

**PRODUKSI XILANASE DARI TONGKOL JAGUNG DENGAN SISTEM BIOPROSES
MENGUNAKAN BACILLUS CIRCULANS UNTUK PRA-PEMUTIHAN PULP
PRODUCTION OF XYLANASE FROM CORN COB BY BIOPROCESS SYSTEM
USING BACILLUS CIRCULANS FOR PRE-BLEACHING PULP**

Krisna Septiningrum, Chandra Apriana P

Balai Besar Pulp dan Kertas, Kementerian Perindustrian Indonesia

krisnabio@yahoo.co.id

ABSTRAK

Proses pemutihan pulp dengan menggunakan bahan kimia klorin menghasilkan bahan buangan yang mengandung senyawa klor organik yang bersifat toksik sehingga menimbulkan masalah lingkungan yang serius. Penggunaan xilanase pada proses pra-pemutihan pulp dapat menurunkan jumlah senyawa klorin yang digunakan. Namun xilanase komersial dengan harga yang murah yang sesuai dengan kondisi pra-pemutihan pulp, yaitu tahan suhu tinggi dan pH alkali, belum tersedia.

Penelitian mengenai biokonversi serbuk tongkol jagung menggunakan *Bacillus circulans* dengan proses fermentasi fase padat untuk produksi xilanase telah berhasil dilakukan. Bakteri hasil aktivasi dengan medium xilan sejumlah $2,58 \times 10^7$ CFU/mL digunakan sebagai inokulum untuk produksi xilanase. Fermentasi dilakukan pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Penelitian dilakukan dengan cara mempelajari pengaruh penambahan *moistening solutions*' (MS), rasio substrat-MS, jumlah inokulum dan waktu produksi terhadap produksi xilanase. Ekstrak kasar yang diperoleh dari kondisi optimum kemudian dikarakterisasi pH dan suhu optimum, aktivitas selulase dan berat molekulnya.

Aktivitas xilanase tertinggi yaitu sebesar 11,006 U/mL dicapai pada penambahan MS 7 dengan komposisi K_2HPO_4 1 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg (mg/g substrat); rasio substrat-MS = 1:2,5 (w/v); penambahan inokulum 10% (v/w) dengan waktu produksi 96 jam. Xilanase yang diperoleh memiliki aktivitas optimum pada pH 8,5 dengan suhu optimum 50°C dengan aktivitas selulase 0,07 U/mL. Ekstrak kasar mengandung satu jenis xilanase dengan berat molekul 60,42 kDa. Karakteristik xilanase yang dihasilkan tersebut telah sesuai dengan proses pra-pemutihan di industri pulp dan kertas.

Kata kunci: Xilanase, *Bacillus circulans*, fermentasi fase padat (SSF), tongkol jagung, pra-pemutihan

ABSTRACT

The chemical bleaching process uses considerable amount of chlorine and chlorine-based chemicals that forms toxic byproducts causing serious pollution problems. The use of xylanases in pre-bleaching stage can reduce the amount of chlorine needed for kraft pulp bleaching. Nowadays, commercial low price xylanase that is suitable for pre-bleaching pulp condition, i.e. alkalistable and thermostable, is not available yet.

*A bioprocess research on corn cob powder bioconversion using *Bacillus circulans* for xylanase production under solid state fermentation has been successfully carried out. Activation process using xylan medium produced bacterial cell (2.58×10^7 CFU/mL) was used as inoculums in fermentation process at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The influence of various parameters such as moistening solutions (MS), substrate-MS ratio (moisture level), size of inoculums and incubation periods to xylanase yield were evaluated. Optimum pH, temperature, cellulase activity and molecular mass of crude enzymes from optimum condition were determined.*

*The highest xylanase activity (11.006 U/mL) was obtained when MS 7 (K_2HPO_4 1 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg and $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg (mg/g substrate)) was added in substrate-MS with ratio 1: 2.5 (w/v); 10% (v/w) inoculum size and 96 hours production time. Cellulase activity was 0.07 U/mL meanwhile xylanase activity was obtained at optimum pH and temperature 8.5 and 50°C respectively. Crude enzymes contained one type of enzyme with molecular mass 60.42 kDa. Crude enzymes of xylanase from *B. circulans* exhibited favorable for pre-bleaching stage in pulp and paper industry because of its optimum activity in alkaline pH and high temperature.*

Keywords: xylanase, *Bacillus circulans*, solid state fermentation (SSF), corn cob, pre-bleaching

PENDAHULUAN

Beberapa industri pulp di Indonesia masih menggunakan bahan kimia berbasah dasar klorin dalam proses pemutihan pulp, karena sifatnya yang reaktif, efektif dan

menghasilkan pulp dengan sifat fisik dan derajat putih tinggi, dengan harga yang relatif murah. Tujuan utama dari proses pemutihan adalah untuk meningkatkan derajat putih pulp. Proses pemutihan pulp tidak hanya membuat pulp menjadi lebih

putih atau cerah, tetapi juga membuatnya stabil sehingga tidak menguning atau kehilangan kekuatan selama penyimpanan (Dence dan Reeve (ed.), 1996). Penggunaan klor sebagai bahan pemutih pulp mulai banyak ditinggalkan karena buangnya mengandung senyawa klor organik (dioksin dan furan) yang bersifat toksik, mutagenik, persisten, bioakumulatif sehingga menimbulkan persoalan lingkungan yang sangat serius (Dence dan Reeve (ed.), 1996). Salah satu metode alternatif untuk mengurangi dampak lingkungan yang ditimbulkan oleh penggunaan klor adalah penggunaan xilanase.

Xilanase (1,4- β -D-xilan xilanohidrolase, E.C 3.2.1.8) merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis xilan. Enzim ini digunakan dalam proses pra pemutihan (*pre-bleaching*) pulp kimia (Kirk dan Jeffries, 1996). Dalam proses pemutihan pulp, xilanase berfungsi sebagai fasilitator untuk mempermudah proses penghilangan kompleks lignin-karbohidrat (LCC) yang terbentuk saat proses *pulping* sehingga mudah bereaksi dengan bahan kimia pemutih dan meningkatkan ekstraksi lignin (Beg *et al.*, 2001). Penggunaan xilanase dapat menurunkan konsumsi senyawa klorin sampai dengan 20 - 40% dan dapat meningkatkan kualitas kertas yang dihasilkan (Dhillon *et al.*, 2000b; Beg *et al.*, 2001). Selain itu, penggunaan enzim dalam proses pemutihan pulp biayanya lebih rendah jika dibandingkan dengan proses delignifikasi oksigen, *extended cooking*, dan substitusi ozon, klorin dan hidrogen peroksida yang membutuhkan biaya tinggi. Karakteristik xilanase yang dapat digunakan dalam proses pemutihan ini diharapkan tahan suhu tinggi (60-70°C), tahan pH alkali (Nakamura *et al.*, 1993), berupa endoxilanase (Viikari *et al.*, 1994) dan bebas dari aktivitas selulase.

Hingga saat ini, aplikasi penggunaan xilanase pada industri pulp dan kertas sangat jarang karena adanya beberapa kendala yang dihadapi, diantaranya adalah: belum tersedianya xilanase komersial yang sesuai dengan dengan kondisi proses pra-

pemutihan pulp (tahan suhu tinggi dan pH alkali); proses produksi xilanase saat ini menggunakan xilan murni sebagai inducer sehingga biaya produksi mahal; enzim bersifat eksotik (bukan anorganik), penyimpanan enzim yang terlalu lama tanpa menggunakan metode penyimpanan yang baik dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga dosis pemakaian terus meningkat, dan kurangnya transfer teknologi mengenai penggunaan enzim di industri. Karakteristik xilanase komersial yang ada saat ini 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).

Salah satu persyaratan utama menggunakan substrat padat untuk produksi xilanase adalah kandungan xilan yang tinggi, yang biasanya ditunjukkan oleh kandungan hemiselulosanya. Tongkol jagung diketahui mengandung xilan yang lebih tinggi dibandingkan bagas tebu, *oat hulls*, sekam, kulit kacang dan kulit biji kapas (Tabel 1). Kandungan xilan atau pentosan pada tongkol jagung berkisar antara 12,4-12,9% (Richana *et al.*, 1994). Sumber lain menyatakan dari seluruh limbah pertanian yang ada, kandungan xilan dalam tongkol jagung menunjukkan jumlah tertinggi yaitu dapat mencapai 40g/100g. Hal ini mengindikasikan tongkol jagung mempunyai prospek sebagai bahan baku industri maupun pengolahan berbasis xilan, seperti produksi xilanase, furfural dan xilitol. Penggunaan tongkol jagung sebagai *enhancer* untuk produksi xilanase dari *Streptomyces cyaneus* SN32 telah dilakukan oleh Ninawe dan Kuhad (2005, dalam Gupta dan Kar, 2008). Selain itu, Shah dan Madamwar (2005) juga menggunakan tongkol jagung untuk memproduksi xilanase dari *Aspergillus foetidus* MTCC 4898. Hasil penelitian dari keduanya menunjukkan tongkol jagung

merupakan substrat padat terbaik untuk produksi xilanase jika dibandingkan dengan kulit gandum, bagas, jerami padi, sekam dan jerami gandum.

Tabel 1. Kandungan xilan dari beberapa limbah pertanian

Bahan	Xilan (%)
Bagas tebu	9,6
Oat hulls	12,3
Tongkol jagung	12,9
Sekam	6,3
Kulit kacang	6,3
Kulit biji kapas	10,2

Sumber: Richana *et al.*, 1994

Indonesia merupakan salah satu negara yang berpotensi besar dalam penyediaan bahan baku yang berasal dari limbah pertanian. Produksi jagung nasional pada tahun 2009 adalah $\pm 17,59$ juta ton per tahun dengan luas panen 507.333 Ha (www.setneg.go.id). Produk samping yang dihasilkan dari usaha tani jagung yaitu jerami jagung (daun, batang) dan tongkol jagung. Jerami jagung semakin populer untuk makanan ternak, sedangkan untuk tongkol belum ada pemanfaatan yang bernilai ekonomi. Rohaeni *et al.* (2005) menyatakan potensi limbah berupa jerami jagung adalah sebesar 12,19 ton/ha dalam bentuk segar sedang tongkolnya 1 ton/ha. Limbah lignoselulosa yang berlimpah dan belum termanfaatkan dapat dikonversi menjadi produk akhir yang lebih bernilai secara ekonomi dengan menggunakan fermentasi fase padat (Prabhakar *et al.*, 2005).

Saat ini produksi enzim banyak dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi fasa padat atau *solid state fermentation* (SSF). Prinsip dasar SSF adalah pertumbuhan mikroba pada substrat padat basah dengan kadar air rendah atau berada di dalam pori tanpa adanya pergerakan air (Archana dan Satyanarayana, 1997; Prabhakar *et al.*, 2005) namun substrat harus memiliki kadar air yang cukup untuk mendukung pertumbuhan dan metabolisme mikroba (Singhania *et al.*, 2009). Proses produksi dengan SSF memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan metode lain seperti *sub merged*

fermentation. Keuntungan dari sisi ekonomi diantaranya adalah medium fermentasi yang lebih murah, peralatan dan pengaturan operasi sederhana diperoleh jumlah produk yang lebih tinggi, kebutuhan energi yang rendah, proses *scaling up* yang lebih mudah, stabilitas produk yang lebih tinggi dan pengendalian kontaminasi lebih mudah karena rendahnya kadar air saat fermentasi berlangsung (Prabhakar *et al.*, 2005; Singhania *et al.*, 2009).

Salah satu faktor utama keberhasilan proses SSF adalah pemilihan substrat padat. Substrat padat tersebut digunakan sebagai tempat hidup dan sumber nutrisi mikroba untuk melakukan aktivitas hidupnya (Shah dan Madamwar, 2005). Oleh karena itu substrat padat sebaiknya mengandung makronutrisi (karbon, nitrogen), mikronutrisi dan elemen-elemen lainnya yang dapat mendukung aktivitas mikroba.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan xilanase hasil pemurnian parsial dari *Bacillus circulans* aktif pada suhu 50 – 80°C, pH 8,5 – 10, dan memiliki aktivitas selulase yang rendah (Septiningrum dan Moeis, 2009). Karakteristik xilanase yang dihasilkan tersebut telah sesuai dengan proses pra-pemutihan di industri pulp dan kertas. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memproduksi xilanase menggunakan serbuk tongkol jagung dari *Bacillus circulans* dengan proses SSF. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengatasi kendala-kendala dalam ketersediaan enzim yang spesifik untuk pra-pemutihan pulp dengan harga yang murah.

BAHAN DAN METODA

Bahan dan Alat

Jenis mikroba yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Bacillus circulans* yang diperoleh dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB. Medium yang digunakan untuk penelitian terdiri dari tiga medium. Medium pertama adalah *nutrient agar* (NA) untuk menyimpan bakteri koleksi. Medium kedua yaitu *Nutrient Broth* (NB) yang digunakan sebagai medium aktivasi bakteri untuk

produksi enzim. Medium ketiga adalah medium xilan yang digunakan untuk aktivasi berikutnya. Medium xilan terdiri dari pepton 0,5%, ekstrak ragi 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, xilan *birch wood* 0,5% (Sigma Chemical), pH medium diatur 10,5 dengan Na_2CO_3 1% (Nakamura *et al.*, 1993 dengan modifikasi).

Substrat padat yang digunakan untuk produksi enzim adalah tongkol jagung yang sudah dijadikan serbuk dengan ukuran 20-40 mesh. *Moistening solutions* (MS) yang digunakan ada tiga jenis yaitu MS1, MS7 dan MS 8. MS adalah larutan garam yang terdiri dari $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , dan $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Adapun komposisi larutan garam tersebut adalah MS 1 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,4 g/L), MS 7 (mg/g substrat) terdiri dari K_2HPO_4 1 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 mg dan $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1 mg, sedangkan komposisi MS 8 (mg/g substrat) adalah K_2HPO_4 10 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg, dan $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1mg. Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pereaksi untuk uji aktivitas xilanase dan pereaksi untuk karakterisasi xilanase.

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, *laminar air flow*, *rotary shaker*, inkubator, *refrigerated centrifuge*, sentrifuse klinis, pengaduk magnetik, *vortex mixer*, spektrofotometer UV-vis, dan *waterbath*.

Prosedur Kerja

1. Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui tahapan sebagai berikut: penyiapan substrat padat, penyiapan inokulum mikroba, dan perlakuan pembuatan enzim. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 1. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh kemudian ditentukan pH dan suhu optimum, aktivitas selulase dan berat molekulnya.

2. Pengujian produk enzim

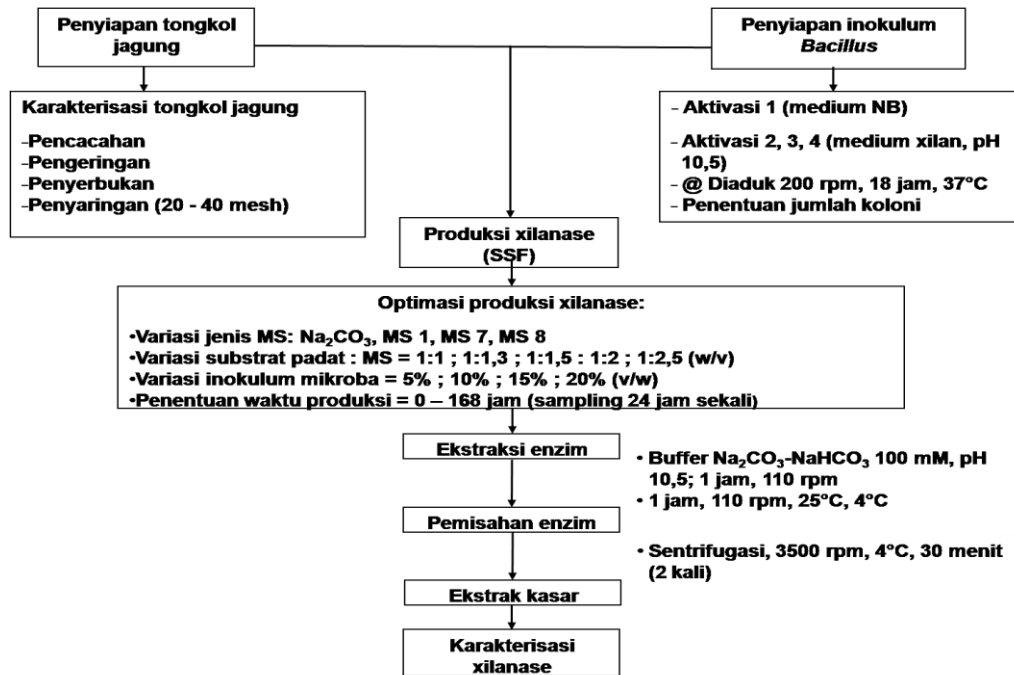
Uji aktivitas ekstrak kasar xilanase dan pengukuran gula pereduksi dilakukan

dengan menggunakan metode Nakamura *et al.* (1993, dengan Modifikasi) dan metode Walker dan Harmon (1996). Ekstrak kasar enzim diencerkan sejumlah 2,5-100x dalam buffer Tris-Glisin 100 mM pH 8,5. Larutan xilan *birch wood* (Sigma Chemical) 3% digunakan sebagai substrat untuk uji aktivitas. Satu unit (U) aktivitas xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 μ mol gula pereduksi (xilosa) per menit pada kondisi percobaan (buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5, suhu 50°C).

Aktivitas xilanase diuji dengan mengukur jumlah gula pereduksi dari xilan dengan menggunakan metode Ferisianida Alkali. Campuran enzim ditambahkan Kalium ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) 10,6 mM sejumlah 600 μ L, kemudian dididihkan selama sepuluh menit. Campuran tersebut didinginkan lalu ditambahkan akuades sejumlah 4 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Konsentrasi standar xilosa yang digunakan adalah 0-80 mg/100mL.

Karakterisasi produk enzim

Penentuan pH optimum dilakukan dengan menguji aktivitas xilanase pada rentang pH 8–10,5 dengan interval 0,5. Untuk penentuan pH optimum digunakan tiga jenis buffer yaitu buffer Tris-Cl untuk pH 8, buffer Glisin-NaOH untuk pH 8,5-10 dan buffer $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 untuk pH 10,5. Penyesuaian pH enzim dilakukan dengan cara mengencerkan enzim 10-100x pada berbagai pH sehingga konsentrasi akhir buffer pada reaksi 100 mM. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas xilanase pada rentang suhu 30-70°C dengan rentang 10°C pada pH optimum. Uji aktivitas selulase (Metode Wang *et al.*)*, keragaman dan berat molekul xilanase dalam ekstrak kasar (Metode Elektroforesis *Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)) dilakukan di Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). Metode ini yang biasa digunakan di BPPT, penulis tidak mengetahui sumber pustakanya



Gambar 1. Alur penelitian pembuatan xilanase

HASIL DAN PEMBAHASAN

Potensi dan Karakterisasi Tongkol Jagung

Karakteristik tongkol jagung yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 1 kg tongkol jagung (kering) dapat diperoleh 66% serbuk tongkol jagung, 33% produk halus dan 1% debu terbang, artinya dari 1 ton tongkol jagung dapat diperoleh 660 kg serbuk tongkol jagung.

Tabel 2. Hasil Analisis Kimia Tongkol Jagung

Komponen Kimia	Kandungan (%)
Hemiselulosa (pentosan)	30,91
α-selulosa	26,81
Lignin	15,52
Total Karbon	39,80
Total Nitrogen	2,12
Kadar air	8,38

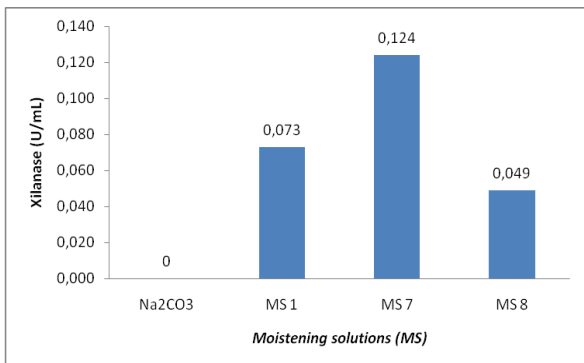
Hasil karakterisasi menunjukkan tongkol jagung memiliki kandungan hemiselulosa yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk produksi xilanase. Xilan dari tongkol jagung akan berperan sebagai inducer untuk

produksi enzim dengan harapan produksi xilanase akan meningkat. Selain itu, tongkol jagung mengandung karbon cukup tinggi karena mengandung selulosa, hemiselulosa dan lignin, disamping itu mengandung pula nitrogen sehingga kebutuhan nitrogen untuk aktivitas mikroba dapat terpenuhi. Keberadaan nitrogen penting karena dapat mempengaruhi pola fermentasi yang terjadi dalam proses SSF.

Pengaruh penambahan *Moistening Solutions* (MS)

Larutan garam mineral penting untuk produksi enzim karena beberapa enzim seperti xilanase, selulase dan proteinase sangat sensitif terhadap komposisi *moistening solutions* yang digunakan (Shah dan Madamwar, 2005). Larutan garam yang mengandung campuran mineral esensial seperti Mg, K, dan P perlu ditambahkan dengan konsentrasi tertentu kedalam medium fermentasi karena adanya penambahan satu atau beberapa kombinasi konsentrasi larutan mineral berpengaruh terhadap proses fermentasi dan produk metabolit yang dihasilkan oleh mikroba.

Moistening solutions berbeda seperti larutan Na_2CO_3 dan larutan Na_2CO_3 dengan garam mineral MS 1, MS7 dan MS 8*) digunakan untuk produksi enzim menggunakan proses SSF (Gambar 2). Komposisi ini dipilih karena xilanase dapat dihasilkan dalam konsentrasi cukup tinggi oleh mikroba jika kandungan fosfat dalam medium tinggi (Shindhu *et al.*, 2006). Selain itu karena komposisi bahan kimia yang digunakan sederhana, mudah diperoleh dan murah dari sisi ekonomi sehingga biaya produksi xilanase rendah. Substrat padat yang digunakan ditambahkan *moistening agents* dengan garam mineral sehingga diperoleh kandungan air $\pm 60\%$ dengan pH awal ± 10 . Pengaturan pH dilakukan dengan menggunakan larutan Na_2CO_3 sebagai pelarut *moistening solutions*. Hasil penelitian menunjukkan MS 7 diketahui sebagai *moisturizing solutions* yang terbaik untuk produksi xilanase (0,124 U/mL) jika dibandingkan dengan larutan Na_2CO_3 , dan larutan Na_2CO_3 dengan MS 1 dan MS 8. Larutan Na_2CO_3 yang ditambahkan mineral MS7 ini selanjutnya digunakan untuk produksi xilanase.



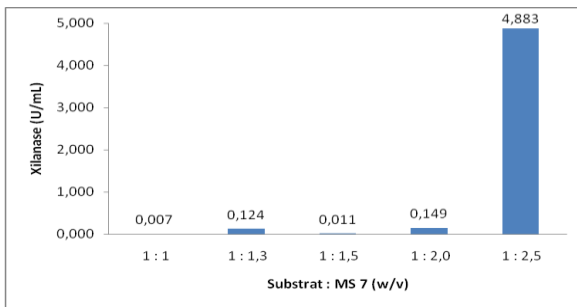
Gambar 2. Pengaruh penambahan *moistening solutions* terhadap produksi xilanase

Ekstrak kasar diproduksi pada serbuk tongkol jagung pH 10; suhu 37°C; selama 72 jam. Kondisi uji aktivitas: buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5 pada suhu 50°C

Pengaruh rasio substrat padat: *moistening solutions* (moisture content)

Kadar air (*moisture content*) merupakan faktor terpenting penentu keberhasilan proses SSF (Shah dan Madamwar, 2005). Kadar air dalam proses SSF diperoleh dengan cara membasahi substrat padat dengan *moistening solutions* dengan rasio tertentu. Kadar air ini berpengaruh terhadap sifat fisik substrat padat yang digunakan sebagai medium fermentasi yang pada akhirnya akan berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba dan biosintesis produk. Jika kadar air proses SSF terlalu tinggi, porositas substrat akan menurun akibatnya ukuran partikel dan tekstur substrat berubah, dan transfer oksigen menjadi rendah. Sebaliknya, jika kadar air proses SSF terlalu rendah akan menurunkan kelarutan nutrisi dari substrat padat akibatnya pertumbuhan mikroba terganggu sehingga produksi enzim akan terhambat.

Hasil penelitian menunjukkan produksi xilanase terendah diperoleh pada rasio substrat padat : MS 7 = 1 : 1 yaitu 0,007 U/mL kemudian meningkat seiring dengan meningkatnya rasio substrat padat terhadap *moistening agents* (Gambar 3). Aktivitas xilanase meningkat sejumlah 697x ketika substrat padat dibasahi MS7 dengan perbandingan 1 : 2,5 (4,883 U/mL) jika dibandingkan dengan rasio 1 : 1. Sehingga rasio substrat padat : MS 7 = 1 : 2,5 digunakan untuk produksi xilanase selanjutnya. Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Gessesse dan Mamo (1999), yang menyatakan produksi xilanase oleh *Bacillus* sp. menggunakan SSF mencapai maksimum ketika substrat dibasahi *moistening solutions* dengan rasio lebih rendah yaitu 1 : 0,5 s/d 1 : 1,5. Perbedaan ini dapat terjadi karena adanya variasi karakteristik pengikatan air dari substrat yang digunakan dalam proses fermentasi (Shah dan Madamwar, 2005).



Gambar 3. Pengaruh rasio substrat padat : MS 7 terhadap produksi xilanase

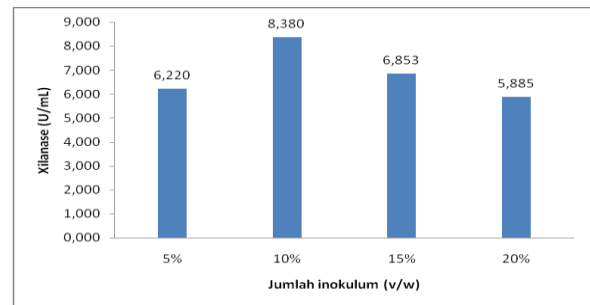
Ekstrak kasar diproduksi pada serbuk tongkol jagung pH 10; suhu 37°C; selama 72 jam. Kondisi uji aktivitas: buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5 pada suhu 50°C

Pengaruh jumlah inokulum

Agar kualitas proses fermentasi dapat terjaga maka prosedur inokulasi yang digunakan dalam fermentasi harus konsisten. Dua hal yang harus dipertimbangkan dalam prosedur inokulasi adalah jumlah dan umur inokulum yang digunakan (Stanbury dan Whitaker, 1987). Berdasarkan pola pertumbuhan *Bacillus circulans* yang telah dilakukan pada percobaan sebelumnya, jumlah inokulum yang digunakan untuk produksi xilanase adalah $2,58 \times 10^7$ CFU/mL dengan umur inokulum 18 jam.

Untuk menentukan jumlah inokulum yang digunakan dalam proses SSF maka dilakukan percobaan variasi penambahan inokulum dengan rentang 5% - 20% (v/w). Hasil penelitian menunjukkan aktivitas xilanase tertinggi yaitu 8,38 U/mL diperoleh ketika inokulum sejumlah 10% (v/w) ditambahkan ke proses SSF (Gambar 4) dengan rasio substrat : MS 7 = 1 : 2,5. Aktivitas xilanase terendah diperoleh ketika inokulum sejumlah 20% ditambahkan ke dalam proses fermentasi, yaitu 5,885 U/mL. Inokulum lebih kecil dari 10% tidak sesuai untuk produksi xilanase karena inokulum yang digunakan jumlahnya tidak optimum sehingga bakteri sulit untuk beradaptasi akibatnya fase lag menjadi lebih panjang, bakteri tidak terlalu aktif akibatnya biomassa yang terbentuk tidak maksimum dalam

waktu singkat dan produksi xilanase menjadi terhambat. Jika jumlah inokulum lebih besar dari 10% maka akan terjadi kompetisi bakteri untuk mendapatkan nutrisi di dalam proses fermentasi akibatnya biomassa yang terbentuk tidak maksimum sehingga produksi xilanase menjadi berkurang.



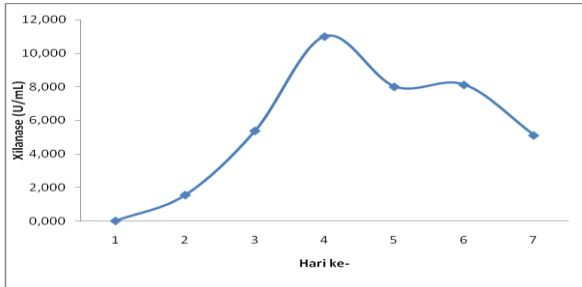
Gambar 4. Pengaruh variasi inokulum terhadap produksi xilanase

Ekstrak kasar diproduksi pada serbuk tongkol jagung pH 10; suhu 37°C; selama 72 jam. Kondisi uji aktivitas: buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5 pada suhu 50°C

Pengaruh Waktu Produksi

Bacillus dapat tumbuh dengan baik pada substrat padat karena kemampuannya membentuk sel berfilamen sehingga dapat menempel dan berpenetrasi pada permukaan substrat untuk mencari air yang dibutuhkan untuk hidupnya (Archana dan Satyanarayana, 1997). Untuk mengetahui waktu produksi xilanase maka dilakukan penelitian penentuan waktu produksi xilanase yang dilakukan selama 168 jam (Gambar 5). Xilanase mulai terbentuk pada hari ke-2 dengan aktivitas 1,544 U/mL kemudian meningkat tajam sampai hari ke-4, lalu aktivitasnya menurun hingga hari ke-7 (5,102 U/mL). Hasil penelitian menunjukkan aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada hari ke-4 dengan aktivitas 11,006 U/mL. Hasil yang serupa ditunjukkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Sindhu *et al* (2006) yang menggunakan *B. megaterium* untuk produksi xilanase. Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Archana dan Satyanarayana (1997), aktivitas xilanase tertinggi dari *B. licheniformis* menggunakan proses SSF diperoleh pada hari ke-3. Perbedaan ini disebabkan oleh

karakteristik strain yang digunakan untuk produksi seperti laju pertumbuhan bakteri dan pola produksi enzim yang akan berpengaruh terhadap waktu produksi xilanase.



Gambar 5. Pengaruh periode waktu inkubasi terhadap produksi xilanase

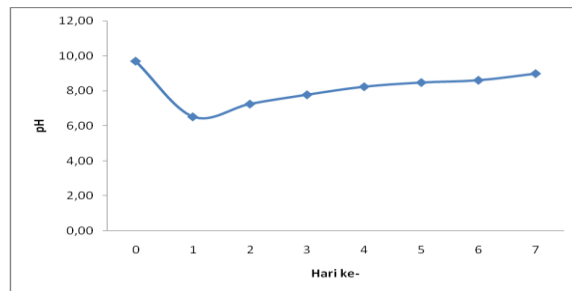
Ekstrak kasar diproduksi pada serbuk tongkol jagung pH 10; suhu 37°C; selama tujuh hari berturut-turut (*sampling* 24 jam sekali), rasio substrat : MS 7 = 1 : 2,5. Kondisi uji aktivitas: buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5 pada suhu 50°C

Adanya penurunan aktivitas xilanase dari hari ke-5 s/d hari ke-7 mungkin disebabkan adanya:

1. produk akhir proses enzimatik seperti xilosa yang berperan sebagai inhibitor umpan balik pada konsentrasi yang tinggi sehingga produksi xilanase terhambat.
2. Represi katabolit biosintesis xilanase oleh glukosa. Keberadaan glukosa pada medium akan menghambat aktivitas gen xilanase untuk memproduksi xilanase. (Kulkarni *et al.*, 1999)

Selama proses fermentasi berlangsung juga dilakukan pengamatan pH (Gambar 6), *cell density* dan kadar air. pH berperan penting dalam proses fermentasi karena setiap organisme memiliki rentang pH optimum untuk tumbuh dan melakukan aktivitasnya. Faktor lingkungan ini berperan dalam menentukan proses enzimatik yang terjadi di dalam sel dan transpor enzim melalui membran sel. Hasil penelitian menunjukkan pH awal proses fermentasi adalah ±10, kemudian menurun pada hari ke-1 (6,52) kemudian meningkat lagi sehingga mencapai 8,99 pada hari ke-7. Aktivitas xilanase mencapai maksimum ketika pH

proses fermentasi mencapai 8,24 pada hari ke-4. Adanya penurunan pH selama proses fermentasi berlangsung karena terbentuknya asam-asam organik sebagai produk akhir proses metabolisme. Sedangkan, adanya peningkatan pH terjadi karena mikroba mulai menggunakan nitrogen sebagai sumber nutrisi akibatnya konsentrasi amonia di dalam proses fermentasi meningkat. Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas xilanase tertinggi diperoleh ketika log *cell density* bakteri mencapai 9,9 ($9,9 \times 10^9$ CFU/ g berat kering) dengan kadar air 76,43%.



Gambar 6. pH proses fermentasi selama proses SSF berlangsung menggunakan *Bacillus circulans*

Karakterisasi Produk Xilanase

Karakterisasi xilanase dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim hasil produksi dengan menggunakan fermentasi fase padat, meliputi parameter pH, suhu, berat molekul, keragaman xilanase dan aktivitas selulase.

1. Pengaruh pH

Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas xilanase ditentukan dengan menguji aktivitas enzim dengan substrat xilan *birch wood* 3%. Penyesuaian pH uji dilakukan dengan melarutkan enzim dalam larutan buffer (pH 8 – 10,5) dengan interval 0,5. Pemilihan larutan buffer didasarkan pada pertimbangan kisaran pH yang diinginkan. Stabilitas buffer berhubungan dengan substrat, kofaktor, kekuatan ion, dan kondisi bebas kontaminan. Hasil penelitian untuk pH optimum, menunjukkan xilanase dari *Bacillus circulans* memiliki rentang pH yang

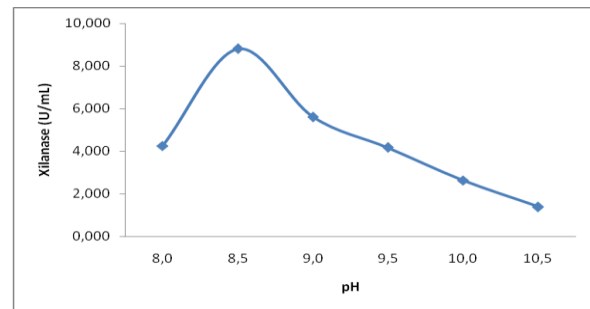
luas yaitu 8,0 - 10,5 (Gambar 7). Aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada pH 8,5 dengan aktivitas 8,80 U/mL, kemudian aktivitas xilanase mengalami penurunan yang tajam dengan aktivitas xilanase terendah pada pH 10,5 (1,39 U/mL).

2. Pengaruh suhu

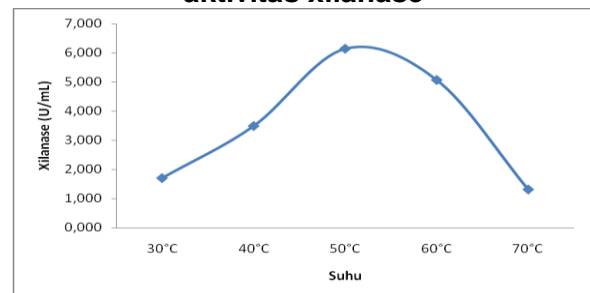
Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase dilakukan dengan menginkubasi xilanase pada rentang suhu 30-70°C selama 30 menit pada pH 8,5 (Gambar 8). Xilanase *Bacillus circulans* memiliki rentang suhu yang cukup luas yaitu 30° – 70° C dengan aktivitas tertinggi pada suhu 50°C (6,13 U/mL). Pada suhu 30°C aktivitas xilanase 1,7 U/ mL kemudian mencapai aktivitas tertinggi pada suhu 50°C kemudian menurun hingga mencapai aktivitas 1,3 U/ mL pada suhu 70°C.

Apakah dalam percobaan ini dipakai birch wood? Ya, sesuai dengan penjelasan di metode kerja

Kondisi optimum dibutuhkan xilanase untuk membentuk kompleks enzim-substrat pada semua sisi aktif enzim sehingga mengaktifkan seluruh enzim untuk mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Dibandingkan dengan xilanase dari mikroba lain, suhu optimum xilanase masih pada kisaran suhu optimum sebagian besar xilanase dari *Bacillus* sp. Menurut Sunna dan Antranikian (1997), xilanase dari *Bacillus* sp. mempunyai kisaran suhu optimum antara 50-70°C pada pH 6-10. Dhillon dan Khanna (2000b) menunjukkan bahwa xilanase dari *B. circulans* AB 16 yang ditumbuhkan pada sekam padi mempunyai suhu optimum pada 80°C dan pH 6 - 7. Nakamura *et al.* (1993) yang menunjukkan pH optimum xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 dicapai pada pH 9 dan menunjukkan penurunan yang drastis pada pH 10 dan 11.



Gambar 7. Pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase



Gambar 8. Pengaruh suhu terhadap aktivitas xilanase Kondisi uji aktivitas: buffer Glisin-NaOH 100 mM pH 8,5

3. Keragaman Xilanase, Berat Molekul Xilanase dan Aktivitas Selulase

Untuk mengetahui keragaman dan berat molekul xilanase pada ekstrak kasar *Bacillus circulans* maka dilakukan elektroforesis SDS-PAGE. Metode ini merupakan salah satu cara untuk menganalisis dan mengkarakterisasi makromolekul. Gel poliakrilamida yang mengandung SDS digunakan untuk memisahkan dan mengkarakterisasi campuran protein, karena dapat memisahkan protein berdasarkan ukuran, muatan dan titik isoelektriknya. Hasil elektroforesis menunjukkan ekstrak kasar mengandung satu jenis xilanase dengan berat molekul 60,42 kDa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kulkarni *et al* (1999) yang menyatakan bahwa berat molekul xilanase pada mikroba berkisar antara 8 – 145 kDa.

Uji selulase dilakukan dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Wang *et al.* Hasil uji menunjukkan bahwa aktivitas selulase pada ekstrak kasar sangat rendah yaitu sekitar 0,63% (0,7 U/mL) jika dibandingkan dengan aktivitas xilanase yang diperoleh (11,006 U/mL). Uji selulase perlu dilakukan karena xilanase yang digunakan pada proses pra-pemutihan sebaiknya tidak memiliki aktivitas selulase atau memiliki aktivitas yang rendah. Selain itu juga digunakan untuk mengetahui apakah *Bacillus* yang digunakan menghasilkan selulase dengan aktivitas cukup tinggi atau tidak karena tongkol jagung yang digunakan mengandung α -selulosa cukup tinggi (26,81%) yang merupakan substrat untuk produksi selulase. Tsujibo *et al.* (1992 dalam Tuncer, 2000) menyatakan aktivitas *carboxymethyl cellulase* (CMC-ase) yang tinggi dapat mendegradasi serat selulosa dan menurunkan sifat pulp yang dihasilkan dalam proses pemutihan pulp secara biologi. Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa, xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sesuai dengan karakteristik yang diinginkan untuk proses *biobleaching* karena memiliki aktivitas selulase yang rendah (Viikari *et al.*, 1994).

KESIMPULAN

Xilanase telah dapat diproduksi dari tongkol jagung menggunakan *Bacillus circulans* dengan metode fermentasi fase padat. Aktivitas xilanase tertinggi yaitu sebesar 11,006 U/mL diperoleh pada penambahan MS 7 dengan rasio substrat - MS = 1:2,5; penambahan inokulum 10% dengan waktu inkubasi 96 jam pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Karakterisasi enzim menunjukkan xilanase dari *Bacillus circulans* memiliki aktivitas selulase sebesar 0,07 U/mL dengan pH dan suhu optimum 8,5 dan 50°C . Hasil SDS-PAGE menunjukkan ekstrak kasar mengandung satu jenis xilanase dengan berat molekul 60,42 kDa. Karakteristik xilanase yang dihasilkan dari *B. circulans* ini telah sesuai dengan proses pra-pemutihan di industri pulp dan kertas.

DAFTAR PUSTAKA

- Archana, A dan T. Satyanarayana. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**:12-17.
- 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.
- Dence, C.W., Douglas W. Reeve (ed).1996. *Pulp Bleaching: Principles and Practice*.
- 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
- Gessesse, A. dan Gashaw Mamo. 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**: 68–72.
- Gupta, U and Rita Kar. 2008. Optimization and Scale up of Cellulase free Endo xylanase Production by Solid State Fermentation on Corn cob and by Immobilized Cells of a Thermotolerant Bacterial Isolate. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **1**(3): 129-134.
- <http://www.setneg.go.id>. Peran Teknologi Pertanian dalam Meningkatkan Produktivitas Tanaman Jagung. 22 Maret 2010 (diunduh tanggal 16 Mei 2010).
- 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.
- 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.
- Prabakhar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., and Bono, A. 2005. Review Article an overview engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, **1**(2): 10-16.
- Richana, N., P. Lestina, dan T.T. Irawadi. 1994. Karakterisasi lignoselulosa dari limbah tanaman pangan dan pemanfaatannya untuk pertumbuhan bakteri RXA III-5 penghasil xilanase. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, **23**(3):171-176.
- Rohaeni, E.N., N. Amali, A. Subhan, A. Darmawan dan Sumanto. 2005. Potensi dan Prospek Penggunaan Limbah Jagung Sebagai Pakan Ternak Sapi di Lahan Kering Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan Selatan. Prosiding Lokakarya Nasional Tanaman Pakan Ternak Bogor: *PUSLITBANGNAK*: 162-168.
- Septiningrum, K dan Maelita R. Moeis. 2009. Isolasi dan karakterisasi xilanase dari *Bacillus circulans*. *Berita Selulosa*, **44**(1).
- Shah, A. R and Datta Madamwar. 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**: 233–243.
- Sindhu, I., Sanjay Chhibber, Neena Capalash, Prince Sharma. 2006. Production of Cellulase-Free Xylanase from *Bacillus megaterium* by Solid State Fermentation for Biobleaching of Pulp. *Current Microbiology*, **53**: 167–172.
- Singhania, R.R., Anil Kumar Patel., Carlos R. Soccol, Ashok Pandey. 2009. Review recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **44**: 13-18.
- Stanbury, P.F. dan A. Whitaker. 1987. *Principles of Fermentation Technology*. 2nd ed. Pergamon Press.
- Sunna, A., G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, **17**: 39-67.
- 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.