

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI XILANASE DARI JAMUR XILANOLITIK ASIDOFILIK

Eka Tresna Widhiana^{1*}, Puji Ardiningsih¹, Lia Destiarti¹
¹Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Tanjungpura
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak
*E-mail: ekatresnawidhiana@gmail.com

ABSTRAK

Xilanase mampu menghidrolisis hemiselulosa khususnya xilan. Enzim ini sering digunakan baik dalam industri roti, makanan dan minuman, maupun sebagai campuran pakan ternak. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah memproduksi dan mengarakterisasi xilanase yang dihasilkan oleh jamur xilanolitik asidofilik asal tanah gambut Pontianak, Kalimantan Barat. Isolat jamur xilanolitik asidofilik yang diperoleh diremajakan pada media PDA selektif steril. Isolat ini digunakan pada produksi enzim dengan waktu fermentasi optimum selama 7 hari. Pengujian aktivitas ekstrak kasar xilanase dilakukan dengan variasi suhu (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C) dan pH (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 dan 5,5). Aktivitas ekstrak kasar enzim optimum pada suhu 70°C dan pH 3,5 dengan aktivitas sebesar 757,87 mU/mL. Aktivitas jamur xilanolitik asidofilik dari tanah gambut Pontianak Kalimantan Barat memiliki aktivitas lebih baik dibandingkan aktivitas xilanolitik isolat jamur terbaik yang diisolasi dari serasah dan tanah di lantai hutan mangrove pesisir pantai pasir putih Situbondo yang memiliki aktivitas sebesar 84 mU/mL.

Kata kunci: tanah gambut, jamur xilanolitik asidofilik, xilanase

PENDAHULUAN

Xilanase mampu menghidrolisis hemiselulosa khususnya xilan menjadi gula dan etanol. Xilanase dengan aktivitas optimum pada tingkat keasaman yang rendah digunakan pada industri roti, makanan dan minuman serta sebagai campuran pakan ternak (Polizeli *et al.*, 2005). Penggunaan xilanase dalam produksi pakan sangat penting, karena xilanase mampu memecah arabinoxylan yang memiliki efek anti nutrisi pada bahan pakan dan mengurangi viskositas bahan baku (Twomey *et al.*, 2003). Selain itu, xilanase dapat digunakan dalam pembuatan roti, karena xilanase mampu memecah hemiselulosa dalam tepung terigu, sehingga dapat membantu dalam redistribusi air dan membuat adonan lembut serta meningkatkan volume roti. Industri jus dan anggur juga memerlukan xilanase pada proses ekstraksi, penjernihan dan stabilisasi (Polizeli *et al.*, 2005).

Xilanase untuk keperluan industri umumnya diperoleh dari jamur karena kemudahannya dalam kultifikasinya. Jamur *Aspergillus* sp. dan beberapa jenis jamur

lainnya yang telah diisolasi dari berbagai jenis tanah seperti tanah semi-arid di India (Chandra *et al.*, 2012), tanah di lantai hutan mangrove Situbondo (Prasetya, 2005) dan tanah gambut Sumatra Utara (Saragih, 2009) diketahui memiliki aktivitas xilanolitik optimum pada pH rendah (Polizeli *et al.*, 2005).

Tanah gambut memiliki karakteristik sangat unik, dengan tingkat keasamannya yang relatif tinggi (kisaran pH 3–4) dan 95% komponen penyusun tanah gambut merupakan fraksi organik seperti asam humat, himatomelanat, humin, lignin, selulosa dan hemiselulosa (Hartatik dkk, 2011). Tanah gambut jenis saprik memiliki populasi jamur paling besar yaitu sebesar 37.000 dibanding jenis tanah gambut lainnya yaitu tanah gambut hemik dan fibrik masing-masing 1.970 dan 10.370 (Saragih, 2009).

Penelitian terhadap karakteristik xilanase dari jamur xilanolitik asidofilik yang diisolasi dari tanah gambut Pontianak, Kalimantan Barat belum pernah dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengarakterisasi xilanase yang dihasilkan oleh jamur

xilanolitik asidofilik dari tanah gambut Pontianak, Kalimantan Barat.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang dipakai pada penelitian ini meliputi peralatan gelas, *autoclave* STIK MJ-78A, *centrifuge* SIGMA 1-14, *hot plate*, *laminar air flow*, mikropipet, neraca analitik, pH meter, *shaker incubator* STIK PS-B2125, *vortex* HVD Microspin FV-2400, spektrofotometer UV-Vis GENESYS 6 dan termometer.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat jamur xilanolitik asidofilik dengan kode isolat IJ3 yang telah diisolasi dari tanah gambut Pontianak Kalimantan Barat, glukosa, reagen Nelson, reagen arsenomolibdat, akuades, buffer pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 dan 5,5, *beechwood xylan* dari sigma, *potatoes dextrose agar* (PDA), *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4), natrium klorida (NaCl), amonium klorida (NH_4Cl) dan dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4).

Prosedur Penelitian

Pembuatan Media

- a. Media Padat Selektif modifikasi media Chandra *et al.* (2012)

Komposisi media agar untuk seleksi jamur digunakan PDA 3,9 g, xilan 0,5 g dan 100 mL buffer sitrat pH 4,0. Bahan-bahan ditimbang kemudian dilarutkan dalam buffer sitrat dan disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

- b. Media Cair

Media cair untuk produksi xilanase dibuat dengan memodifikasi media Dung *et al.* (1991). Modifikasi dilakukan pada pH media yang digunakan. Komposisi media cair (% b/v) adalah: 0,2% *yeast* ekstrak, 1,5% K_2HPO_4 , 0,025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7% xilan, 0,25% NaCl, 0,5% NH_4Cl , 0,5% Na_2HPO_4 dalam buffer sitrat 0,2 M pH 4. Semua bahan dilarutkan, diaduk sampai homogen kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

Penentuan Waktu Optimum untuk Produksi Xilanase (Oktarina, 2008)

Isolat Jamur xilanolitik asidofilik yang telah diremajakan menggunakan media padat selektif steril, diambil sebanyak 1 ose,

dimasukkan kedalam 150 mL media mineral cair selektif steril, kemudian diinkubasi hingga 14 hari dalam *shaker incubator* pada suhu 30°C dengan kecepatan 140 rpm. Sampling dilakukan setiap hari sejak hari ke-4 sampai hari ke-14 untuk pengujian aktivitas xilanase yang dihasilkan. Sampling dilakukan dengan cara mengambil 10 mL media cair kemudian ekstrak kasar enzim dipisahkan dari sel jamur menggunakan *centrifuge* pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan ditentukan aktivitas ekstrak kasar enzim yang dihasilkan. Hasil pengukuran kemudian diplotkan kedalam kurva produksi. Kurva produksi dibuat dengan menghubungkan titik-titik antara waktu inkubasi (hari) sebagai sumbu X dan aktivitas (mU/mL) sebagai sumbu Y.

Uji Aktivitas Xilanase

Uji aktivitas xilanase dilakukan dengan modifikasi metode Muawanah (2006). Analisis kadar gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson. Sebanyak 1 mL buffer sitrat pH 4, dicampurkan dengan 1 mL substrat xilan 1% kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim yang telah diencerkan 10 kali dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dipanaskan selama 20 menit pada air mendidih, setelah didinginkan selama 5 menit pada air mengalir, dan ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat, larutan kemudian ditambahkan aquades hingga volume total menjadi 10 mL. Pembacaan absoransi dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 755 nm.

Sebagai larutan kontrol digunakan enzim yang diinaktivasi (pemanasan 100°C selama 30 menit) dan blangko dibuat dengan mencampurkan 1 mL akuades, 1 mL buffer sitrat pH 4 dan 1 mL xilan 1% kemudian diperlakukan sama dengan pada saat uji aktivitas xilanase. Aktivitas xilanase dihitung dengan menggunakan persamaan (Sohpal *et al.*, 2010):

$$A_x = \frac{C_s - C_k \times 1000}{BM_{xilososa} \times t \times V_E}$$

Keterangan :

A_x : Aktivitas xilanase (U/mL)

C_s : Konsentrasi gula pereduksi dalam sampel (mg/mL)

Ck : Konsentrasi gula pereduksi dalam kontrol (mg/mL)
 BM_{xilosa} : 150,3 mg/mmol
 T : Waktu inkubasi reaksi enzim (menit)
 V_E : Volume enzim yang ditambahkan (mL)

Karakterisasi Xilanase

Ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas terbesar pada tahap produksi enzim dikarakterisasi pH dan suhunya dengan modifikasi metode Muawanah (2006). Aktivitas xilanase diukur dengan menggunakan metode yang sama seperti prosedur uji aktivitas xilanase.

a. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Penentuan suhu optimum xilanase dilakukan dengan menginkubasikan campuran substrat xilan 1%, dan enzim dengan menggunakan buffer pada pH 4,0 dengan kisaran suhu 30-80°C selama 10 menit.

b. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Penentuan pH optimum xilanase dilakukan dengan menginkubasikan campuran substrat xilan 1% dan enzim pada suhu optimum dengan variasi pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; dan 5,5. Buffer yang digunakan adalah buffer KCl-HCl (untuk pH 2,0), buffer KHP-HCl (untuk pH 2,5 3,0 dan 3,5) dan buffer sitrat (untuk pH 4,0; 4,5 dan 5,5).

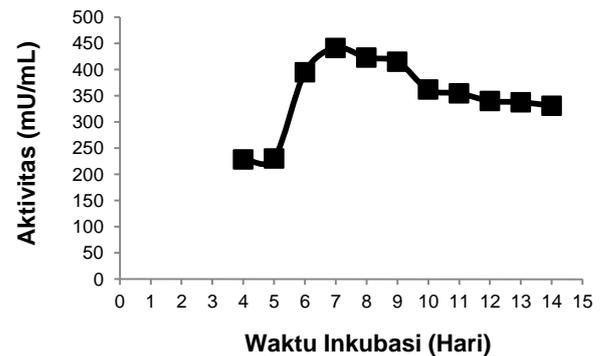
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Optimum untuk Produksi Xilanase

Penentuan waktu optimum untuk produksi xilanase perlu dilakukan untuk menentukan waktu terbaik untuk fermentasi isolat jamur xilanolitik asidofilik. Nilai aktivitas xilanolitik isolat jamur xilanolitik asidofilik dari hari ke-4 hingga hari ke-14 disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan gambar tersebut, xilanase yang dihasilkan oleh isolat jamur xilanolitik asidofilik memiliki aktivitas tertinggi pada hari ke-7 (441,12 mU/mL).

Gambar 1, memperlihatkan bahwa terjadi kenaikan aktivitas yang sangat kecil dari hari ke-4 sampai hari ke-5. Dua hari berikutnya (hari ke-6 hingga hari ke-7) terjadi kenaikan aktivitas yang cukup tinggi dan aktivitas xilanase optimum pada hari

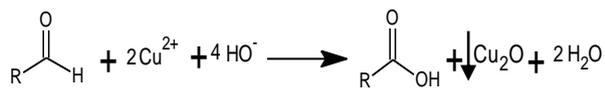
ke-7. Aktivitas xilanase kembali menurun secara perlahan (mendekati konstan) pada hari ke-8 sampai hari ke-14.



Gambar 1 Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase isolat jamur xilanolitik asidofilik

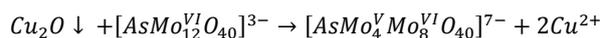
Menurut Willey *et al* (2008) kurva pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari 4 fase yaitu fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian. Hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 1, menunjukkan fase log dimulai hari ke-4 hingga ke-7) terjadi peningkatan jumlah sel secara drastis. Pada kondisi ini mikroorganisme tumbuh dan membelah dengan kecepatan maksimum, menyebabkan media semakin miskin nutrisi, sehingga menstimulasi sel memproduksi enzim yang dibutuhkan untuk biosintesis nutrisi yang tidak tersedia pada media. Memasuki fasa stasioner (hari ke-8 hingga hari ke-14), terjadi keseimbangan antara pembelahan sel dan kematian sel atau sel hanya berhenti membelah namun tetap aktif secara metabolik. Hal ini disebabkan oleh kurangnya nutrisi dan oksigen, serta akumulasi toksin.

Uji aktivitas xilanolitik isolat jamur xilanolitik asidofilik dari hari ke-4 hingga hari ke-14 dilakukan dengan modifikasi metode Muawanah (2006). Analisis kadar gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson. Uji kadar gula pereduksi dengan metode Somogyi-Nelson berdasarkan reaksi antara gugus aldehid pada gula pereduksi mereduksi tembaga (II) (CuO) menjadi tembaga (I) (Cu₂O). Proses ini dipercepat dengan pemanasan (Dawam, 2010). Persamaan reaksi adalah sebagai berikut:



Gambar 2 Reaksi oksidasi gugus aldehid oleh ion tembaga (II)

Tembaga (I) kemudian dioksidasi kembali oleh kompleks arsenomolibdat membentuk molibdenum berwarna biru (Bintang, 2010) karena jumlah Mo(VI) berkurang menjadi Mo(V) (Sushma *et al.*, 2013). Persamaan reaksi adalah sebagai berikut:



Gambar 3 Pembentukan *molybdenum blue*

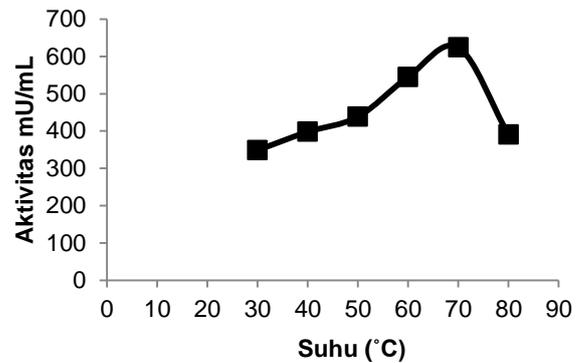
Absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi larutan (Bintang, 2010). Semakin tinggi konsentrasi gula pereduksi yang terbentuk, maka semakin tinggi aktivitas enzim. Hal ini dikarenakan pada umumnya kadar gula pereduksi yang terbentuk sebagai produk hidrolisis erat kaitannya dengan aktivitas enzim.

Hasil Uji Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Xilanase

a. Penentuan Suhu Optimum

Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim sama seperti reaksi kimia umumnya, laju reaksi akan meningkat bila suhu dinaikkan. Laju reaksi akan meningkat sama dengan kenaikan suhu hingga tidak mungkin lagi mengukur aktivitasnya akibat inaktivasi yang cepat (Bintang, 2010). Dengan kata lain, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai. Kenaikan suhu di atas suhu optimum akan menyebabkan aktivitas enzim menurun akibat denaturasi xilanase karena terganggunya sisi aktif enzim.

Pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase dari isolat jamur xilanolitik asidofilik dapat dilihat pada Gambar 4.



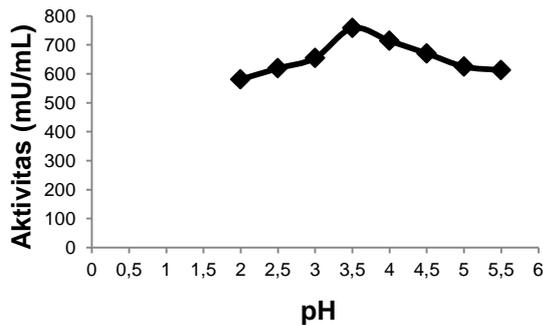
Gambar 4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase isolat jamur xilanolitik asidofilik

Aktivitas ekstrak kasar xilanase isolat jamur xilanolitik asidofilik optimum pada suhu 70°C dengan aktivitas sebesar 624,22 mU/mL. Xilanase dari jamur termofilik *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 memiliki suhu optimum 75°C, xilanase lainnya diproduksi oleh *Aspergillus niger*, memiliki suhu optimum 60°C (Damaso *et al.*, 2000; Coral *et al.*, 2002). Sebagian besar enzim akan terdenaturasi pada suhu lebih dari 60°C (Poedjiadi, 2004), protein termofilik stabil terhadap suhu lingkungan yang relatif tinggi karena memiliki ikatan disulfida sebagai mekanisme utama untuk stabilisasi protein. Ikatan disulfida antar dan di dalam polipeptida menstabilkan struktur tersier dan kuaterner protein (Jorda and Yeates, 2011; Murray *et al.*, 2003).

b. Penentuan pH Optimum

Kecepatan reaksi katalisis hampir semua enzim sangat tergantung pada konsentrasi ion hidrogen. Pada enzim yang katalisisnya melibatkan mekanisme asam-basa, gugus R residu yang terlibat harus dalam keadaan protonasi yang tepat (gugus R yang terlibat merupakan penerima atau pemberi proton). Enzim yang bereaksi dengan substratnya melalui pembentukan kompleks enzim-substrat yang berikatan secara kovalen dan sangat tidak stabil (katalisator kovalen), melibatkan pembentukan jembatan garam dengan enzim. Gugus yang paling umum untuk pembentukan jembatan garam ini adalah gugus karboksilat bermuatan negatif dan gugus amina terprotonasi yang bermuatan positif. Perubahan muatan gugus akan mempengaruhi pengikatan substrat sehingga dapat menghambat atau

meniadakan sifat katalitik enzim (Murray *et al.*, 2003; Lehninger, 1982).



Gambar 5 Pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase isolat jamur xilanolitik asidofilik

Gambar 5 memperlihatkan pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase dari isolat jamur xilanolitik asidofilik. Ekstrak kasar xilanase dari isolat jamur xilanolitik asidofilik memiliki aktivitas optimum pada pH 3,5 dengan aktivitas sebesar 757,87 mU/mL. Touhy *et al.* (1995) mempublikasikan xilanase yang diproduksi oleh *Talaromyces emersonii* memiliki pH optimum pada 3,5-4,7. Beberapa Jamur yang juga dilaporkan memiliki pH optimum pada pH rendah antarlain *Aspergillus aculeatus* pH 4,0 dan 5,0, *Aspergillus awamori* pH 4,0-5,5 *Aspergillus sydowii* pH 4,0 *Aureobasidium pullulans* pH 4,4 *Penicillium capsulatum* pH 3,8 dan *Penicillium sp.* pH 2,0 (Polizeli *et al.*, 2005)

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Produksi xilanase dari isolat jamur xilanolitik asidofilik optimum pada waktu inkubasi selama 7 hari.
2. Ekstrak kasar xilanase isolat jamur xilanolitik asidofilik memiliki aktivitas optimum pada suhu 70°C dan pH 3,5 dengan aktivitas sebesar 757,87 mU/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Bintang, M., 2010, Biokimia-Teknik Penelitian, Penerbit Erlangga, Jakarta.
Chandra, S.; Sharma, R.; Jasuja, N.D.; Saxena R. and Rana, S., 2012,

Xylanase Assay of Fungal Isolats from Semi-Arid Soil of India, *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 2 (4): 2231-6345.

- Coral, G.; Arian, B.; Unaldi, M.N. and Guvenmez, H.K., 2002, Some Properties of Thermostable Xylanase from An *Aspergillus niger* Strain, *Ann. Microbiol*, 52:299-306.
- Damaso, M.C.T.; Andrade, C.M.M.C.; Pereira Jr., N., 2000, Use of Corncob for Endoxylanase Production by Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC 4145, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 84-86: 821-834
- Dawam, 2010, Kandungan Pati Umbi Suweg (*Amorphophyllus campanulatus*) pada Berbagai Kondisi Tanah di Daerah Kalioso, Matesih dan Baturetno, Program Studi Biosains, Universitas Sebelas Maret, Surakarta (Tesis).
- Dung, N.V.; Vetayasuporn, S.; Kamio, Y.; Abe, N.; Kaneko, J. and Izaki, K., 1991, Purification dan Properties of β -1,4 xylanase from *Aeromonas caviae* W-61, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2):445-449.
- Jorda, J. and Yeates, T.O., 2011, Widespread Disulfide Bonding in Proteins from Thermophilic Archaea, *Archaea*, 2011: 1-9.
- Lehninger, 1982, Dasar-dasar Biokimia, jilid 1, Alih bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.
- Muawanah, A., 2006, Produksi Enzim Xilanase Termotabil dari *Thermomyces lanuginosus* ifo 150 pada Substrat Bagasse Tebu, Program Studi Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Tesis.
- Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. and Rodwell, V.W., 2003, Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edition, McGraw-Hill, New York.
- Oktarina, E., 2008, Penapisan dan Uji Aktivitas Bakteri Alkalo Termofilik Penghasil Xilanase, Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok (Skripsi).
- Poedjiadi, A., 2004, Dasar-dasar Biokimia, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A. and Amorim, D. S., 2005, Xylanases from Fungi: Properties and industrial

- applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 577–591.
- Prasetya, I.E., 2005, Skrining Kapang Xylanolitik dari Lantai Hutan Mangrove Pesisir Pantai Pasir Putih Situbondo, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember, Jember (Skripsi).
- Saragih, S. D., 2009, Jenis-jenis Fungi dan Tingkat Kematangan Gambut, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatra Utara, Medan (Skripsi).
- Sohpal, V. K.; Dey, A.; Singh, A., 2010, Investigate of Process Parameters on Xylanase Enzyme Activity in *Melanocarpus Albomyces* Batch Culture, *Proceedings of the World Congress on Engineering*, 1.
- Sushma, K.; Ghosh, S.; Banji, D., 2013, Role of Chemical and Analytical Reagents in Colorimetric Estimation of Pharmaceuticals-A Review, *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Research*, 1(5): 433-445.
- Tuohy, M.G.; Laffey, C.D. and Coughlan, M.P., 1994, Characterization of the Individual Components of the Xylanolytic Enzyme System of *Talaromyces emersonii*, *Bioresource Technology*, 50:37-42.
- Twomey, L.N.; Pluske, J.R.; Rowe, J.B.; Choct, M.; Brown, W.; McConnell, M.F. and Pethick, D.W., 2003, The Effects of Increasing Levels of Soluble Non-starch Polysaccharides and Inclusion of Feed Enzymes in Dog Diets on Faecal Quality and Digestibility, *Animal Feed Science and Technology*, 108:71–82.
- Willey, J.M.; Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J., 2008, *Microbiology*, 7th Edition, McGraw- Hill, New York.