

# Makara

## SERI SAINS

SK Dirjen Dikti Akreditasi Jurnal No. 167/DIKTI/Kep./2007

**Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8**

Anja Meryandini, Nunuk Widhyastuti & Yulin Lestari

Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga,  
Bogor 16680, Indonesia

Nunuk Widhyastuti

Puslit Biologi, Cibinong Science Center, Jln Raya Jakarta-Bogor KM 46,  
Bogor 16911, Indonesia

Halaman 55-60



## PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI XILANASE *Streptomyces* sp. SKK1-8

Anja Meryandini<sup>1</sup>, Nunuk Widhyastuti<sup>1,2</sup>, dan Yulin Lestari<sup>1</sup>

1. Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

2. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

E-mail: ameryandini@yahoo.com

### Abstrak

*Streptomyces* sp. SKK1-8 adalah bakteri penghasil xilanase. Enzim xilanase murni memiliki kondisi optimum pada 4,5 dan 50°C. Berat molekul enzim xilanase sekitar 14,4 kDa dan 13,40 kDa. Xilanase dari *Streptomyces* sp SKK1-8 dapat memecah substrat *p*-NP- $\beta$ -D-xilanopiranosida, *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida, *p*-NP- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan *p*-NP- $\alpha$ -D-galaktopiranosida. Nilai Vmax dan Km nya pada 50°C berturut-turut adalah 0,1796 ( $\mu$ mol xilosa/ menit/ml) dan 0,101 (mg/ml).

### Abstract

**Purification and Characterization of *Streptomyces* sp. SKK1-8 xylanase.** *Streptomyces* sp. SKK1-8 is a xylanase produced bacteria. Purified xylanase has an optimum condition at pH 4.5 and 50°C. The molecular mass of purified xylanase were determined to be 14.4 kDa and 13.4 kDa. The xylanase was capable of hydrolysing *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, *p*-NP- $\beta$ -D-xylanopiranoside, *p*-NP- $\beta$ -D-glucopiranoside, *p*-NP- $\alpha$ -D-galactopiranoside. The Km and Vmax values at 50°C measured on Birchwood xylan were 0.101 mg/ml and 0.1796  $\mu$ moles/minute/ml.

**Keywords:** Xylanase, streptomyces, purified

### 1. Pendahuluan

Hemiselulosa merupakan heteropolimer polisakarida yang keberadaannya di alam kedua terbanyak setelah selulosa. Kandungan hemiselulosa pada tanaman berkisar antara 20-30% berat kering kayu [1], sedangkan pada daun kadarnya mencapai 80-85% [2]. Keberadaan hemiselulosa yang melimpah di alam dan sifatnya yang dapat diperbaharui memungkinkan pemanfaatan hemiselulosa sebagai bahan baku untuk diolah menjadi produk yang bernilai ekonomis.

Xilan adalah komponen utama hemiselulosa yang memiliki tulang punggung rantai D-xilopiranosida dengan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4. Xilan memiliki residu *O*-asetil, arabinosil dan 4-*O*-metil-D-asam glukuronat yang terikat pada tulang punggungnya. Hidrolisa lengkap xilan menjadi monomernya memerlukan kerja sinergi beberapa enzim xilanolitik [3].

Enzim xilanolitik merupakan enzim kompleks yang terdiri atas 1,4- $\beta$ -endoxilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-

arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glukuronidase, asetil xilan esterase dan asam fenolat (asam ferulat dan asam fumarat) esterase [4]. Xilanase mikroba memiliki aplikasi yang luas. Enzim ini dapat digunakan untuk *biobleaching* pada industri kertas, penjernihan dan meningkatkan aroma jus dan anggur, meningkatkan kualitas roti dan pakan ternak, pengolahan limbah serta pengomposan.

Enzim ekstrak kasar *Streptomyces* sp. SKK1-8 memiliki suhu optimum pada 50°C, dan aktivitas pada rentang pH yang luas dengan pH optimum pada pH 6, stabil pada penyimpanan selama 1 bulan dalam refrigerator dan bebas dari selulase. Xilosa dan arabinosa merupakan produk hidrolisisnya dari *birchwood* xilan. Hasil SDS-PAGE dan zimogram menunjukkan adanya tiga pita xilanase yang berdekatan dengan berat molekul 16,80 kDa, 15,21 kDa dan 13,86 kDa [5].

Pada penelitian ini xilanase dimurnikan dengan filtrasi gel menggunakan matrik Sephadex G-100 dan kromatografi pertukaran ion menggunakan matrik penukar anion DEAE-Sephadex A50.

## 2. Metode Penelitian

**Preparasi larutan xilanase.** *Streptomyces* sp. SKK1-8 diremajakan pada cawan petri berisi media agar-agar xilan (mengandung 1 % ekstrak khamir, 10,3 % sukrosa dan 0,5% birchwood xilan), diinkubasi pada suhu kamar selama 4 hari sampai terbentuk spora (sporulasi). Sebanyak 3 *cockborer* kultur padat *Streptomyces* sp. SKK1-8 tersebut diinokulasikan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 ml media cair xilan, diinkubasikan pada suhu kamar selama 10 hari dengan pengocokan (150 rpm). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada 10,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

**Pengujian aktivitas xilanase.** Aktivitas xilanase diukur dengan mendeteksi gula pereduksi yang terbentuk menggunakan metode Miller [6]. Xilosa digunakan sebagai standar untuk penghitungan aktivitas xilanase. Satu unit aktivitas xilanase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µmol gula xilosa dari substrat *birchwood* xilan permenit pada kondisi suhu 50°C, pH 6,0. Kadar protein diukur menggunakan metode Bradford [7].

**Pengendapan dengan aseton.** Ekstrak kasar xilanase diendapkan dengan menggunakan beberapa konsentrasi aseton untuk mengetahui kondisi optimumnya. Jumlah aseton yang digunakan didasarkan pada tabel dari Scopes [8].

**Pemurnian xilanase.** Xilanase dimurnikan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel dan penukar ion. Matrik Sephadex G-100 dikembangkan dalam 10 mM bufer fosfat pH 6,0.

Matrik DEAE-Sephadex A50 dikembangkan dengan 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Protein yang tidak terikat matrik dibilas dengan bufer yang sama, sedangkan protein yang terikat matrik dibilas dengan gradien linier larutan NaCl (0-0,5 M NaCl dalam bufer yang sama) dan 1 M NaCl. Pembilasan dilakukan dengan kecepatan alir 0,5 ml/menit.

Elektroforesis dilakukan pada kondisi protein terdenaturasi (SDS-PAGE) atau tidak terdenaturasi (*native* PAGE). Larutan xilanase dari setiap tahap pemurnian dilihat menggunakan gel poliakrilamida dengan konsentrasi 4% akrilamida pada gel penahan dan 10% akrilamida pada gel pemisah. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt, 50 mA. Hasil elektroforesis diwarnai dengan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) atau pewarna perak nitrat. Fraksi filtrasi gel dan fraksi kromatografi penukar anion dipisahkan 40 kali sebelum dilakukan elektroforesis.

**Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas xilanase murni.** Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji

dengan cara mereaksikan enzim dengan substrat pada suhu 50°C selama 30 menit pada berbagai kondisi pH larutan bufer (pH 4,0-9,0 dengan selang 0.5 unit). Bufer yang digunakan yaitu bufer asetat (pH 4,0-6,0), bufer fosfat (pH 6,0-8,0) dan bufer Tris-HCl (pH 7,0-9,0). Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat selama 30 menit pada berbagai suhu (40-80°C dengan selang 5°C). Gula pereduksi yang terbentuk diukur dengan metode [6]

**Studi kinetika xilanase.** Studi kinetika dilakukan dengan membuat grafik Lineweaver-Burk (*double reciprocal*) untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  reaksi enzimatik dari xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8. Persamaan Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

**Hidrolisis substrat spesifik.** Pengujian hidrolisis substrat spesifik dilakukan dengan cara mereaksikan enzim murni dengan berbagai substrat spesifik yang merupakan turunan *p*-nitrofenol, yaitu: *p*-nitrofenol- $\alpha$ -L-arabinosida, *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-xilanopiranosida, *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-glukopiranosida, *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-galaktopiranosida dan *p*-nitrofenol-asetat. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µmol *p*-nitrofenol dari substrat spesifik permenit pada kondisi seperti tersebut di atas.

## 3. Hasil dan Pembahasan

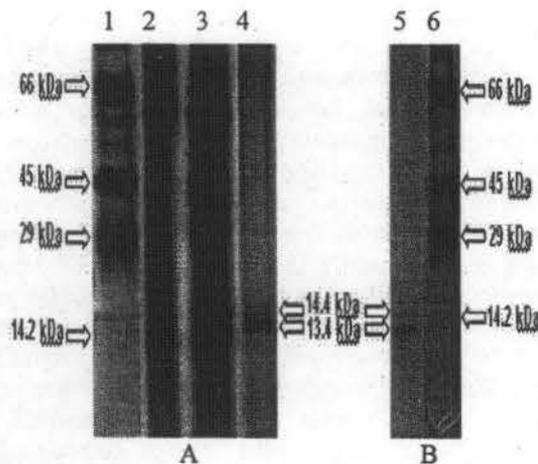
**Pemurnian xilanase dengan filtrasi gel dan kromatografi penukar anion.** Hasil SDS PAGE yang diberi pewarna perak nitrat menunjukkan bahwa di dalam larutan xilanase kasar *Streptomyces* sp. SKK1-8 terdapat berbagai protein dengan berat molekul bervariasi (sumur 2). Tampaknya pengendapan xilanase dengan 50-80% aseton (sumur 3) tidak banyak menghilangkan protein kontaminan tetapi meningkatkan konsentrasi protein termasuk xilanase (2 pita protein yang bergerak paling jauh). Hal ini terlihat dengan makin tebalnya pita pada sumur 3 dibandingkan pita pada sumur 2. Hasil *native* PAGE dan SDS-PAGE dari fraksi kromatografi penukar anion memperlihatkan adanya 2 pita yang sangat berdekatan dengan berat molekul masing-masing sebesar 14,4 kDa dan 13,4 kDa (Gambar 1).

Pemurnian xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8 dari larutan enzim kasar sampai kromatografi penukar anion dirangkum dalam Tabel 1. Xilanase setelah kromatografi penukar anion memiliki tingkat kemurnian 12,97 kali dibandingkan larutan enzim kasarnya dengan hasil 48,42%. Protein total mengalami penurunan

sedangkan aktivitas spesifik mengalami peningkatan seiring dengan proses pemurnian.

Xilanase dari genus *Streptomyces* pada umumnya dimurnikan dengan menggunakan teknik kromatografi dan memberikan hasil yang bervariasi. Xilanase *S. achromogenes* ISP 5028, *S. longisporus rubes* IMMAS AS 4-167 dan *Streptomyces* sp. IAUR 8812 hasil pemurnian dengan kromatografi penukar anion dan filtrasi gel memiliki tingkat kemurnian dan hasil sebesar 14,7; 4,2; 3,9 dan 8,4; 12,1; 41,8 berturut-turut [9]. Empat xilanase dari *S. actuosus* yang dimurnikan melalui proses pengendapan (amonium sulfat), filtrasi gel (Sephacryl S-200) dan kromatografi penukar kation (CM-Sepharose CL-6B) memiliki tingkat kemurnian antara 14-62 dan tingkat pemulihan antara 4-11,3% [10]. Xilanase *S. viridosporus* T7A hasil pemurnian dengan penukar anion (Q-Sepharose), filtrasi gel (Sephadex) dan *isoelectric focusing* memiliki tingkat kemurnian tinggi tetapi hasilnya rendah [11].

Hasil *native PAGE* dan SDS-PAGE dari fraksi kromatografi penukar anion xilanase *Streptomyces* sp.



Gambar 1. Profil hasil *native PAGE* (A) dan SDS-PAGE (B) dari xilanase. 1 dan 6 marker, 2 xilanase kasar, 3 fraksi aseton, 4 dan 5 fraksi penukar ion.

Tabel 1. Tahap pemurnian xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8

Tahap	Total Aktivitas (U)	Total protein (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Tingkat kemurnian
Enzim kasar	285.6	2680.8	0.1065	100	1
Aseton (50-80%)	62.6	241.7	0.4418	21.9	2.53
Filtrasi Gel	140.5	224.1	0.6271	49.2	5.88
Penukar Anion	138.3	100.0	1.3817	48.4	12.97

SKK1-8 menunjukkan adanya dua pita protein yang letaknya berdekatan dengan berat molekul masing-masing sebesar 14,4 kDa dan 13,4 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa xilanase *Streptomyces* sp SKK1-8 belum dapat dimurnikan sampai tahap kromatografi penukar anion sehingga diperlukan proses pemurnian lebih lanjut. Untuk itu perlu digunakan teknik yang dapat memisahkan campuran protein dengan berat molekul dan keelektronegatifan yang berdekatan.

Xilanase dari genus *Streptomyces* memiliki berat molekul yang beragam dan dikelompokkan menjadi xilanase BM tinggi (>30 kDa) dengan pI rendah dan xilanase BM rendah (<30 kDa) dengan pI tinggi. *Streptomyces* sp. S38 menghasilkan 3 xilanase dengan BM masing-masing sebesar 24,5 kDa, 37,5 kDa dan 38 kDa dengan pI 9,8; 5,2 dan 4,7 [12]. Namun beberapa xilanase tidak sesuai dengan sistem pengelompokan tersebut, misalnya xilanase *S. viridosporus* yang memiliki BM 59 kDa dengan pI 10,2 [11]. Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8 memiliki BM rendah, tetapi belum diketahui pI-nya sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pI dari xilanase tersebut. Terdapat kemungkinan bahwa pI xilanase tersebut lebih rendah dari pH 7,0. Hal ini mengingat bahwa pada pH 7,0 hampir setengah dari xilanase yang terdapat pada larutan xilanase kasar tidak terikat polimer anionik eudragit S100 bermuatan negatif yang berarti xilanase juga bermuatan negatif.

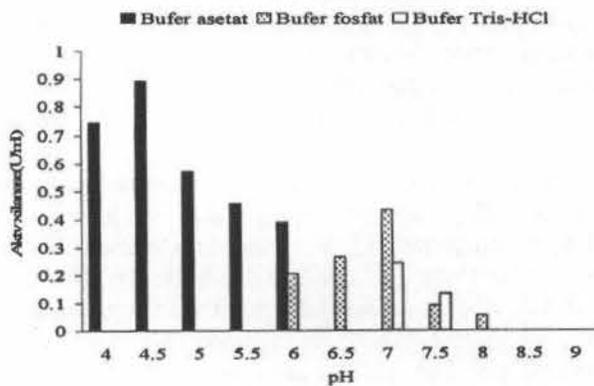
**Karakterisasi xilanase.** Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase diuji dengan menggunakan 3 jenis bufer dengan konsentrasi 0.1 M, yaitu bufer asetat (pH 4,0-6,0), bufer fosfat (pH 6,0-8,0) dan bufer Tris-HCl (pH 7,0-9,0). Xilanase menunjukkan aktivitas tertinggi pada pH 4,5 (0,892 U/ml), selanjutnya menurun dengan naiknya pH. Pada pH 7,0 aktivitas xilanase meningkat lagi (0,432 U/ml) dan kehilangan aktivitasnya pada pH 8,5. Xilanase pada pH 6,0 dalam larutan bufer asetat dan bufer fosfat menunjukkan aktivitas yang berbeda. Aktivitas xilanase dalam larutan bufer asetat hampir dua kali lipat aktivitas xilanase dalam bufer fosfat, yaitu masing-masing sebesar 0,389 U/ml dan 0,204 U/ml (Gambar 2).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase diperlihatkan dalam Gambar 3. Aktivitas xilanase meningkat dengan meningkatnya suhu sampai mencapai 50°C, selanjutnya menurun pada suhu 60°C dan kehilangan seluruh aktivitasnya pada suhu 70°C. Xilanase menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 50°C, yaitu sebesar 1,102 U/ml.

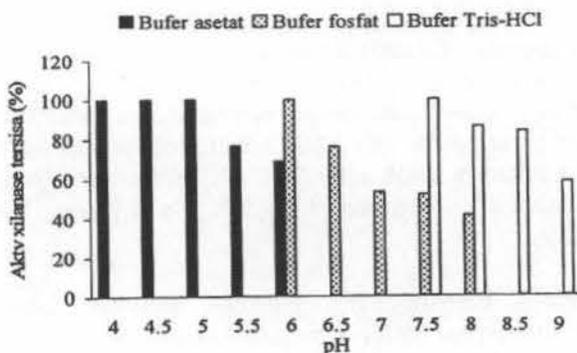
Profil pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase *Streptomyces* SKK1-8 menunjukkan aktivitas tertinggi pada pH 4,5 dan adanya aktivitas yang cukup tinggi pada pH 7,0 (Gambar 2). Adanya aktivitas pada dua daerah pH tersebut kemungkinan karena masih adanya

dua protein dari hasil kromatografi penukar anion, sesuai dengan hasil elektroforesis yang menunjukkan adanya 2 pita berdekatan (Gambar 1). Hal ini sedikit berbeda dengan xilanase *Streptomyces* SKK1-8 hasil pengendapan aseton yang menunjukkan aktivitas tertinggi pada pH 6,0 dan aktivitas cukup tinggi pada pH 3,0; 7,2 dan 8,5. Hasil zimogramnya memperlihatkan adanya tiga xilanase [5]. Perbedaan tersebut kemungkinan karena perbedaan jumlah xilanase yang terdapat dalam larutan enzim dan jenis bufer yang digunakan dalam pengujian. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa xilanase dari genus *Streptomyces* memiliki aktivitas optimal pada pH yang bervariasi. *Streptomyces* sp. strain S38 menghasilkan 3 jenis xilanase yang memiliki aktivitas optimal antara pH 6,0-8,0 [12]. Xilanase *Streptomyces* T7 memiliki aktivitas optimum pada pH 4,5-5,0 [13]. Xilanase *S. Galbus NR* memiliki aktivitas optimum pada pH 6,5 [14].

Menurunnya aktivitas enzim karena perubahan pH larutan yang tidak terlalu besar (sedikit dibawah atau diatas pH optimalnya) disebabkan oleh berubahnya keadaan ion enzim dan seringkali juga keadaan ion



Gambar 2. Profil hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase. Bufer yang digunakan: bufer asetat (pH4-6), bufer fosfat (pH 6-8) dan bufer Tris-HCl (pH 7-9)



Gambar 3. Profil hasil pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase

substrat. Perubahan kondisi ion enzim dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi katalitik mengikat substrat maupun pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuartener enzim yang aktif. Aktivitas enzim yang mengalami penurunan tersebut dapat dipulihkan kembali dengan merubah kondisi reaksi enzimatik pada pH optimalnya. Pada pH tertentu perubahan muatan ion pada rantai samping yang dapat terionisasi dari residu asam amino enzim menjadi terlalu besar sehingga mengakibatkan terjadinya denaturasi enzim yang disertai dengan hilangnya aktivitas katalitik enzim. Disamping itu, perubahan struktur tersier menyebabkan kelompok hidrofobik kontak dengan air sehingga solubilitas enzim menjadi berkurang. Berkurangnya solubilitas enzim dapat mengakibatkan turunnya aktivitas enzim secara bertahap [15,16].

Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8 menunjukkan aktivitas yang berbeda dalam jenis bufer yang berbeda (Gambar 2). Tampaknya aktivitas dan stabilitas xilanase tersebut dipengaruhi baik oleh pH maupun jenis bufer. Pada pH 6,0, aktivitas xilanase dalam bufer asetat lebih tinggi dibandingkan dalam bufer fosfat, sedangkan pada pH 7,0 aktivitas dalam bufer fosfat dua kali lipat aktivitasnya dalam bufer Tris-HCl. Hal ini menunjukkan bahwa jenis bufer berpengaruh terhadap aktivitas xilanase. Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase juga dijumpai pada xilanase *Cellulomonas flavigena* dan *Thermotoga maritima*. Aktivitas xilanase *Cellulomonas flavigena* pada pH 6,5 (pH optimalnya) dalam bufer sitrat-fosfat lebih tinggi 45% dibandingkan dalam bufer Tris-HCl [17]. Aktivitas relatif xilanase *Thermotoga maritima* pada pH 5,0 dalam bufer asetat sekitar 7 kali lipat dibandingkan aktivitasnya dalam bufer MES, namun pada pH 5,5 aktivitas relatifnya hanya 20% lebih tinggi. Pada pH 7,0 aktivitas relatif xilanase dalam 3 jenis bufer (fosfat, Tris-HCl dan CHES) menunjukkan nilai yang berbeda [18]. Perbedaan aktivitas dalam jenis bufer yang berbeda dikarenakan perbedaan pK bufer, jenis dan jumlah muatan ion komponen bufer [19].

Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8 memiliki suhu optimum. Aktivitas xilanase menurun drastis pada suhu 60°C dan kehilangan seluruh aktivitasnya pada suhu 70°C. Penelitian [5] menunjukkan hasil yang serupa kecuali pada suhu 70°C xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8 hasil pengendapan dengan aseton masih memiliki sekitar 20% aktivitas optimalnya sampai suhu 90°C. Xilanase yang dihasilkan oleh genus *Streptomyces* memiliki suhu optimum yang bervariasi, namun pada umumnya optimum dan stabil pada suhu 50-75°C [13]. Xilanase hasil penelitian ini menyerupai xilanase *S. galbus Nr* yang memiliki aktivitas optimum sampai suhu 50°C, dan kehilangan aktivitasnya pada suhu yang lebih tinggi [14]. *Streptomyces* sp. strain S38 menghasilkan 3 jenis xilanase yang memiliki aktivitas

optimum pada suhu 55-60°C, tetapi Xyl3 lebih stabil dibandingkan Xyl1 dan Xyl2 dimana Xyl3 masih menyisakan lebih dari 80% aktivitasnya setelah preinkubasi selama 15 menit pada suhu 60°C [12].

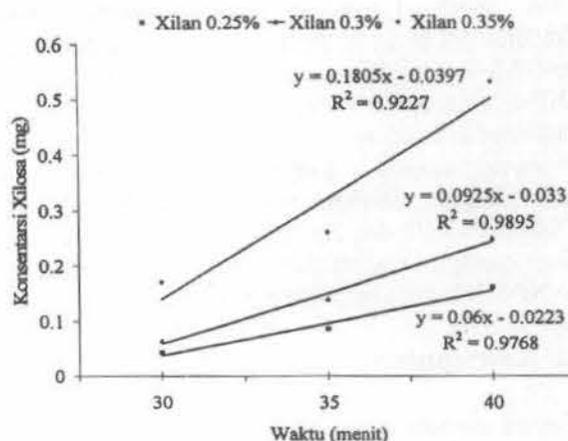
Peningkatan aktivitas enzim dibawah suhu optimum disebabkan meningkatnya energi kinetika karena kenaikan suhu reaksi yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi dari molekul-molekul yang bereaksi (enzim dan substrat) sehingga memperbesar frekuensi tumbukan yang merupakan peluang keduanya untuk bereaksi. Menurunnya aktivitas enzim diatas suhu optimal disebabkan terputusnya ikatan sekunder enzim karena besarnya energi kinetika dari molekul-molekul enzim melampaui penghalang energi yang mempertahankan ikatan tersebut [16,19].

Penghitungan kinetika enzim dilakukan dengan mengukur konsentrasi xilosa sebagai produk hidrolisis substrat birchwood xilan pada berbagai konsentrasi selama waktu tertentu. Dari persamaan  $y = 0,5626x + 5,5675$  diperoleh nilai  $1/V_{max} = 5.5675$  dan nilai  $K_m / V_{max} = 0,5626$ . Maka nilai  $V_{max} = 0,1796$  ( $\mu\text{mol}$  xilosa/menit/ml) dan nilai  $K_m = 0,101$  (mg/ml). Dapat dikatakan bahwa pada kecepatan reaksi maksimalnya, xilanase dari *Streptomyces* sp. SKK1-8 dapat menghasilkan 0,101  $\mu\text{M}$  xilosa permenit.

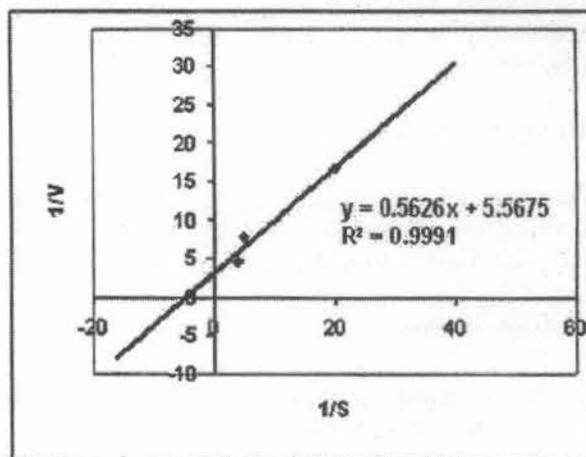
Hasil pengujian aktivitas xilanase pada berbagai substrat turunan p-nitrofenol menunjukkan bahwa xilanase dari *Streptomyces* sp. SKK1-8 dapat memecah substrat p-NP- $\beta$ -D-xilopiranosida, p-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida, p-NP- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan p-NP- $\alpha$ -D-galaktopiranosida, akan tetapi tidak memecah substrat p-NP-asetat (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa xilanase hasil kromatografi penukar anion memiliki aktivitas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glukuronidase, endoxilanase,  $\alpha$ -D-galaktopiranosidase dengan aktivitas tertinggi sebagai endoxilanase, yaitu sebesar 0,1012 U/ml.

Kemampuan xilanase menghidrolisa lebih dari satu substrat kemungkinan karena masih adanya 2 protein (seperti ditunjukkan oleh hasil native PAGE) yang diduga sebagai xilanase dan adanya lebih dari satu aktivitas pada masing-masing xilanase (bifungsional). Sifat bifungsional juga telah dilaporkan pada beberapa xilanase mikroba.

Menurut Wong, dkk.[20], kebanyakan xilanase murni hanya memiliki satu aktivitas, namun beberapa lignoselulolitik enzim dilaporkan memiliki spesifisitas substrat yang luas. Semula diduga hal itu disebabkan ketidak murnian enzim dan substratnya. Namun penelitian lebih mendalam menunjukkan bahwa beberapa enzim yang dimasukkan dalam famili 16; 52 dan 62 merupakan enzim bifungsional yang memiliki 2 katalitik domain dimana salah satunya merupakan katalitik domain dari xilanase famili 10 atau 11 [4].



Gambar 4. Kurva linier konsentrasi xilosa vs waktu



Gambar 5. Kurva double reciprocal Lineweaver-Burk

Tabel 2. Aktivitas hidrolisis substrat spesifik oleh xilanase

Substrat	Aktiv. (U/ml)
p-NP Asetat	0
p-NP- $\beta$ -D-Xilopiranosida	0.1012
p-NP- $\alpha$ -L-Arabinofuranosida	0.0993
p-NP- $\alpha$ -D-Glukopiranosida	0.0892
p-NP- $\alpha$ -D-Galaktopiranosida	0.0773

Xilanase juga diketahui memiliki aktivitas lain selain aktivitas xilosidase. Xilanase *Clostridium stercorarium* mampu menghidrolisis substrat p-NP-  $\beta$ -D-xilopiranosida dan p-NP- $\alpha$ -L-arabinopiranosida [21]. Xilanase *Clostridium cellulovorans* diketahui memiliki aktivitas glikosil hidrolase famili 11 dan asetilxilan esterase [22]. Menurut [23], kecambah *Hordeum vulgare* L menghasilkan  $\beta$ -D-xilosidase dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dengan BM yang sama (67 kDa) tetapi memiliki pI berbeda. Masing-masing enzim tersebut dapat menghidrolisa substrat p-NP- $\beta$ -D-xilosa

dan *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida tetapi efesien katalitiknya berbeda. Aktivitas  $\beta$ -D-xilosidase terhadap *p*-NP- $\beta$ -D-xilosida 30 kali lipat aktivitasnya terhadap *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida, sedangkan aktivitas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase terhadap *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida hanya sedikit lebih tinggi dibandingkan aktivitasnya terhadap *p*-NP- $\beta$ -D-xilosida. Xilanase (Xyl2 dan Xyl3) *Streptomyces* sp. strain S38 juga mampu menghidrolisa substrat *p*-NP-xilosida dan *p*-NP-selobiosida sedangkan Xyl1 tidak [12].

#### 4. Kesimpulan

Enzim xilanase murni memiliki kondisi optimum pada 4.5 dan 50°C dengan berat molekul 14.4 kDa dan 13.40 kDa. Xilanase dapat memecah substrat *p*-NP- $\beta$ -D-xilanopiranosida, *p*-NP- $\alpha$ -L-arabinofuranosida, *p*-NP- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan *p*-NP- $\alpha$ -D-galaktopiranosida. Nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$  nya pada 50°C berturut-turut adalah 0.1796 ( $\mu$ mol xilosa/ menit/ml) dan 0.101 (mg/ml).

#### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Hibah Bersaing dengan kontrak nomer 026/SPPP/PP-PM/DP-M/IV/2005 untuk Anja Meryandini pada tahun 2005.

#### Daftar Acuan

- [1] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, FEMS Microbiol. Rev. 23 (1999) 411-456.
- [2] R.L. Howard, E. Abotsi, E.L.J. van Rensburg, S. Howard, African J. Biotechnol. 2(12) (2003): 602-619.
- [3] S. Subramanian, P. Prema, Critical Rev. Biotechnol. 22(1) (2002) 33-46.
- [4] T. Collins, C. Gerday, G. Feller, FEMS Microbiol. Rev. (2005) 29:3-23.
- [5] A. Meryandini, T. Hendarwin, D. Saprudin, Y. Lestari, Hayati (2006) 13(4):151-155.
- [6] G.L. Miller, Anal. Chem. (1959) 3:31426-31428.
- [7] M.M. Bradford, Anal. Biochem. (1976) 72:248-254.
- [8] R.K. Scopes, Protein Purification, Principles and Practice. Ed. ke-2, Springer-Verlag, New York, 1987.
- [9] N. Belfaquih, C. Jaspers, Kurzatkowski, M.J. Penninckx, World J. Microbiol. Biotechnol. (2002) 18:699-705.
- [10] Wang et. al, Enzyme Microb. Technol. (2003) 33:917-925.
- [11] T.S. Magnuson, D.L. Crawford, Enzyme Microb. Technol. (1997) 21:160-164.
- [12] J. Georis, F. Giannotta, E. de Buylb, B. Granier, J.M. Fre're, Enzyme Microb. Technol. (2000) 26:178-186.
- [13] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001) 56:326-338.
- [14] A.L. Kansoh, Z.A. Nagieb, Xylanase and Mannanase Enzymes from *Streptomyces galbus* NR and Their Use in Biobleaching of Soft Kraft Pulp. Antonie van Leeuwenhoek (2004) 85:103-114.
- [15] T. Palmer, Understanding enzymes. Ellis Horwood Ltd., England, 1981
- [16] H.A. Harper, V.W. Rodwel, P.A. Mayer, Review of Physiological Chemistry, Lange Medical Publication, California, 1984.
- [17] A. Martinez-Trujila, O. Perez-Avalos, T. Ponce-Nayola, Enzyme Microb. Technol. (2003) 32:401-406.
- [18] J. Zhengqiang, et al., J. Biosci Bioeng (2001) 92(5):423-428.
- [19] M.T. Suhartono, Enzim dan Bioteknologi, PAU Bioteknologi IPB, Bogor, 1989
- [20] K.K.Y. Wong, L.U.L. Tan, J.N. Saddler, Microb. Rev. (1988) 52(3):305-317.
- [21] K. Sakka, et al., Biosci Biotech Biochem. (1993).57:268-272.
- [22] A. Kougi, K. Murashima, R.H. Doi, Appl. Environ. Microbiol. (2002) 68:6399 - 6402
- [23] R.C. Lee, M. Hrmova, R.A. Burton, J. Lahnstein G.B. Fincher, J. Biol. Chem. (2003) 278(7):5377-5387.