

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.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan atau memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Pemanfaatan 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 endoxilanasase dengan substrat bagasse tebu tanpa proses delignifikasi

Nama mikroba	Endoxilanasase	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 fxml</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 kemersial *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-4-0-metilglukoronoxilan) dan hetero 1-4- β -D—manan (galaktoglokomanan 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-glokosidik dengan jumlah monomer 150-200 unit. Rantai xilan bercabang dan

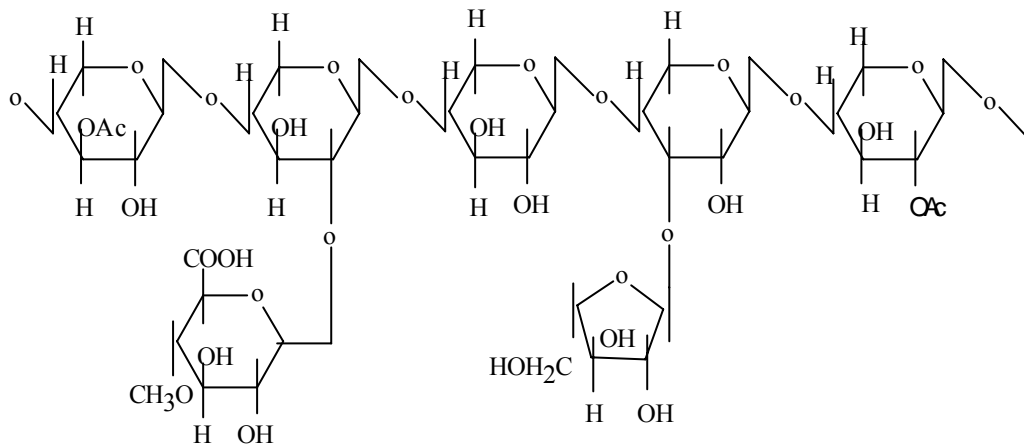
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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 iodum. 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 endoxilanasase dan beta xilosidase.

C. *Thermomyces Lanuginosus*

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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 hemisellulase 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.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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, endoxilanase diperoleh dari ekstraseluler (filtrat bebas sel) sedangkan β -xylosidase 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 -xylosidase.

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

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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 (Tsujiyo *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 Mn²⁺ dan Fe²⁺ 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 Ca²⁺ yang mampu menaikkan aktivitas enzim xilanase sampai tingkat 102 %, sedangkan ion logam

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan atau memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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). Pengcilan 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

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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 nutrisi 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,

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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

Purkharthofer *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.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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