

ISOLASI DAN KARAKTERISASI XILANASE DARI *BACILLUS CIRCULANS*

Krisna Septiningrum*, Maelita R. Moeis**
*Balai Besar Pulp dan Kertas, Bandung
**Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB, Bandung

Naskah diterima tanggal : 20 Juni 2008

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM *BACILLUS CIRCULANS*

ABSTRACT

A research of isolation and characterization of xylanases (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) that suitable for pulp pre-bleaching has been conducted. Several Bacillus has the ability to produce thermostable and alkalistable xylanase. The objective of this experiment was to isolate and characterize xylanase from Bacillus circulans. First, xylanase was isolated. The extracellular enzyme was partially purified by fractionation steps using ammonium sulphate (20-40% saturation) and ion exchange chromatography DEAE-ToyoPEARL. Optimum pH and temperature of the partially purified enzyme were determined. Enzyme purification using ion exchange chromatography showed an increase in specific activity (805.48 U/mg) with 46.8 fold purification. Enzyme characterization of the partially purified enzyme showed an optimum pH 9.5 with optimum temperature 80°C. Partially purified xylanase from B. circulans exhibited favorable potential for pre-bleaching stage in pulp and paper industry because have some advantages in technical, economical and environmental aspect.

Keywords: Xilanase, Bacillus circulans, pre-bleaching, enzyme purification, DEAE-ToyoPEARL

INTISARI

Penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi xilanase (1,4-β-D-xilan xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) yang penggunaannya sesuai dengan kondisi proses pra pemutihan pulp telah dilakukan. Beberapa isolat *Bacillus* diketahui mampu menghasilkan xilanase yang tahan pH alkali dan suhu tinggi. Dalam penelitian ini xilanase dari *Bacillus circulans* diisolasi dan dikarakterisasi. Enzim ekstraselular yang diperoleh dimurnikan secara parsial dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat (persen saturasi 20-40%) yang dilanjutkan dengan kromatografi penukar ion DEAE-ToyoPEARL. Pada pH dan suhu optimum xilanase hasil pemurnian kemudian dikarakterisasi. Pemurnian enzim menggunakan kromatografi penukar ion menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim spesifik (805,48 U/mg) dengan kelipatan pemurnian 46,8 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Karakterisasi xilanase hasil pemurnian parsial menunjukkan pH optimum xilanase 9,5 dengan suhu optimum 80°C. Xilanase hasil pemurnian parsial ini diharapkan dapat digunakan untuk proses pra-pemutihan pada industri pulp dan kertas karena memiliki beberapa keunggulan baik dari sisi teknis, ekonomi dan lingkungan.

Kata kunci: Xilanase, *Bacillus circulans*, pra-pemutihan, pemurnian enzim, DEAE-ToyoPEARL

PENDAHULUAN

Teknologi industri pulp dan kertas terus mengalami perkembangan terutama teknologi yang berwawasan lingkungan. Usaha yang dilakukan diantaranya mengurangi limbah yang dihasilkan. Pemakaian bahan kimia dalam industri pulp dan kertas tidak dapat dihindarkan mengingat kelangsungan proses yang kontinyu harus terjaga dengan baik (Haroen dan Artiningsih, 2004). Saat ini telah dikembangkan

proses bioteknologi dalam industri pulp dan kertas. Enzim dapat digunakan pada beberapa proses pembuatan pulp dan kertas seperti pada pemasakan (*cooking*), reduksi *pitch*, pemutihan (*bleaching*) dan *deinking* (Kirk dan Jeffries, 1996). Pemakaian enzim memiliki banyak keunggulan seperti menghemat energi, mengurangi kebutuhan bahan kimia dan meningkatkan kekuatan pulp dan kertas. Namun dibandingkan dengan proses kimia atau

mekanis, aplikasi penggunaan enzim pada industri pulp dan kertas masih menghadapi beberapa kendala seperti ketersediaan enzim yang masih harus diimpor, penanganan dan penyimpanan enzim dan lamanya waktu yang digunakan untuk pembuatan pulp dan kertas. Hal ini mengakibatkan aplikasi enzim dalam industri masih sangat jarang.

Salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan dalam industri pulp dan kertas adalah xilanase. Penggunaan xilanase pada industri pulp dan kertas meningkat tajam sejak ditemukan pertama kali oleh Viikari *et al.* (1994), yang ditandai dengan meningkatnya jumlah penelitian yang berhubungan dengan penemuan mikroba yang mampu menghasilkan xilanase serta aplikasi xilanase pada proses pemutihan pulp (Beg *et al.*, 2001). Tujuan utama dari proses pemutihan adalah untuk meningkatkan derajat putih pulp, sehingga pulp tersebut sesuai untuk dibuat kertas dengan jenis tertentu. Proses pemutihan pulp tidak hanya membuat pulp menjadi lebih putih atau cerah, tetapi juga membuatnya stabil sehingga tidak menguning atau kehilangan kekuatan dan derajat putih selama penyimpanan (Dence dan Reeve (ed.), 1996). Xilanase digunakan untuk meningkatkan ekstraksi lignin dan melepaskan kromofor dari pulp dalam tahapan awal pemutihan pulp (Beg *et al.*, 2001). Penggunaan enzim ini diharapkan dapat mereduksi penggunaan bahan kimia klor yang digunakan pada berbagai tahapan dalam proses pemutihan sehingga menjadi lebih ramah lingkungan (Kulkarni *et al.*, 1999).

Penggunaan xilanase pada proses pra-pemutihan hasilnya masih belum efektif mengingat karakteristik xilanase komersial yang ada saat ini adalah memiliki suhu optimum kurang dari 50 °C dengan pH asam atau netral (Dhillon *et al.*, 2000a) sehingga kurang sesuai dengan kondisi proses pra-pemutihan pulp. Beberapa contoh xilanase komersial yang ada saat ini adalah Irgazyme (pH 5 - 7, 55 °C), Cartazyme HS-10 (pH 3 - 5, 30 °C - 50 °C), Pulpzyme HB (pH 6 - 8, 50 °C - 55 °C) dan Novozyme (pH 8, 40 °C) (Dhillon *et al.*, 2000a). Xilanase yang dibutuhkan dalam proses pra-pemutihan pulp diharapkan memiliki beberapa karakteristik spesifik seperti tahan suhu tinggi (60-70°C), tahan pH alkali (Nakamura *et al.*, 1993), berupa endoxilanase (Viikari *et al.*, 1994) dan bebas dari aktivitas selulase.

Xilanase dapat diproduksi oleh beberapa organisme seperti bakteri, alga, jamur (Beg *et al.*,

2001; Sunna *et al.*, 1997), aktinomisetes (Beg *et al.*, 2001), ragi, protozoa, gastropoda dan artropoda (Kulkarni *et al.*, 1999). Beberapa jenis bakteri dan jamur diketahui mampu menghasilkan xilanase ekstraseluler yang dapat menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilosa. Selain itu beberapa mikroorganisme yang terdapat pada ruminansia diketahui berpotensi sebagai penghasil xilanase karena hewan ruminansia tersebut mengkonsumsi hemiselulosa dalam jumlah besar.

Genus *Bacillus* diketahui sebagai penghasil xilanase yang aktif pada suhu 50 °C - 60 °C, dengan pH 7 - 9, sehingga enzim dari bakteri ini diharapkan dapat diproduksi dan digunakan pada proses awal pemutihan pulp di industri pulp dan kertas. Penelitian yang berhubungan dengan hal tersebut telah dilaporkan oleh beberapa peneliti seperti Khasin *et al.* (1993), Nakamura *et al.* (1993), Blanco *et al.* (1995), Sunna *et al.* (1997) dan Sã-Pereira *et al.* (2002). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan *Bacillus circulans* diketahui mampu menghasilkan xilanase dengan aktivitas selulase terendah. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi xilanase dari *Bacillus circulans*. Penelitian ini diharapkan dapat mengatasi permasalahan ketersediaan enzim yang spesifik dan kendala yang dihadapi dalam aplikasinya di industri pulp dan kertas. Pengembangan produksi dalam skala komersial diharapkan dapat menciptakan kewirausahaan baru dan juga mendukung perkembangan industri pulp dan kertas yang berwawasan lingkungan.

BAHAN DAN METODA

Bahan dan Alat

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary shaker*, kantung dialisis berbahan dasar selulosa (SIGMA CHEMICAL) dengan ukuran pori yang dapat memisahkan protein minimal 12 kDa., *refrigerated centrifuge*, pengaduk magnetik, kolom kromatografi, avometer, spektrofotometer, *waterbath*, elektroforesis Mini Protean IIXI (Bio Rad).

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *B. circulans* yang berasal dari laboratorium Mikrobiologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB, Bandung. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah

ammonium sulfat, NaHCO_3 , Na_2CO_3 , matriks DEAE-Toyopearl 650 M (Tosoh Corp, Tokyo, Jepang), NaCl , xilosa, K_3FeCN_6 , *Bovine serum albumin* (BSA, Fraksi V, Merck), *Tris base*, glisin, NaOH , poliakriamida, gliserol, bromofenol biru, *Congo Red*, asam asetat. Medium xilan terdiri dari pepton 0,5%, ekstrak ragi 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%, xilan *oat spelt* 0,5% (Sigma Chemical), pH medium diatur 10,5 dengan Na_2CO_3 1% (Nakamura *et al.*, 1993 dengan modifikasi).

Metoda

Isolasi Xilanase

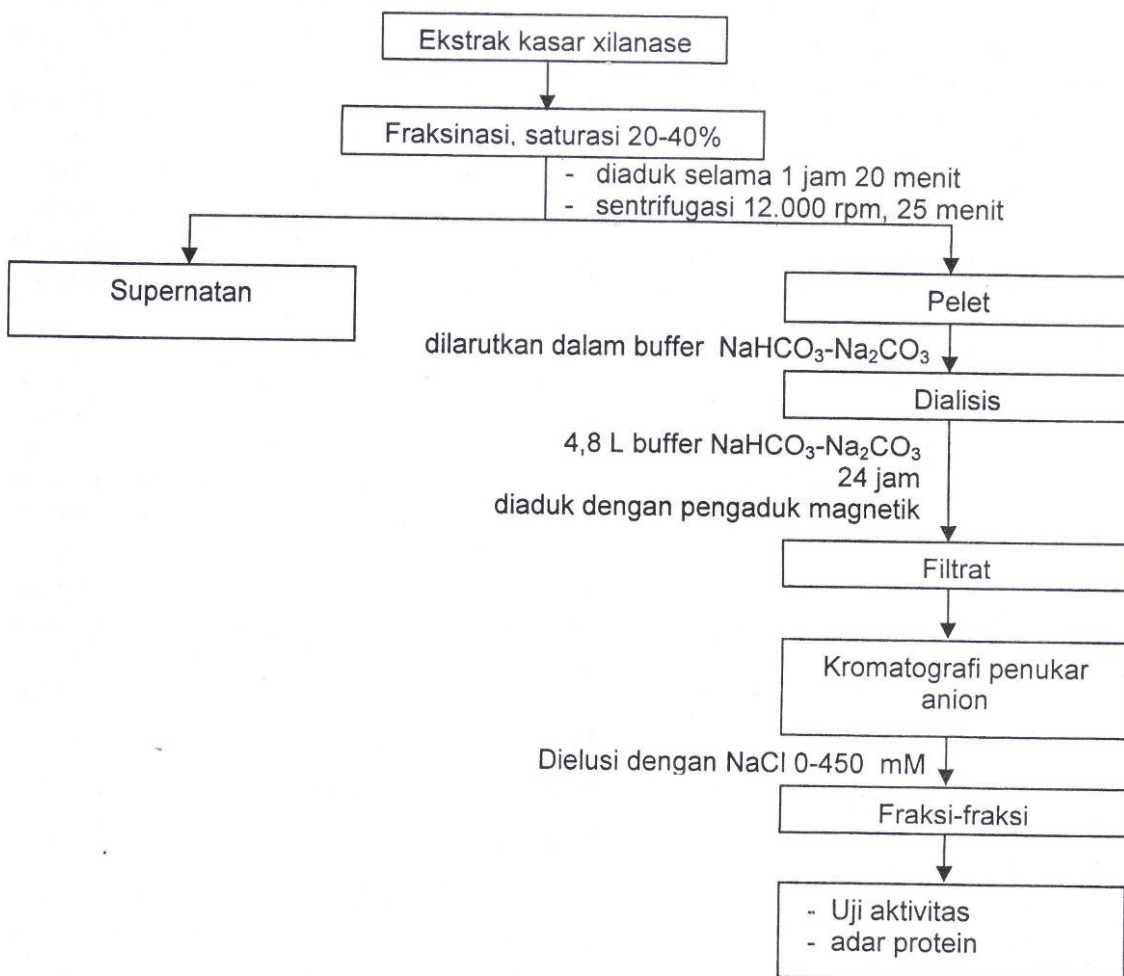
Untuk mengetahui waktu bakteri menghasilkan xilanase dan umur inokulum kultur yang digunakan maka dilakukan pembuatan kurva tumbuh dan kurva aktivitas xilanase dari *B. circulans*. Isolat ditumbuhkan pada medium xilan kemudian diinkubasi selama 80 jam. Untuk mengetahui pola pertumbuhan dan aktivitas xilanase, diambil sampel sejumlah

3 mL setiap dua jam sekali sampai dengan jam ke-24, kemudian setiap enam jam sekali sampai jam ke-60, dan 12 jam sekali sampai kultur berumur 80 jam. Seluruh sampel yang diperoleh dihitung jumlah koloninya dan aktivitas xilanasenya.

Berdasarkan kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas xilanase yang telah dibuat, dilakukan produksi xilanase. Kultur *B. circulans* diinokulasikan ke dalam medium xilan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengadukan 200 rpm selama 18 jam. Inokulum yang digunakan adalah 10% (v/v). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur bakteri dengan kecepatan 8.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C .

Pemurnian Parsial Xilanase (Nakamura *et al.*, 2003 dengan modifikasi)

Seluruh tahapan pemurnian dilakukan pada suhu 4°C dengan diagram alir seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Alir Pemurnian Parsial Xilanase dari *B. circulans* (Nakamura *et al.*, 1993 dengan modifikasi)

a. Fraksinasi Bertingkat dan Dialisis

Ekstrak kasar enzim xilanase dari hasil isolasi difraksinasi bertingkat dengan menggunakan garam ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) sehingga diperoleh persen saturasi 0-20, 20-40, 40-60, 60-80, dan 80-100. Larutan kemudian diaduk dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 25 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer NaHCO₃-Na₂CO₃ 25 mM pH 9,3. Hasil fraksinasi kemudian didialisis dalam 4,8 L buffer NaHCO₃-Na₂CO₃ selama 24 jam.

b. Kromatografi Penukar Ion

Filtrat hasil dialisis kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom. Kromatografi dilakukan dengan menggunakan bahan pendukung DEAE-Toyopearl 650 M yang telah disetimbangkan dengan buffer NaHCO₃-Na₂CO₃. Filtrat hasil dialisis kemudian dialirkan ke dalam kolom dan dielusi secara bertahap dengan menggunakan larutan NaCl (0-450 mM) dalam buffer NaHCO₃-Na₂CO₃ sehingga diperoleh fraksi-fraksi. Setiap fraksi yang diperoleh diuji aktivitas xilanase dan kadar proteinnya. Uji aktivitas xilanase dan pengukuran protein dilakukan menggunakan metode sebagai berikut:

Uji Aktivitas Xilanase (Nakamura *et al.*, 1993 dengan modifikasi)

Aktivitas xilanase diuji dengan mengukur jumlah gula pereduksi dari substrat xilan dengan menggunakan metode Ferisianida Alkali (Walker dan Harmon, 1996). Mula-mula ekstrak enzim sejumlah 50 µL ditambahkan ke dalam substrat xilan *oat spelt* 1-3% sejumlah 150 µL dalam buffer Na₂CO₃-NaHCO₃ 25-100 mM (pH 10,5). Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 39°C selama 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan ferisianida alkali sejumlah 600 µL dan dididihkan selama 10 menit. A₄₂₀ diukur setelah campuran ditambahkan air sejumlah 4 mL. Satu unit (U) aktivitas xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 µmol gula pereduksi (xilosa) per menit dengan xilan sebagai substrat.

- Pengukuran Kadar Protein

Kadar protein diukur dengan menggunakan metoda Bradford (1976) dengan

menggunakan *bovine serum albumin* (BSA, Fraksi V; Merck) sebagai standar.

Karakterisasi Xilanase

- Penentuan pH dan Suhu Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan menguji aktivitas xilanase pada rentang pH 8-10 dengan rentang pH 0,5. Untuk penentuan pH optimum xilanase digunakan dua jenis buffer yaitu buffer Tris-Cl untuk pH 8, dan buffer Glisin-NaOH untuk pH 8,5-10. Penyesuaian pH enzim dilakukan dengan cara mengencerkan enzim sejumlah 10-100x pada berbagai pH sehingga konsentrasi akhir buffer pada reaksi 100 mM. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim xilanase pada rentang suhu 30-90°C selama 30 menit dengan rentang 10°C pada pH optimum yang diperoleh.

- Analisis Zimogram

Sampel enzim dielektroforesis dengan *native* gel poliakrilamida 10 % selama 4-5 jam dengan kondisi dingin (4-8°C). Mula-mula enzim dicampur dengan sampel buffer 5x yang mengandung Tris-Cl 312,5 mM pH 6,8, gliserol 50% (v/v) dan Bromofenol biru 0,05%. Sampel sejumlah 10-36 µL dimasukkan ke dalam sumur kemudian dielektroforesis dengan arus sebesar 24 mA pada *double strength running buffer* (pH 9). Gel dielektroforesis pada Mini Protean IIXI (Bio Rad) dengan tanki elektroforesis vertikal. Gel kemudian direndam di dalam buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5 dengan substrat xilan 0,1% pada suhu 50°C selama 20-30 menit. Gel kemudian diwarnai menggunakan *Congo Red* 0,1% selama 15 menit pada suhu ruangan. Gel tersebut kemudian dibilas dengan menggunakan larutan NaCl 1 M sampai kelebihan warna pada pita hilang. Gel lalu dibilas kembali menggunakan asam asetat 0,5% sehingga akan diperoleh zona bening yang menunjukkan adanya aktivitas enzim xilanase dengan latar belakang biru gelap.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Xilanase

B. circulans digunakan untuk menghasilkan xilanase pada penelitian ini berdasarkan hasil penapisan kualitatif yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Hasil penapisan menunjukkan bahwa isolat ini dapat menghasilkan xilanase dengan memiliki

aktivitas selulase rendah yaitu 0,232 U/mL, yang lebih rendah jika dibandingkan dengan isolat *Bacillus* lainnya sehingga sesuai digunakan untuk industri pulp dan kertas. Tsujibo *et al* (1992 dalam Tuncer, 2000) menyatakan aktivitas selulase (CMC-ase) yang tinggi dapat mendegradasi serat selulosa dan menurunkan sifat pulp yang dihasilkan dalam proses pulping secara biologi.

Berdasarkan jumlah koloni yang diperoleh, dari kurva pertumbuhan dapat diketahui umur inokulum yang digunakan untuk menghasilkan xilanase adalah 18 jam. Kondisi fermentasi yang digunakan untuk menghasilkan xilanase adalah suhu 37 °C, pH medium 10,5 dengan pengadukan 200 rpm selama 18 jam, dengan jumlah inokulum bakteri yang digunakan adalah 10% (v/v). Berdasarkan aktivitas xilanase yang diperoleh, dibuat kurva aktivitas xilanase. Kurva aktivitas menunjukkan bahwa aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada jam ke-18 dan jam ke-36 (0,378 U/mL enzim).

Berdasarkan analisis pola pertumbuhan dan kurva aktivitas maka waktu bakteri menghasilkan xilanase yang digunakan untuk percobaan selanjutnya adalah 18 jam, mengingat pada jam tersebut xilanase memiliki aktivitas tertinggi dan memiliki waktu fermentasi yang singkat. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dari fermentasi dengan menggunakan 100 mL medium adalah 100 mL, berarti xilanase yang dihasilkan pada kondisi tersebut dapat mencapai rendemen 100%.

Pemurnian Parsial Xilanase

Pemisahan dan pemurnian parsial xilanase dari *B. circulans* merujuk kepada metode pemurnian yang telah dilakukan oleh Nakamura *et al.* (1993). Pemurnian dilakukan secara parsial artinya dari penelitian ini tidak didapatkan enzim yang benar-benar murni. Tingkat kemurnian suatu enzim diketahui dari aktivitas spesifik enzim tersebut, semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka enzim akan semakin murni. Selain itu juga dapat diketahui berdasarkan kelipatan pemurnian enzim yang diperoleh. Hal ini dapat diketahui dengan cara membagi aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian dengan aktivitas spesifik awal ekstrak kasar enzim (Minch, 1989).

Ekstrak kasar xilanase *B. circulans* hasil isolasi difraksinasi bertingkat dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Englard dan Seifter (1990) sehingga diperoleh lima fraksi. Kehadiran garam ammonium sulfat

pada konsentrasi tertentu berpengaruh terhadap kelarutan suatu protein. Jika konsentrasi garam tinggi (kekuatan ionik larutan meningkat) maka kelarutan protein akan menurun sehingga protein dapat mengendap dengan sempurna (*salting out*), tetapi jika kekuatan ionik larutan rendah maka akan terjadi sebaliknya (*salting in*) (Englard dan Seifter, 1990).

Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa xilanase dari *B. circulans* dapat mengendap pada seluruh tingkatan fraksinasi yang digunakan (Tabel 1), karena pada seluruh fraksi yang diperoleh menunjukkan adanya aktivitas xilanase. Xilanase mulai dapat mengendap pada konsentrasi garam dengan persen saturasi 0-20. Pengendapan protein ini semakin meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah garam yang ditambahkan ke dalam sampel protein, yang ditandai dengan meningkatnya jumlah endapan yang diperoleh. Fraksi-fraksi hasil pemekatan garam ammonium sulfat kemudian didialisis untuk menghilangkan garam ammonium sulfat dan molekul kecil berberat molekul rendah (Pohl, 1990). Proses dialisis ini diatur oleh perbedaan konsentrasi larutan di dalam dan diluar membran semipermeabel, membran tersebut berupa kantung dialisis (Pohl, 1990; Scopes, 1994).

Berdasarkan hasil uji aktivitas spesifik, aktivitas xilanase fraksi dengan saturasi 20-40% menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik tertinggi yaitu sebesar 585,12 U/mg, jika dibandingkan dengan fraksi-fraksi lainnya (Tabel 1). Berdasarkan hal tersebut maka sampel fraksi 20-40% digunakan untuk proses pemurnian lebih lanjut dengan kolom kromatografi.

Enzim hasil fraksinasi 20-40% yang telah didialisis kemudian dialirkan ke dalam kolom penukar anion untuk dimurnikan lebih lanjut. Setelah sampel protein dialirkan ke dalam kolom, sampel kemudian dielusi secara bertahap dengan menggunakan NaCl (0-450 mM) dalam buffer NaHCO₃-Na₂CO₃ 25 mM, pH 9,3 sehingga diperoleh 40 fraksi. Prinsip kolom penukar ion adalah protein dengan ikatan elektrostatis yang lebih rendah dengan matriks akan dielusi terlebih dahulu dan diikuti protein dengan ikatan elektrostatis yang lebih tinggi (Bollag *et al.*, 1996). Seluruh fraksi yang diperoleh dari kromatografi penukar ion kemudian diukur aktivitas enzim spesifiknya. Hasil pemisahan protein dengan kolom penukar anion menunjukkan puncak aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada fraksi ke-14 dengan aktivitas spesifik 805,48 U/mg.

Tabel 1. Kadar Protein, Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Xilanase *B. Circulans* Hasil Fraksinasi Bertingkat dan Dialisis

% saturasi	Berat Endapan (g)	Volume total hasil fraksinasi (mL)	Volume total hasil dialisis (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0-20	0,541	2	2,05	0,070	0,14	1,97
20-40	0,725	3	3	0,003	1,73	585,12
40-60	1,759	8	10,4	0,034	1,31	38,67
60-80	1,012	4,5	5,6	0,038	2,76	72,32
80-100	1,012	4,5	6,8	0,010	0,21	20,39

Tabel 2. Aktivitas Spesifik Enzim Xilanase Hasil Pemurnian Parsial dari *B. circulans*

Tahapan pemurnian parsial	Vol (mL)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas total (U)	Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kelipatan	Rendemen (%)
Ekstrak kasar	100	0,413	41,3	0,024	17,21	1	100
Fraksinasi (NH ₄) ₂ SO ₄	3	1,728	5,180	0,0030	585,12	34	12,5
Kromatografi DEAE	2	0,264	0,53	0,0003	805,48	46,8	1,28

Dari hasil pemisahan dapat diketahui bahwa pemurnian xilanase dengan fraksinasi (NH₄)₂SO₄ dengan saturasi 20-40% menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik menjadi 585,12 U/mg dengan tingkat kemurnian 34 kali jika dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Hasil pemurnian enzim xilanase menggunakan kromatografi penukar anion menunjukkan peningkatan aktivitas enzim spesifik menjadi 805,48 U/mg dengan tingkat kemurnian 46,8 kali jika dibandingkan dengan ekstrak kasarnya (Tabel 2).

Hasil pemurnian xilanase dengan metode ini menunjukkan tingkat kemurnian yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pemurnian xilanase dari *B. circulans* AB16 yang telah dilakukan oleh Dhillon *et al* (2000a). Hasil penelitian yang dilakukan tersebut menunjukkan pemurnian tahap pertama xilanase (*Xyl A* dan *Xyl B*) kromatografi penukar anion Sepharose Q lebih rendah jika dibandingkan dengan tingkat kemurnian xilanase dari *B. circulans*. Hasil pemurnian *Xyl A* dan *Xyl B* tersebut menunjukkan tingkat kemurnian sebesar 23 kali dan 0,87 kali jika dibandingkan dengan ekstrak kasarnya (Dhillon *et al.*, 2000a).

Karakterisasi Enzim Xilanase

Karakterisasi enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan enzim hasil pemurnian parsial (fraksi 14) dengan parameter pH dan suhu. Selain itu zimogram juga dilakukan untuk mengetahui keragaman xilanase dari setiap tahapan pemurnian yang dilakukan. Pengaruh pH dan suhu terhadap Aktivitas Xilanase

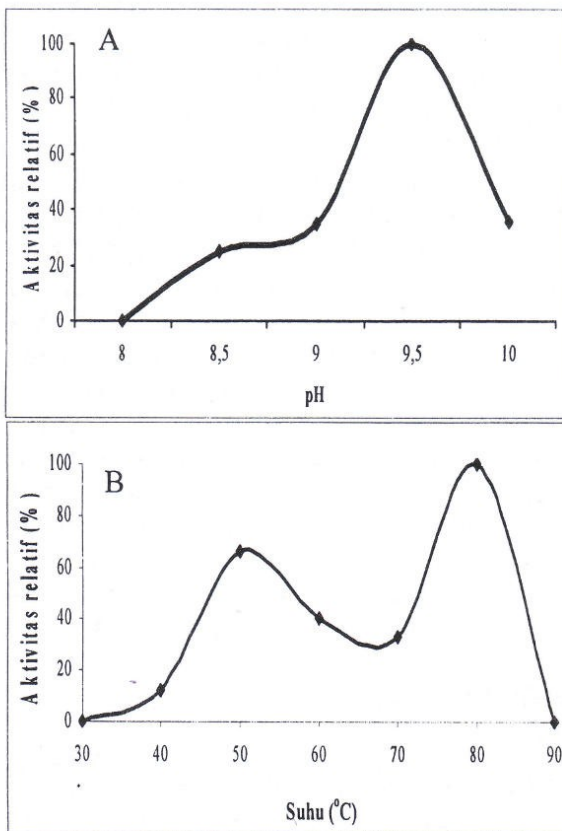
Xilanase *B. circulans* memiliki rentang pH yang cukup luas yaitu 8,5-10, dengan aktivitas maksimum pada pH 9,5 (Gambar 2A). pH optimum xilanase hasil pemurnian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan xilanase *B. circulans* AB 16 (*Xyl A* dan *Xyl B*) yang memiliki pH optimum 6,0-6,5 (Dhillon *et al.*, 2000a) dan aktivitas xilanase cenderung menurun seiring meningkatnya pH yang digunakan [% penurunan 27%-52% untuk pH 8,0 dan 50%-61 % untuk pH 9,0]. Berarti xilanase yang diperoleh memiliki keunggulan jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu karena mempunyai pH optimum lebih tinggi.

Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase dilakukan dengan menginkubasi xilanase pada berbagai rentang suhu selama 30 menit pada pH 9,5 (Gambar 2B). Xilanase *B. circulans*

memiliki rentang suhu yang cukup luas yaitu 40°–80° C dengan aktivitas maksimum pada suhu 80°C. Karakteristik yang sama juga diperoleh dari xilanase (*Xyl A* dan *Xyl B*) dari *B. circulans* AB 16 yang menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 75°–80° C.

Adanya perbedaan aktivitas enzim terhadap suhu dan pH yang digunakan pada penentuan pH dan suhu optimum dapat terjadi karena adanya perbedaan interaksi kimia yang terjadi pada protein (Bataillon *et al.*, 2000). Interaksi kimia tersebut menyebabkan perubahan konformasi protein yang berpengaruh terhadap stabilitas dan aktivitas suatu protein. Stabilitas dan aktivitas suatu protein dipengaruhi oleh keadaan lingkungan mikro protein dan distribusi asam amino bermuatan pada permukaan protein (Nath dan Rao, 2001).

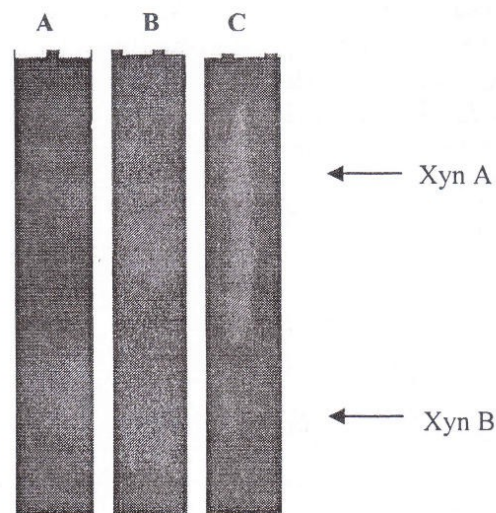
Adanya modifikasi pada protein tersebut dapat meningkatkan interaksi pada protein tersebut sehingga protein tersebut menjadi lebih rigid dan stabil pada suhu dan pH tinggi, sehingga enzim tidak terdenaturasi.



Gambar 2. Pengaruh pH (A) dan Suhu (B) terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Pemurnian Parsial

Keragaman Xilanase

Analisis menggunakan metode zimogram dilakukan untuk mengetahui keragaman xilanase pada setiap tahapan pemurnian yang dilakukan. Keragaman enzim ini dapat terjadi karena adanya isoenzim. Isoenzim pada mikroba xilanolitik merupakan hal yang wajar (Beg *et al.*, 2001, Dhillon *et al.*, 2000a). Produksi isoenzim ini merupakan strategi yang digunakan oleh mikroba agar bisa menghidrolisis substrat xilan dengan sempurna (Walker dan Harmon, 1996). Gen-gen isoenzim ini biasanya dapat ditemukan dalam bentuk polisistronik maupun non-polisistronik dalam beberapa salinan dalam genom, dan pada beberapa kasus xilanase terekspresi dari beberapa gen yang berbeda (Englard dan Seifter, 1990).



Gambar 3. Hasil Zimogram dari Ekstrak Kasar (A), Fraksinasi Saturasi 20-40% (B) dan Fraksi 14 (C)

Hasil zimogram dari sampel hasil fraksinasi dengan saturasi 20-40% dan kromatografi penukar ion (fraksi 14) (Gambar 3) menunjukkan masih ada dua jenis xilanase. Hasil zimogram tersebut dapat digunakan untuk menjelaskan adanya dua puncak aktivitas pada penentuan suhu optimum. Kedua xilanase ini diduga isoenzim karena keduanya memiliki berat molekul berbeda tetapi memiliki titik isoelektrik yang sama karena kedua protein tersebut mengendap pada fraksi yang sama (persen saturasi 20-40). Jika dihubungkan dengan pH optimum xilanase yang diperoleh (pH 9,5), mungkin pH dari kedua xilanase *B. circulans* (*Xyn A* dan *Xyn B*) pada fraksi 14 mendekati nilai pI akibatnya kedua protein

dapat mengendap pada fraksi yang sama. Ketika titik isoelektrik suatu protein tercapai, permukaan protein akan terhidrasi akibatnya protein memiliki kelarutan yang rendah sehingga mudah mengendap (Pohl, 1990)

Kemungkinan Penggunaan Xilanase di Industri Pulp dan Kertas

Penggunaan xilanase dengan karakteristik spesifik seperti tahan alkali dan suhu tinggi akan memiliki beberapa keunggulan jika ditinjau dari sisi teknis, ekonomi dan lingkungan. Keunggulan-keunggulan tersebut antara lain:

Aspek Teknis

- Penggunaan xilanase yang tahan alkali dan suhu tinggi akan memudahkan aplikasi enzim pada tahapan pra-pemutihan, karena sudah sesuai dengan kondisi proses pemutihan pulp sehingga tidak memerlukan proses netralisasi dan pendinginan pulp (Beg *et al.*, 2001)
- Penggunaan xilanase pada tahap pra pemutihan pulp memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan pemutihan secara konvensional seperti dapat meningkatkan fibrilasi pulp dan retensi air, mereduksi waktu penggilingan pulp virgin, meningkatkan derajat giling dari serat daur ulang (Beg *et al.*, 2001), meningkatkan derajat putih dan menurunkan bilangan kappa (Viikari *et al.*, 1994).
- Dhillon *et al.* (2000b) menyatakan penggunaan xilanase dapat menurunkan konsumsi senyawa klorin sampai dengan 20% dan dapat diperoleh derajat putih yang sama dengan kontrol (tanpa menggunakan xilanase) pada tahapan pemutihan CEH (chlorinasi, extraction, dan hipoklorit) yang disertai dengan viskositas pulp yang lebih tinggi sehingga dapat meningkatkan kualitas kertas yang dihasilkan

Aspek Ekonomi

- Beg *et al.* (2001) menyatakan enzim merupakan metode alternatif dengan biaya rendah sehingga dapat digunakan untuk mereduksi penggunaan klorin dan bahan-bahan kimia pemutihan lainnya, jika dibandingkan dengan proses delignifikasi oksigen, *extended cooking*, dan substitusi ozon, klorin dan hidrogen peroksida yang membutuhkan investasi tinggi. Penggunaan xilanase pada tahap pra-pemutihan ini dapat mereduksi penggunaan bahan kimia berbau

dasar klorin/ bahan pengoksidasi yang bersifat toksik sejumlah 20-40% (Garg *et al.* (1998); Vicuna *et al.* (1997) dalam Beg *et al.*, 2001)

- Dengan diproduksinya xilanase yang sesuai dengan karakteristik untuk proses pra pemutihan maka ketergantungan ketersediaan enzim untuk industri pulp dan kertas dari impor dapat dikurangi. Selain itu terjadinya penurunan aktivitas enzim selama proses penyimpanan dapat dikurangi karena pengadaan enzim yang kontinyu.

Aspek Lingkungan

Beg *et al.* (2001) menyatakan penggunaan xilanase pada tahap pra-pemutihan pulp dapat mereduksi penggunaan bahan kimia berbau dasar klorin atau bahan pengoksidasi yang bersifat toksik sejumlah 20-40% (Garg *et al.* (1998); Vicuna *et al.* (1997) dalam Beg *et al.*, 2001). Dengan menurunnya senyawa klorin yang digunakan pada proses pemutihan maka secara teoritis diharapkan kandungan bahan berbahaya seperti senyawa organik teroksidasi (AOX) dan dioksin pada air limbah industri pulp dan kertas dapat direduksi (Dence dan Reeve, 1996; Bajpai, 1999). Oji Paper-Jepang telah menggunakan xilanase yang tahan alkali dan suhu tinggi dalam proses pemutihan, hasilnya xilanase dapat menurunkan jumlah klorin dan klorin dioksida yang digunakan sejumlah 35% dan 65%. Akibatnya telah terjadi reduksi AOX sejumlah 40% (OECD, 2001). Penelitian lain menyatakan bahwa aplikasi xilanase dengan tahapan pemutihan XD (EO) P (EP) D dapat menurunkan warna dan konsentrasi AOX dari keluaran IPK sejumlah 30% dan 46% (Strunk *et al.*, 1992). Dence dan Reeve (1996) menyatakan penggunaan xilanase sebelum tahapan D₉₀C₁₀E dapat menurunkan AOX dari 1 menjadi 0,6 kg/ton pulp, selain itu dapat menurunkan COD dari 55 menjadi 50 kg/ton pulp jika dibandingkan dengan pemutihan tanpa xilanase.

KESIMPULAN

- Enzim xilanase dari *B. circulans* telah dapat dihasilkan pada suhu 37°C dengan pengadukan 200 rpm selama 18 jam dengan rendemen 100%.
- Enzim xilanase dimurnikan secara parsial melalui tahap fraksinasi ammonium sulfat (saturasi 20-40%) dan kromatografi penukar ion DEAE-ToyoPEARL. Pemurnian parsial menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik

(805,48 U/mg) dengan tingkat kemurnian 48 kali jika dibandingkan dengan ekstrak kasar xilanase (17,21 U/mg).

- Karakterisasi enzim menunjukkan xilanase dari *B. circulans* memiliki pH optimum 9,5 dengan suhu optimum 80°C
- Berdasarkan sisi teknis, ekonomi dan lingkungan, penggunaan xilanase tahan alkali dan suhu tinggi memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan proses pemutihan konvensional

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai, P. 1999. *Application of enzymes in the Pulp and Paper Industry. Biotechnolology Progress*. 15: 147-157
- Bataillon, M., A. P. N. Cardinali, N. Castillon, F. Duchiron. 2000. *Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from Bacillus sp. strain SPS-0. Enzyme and Microbial Technology*. 26: 187-192.
- Beg, Q.K., Kapoor. M., Mahajan, L., Hoondal, G. S. 2001 *Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology*, (56): 326-338.
- Blanco, A., T. Vidal, Jose F. Colom, F. I. Javier Pastor. 1995. *Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant Bacillus sp. Strain BP-23. Applied and*
- Englard, S., S. Seifter. 1990. *Precipitation Techniques. dalam: M.P. Deutscher (ed.). 1990. Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification. Vol. 182. Academic Press, USA.*
- Haroen, W.K., T. Artiningsih. 2004. *Penggunaan enzim polyporaceae pada pemutihan pulp kraft Acacia mangium. Prosiding Seminar MIPA IV, ITB. Bandung. pp. 347-351.*
- Jeffries, T.W. 1994. *Biodegradation of lignin and hemicelluloses. dalam: C. Ratledge (ed.). Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp.233-277.*
- Khasin, A., Iris Alchanati, Yoav Shoham. 1993. *Purification and characterization of a thermostable xylanase from Bacillus stearothermophilus T-6. Applied and Environmental Microbiology*, 59(6): 1725-1730
- Environmental Microbiology*, 61(12): 4468-4470.
- Bollag, D. M., Michael D. Rozycki, Stuart J. Edelstein. 1996. *Protein Methods. 2nd ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. USA.*
- Bradford, M. M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Collins, T., C. Gerday, G. Feller. 2005. *Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3-23.
- Dence, C.W., Douglas W. Reeve (ed). 1996. *Pulp Bleaching: Principles and Practice. TAPPI Press Atlanta, Georgia, USA.*
- Dhillon , A., J. K. Gupta, B.M. Jauhari, S. Khanna. 2000b. *A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by Bacillus circulans AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. Bioresource Technology*, 73: 273-277.
- Dhillon , A., J. K. Gupta, S. Khanna. 2000a. *Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from Bacillus circulans AB 16. Process Biochemistry*, 35: 849-856.
- Kirk, T. K., Jeffries, T.W., *Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing, 1996 dalam Jeffries, T.W., Viikari, L. (ed). Enzymes for Pulp and Paper Processing, Bab 1. Washington. USA. pp. 1-13.*
- Kulkarni, N., Abhay Shendye, Mala Rao. 1999. *Molecular and biotechnological aspects of xylanase. FEMS Microbiological Reviews*, 23: 411-456.
- Minch, M.J. 1989. *Experiments in Biochemistry: Projects and Procedures. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. USA.*
- Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono, K. Horikoshi. 1993. *Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic Bacillus sp. strain 41M-1. Applied and Environmental Microbiology*, 59(7): 2311-2316.
- Nath, D., Mala Rao. 2001. *pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic*

- Bacillus* sp. (NCIM 59. Enzyme and Microbial Technology, **28**: 397-403.
- OECD, 2001. On site production of xylanase (Oji Paper-Japan) dalam *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*. Paris, Prancis.
- Pohl, T. 1990. Concentration of Protein and Removal of Solutes. dalam: M.P. Deutscher (ed.). 1990. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. Vol. 182. Academic Press, USA.
- Sã-Pereira, P., Maria Costa-Ferreira, M. R. Aires-Barros. 2002. Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)- β -xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, **94**: 265-275.
- Scopes, 1994. Scopes, R.K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*. 3rd ed. Springer. USA.
- Strunk, W., R. Klein, D. Elm, R.Choma dan V. Sundaram. 1992. Enzyme boosting and peroxide reinforcement in 100% chlorine dioxide bleaching sequences- A low capital alternative to oxygen delignification dalam: Kulas, K.A (ed). 1992. *Elemental chlorine free bleaching*. TAPPI Press, Atlanta.
- Sunna, A., Steffen G. Prowe, Tim Stoffregen, G. Antranikian. 1997. Characterization of the xylanase from the new isolated thermophilic xylan-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d and *Bacillus flavothermus* strain LB3A. *FEMS Microbiology Letter*, **148**: 209-216.
- Tuncer, M. 2000. Characterization of endoxylanase activity from *Thermomonospora fusca* BD25. *Turkey Journal Biology*, **24**: 737-752.
- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**: 335-350.
- Walker, J.A., D. L. Harmon. 1996. Technical Note: A Simple, Rapid Assay for α -Amylase in Bovine Pancreatic Juice. *Journal of Animal Science*, **74**: 658-66
-