xilanase yang menggunakan substrat bahan lignoselulosa alami selalu ditambahkan senyawa nutrisi yang mengandung unsur nitrogen, karbon, calsium dan unsur logam seperti Mg dan Zn. Penambahan nutrisi ditujukan untuk meningkatkan produksi enzim (Mendels dan Reese 1957). Penggunaan bagasse tebu sebagai substrat produksi enzim xilanase pada

penelitian ini juga ditambahkan komponen nutrisi Mendels sebagai larutan pengatur kadar air.

B. Pengaruh Delignifikasi

Lignin merupakan senyawa polimer yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Lignin tidak pernah ditemukan dalam bentuk sederhana diantara polisakarida-polisakarida dinding sel, tetapi selalu berikatan dan bergabung dengan polisakarida tersebut. Polisakarida merupakan prerequisite terbentuknya makromolekul lignin diantara dinding sel tanaman. Hubungan molekular ketiga komponen lignin, hemiselulosa dan selulosa pada sel tanaman adalah berupa kompleks lignin-polisakarida. Pada kenyataannya ketiga komponen ini tidak dapat dipisahkan secara sempurna dengan teknik pemisahan dan pemurnian yang khusus. Pada selulosa atau hemiselulosa yang telah dimurnikan selalu ditemukan lignin (Fengel dan Wegener 1984)

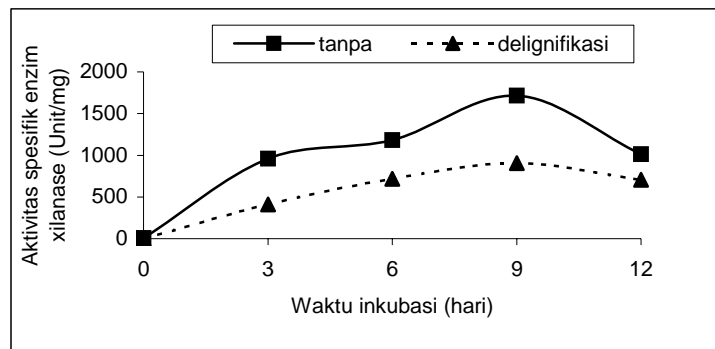
Adanya lignin pada struktur kristal lignoselulosa jaringan tanaman dapat membatasi hidrolisis hemiselulosa oleh enzim atau asam. Proses delignifikasi adalah suatu cara penguraian lignin yang sering diaplikasikan pada bahan lignoselulosa limbah pertanian. Pemanfatan bahan lignoselulosa sebagai substrat atau media pada produksi enzim, bahan lignoselulosa didelignifikasi terlebih dahulu supaya tingkat kristalisasi bahan lignoselulosa menurun. Tingkat kristalisasi polimer lignoselulosa yang sudah rapuh mengakibatkan proses sintesis enzim lebih efektif.

Delignifikasi pada penelitian ini selain bertujuan untuk menurunkan kandungan lignin juga bertujuan memutuskan ikatan antar komponen

lignoselulosa yang meliputi lignin, selulosa dan hemiselulosa. Bagasse tebu yang sudah didelignifikasi akan lebih mudah dimanfaatkan oleh *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 untuk memproduksi enzim xilanase. Hal ini dikarenakan tingkat polimerisasi kristal lignoselulosa menurun dan hemiselulosa yang berperan sebagai penginduksi sintesis enzim xilanase dapat berfungsi lebih optimal.

Delignifikasi bagasse tebu dilakukan secara mikrobiologi yakni dengan menumbuhkan jamur pelapuk putih PSM 01. Pada proses ini bagasse tebu mengalami penguraian lignin yang ditunjukkan oleh adanya aktivitas enzim lacase (E.C. 1.10.3.2) sebesar 15,6 unit /gr. Enzim lacase adalah merupakan salah satu enzim pendegradasi lignin. Pemilihan jamur pelapuk putih PSM 01 didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Prasetya (1996), yang pada penelitiannya jamur tersebut telah berhasil menurunkan kadar lignin sebanyak 20% yang digunakan pada substrat kraft pulp.

Pengaruh delignifikasi terhadap aktivitas enzim xilanase selama fermentasi dengan kadar air awal 65% digambarkan pada gambar 5. Hasil pengamatan dan analisis uji statistik dapat disimpulkan bahwa proses delignifikasi tidak berpengaruh terhadap kenaikan aktifitas enzim xilanase (α 0,05) (lampiran 6). Produksi enzim xilanase pada bagasse tebu yang tidak didelignifikasi memberikan aktivitas enzim yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan aktivitas enzim pada bagasse tebu yang didelignifikasi. Walaupun lignin yang ada pada bagasse tebu telah terdegradasi tetapi aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan tidak mengalami peningkatan.



Gambar 5. Pengaruh proses delignifikasi terhadap aktivitas spesifik enzim xilanase pada media fermentasi dengan kadar air awal 65 %.

Produksi enzim xilanase dengan kadar air awal 80% pada bagasse tebu yang didelignifikasi menghasilkan aktifitas enzim xilanase lebih tinggi bila dibandingkan dengan pada bagasse tebu tanpa delignifikasi pada hari ke 2 (lampiran 4). Hal ini diduga karena pada kandungan air yang tinggi dan adanya lignin dan hemiselulosa bebas dapat memacu sintesis enzim xilanase oleh *Thermomyces lanuginosus* IFO 150. Pada hari ke 6, aktivitas xilanase pada bagasse tebu yang didelignifikasi lebih kecil dari aktivitas xilanase pada bagasse tebu tanpa delignifikasi, diduga pada saat tersebut lignin dan hemiselulosa bebas sudah tidak tersedia, akibatnya kapang harus melakukan penguraian substrat bagasse tebu.

Proses delignifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini secara keseluruhan tidak berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150, sehingga proses produksi enzim xilanase dipilih media bagasse tebu yang tidak didelignifikasi.

Delignifikasi sebagai perlakuan awal dalam produksi enzim xilanase, juga dilakukan oleh peneliti lain. Berbagai penelitian ternyata menghasilkan pengaruh bervariasi terhadap aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan. Doppelbauer *et.al.* (1987) melakukan delignifikasi terhadap berbagai limbah lignoselulosa sebelum digunakan untuk produksi enzim xilanase dan selulosa dengan *Trichoderma reesei*. Hasilnya menunjukkan adanya penurunan kadar lignin, akan tetapi pada saat produksi enzim tidak menyebabkan tingginya aktivitas kedua enzim tersebut. Irawadi (1991) melakukan delignifikasi dengan cara kimiawi terhadap substrat tandan kelapa sawit dalam produksi enzim xilanase dan selulase. Ternyata turunnya kadar lignin tidak dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase. Sebaliknya Gomes *et.al.* (1994) yang menggunakan *T. aurantiacus* dalam produksi enzim xilanase, menyatakan bahwa perlakuan delignifikasi berpengaruh positif terhadap aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan. Jain (1995) melakukan produksi enzim xilanase dari *Thermophilic melanocarpus albomyces Iis-68*. Sebelum enzim xilanase diproduksi, berbagai substrat diberi perlakuan awal dengan alkali dan penghilangan lignin dengan asam asetat dan klorat. Ternyata pada substrat jerami gandum dan bagasse tebu (kandungan lignin rendah) perlakuan tersebut tidak meningkatkan aktivitas enzim xilanase, tetapi pada kulit ari beras dan jerami padi (kandungan lignin dan silika yang tinggi) perlakuan tersebut dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase.

Proses delignifikasi yang disebutkan diatas adalah dengan cara kimia seperti dengan alkali, asam klorat, asam asetat dan peroksida. Delignifikasi pada penelitian ini dilakukan secara mikrobiologi yaitu jamur pelapuk putih yang

dinilai efektif dalam menghilangkan lignin (Kirk dan Chang 1980). Bagasse tebu sebelum digunakan dalam produksi enzim ditumbuhkan jamur pelapuk putih PSM01. Hasil yang diperoleh adalah proses delignifikasi tidak meningkatkan aktivitas enzim xilanase pada saat produksi. Ketidakmampuan delignifikasi dalam peningkatan aktivitas enzim xilanase diduga proses delignifikasi bagasse tebu oleh jamur pelapuk putih PSM 01 tidak optimal. Tidak optimalnya PSM 01 dalam delignifikasi mungkin dikarenakan lignin yang terdapat pada bagasse tebu sulit didegradasi oleh PSM 01, terbukti aktivitas lakase PSM 01 sebesar 15,6 Unit/gr. Sedangkan pada substrat *acacia mangium*, lakase PSM 01 dapat memiliki aktivitas 60,8 Unit/mg.

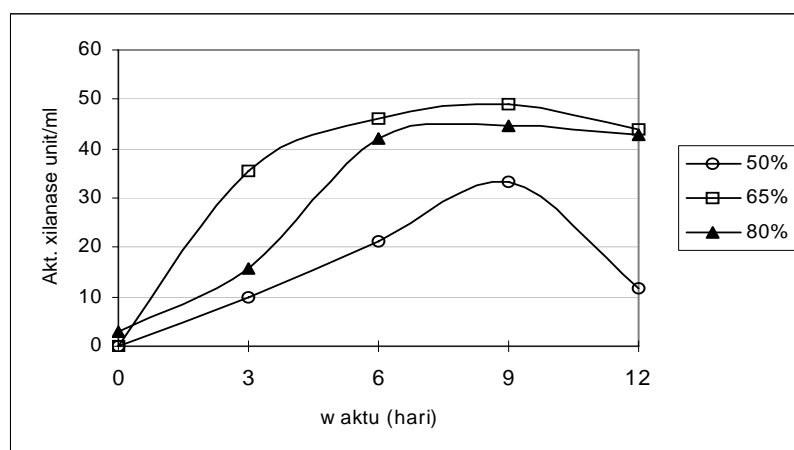
Ketidakmampuan delignifikasi dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* pada substrat bagasse tebu kemungkinan juga disebabkan oleh kandungan lignin pada bagasse tebu yang rendah (13-30%), sedangkan kandungan hemiselulosanya tinggi (25-50) (Hardjo 1989), sehingga proses delignifikasi tidak berpengaruh pada aktivitas enzim xilanase. Berdasarkan hal tersebut maka dapat disimpulkan bahwa produksi enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dapat berlangsung pada substrat bagasse tebu tanpa perlakuan delignifikasi.

C. Pengaruh Kadar Air Awal Media Fermentasi

Tahap ini ditujukan untuk mempelajari pengaruh kadar air awal media fermentasi terhadap aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan. Produksi enzim xilanase dilakukan dengan berbagai macam kadar air media yaitu sebesar 50%,

65% dan 80%. Selama fermentasi dilakukan pengamatan aktivitas enzim xilanase pada filtrat enzim yang dihasilkan. Pengamatan terhadap pengaruh kadar air awal media dilakukan pada dua jenis substrat yaitu bagasse tebu yang tidak didelignifikasi dan bagasse tebu yang didelignifikasi.

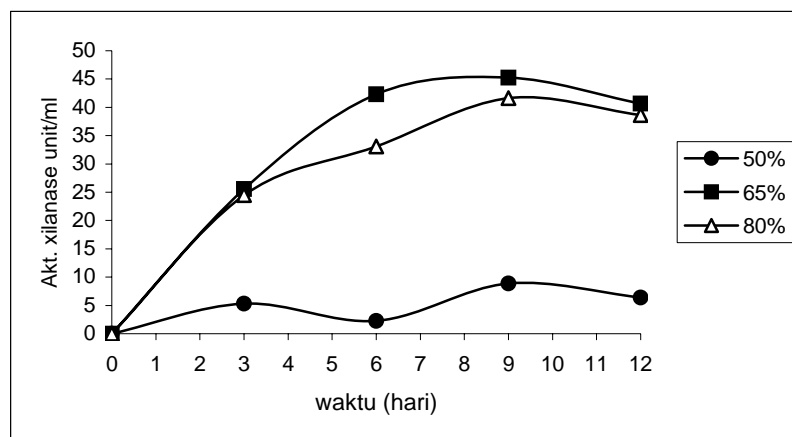
Kadar air awal media pada produksi enzim xilanase ternyata berpengaruh secara nyata (α 0.05) terhadap aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan. Keberadaan air yang mengandung medium Mendels berpengaruh pada proses sintesis enzim yang dilakukan oleh kapang *T. lanuginosus* IFO 150. Masing-masing kadar air awal media 50%, 65%, dan 80% menghasilkan aktivitas xilanase sebesar 33.14, 48.89 dan 44.82 Unit/ml untuk media yang tidak didelignifikasi (gambar 6). Sedangkan aktivitas enzim xilanase pada media yang didelignifikasi memberikan hasil pada masing-masing kadar air awal tersebut adalah 12.34, 45.24 dan 41.63 Unit/ml (gambar 7).



Gambar 6. Pengaruh kadar air awal media fermentasi terhadap aktivitas enzim pada media bagasse tebu yang tidak didelignifikasi.

Pada gambar 6 terlihat bahwa terjadi kenaikan aktivitas enzim xilanase pada media dengan kadar air awal 65%. Produksi enzim xilanase dengan media berkadar air awal 80% menghasilkan aktivitas enzim yang lebih rendah dibandingkan dengan media yang berkadar air awal 65 %. Selisih aktivitas enzim pada awal fermentasi adalah lebih besar akan tetapi mulai hari ke 6 perbedaan tersebut tidak begitu besar. Produksi xilanase dengan media berkadar air awal 50% memberikan hasil aktivitas enzim yang sangat rendah. Adanya perbedaan aktivitas enzim xilanase tersebut dikarenakan ketersediaan air yang terdapat dalam media mempengaruhi kerja dari kapang dalam mensintesis enzim xilanase. Kapang *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dapat bekerja secara optimal pada media fermentasi dengan kadar air awal 65%

Selain jumlah air, keberadaan nutrisi berupa media Mendels yang ditambahkan ke dalam larutan pengatur kadar air juga dapat mempengaruhi proses sintesis enzim. Penambahan nutrisi Mendels pada media berkadar air awal 65 % menghasilkan aktivitas enzim xilanase tertinggi.



Gambar 7. Pengaruh kadar air awal media fermentasi terhadap aktivitas enzim pada media bagasse tebu yang didelignifikasi.

Pada media bagasse tebu yang didelignifikasi, aktivitas enzim xilanase paling tinggi dicapai oleh fermentasi dengan kadar air awal 65%. Fermentasi dengan kadar air awal 50% menghasilkan aktivitas xilanase paling rendah. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kadar air awal 65% memberikan peningkatan aktivitas enzim xilanase secara nyata (α 0.05) (lampiran 6). Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa media yang dipilih dalam fermentasi produksi enzim xilanase adalah berkadar air 65%.

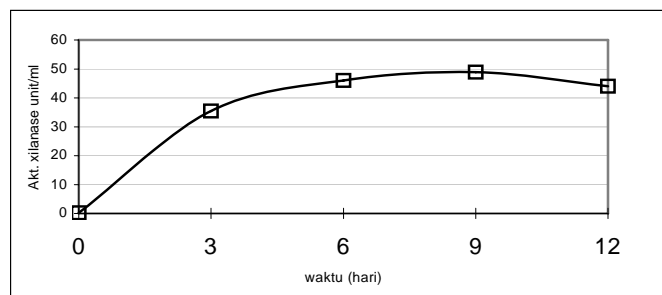
Penelitian tentang pengaruh kadar air awal media pada proses produksi enzim xilanase telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Penelitian yang menggunakan jamur *Aspergillus fumigatus* dan *Humicola lanuginosa* pada media tongkol jagung memperoleh kadar air awal optimum 65% (Kitpreechavanich *et al.* 1984), sedangkan dengan jamur *T. lanuginosus* diperoleh kadar air optimum 70% (Purkarthofer *et al.* 1994). Demikian juga Irawadi (1991) yang memproduksi xilanase dengan media tandan kosong kelapa sawit dan sabut kelapa dengan jamur *Neurospora sitophila* menggunakan kadar air awal media 70%. Selain itu penelitian oleh Alam *et al.* (1994) pada media ampas gandum dengan jamur *Thermoascus aurantiacus* digunakan kadar air awal 50%. Pada penelitiannya Alam menggunakan variasi kadar air awal media dari 20% sampai 100%, ternyata pada kadar air awal media 50% dicapai aktivitas enzim xilanase paling tinggi dan diikuti konsentrasi protein terlarut yang tertinggi.

Perbedaan kadar air optimum pada penelitian ini dengan penelitian tersebut selain disebabkan oleh jenis jamur yang digunakan berbeda, juga

disebabkan oleh perbedaan kemampuan menyerap air dari bagasse tebu yang lebih kecil bila dibandingkan dengan tandan sawit dan tongkol jagung.

D. Penentuan Waktu Fermentasi

Tahapan penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu fermentasi optimum dalam produksi enzim xilanase dengan menggunakan media bagasse tebu. Fermentasi produksi enzim xilanase dengan media bagasse tebu yang tidak didelignifikasi dan kadar air awal 65% dilakukan selama 12 hari. Hasil aktivitas enzim xilanase selama fermentasi dapat dilihat pada gambar 8. Pada gambar tersebut terlihat bahwa terjadi kenaikan aktivitas xilanase yang tinggi pada 3 hari pertama. Kenaikan aktivitas enzim mulai mendekati konstan pada hari ke enam. Aktivitas xilanase tertinggi dicapai pada hari ke 9 dan pada hari ke 12 mulai terjadi penurunan. Karena aktivitas enzim xilanase tertinggi dicapai pada hari ke 9 maka waktu fermentasi yang digunakan dalam produksi enzim xilanase adalah 9 hari.

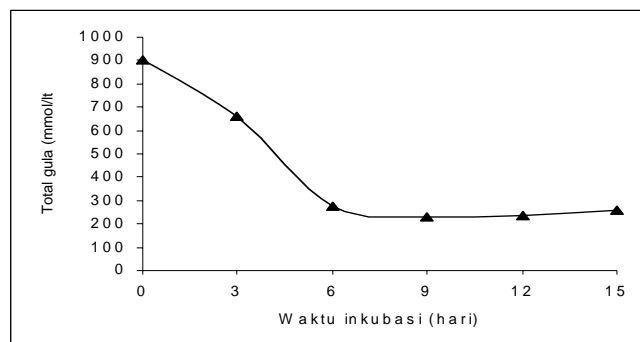


Gambar 8. Pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim xilanase

Pada tahap ini juga dilakukan pengamatan terhadap kadar glukosa sisa dan kadar protein filtrat enzim selama fermentasi. Hal ini untuk mengetahui

berlangsungnya proses metabolisme yang terjadi pada *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dan aktivitas spesifik enzim xilanase.

Glukosa sisa yang terdapat pada filtrat enzim diukur sebagai total gula tereduksi dengan metode Somogy-Nelson, dimana gula yang terukur adalah seluruh gula yang terdapat dalam filtrat enzim baik yang sudah terdapat dalam media maupun hasil metabolisme mikroba selama fermentasi. Pada gambar 9 disajikan grafik kadar total gula pereduksi selama fermentasi. Terlihat bahwa kadar total gula pereduksi menurun sejak awal fermentasi sampai dengan hari ke 9 fermentasi, dan pada hari berikutnya tidak terlihat lagi perubahan kadar gulanya. Hasil ini membuktikan bahwa selama fermentasi dengan waktu inkubasi 12 hari terjadi aktivitas proses metabolisme pada kapang *Thermomyces lanuginosus* IFO 150. Pada proses tersebut terjadi pemanfaatan glukosa dan gula sederhana lainnya yang terdapat dalam media, baik yang merupakan produk hidrolisis enzim maupun yang terdapat pada media sebelum fermentasi, sebagai sumber karbon. Glukosa dan monosakarida lainnya merupakan sumber karbon yang paling mudah dimanfaatkan oleh kapang (Irawadi 1991).



Gambar 9. Kadar total gula tereduksi selama fermentasi

Pola penurunan kadar total gula pereduksi selama fermentasi pada penelitian ini sama dengan penelitian yang dilakukan Irawadi (1991). Semakin lama waktu fermentasi, kadar total gula makin menurun dan stabil pada waktu optimumnya. Penurunan kadar total gula tereduksi menunjukkan bahwa penggunaan gula untuk pertumbuhan sel kapang lebih besar apabila dibandingkan dengan pembentukan gula akibat hidrolisis enzim.

Hasil pengukuran kadar protein dan sekaligus aktivitas spesifik enzim xilanase selama fermentasi dapat dilihat di lampiran 5. Aktivitas spesifik enzim xilanase meningkat dari awal fermentasi sampai hari ke 9. Hal ini menunjukkan bahwa laju sintesis enzim xilanase dipengaruhi oleh waktu fermentasi, pada awal fermentasi sintesis xilanase lebih tinggi karena hemiselulase yang bersifat larut dalam air ketersediaanya melimpah walaupun belum terjadi pemecahan pada substrat bagasse tebunya.

Kadar protein terlarut yang terdapat dalam filtrat enzim selama fermentasi tidak begitu banyak mengalami perubahan. Hal ini disebabkan karena protein selain digunakan oleh kapang sebagai sumber nitrogen, juga disintesa selama pertumbuhannya. Berdasarkan aktivitas spesifik yang meningkat sejalan dengan waktu fermentasi diduga bahwa semakin kecil kemungkinan disintesisnya enzim lain selain xilanase oleh kapang.

Analisis statistik pada α 0,05 menyatakan waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase. Didukung dengan analisa glukosa sisa dan analisa protein terlarut maka dapat ditentukan bahwa waktu optimum untuk fermentasi dalam produksi enzim xilanase dengan kapang *Thermomyces*

lanuginosus IFO 150 adalah 9 hari. Aktivitas enzim xilanase yang dihasilkan pada kondisi tersebut adalah 48,88 U/ml atau 1685,54 Unit/mg

Penelitian lain yang menggunakan media bagasse tebu dan jamur *Aspergillus ochraceus* dalam produksi xilanase, mendapatkan waktu optimum fermentasi 16 hari dengan aktivitas sebesar 18,6 Unit/ml (Biswas *et al.* 1988). Selain itu Kadowaki *et al.* (1997) yang menggunakan jamur *Aspergillus tamarii* pada media bagasse tebu dengan fermentasi basah, diperoleh waktu optimum pada hari ke lima dengan aktivitas 16,7 Unit/ml. Demikian juga produksi enzim xilanase dengan jamur *Aspergillus awamori* diperoleh waktu optimum 2,5 hari dengan aktifitas xilanase sebesar 100 Unit/ml (Lemos dan Perera 2002).

Penggunaan *Thermomyces lanuginosus* dalam produksi enzim xilanase dengan media tongkol jagung pada penelitian lain, mendapatkan waktu fermentasi optimum 9 hari dengan aktivitas sebesar 337.000 nkat/g (Purkarthofer *et al.* 1993). Apabila dibandingkan dengan beberapa penelitian tersebut, hasil yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki tingkat aktivitas enzim yang tidak jauh berbeda. Aktifitas enzim pada penelitian ini adalah lebih tinggi dibandingkan hasil yang diperoleh Biswas *et al.* (1988) dan Kadowaki *et al.* (1997), tetapi lebih rendah bila dibandingkan hasil penelitian Lemos dan Pereira (2002). Perbedaan ini disebabkan jenis jamur yang digunakan berbeda serta kondisi fermentasi yang bervariasi sehingga tidak dapat dibandingkan secara langsung. Pemakaian jamur *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 memiliki kelebihan dibandingkan dengan jamur lain karena memiliki kemampuan mendegradasi xilan (xilanase) tanpa diikuti aktivitas selulase.

Aktivitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 yang ditumbuhkan pada media bagasse tebu dalam penelitian ini adalah 1685.54 U/mg. Aktivitas enzim xilanase tersebut lebih tinggi bila dibandingkan dengan aktivitas xilanase *T lanuginosus* (72,8 U/mg) pada media xilan murni (Gomes 1993). Hal ini menunjukkan bahwa bagasse tebu dapat dijadikan alternatif media pengganti xilan murni dalam produksi enzim xilanase, sebagaimana tongkol jagung dan juga ampas gandum.

E. Karakterisasi Enzim

Tahapan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat-sifat dari *crude* enzim yang dihasilkan. Setiap enzim yang diproduksi pada jenis substrat tertentu dan mikroorganisme tertentu akan memiliki sifat dan cara kerja yang berbeda-beda. Salah satu sifat enzim yang sangat penting adalah stabilitas. Stabilitas enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya adalah waktu penyimpanan, suhu, pH dan senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim. Sedangkan berhubungan dengan cara kerja enzim maka aktivitas optimum juga sangatlah penting untuk diketahui. Aktivitas optimum enzim juga dipengaruhi oleh suhu dan pH. Setiap enzim akan memiliki sifat khas berupa aktivitas optimum dan stabilitas enzim. Sifat itulah yang akhirnya disebut sebagai karakter suatu enzim yang dapat membedakan dengan enzim lain.

Beberapa sifat enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 yang diproduksi pada bagasse tebu yang ingin diketahui dalam penelitian ini adalah aktivitas optimum pada berbagai suhu dan pH reaksi, stabilitas enzim

akibat perubahan pH dan suhu penyimpanan serta pengaruh penambahan ion logam.

E.1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas enzim

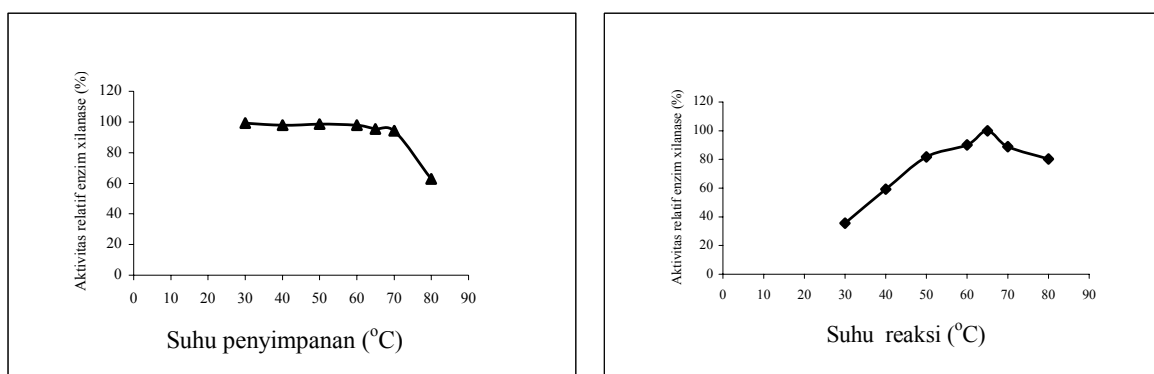
Penentuan suhu optimum aktivitas enzim sangat diperlukan dalam penerapan suatu enzim, sebab pada suhu yang terlalu rendah kestabilan enzim tinggi tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas tinggi tetapi kestabilannya rendah.

Aktivitas enzim dibawah pengaruh suhu tertentu dapat dinyatakan dengan aktivitas relatif dan aktivitas sisa. Pada penelitian ini dipilih aktivitas relatif untuk penentuan suhu optimum dan termostabilitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150. Aktivitas relatif adalah hasil bagi antara aktivitas enzim pada kondisi (suhu, pH dan waktu) tertentu dengan aktivitas enzim pada suhu optimum.

Aktivitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dalam menghidrolisis xilan dengan mediator bufer fosfat 0,2 M pH 6, menunjukkan aktivitasnya pada kisaran suhu 50 °C sampai 80 °C. Aktivitas xilanase optimum dicapai pada suhu reaksi 65 °C (gambar 10 B). Stabilitas enzim xilanase terhadap suhu penyimpanan adalah bersifat termostabil. Terbukti enzim tidak kehilangan aktivitas pada suhu dibawah 60°C. Pada suhu 70°C masih menunjukkan adanya aktivitas relatif sebesar 79,7% (gambar 10 A).

Enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 merupakan enzim yang bersifat termofilik karena memiliki aktivitas optimum pada suhu diatas 55°C

(Yu *et al.* 1987). Kemampuan aktivitas enzim termofilik pada suhu tinggi disebabkan oleh banyaknya jembatan disulfida pada struktur protein enzim, sehingga dibutuhkan suhu tinggi untuk pengaktifannya. Sebaliknya pada enzim yang optimum pada suhu rendah, terjadi pelipatan asam amino sistein pada sisi aktif enzim akibat denaturasi protein pada saat suhu tinggi (Kulkarni *et al.* 1999).



Gambar 10. Karakteristik enzim xilanase akibat perubahan suhu.

Sifat stabilitas terhadap perubahan suhu menunjukkan bahwa enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 termasuk termostabil. Salah satu penyebab sifat termostabilitas enzim tersebut adalah kemampuan mempertahankan diri dari denaturasi protein oleh pengaruh panas. Leningher (1995) menyatakan bahwa denaturasi protein menyebabkan susunan tiga dimensi dari rantai polipeptida enzim terganggu, molekul tersebut terbuka menjadi struktur acak sehingga kehilangan aktivitas biologisnya, tanpa menyebabkan kerusakan pada kerangka kovalen.

Pada penelitian sebelumnya oleh Alam *et al.* (1994) menyatakan bahwa enzim xilanase dari *Thermoascus aurantiacus* memiliki aktivitas optimum pada

suhu 70°C. Produksi xilanase dari mikroba termofilik *B. acidocaldarius* dan *Clostridium thermolacticum* yang masing-masing diproduksi pada suhu 60 dan 65 °C mempunyai aktivitas maksimum pada suhu 80 °C (Kulkarni *et al.* 1999). Sedangkan Cesar dan Vladimir (1996) yang menggunakan substrat *wheat brand* memperoleh kondisi optimum pada suhu antara 60–70 °C. Kondisi optimum enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus IFO 150* yang dicapai dalam penelitian ini hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Cesar (1996).

Proses kimia yang dapat menjelaskan peranan suhu pada sebuah reaksi enzimatik adalah bertambahnya suhu sampai dengan suhu optimum akan meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat sehingga mempermudah keduanya untuk bereaksi. Sebaliknya pada suhu yang lebih tinggi dari suhu optimum maka akan terjadi perubahan konformasi protein enzim dan menyebabkan enzim inaktif. Karena pusat aktif enzim selalu terdiri dari beberapa residu asam amino yang terdapat dalam struktur tiga dimensi protein enzim, maka pembukaan rantai molekul protein menyebabkan kerusakan pusat yang aktif akibatnya enzim tidak aktif.

Pada suhu tinggi substrat juga mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki lokasi aktif enzim. Pada kondisi tersebut laju reaksi enzimatik akan mengalami penurunan.

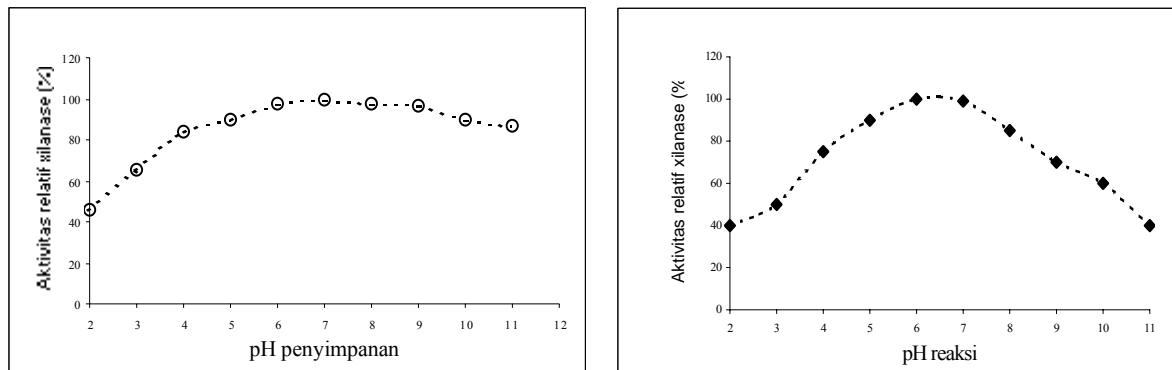
E.2. Pengaruh perubahan pH terhadap aktivitas dan Stabilitas enzim

Suatu reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH sehingga diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi. Enzim menyediakan banyak tempat untuk pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lain. Gugus fungsional pada sisi aktif yang dapat terionisasi memegang peranan penting pada suatu reaksi yang dikatalisa oleh enzim. Berubahnya pH lingkungan enzim maka akan mempengaruhi ionisasi dari gugus ionik enzim dan substrat.

Enzim yang memiliki aktivitas 12.42 Unit/ml digunakan untuk melakukan uji aktivitas pada berbagai pH reaksi, agar diketahui aktivitas optimumnya. Sedangkan untuk mengetahui stabilitasnya, enzim yang telah diinkubasi dalam berbagai pH dan disimpan selama 24 jam diuji aktivitas xilanasenya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktifitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dalam menghidrolisis xilan pada suhu 55 °C, bekerja dengan baik pada pH 5-8 dan mencapai aktivitas optimum pada pH 6.5 (gambar 11B). Berdasarkan hal tersebut enzim memiliki profil pada kisaran pH yang luas dan mengindikasikan bahwa xilanase tersebut diduga memiliki lebih dari satu sub unit gugus aktif (Irawadi 1991).

Stabilitas enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 akibat perubahan pH adalah kurang stabil pada pH 2-4 (aktivitas relatif xilanase 40%) dan lebih stabil pada kisaran pH 6-11. Aktivitas relatif xilanase pada pH 5 adalah sebesar 90%, peningkatan aktivitas sampai pada pH 6.5 dan akhirnya menurun aktivitasnya sampai aktivitas relatif 87% pada pH 11 (gambar 11A).



Gambar 11. Karakteristik enzim xilanase akibat perubahan pH.

Penelitian sebelumnya oleh Alam *et al.* (1994) menyatakan bahwa enzim xilanase dari *Thermoascus aurantiacus* memiliki kondisi optimum pada pH 5, dan enzim stabil pada pH 5-11. Sedangkan Cesar (1996) yang menggunakan substrat *wheat brand* dengan jamur *Thermomyces lanuginosus* memperoleh kondisi optimum pada pH 5-7, dan enzim relatif stabil pada pH 5-9. Dibandingkan dengan enzim xilanase lain, kelebihan enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 yang diperoleh dari penelitian ini adalah memiliki kestabilan terhadap perubahan pH pada daerah pH basa atau alkali hal ini dapat meningkatkan penggunaan enzim xilanase pada proses pemutihan pulp yang memiliki kondisi alkali (Haltrich *etal.* 1996).

E.3. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim xilanase

Tahapan analisa pengaruh ion logam terhadap aktifitas enzim ditujukan untuk mengetahui jenis logam yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150. Pengaruh penambahan ion logam

terhadap aktivitas enzim memiliki tiga kategori yaitu menghambat (inhibitor), meningkatkan (kofaktor) dan tidak mengakibatkan perubahan.

Pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas xilanase akibat penambahan larutan berbagai ion logam dengan konsentrasi 1mM dituliskan pada tabel 5. Hasil yang diperoleh adalah bahwa aktivitas enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dapat ditingkatkan aktivitasnya oleh ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} sedangkan untuk ion Ca^{2+} dan Zn^{2+} hampir tidak mempengaruhi aktivitasnya. Akan tetapi untuk ion Mg^{2+} menyebabkan penurunan aktivitas enzim menjadi 88 %.

Tabel 5. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim xilanase.

Ion logam (1 mM)	Aktivitas enzim (Unit/ml)	Prosen aktivitas
Kontrol	17.81	100
Ca^{+}	18.20	102
Cu^{2+}	19.59	110
Fe^{2+}	22.88	128
Mg^{2+}	15.73	88
Zn^{2+}	18.07	101

Hasil penelitian lain yang menggunakan enzim xilanase dari strain berbeda dan media ampas gandum menyatakan bahwa penambahan ion logam Mn^{2+} dan Fe^{2+} dapat menghasilkan peningkatan aktivitas enzim sebesar 137% dan 141% dan penghambatan 59% oleh ion Hg^{+} , sedangkan ion Mg menghasilkan aktivitas 94% (Cesar dan Vladimir 1996). Selain itu Ghosh *et.al* (1993) menyatakan bahwa hanya penambahan ion Ca^{2+} yang mampu menaikkan aktivitas enzim xilanase sampai tingkat 102 %, sedangkan ion logam Mg, Zn, menghambat pada 87,5 %, ini dilakukan pada enzim xilanase yang berasal dari *Aspergillus Sydowii* MG 49

pada konsentrasi 5 mM. Peneliti tersebut berpendapat bahwa ion logam yang kurang berpengaruh tersebut bersifat sebagai kontaminan dan meningkatkan ikatan antara enzim substrat dengan ikatan elektrostatik.

Peningkatan aktivitas enzim xilanase akibat penambahan larutan ion logam diduga karena ion tersebut dapat menstabilkan enzim dan berfungsi sebagai kofaktor enzim xilanase. Pengikatan ion logam pada sisi aktif enzim mengakibatkan perubahan struktur konformasi enzim sehingga aktivitas katalitiknya meningkat. Hal ini terjadi pada penelitian Ghosh *et al* (1993) dimana ion Co dapat meningkatkan aktivitas enzim β xilosidase menjadi dua kali lebih besar.

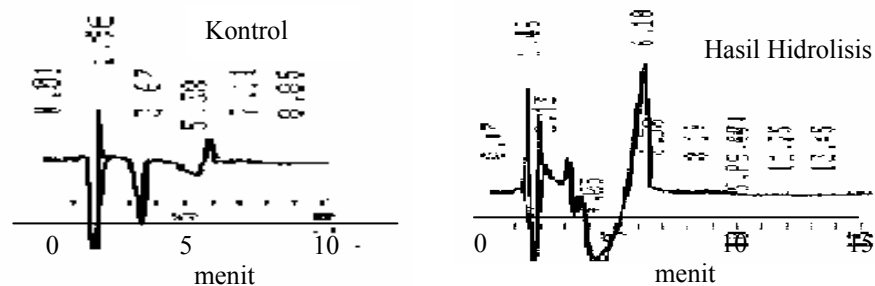
Penghambatan aktivitas enzim akibat penambahan ion logam diduga karena ion logam tersebut tidak mempengaruhi sisi aktif enzim xilanase dan berfungsi sebagai inhibitor. Pengikatan ion logam tidak terjadi pada sisi aktif enzim tetapi pada daerah yang tidak terlibat dalam efisiensi hidrolisis substrat (Irawadi, 1991). Pendapat lain juga menyatakan bahwa penghambatan terjadi karena ion logam tersebut bersifat sebagai kontaminan dan meningkatkan ikatan antara enzim-substrat dengan ikatan elektrostatik yang kuat (Ghosh *et al.*, 1993).

E. 4. Hasil hidrolisis enzim xilanase

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui jenis gula hasil reaksi hidrolisis yang diperoleh dari reaksi enzim xilanase dengan xilan *birch wood* (Sigma) 1%. Metode yang digunakan untuk mengetahui jenis gula hasil hidrolisis adalah metode HPLC. Hasil analisis jenis gula xilosa yang dihasilkan oleh reaksi hidrolisis enzim disajikan pada gambar 12. Pada gambar tersebut terdapat dua

piktogram dari larutan kontrol dan larutan hasil hidrolisis. Perbedaan puncak terjadi pada kedua piktogram tersebut yaitu waktu retensi 5,38 menit dan 6,1 menit. Piktogram larutan hasil hidrolisis, puncak xilosa mengalami pergeseran dikarenakan oleh konsentrasi xilosa yang lebih tinggi dan kemungkinan adanya senyawa hasil hidrolisis selain xilosa.

Proses hidrolisis enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 terhadap substrat xilan pada kondisi optimum selama 10 menit telah menghasilkan gula xilosa pada larutan kontrol dan larutan hasil hidrolisis. Adanya kandungan xilosa dalam larutan kontrol diduga karena pada filtrat enzim yang digunakan sebagai sampel sudah terdapat xilosa yang diproduksi oleh mikroba selama fermentasi enzim dan bukan disebabkan reaksi hidrolisis enzim xilanase.



Gambar 12. Kromatogram hasil analisis xilosa dengan metode HPLC

Penggunaan metode HPLC dalam menganalisis jenis gula dalam reaksi hidrolisis enzimatis telah dilakukan peneliti sebelumnya. Ghokhale *et al.*, (1997) yang menyatakan bahwa enzim xilanase yang bebas selulase yang berasal dari *yeast* telah mampu menguraikan hemiselulosa yang terdapat pada tongkol jagung, serat jerami dan pulp bagasse tebu dengan produk hidrolisis berupa xilosa dalam

jumlah besar dan sedikit xilobiose dan xilotriose. Terbatasnya kolom HPLC dan larutan gula standar yang dimiliki maka untuk jenis gula lain tidak bisa teramati dalam penelitian ini. Berdasarkan pada jenis gula xilosa yang diperoleh dari penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa dalam ekstrak enzim kasar tersebut terdapat enzim xilanase. Hal ini didasarkan pada cara kerja enzim tersebut yang mampu mendegradasi xilan dan akhirnya menghasilkan senyawa xilosa.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Enzim xilanase termostabil *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dapat diproduksi pada media bagasse tebu tanpa perlakuan delignifikasi. Aktivitas enzim xilanase tertinggi sebesar 48.88 Unit/ml dicapai pada media fermentasi dengan kadar air awal 65% dan lama fermentasi 9 hari.

Karakterisasi enzim xilanase *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 telah menghasilkan enzim yang bersifat termostabil. Enzim memiliki aktifitas optimum pada suhu reaksi 65 °C dan pH 6,5. Uji sifat termostabil enzim dibuktikan oleh adanya aktivitas relatif 79.7% pada suhu 70°C. Uji stabilitas terhadap perubahan pH menunjukkan kestabilan pada daerah pH alkali dan kurang stabil pada pH asam. Penambahan Ion logam Cu^{2+} dan Fe^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim sedangkan penambahan ion Mg^{2+} menghambat aktivitas enzim xilanase. Enzim xilanase menghidrolisis substrat larutan xilan murni pada kondisi optimum menghasilkan gula xilosa.

SARAN

Pada penelitian berikutnya disarankan untuk dilakukan penelitian yang memanfaatkan enzim xilanase termostabil *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dalam aplikasi pemutihan pulp atau pada penjernihan *juice* buah sehingga enzim tersebut dapat digunakan di bidang industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Aero S, 1995. Wood Chemistry jilid II. Penerjemah: Hardjono S. UGM Press, Yogyakarta.
- Alam M, Gomes I, Mohiuddin G, Hoq MM. 1994. Production and Characterization of Thermostable xylanase by *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. *Enzym Microb. Technol.* 16 : 298 – 302.
- Assosiation of Official Analytical Chemist. 1985. Official Method of Analysis of the assosiation of Analytical Chemist. 15th ed. AOAC. Inc. Arlington, Virginia.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol* 23: 257-270.
- Bailey MJ, Buchert J, Viikari L. 1993. Effect of pH on Production of Xylanase by *Trichoderma reesai* on xilan and cellulosa base media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:224-229.
- Bedford MR, Classen HL. 1992. The influence of deataro900y xylanase on intestinal viscosity and molekular weight distribution of carbohidrates in rey-fat broiler chick. Dalam Richana N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia. *Buletin Agrobio* 5 (1) 29-35.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanase and their industrial appication. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 326-338
- Biswas SR, Misra AK, Nanda G. 1988. Xilanase and B xylosidase production by *Aspergillus ocraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 31 : 613-616.
- Biswas SR, Jana SC, Misra AK, Nanda G. 1990. Production, Purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus acraceus*. *Biotechnol. Bioengng.* 35 :244-251
- Biely P. 1985. Microbial Xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3: 287-290.
- Bollag DM, Edelsteinn SJ. 1991. Protein Methods. New York. J. Wiley.
- Carvalho W, Silva SS, Litolo M, Filipe MGA, Manchilha IM. 2002. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hidrolisate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. *Z.Nathurforsch.* 57 c : 109-112.

- Cesar T, Vladimir M. 1996. Purification dan properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. Journal Enzyme and Microbial Technology. 19:289-296. Elsevier Science Inc.
- Chen L.F, Gong CS. 1985. J. Food Science 50 226 –228 dalam Parajo JC, Herminia D dan Jose MD. 1998. Biotechnological Production of Xylitol. part 3: Operation in culture Media Made From Lignocellulose Hidrolisates.
- Cho. Goo, Suh S, Choi YI. 1996. Overproduction, purification dan characterization of *Bacillus stearotermophilus* Endo-xylanase A (xyn A). J. Microbiology and Biotecnology 6: 79 – 85.
- Damaso MCT, Andrade CMC, Pereira N. 2002. Production dan properties of cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC- 4145 Braz. J. Microbiol. 33(4).
- Dekker RFH. 1980. Induction dan characterization of celobiose dehidrogenatioe produced by a spesies of *Monolia sp.* J. of Heneral Microbiology 120: 309-316.
- Doppelbauer R, Esterbauer H, Steiner W, Lafferty R, Steinmuller H. 1987. The use of lignocellulosic waste for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 485-494
- Dung NV *et al.* 1993. Purification an properties Of β -, 4-xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. Biosci. Biotech. Biochem. 10 : 1708 – 1712.
- Fengel D, Wegener D. 1984. Wood Chemistry. Ultra structure. reaction. Walter de Gruyter. Berlin. New York.
- Gamerith G, Groicher RS, Zeilinger S, Herzog P, Kubicek EP. 1992. Cellulase poor xylanase produced by *Tricoderma reseei* Rut C30 on hemicellulosa substrat. Appl. Micrbiol. Biotechnol. 38, 315 – 322.
- Gandana SG. 1978. Pengawasan Penggilingan Cara Hawari pada kondisi Indonesia. Berita Pusat Perkebunan Gula Indonesia. Tahun XIV no 2 juni 1982.
- Ghosh M, Das A, Mishra AK, Nanda G. 1993. *Aspergillus syidowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolitic enzyme. Enzyme Microbiol. Technol. 15: 703-709.
- Gilbert M, Breuil C, Saddler JN. 1992. Characterization of enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. Biores. Technol. 39:601-608.

- Gokhale DV, Patil SG, Bastawde KB. 1998. Potential application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulosa fractions. *Bioresource Tehnology* 63 : 187 – 191.
- Gomes *et al.* 1993. Production of High level cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. *J. Biotechnol* 30: 283-293.
- Gomes DJ, Gomes J, Steiner W. 1994. Factor ifluenting the induction of endoxylanase by *Thermoascus auranticus*. *J. Biotechnol.* 33 : 87-94.
- Guttierrez-Correa M, Tengerdy RP. 1998. Xylanase production by fungal mixed culture solid state fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnol. letter* 20: 45-47.
- Haltrich D, Steiner W. 1994. Formation of xylanase by *Shizophillum commune*: effect of medium components. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 229-235.
- Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Zupancic S. 1996. Production of Fungal xylanase. *Biores. Technol.* 58 : 137-161.
- Hardjo S. 1989. Biokonversi pemanfaatan limbah industri pertanian Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Dir-Jen Pendidikan Tinggi. PAU Pangan dan Gizi. IPB Bogor.
- Irawadi TT. 1991. Produksi enzim ekstraselular (selulase dan xylanase dari *Neurospora sitopila* pada substrat limbah padat kelapa sawit [Disertasi] Institut Pertanian Bogor, Fakultas Pascasarjana.
- Irawadi TT. 1999. Kajian Hidrolisis enzimatik limbah lignoselulose dari Industri Pertanian. *J. Teknologi Pertanian* vol 3 (1) 20 – 5.
- Irawadi TT. 2000. Kajian sifat enzim xylanase Murni dari *Neuro sitopila*. *Buletin Kimia* 1 : 17 – 22.
- Irawadi TT, Rukmini HS. 1999. Tehnik Pemurnian Selulase. Pusat Antar Universitas. Bioteknologi. IPB Bogor.
- Jain A. 1995. Production of xylanase by *Thermophilic melanocarpus albomyces* Iis-68. *Process Biochem.* 30: 705-709.
- Jeffries TW, Yang VW, Davis MW. 1998. Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalisilic, arsenomolibdate and ion chromatographic assays. *Apll. Biochem. Biotechnol.* Vol 70:257-265.

- Kadowaki MK, Souza CGM, Simao RCG, Peralta RM. 1997. Xylanase Production by *Aspergillus tamarii*. Appl. Biochem. Biotechnol. 66 : 97-106.
- Kamitsuji H. 2000. Perbandingan aktivitas lakase dari jamur pelapuk putih PSM01 dengan lakase komersial dari *Rhus vernicivera* (Sigma) **dalam** Yanti. 2000. Isolasi lakase dari jamur pelapuk putih PSM01 dengan tehnik Kromatografi penukar ion dan filtrasi gel [skripsi] Bogor: Institut Pertanian Bogor, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengeahuan Alam.
- Kartasaputra AG. 1991. Pengantar anatomi tumbuh-tumbuhan. Rineka Cipta. Jakarta.
- Kirk TK dan Chang HM. 1987. Potensial applycation of bioligninolytic system. Enzyme Microb. Technol. 3:189-196.
- Kitpreechavanich V, Hayasi M, Nagai S. 1984. Production of xilan degrading enzymes by Termophilic fungi *Aspergillus fumigatus* ang *Humicola lanuginosa*. J. Ferment. Technol. 62: 63 –69.
- Kulkarni NA. 1999. Molecular dan Biotechnological Aspect of Xylanases. FEMS Microbial. vol 23 : 411 – 456.
- Lemos JLS, Pereira NJ. 2002. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. Braz. Arch. Biol. Tchnol. vol 45. 4.
- Leningher AL. 1995. Dasar-dasar biokimia. Penerjemah Suhartono M. Airlangga. Jakarta.
- Lowry OH, Rosebroughh NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193:265-270.
- Maheswari R, Kamalam PT, Thurston A. 2000. Thermophilic : their fungi and enzyme. Microbiology and Molecular Biologi Review 64 (3): 461-488.
- Matharani IM, Ahring BK. 1992. Thermophilic and alkalofilic xylanase from several *Dictyoglomus* isolates. Appl. Microbiol. Biotech. 38 : 23 – 17.
- Mendels M, Reese ET. 1957. Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. J. Bacteriaol. 73 :269.
- Millagrers AMF, Lacis LS, Prade LA. 1993. Characterization of xylanase Production by a local isolate of *Penicillium janthilenum*. Enzyme Microb. Technol. 15: 248-253.

- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 :426-428.
- Mishra C, Seeta R, Rao M. 1984. Production and properties of extracellular endoxylanase from *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 224-228.
- Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R, Horikoshi K. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus sp.* Strain 41M1. *Appl and Environ. Microbiol.* 59(7):2311-1316.
- Paturau JM. 1969. *By Product of The Cane Sugar Industri an Introduction to Their Industrial Utilization.* second edition. seri 3. Elsevier.
- Parajo JC, Herminia D, Jose MD. 1998. *Biotechnological Production of Xylitol.* part 3: Operation in culture Media Made From Lignocellulose Hidrolisates.
- Park YS, Yum DY, Bai DH, Yu JH. 1992. Xylanase from alkalophilic *Bacillus sp* YC.335. *Biosci. Bitechnol. Biochem* 56 : 1355 –1356.
- Perez-avaloz O, Ponce-Nayola, TorreM. 1996. Induction of xylanase and B xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl. Microb. Biotechnol.* 46 : 405- 409.
- Prasetya B *et al.* 1996, Production of lignolytic enzyme of white root fungi from Indonesian Tropical forest and their bleachability on the kraf pulp of *accacia mangium*. *Proceeding of the 1st International Wood Science Seminar.* Kyoto. Jepang.
- Purkharthofer H, Sinner M, Steiner W. 1993. Cellulase free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid state culture. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 677-682.
- Rahman AV.1989. *Pengantar Tehnologi Fermentasi.* Pusat Antar Universitas. IPB Bogor.
- Raj KC, Chandra TS. 1995. A Cellulase-free xylanase from alkali toleran *Aspergillus fischeri* Fxn1. *Biotechnol. Letter.* 17 : 309- 314.
- Richana N. 2002. Produksi dan prospek enzim xylanase dalam pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin Agrobio* 5(1):29-36.
- Richard S, Whistler A. 1970. Di dalam Pigman W, Harton D. (eds) the *Carbohydrates Chemistry and Biochemistry.* Academic Press. New York.

- Ruiz-Arribas A, Fernandez-Abalos JM, Sanchez P, Garda AL, Samaria RI. 1995. Overproduction purification and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces Halstedii* JM8. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 2414-2419.
- Sasaki H, Shiba H, Matsumoto N. 1993. Large scale production of xilooligosaccharides using ultrafiltration and reverse osmose membranes. Paper WE53 presented at sixth European Congress on Biotechnology. Firenze. Italy. 13-17 Juni 1993.
- Schwimmer S. 1981. Source Book of Enzymology. New York. Springer-Verlag.
- Schmidt-Kastener G, Golker CI. 1987. Downstream processing in biotechnology di dalam Bu'Lock J. Kristiansen B. editor. Basic Biotechnology. London. Academic Press.
- ShohamY, Zosim Z, Rosenberg E. 1993. Partial Decoloration of Kraft Pulp at High Temperature and High pH value with an Extracellular Xylanase from *Bacillus thermopilus*. J. Biotec. 30 : 123 – 131
- Shomers WJ, Visser, Rombouts FM, Van't KR. 1992. Developments in downstream processing of polysaccharide converting enzymes. J. Biotechnol. 11 : 199-222.
- Somogyi M. 1952. Note on sugar determination. J. Biol. Chem 195: 19-23.
- Sugden C, Bhat MK. 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. World J. Microbiol. Biotechnol., 10, 444-451.
- Sunna A, Puls J, Antrakinan G. 1996. Purification and characterization of two thermostable endo 1,4, B-D-xylanase from *Thermotoga thermarium*. Biotech. Appl. Biochem. 24: 177-185.
- Suprijadi. 1987. Mempelajari proses biodegradasi ampas tebu (bagasse) oleh *Pleurotus ostreotus* untuk bahan pakan ternak. [Skripsi] Institut Pertanian Bogor, Fakultas teknologi pertanian.
- Tim Industri Pertanian IPB dan PTP IX. 1984. Feasibility Study Industri Makanan Ternak. Fakultas Tehnologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Toharisman A. 1993. Potensi pemanfaatan limbah Industri Gula sebagai Bahan Organik Tanah. Berita Pusat Perkebunan Gula Indonesia. 8 Februari 52-54.

- Tsujibo H. 1992. Purification, properties and Partial amino acid Sequences of Thermostable Xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC -520. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 371 – 375.
- Wang SL, Chen LG, Chen CS, Chen LF. 1994. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus sp.G-393*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45/46 : 655-662.
- Watanabe T, Kuwahara H, Prasetya B, Idiyanti T, Suryanegara L. 2002. Biobleaching of *Acacia mangium* kraft pulp using lacase secreted by local isolat PSM 01 in combination with hydrogen peroxide bleaching. *Proceeding of the Fourt International Wood Science Simposium.* Jakarta, 2002.
- Wenzl HKJ. 1990. *Chemical Technology of wood.* Academic press. Inc. London.
- Yang RCA, MacKenzie CR, Bilous D, Seligy VL, Narang SA. 1988. Molecular Cloning and expression of Xylanase gen from *Bacillus polymyxa* in *Escheresia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 1023 – 1029.
- Yu EK, Tan LUL, Gahan MHK. 1987. Production of thermostable xylanase by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 9:16-24.
- Yu J, Park Y, Kim J, Kong I, Bai D. 1993. Nukleotide sequence and analysis of xylanase gene (XynS) from alkali toleran *Bacillus sp*, YA-14 and comparison with other xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 3:139 –145.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan reagen dalam analisis gula dengan metode Somogy-Nelson

a. Reagen Nelson A

Reagen nelson A terdiri dari Na_2CO_3 . Anhidrat 12,5 gr, KNa.Tartrat 12,5 gr, NaHCO_3 10 gr dan Na_2SO_4 100 gr dilarutkan dalam aquadest hingga tepat 500ml.

b. Reagen Nelson B

Pereaksi ini terdiri dari $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 15 gr dilarutkan dalam 100 ml air demineral dan ditambahkan 1-2 tetes H_2SO_4 pekat.

c. Larutan stoc C

Larutan stoc C dibuat dengan A : B dengan perbandingan 25 : 1 (dibuat pada saat akan digunakan)

d. Larutan arsenomolibdat

Pereaksi arsenomolibdat dibuat dengan cara $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 25 gr, H_2SO_4 pekat 21 ml dan aquadest 400 ml dicampur dengan $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$ yang dilarutkan dalam 25 ml air. Kemudian diaduk dan diinkubasi pada 37°C selama 24 –48 jam, dan disimpan dalam botol coklat dan di dalam lemari pendingin.

e. Larutan stok glukosa standar

Glukosa standar 1% dalam (W/v) dalam asam benzoat jenuh diencerkan sehingga diperoleh larutan glukosa standar dengan konsentrasi masing-masing 50, 150 dan 300 $\mu\text{g/ml}$.

f. Larutan xilose standad dibuat dengan konsentrasi 1000 μM dan untuk deret standar dibuat melalui pengenceran sehingga diperoleh 100, 200, 300, 400, 500 μM .

Lampiran 2. Pembuatan Buffer Phosphat 0,2 M

- a. Dibuat larutan A. 0,2 M NaHPO_4 (Monobasic sodium phosphat)
- b. Dibuat larutan B 0,2 M Na_2HPO_4 (Dibasic sodium phosphat)

Buffer pada pH tertentu dibuat dengan sejumlah x ml larutan A dan y ml larutan B, kemudiann dilarutkan dalam aquadest sampai 200 ml dan dilakukan pengukuran pH secara langsung.

PH	X ml larutan A	Y ml larutan B
6,0	87.7	12.3
6,5	68.5	31.5
7,0	39	61
7,5	16	84.0
8,0	5.3	94.7

Lampiran 3. Analisa Kimia Bagasse Tebu

a. Kadar air (AOAC, 1995)

Sampel yang akan diteliti ditimbang di dalam wadah cawan porselin kering yang telah diketahui beratnya kurang lebih sebanyak 1 gram, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 3 jam. Setelah kering cawan beserta isinya didinginkan dalam desikator hingga mencapai suhu kamar, selanjutnya ditimbang. Pengeringan contoh dilakukan sampai diperoleh berat konstan.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B1 - B2}{B1} \times 100$$

Keterangan :

B1 : berat sampel awal (gram)

B2 : berat sampel akhir

b. Kadar lemak (AOAC, 1995)

Padatan contoh bebas air sebanyak 2 gram diekstraksi dengan pelarut n-hexan dalam soklet selama 6 jam. Contoh hasil ekstraksi diuapkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator sampai diperoleh berat konstan. Kadar lemak dalam persen adalah bobot sampel awal dibagi bobot sampel akhir dikalikan 100.

c. Kadar Abu (AOAC, 1995)

Contoh sebanyak 2 gram ditempatkan di dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya, kemudian dipanaskan sampai tidak berasap lagi. Selanjutnya cawan dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 600 °C. Proses pengabuan dilakukan selama 2 jam, kemudian contoh langsung dipindahkan ke dalam desikator, didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dalam persen diperoleh dari bobot sampel awal dibagi dengan bobot sampel akhir dikalikan 100.

Lampiran 3. Analisa kimia Bagasse Tebu (Lanjutan).

d. Kadar Protein (AOAC, 1995)

Contoh yang telah dihaluskan sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 30 ml, kemudian ditambahkan 2,5 ml asam sulfat pekat dan 1 gram katalis selenium. Contoh dididihkan selama 1,5 jam atau sampai cairan jernih dan tidak berasap.

Untuk poses destilasi, labu beserta isinya didinginkan, kemudian campurannya dipindahkan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan 15 ml larutan NaOH 50 %. Erlenmeyer berisi 25 ml asam borat diletakkan di bawah kondensor, sebelumnya ditambahkan 2 tetes indikator (campuran metil merah 0,02 % dalam alkohol dan metil biru 0,02 % dalam alkohol), dengan perbandingan (2:1). Hasil destilasi dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna hijau menjadi ungu. Penetapan blanko dengan cara yang sama.

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \frac{(Y-Z) \times N \times 1,4 \times 6,25}{W}$$

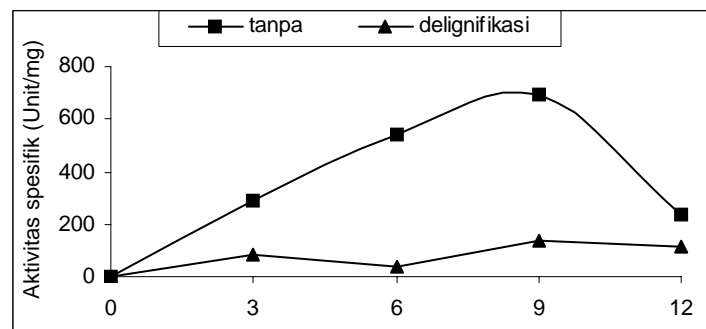
Keterangan :

Y = ml HCl titer untuk blanko N = normalitas HCl

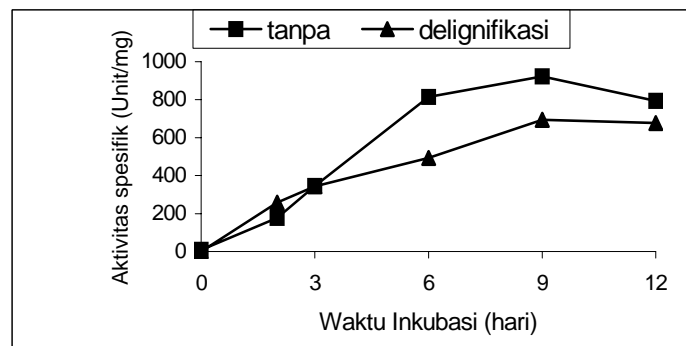
Z = ml HCl titer untuk sampel W = bobot contoh (gram)

Lampiran 4. Pengaruh delignifikasi terhadap aktivitas enzim pada media fermentasi dengan kadar air awal 50% dan 80%.

a. Pengaruh perlakuan delignifikasi terhadap aktivitas enzim xilanase pada media fermentasi dengan kadar air 50%.



b. Pengaruh perlakuan delignifikasi terhadap aktivitas enzim xilanase pada media fermentasi dengan kadar air 80%.



Lampiran 5. Hasil analisa kadar protein terlarut filtrat enzim selama fermentasi.

Waktu inkubasi (hari)	Aktivitas (Unit/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (Unit/mg)
3	31.54	0.037	852.4
6	45.05	0.039	1180.7
9	48.88	0.029	1685.54
12	44.03	0.044	1000.57

Lampiran 6. Hasil analisis ragam pada program SAS.

Hasil Analisis Ragam
Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
DL (Delignifikasi)	2	1 2
H (Hari)	5	0 3 6 9 12
KA (Kadar air)	3	50 65 80

Number of observations 60

Dependent Variable: AKTIVITAS - Aktivitas enzim xilanase (Unit/ml)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	19464.48244	671.18905	752.02	<.0001
Error	30	26.77541	0.89251		
Corrected Total	59	19491.25785			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AKTIVITAS Mean
0.998626	3.991497	0.944729	23.66855

Source	DF	ANOVA SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DL	1	442.48530	442.48530	495.77	<.0001
H	4	10355.53695	2588.88424	2900.67	<.0001
DL*H	4	280.20227	70.05057	78.49	<.0001
KA	2	5901.83058	2950.91529	3306.30	<.0001
DL*KA	2	220.99653	110.49827	123.81	<.0001
H*KA	8	1882.27151	235.28394	263.62	<.0001
DL*H*KA	8	381.15931	47.64491	53.38	<.0001

Duncan's Multiple Range Test for AKTIVITAS

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	0.892514

Means with the same letter are not significantly different.

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	.7877	.8278	.8538	.8723

Duncan Grouping	Mean	N	HARI
A	37.0920	12	9
B	31.1675	12	6
B	30.6865	12	12
C	19.3668	12	3
D	0.0300	12	0

Lampiran 6. Hasil analisis ragam pada program SAS (Lanjutan).

Duncan's Multiple Range Test for AKTIVITAS

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	0.892514

Number of Means	2	3
Critical Range	.6101	.6412

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	KADAR AIR
A	32.8382	20	65
B	28.2753	20	80
C	9.8922	20	50

Duncan's Multiple Range Test for AKTIVITAS

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	0.892514

Number of Means	2
Critical Range	.4982

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	DELIGNIFIKASI
A	26.3842	30	1 (Tidak delignifikasi)
B	20.9529	30	2 (didelignifikasi)