

Preservasi Xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation

T. HARYATI¹, P.A. MARBUN² dan T. PURWADARIA¹

¹Balai Penelitian Ternak, PO Box 221 Bogor 16002
²FMIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

(Diterima dewan redaksi 10 Februari 2010)

ABSTRACT

HARYATI, T., P.A. MARBUN and T. PURWADARIA. 2010. Preservation of *Bacillus pumilus* PU4-2 xylanases by immobilization technique into pollard and cation addition. *JITV* 15(1): 63-71.

Utilization of by-product from agriculture as alternative source of feedstuff has been widely practiced. However their usage is limited due to high fiber content and low nutrient digestibility. The use of specific hydrolizing enzymes, xylanases are gaining importance because of their wide application in various industrial sectors especially in bioconversion of hemicellulosic material. This experiment was done to evaluate the effect of cation addition and immobilization of enzyme into pollard on stability of *B. pumilus* xylanase. The enzyme extract was purified by precipitation with 75% ammonium sulphate. Four kinds of cation (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) were added to the purified enzyme, at concentration of 1m M and stored at 4 and 27°C. For immobilization process, the optimum enzyme concentration that will be added to pollard has been evaluated by analysis of xylanase activity and their recovery. The specific activity of enzyme after precipitation increased 1.8 times, from 420.3 to 765.2 U/mg protein. All cations act as activator which relative activity become 130.6; 139.0; 103.8 and 163.5% respectively. Concentration of 0.5mM Ca^{2+} and Fe^{3+} were most able to keep xylanases activity stable at 4°C. The optimum composition of enzymes and pollard was 1.5 ml for 5 gram of pollard with recovery of xylanases activity of 82.2%. In immobilized enzyme, the activity of enzyme without cation addition is higher than that with addition of Ca^{2+} and Fe^{3+} . Activity of enzyme stored at 4°C is more stable than that at 27°C. Immobilized enzyme is more stable for storage, which lasted for 7 weeks at 27°C and 12 weeks at 4°C compared to liquid enzyme which lasted for only 7 days at 27°C and 13 days at 4°C.

Key words: Xylanase, *Bacillus pumilus* PU4-2, Preservation, Immobilization, Cation

ABSTRAK

HARYATI, T., P.A. MARBUN dan T. PURWADARIA. 2010. Preservasi xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan teknik imobilisasi pada pollard dan penambahan kation. *JITV* 15(1): 63-71.

Penggunaan limbah pertanian sebagai alternatif sumber pakan telah banyak dilakukan. Tetapi penggunaannya masih terbatas karena kandungan seratnya yang tinggi serta pencernaan nutrisinya rendah. Penggunaan enzim hidrolisis yang spesifik seperti xilanase mempunyai keuntungan yang penting karena penggunaannya yang luas dalam berbagai sektor industri terutama dalam biokonversi bahan hemiselulosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penambahan kation dan imobilisasi enzim ke dalam polard terhadap stabilitas xilanase *B. pumilus*. Ekstrak enzim yang diperoleh dipekatkan melalui pengendapan menggunakan amonium sulfat 75%. Ditambahkan 4 macam kation (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) dengan konsentrasi 1 mM dan disimpan pada suhu 4 dan 27°C. Untuk proses imobilisasi dilakukan optimasi penambahan enzim pada polard yang kemudian diuji aktifitas xilanase dan perolehan kembalinya. Aktifitas spesifik enzim setelah pengendapan meningkat 1,8x yaitu dari 420,3 menjadi 765,2 U/mg protein. Semua kation berfungsi sebagai aktivator dimana pada waktu penambahan aktifitas relatif masing-masing sebesar 130,6; 139,0; 103,8 dan 163,5%. Kation Ca^{2+} dan Fe^{3+} dengan konsentrasi 0,5mM paling mampu menjaga stabilitas aktifitas xilanase pada suhu 4°C. Komposisi perbandingan optimum antara enzim dan polar yaitu 1,5 ml tiap 5 gram polard dengan perolehan kembali aktifitas xilanase sebesar 82,2%. Pada enzim yang diimobilisasi, aktifitas enzim tanpa penambahan kation lebih tinggi daripada enzim yang ditambahkan Ca^{2+} dan Fe^{3+} . Aktifitas enzim yang disimpan pada 4°C lebih stabil daripada pada suhu 27°C. Enzim yang diimobilisasi lebih tahan terhadap penyimpanan yaitu 7 minggu pada 27°C dan 12 minggu pada 4°C dibandingkan yang disimpan dalam keadaan cair yaitu 7 hari pada 27°C dan 13 hari pada 4°C.

Kata kunci: Xilanase, *Bacillus pumilus* PU4-2, Preservasi, Imobilisasi, Kation

PENDAHULUAN

Pemanfaatan produk samping pertanian sebagai pengganti pakan telah menarik perhatian banyak peneliti di bidang peternakan. Penggunaan bahan

alternatif ini dapat menekan biaya bahan pakan yang umumnya dipakai seperti jagung, tepung ikan, dan tepung kedelai yang saat ini masih harus diimpor. Produk samping pertanian merupakan bahan alternatif

pakan yang yang tidak bersaing dengan kebutuhan manusia. Penggunaan hasil samping pertanian seperti bungkil kelapa, onggok, pollard dan bungkil inti sawit untuk pakan monogastrik dibatasi oleh kandungan serat kasarnya yang tinggi serta kandungan asam amino yang rendah (SWICK dan TAN, 1995). Tingginya kadar serat kasar pada bahan hasil samping pertanian disebabkan kandungan selulosa (34-62%), hemiselulosa (14-56%), dan lignin (14-36%). Oleh karena itu, perlu dilakukan peningkatan daya cerna melalui teknologi bioproses yang dapat dilakukan melalui fermentasi substrat padat dengan menggunakan mikroba atau penambahan langsung enzim hidrolisis.

Dinding sel tanaman mempunyai struktur yang kompleks terdiri atas polisakarida, selulosa, hemiselulosa, pektin, dan oligosakarida yang lebih dikenal sebagai polisakarida bukan pati (NSP) (HETLAND *et al.*, 2008). Degradasi hemiselulosa dilakukan oleh kumpulan kompleks enzim yang menghidrolisis tulang punggung xilan dan glukomanan serta beragam ikatan pada rantai samping. Xilan adalah penyusun utama hemiselulosa di samping glukukan dan manan. Struktur yang kompleks dan banyaknya xilan di alam menyebabkan enzim xilanolitik sangat penting pada proses biokonversi xilan menjadi produk yang lebih bermanfaat.

Ternak monogastrik tidak memiliki enzim yang dapat menghidrolisis NSP. Kandungan NSP dalam ransum monogastrik merupakan antinutrisi yang menurunkan kinerja ternak unggas. Salah satu enzim yang dapat ditambahkan untuk meningkatkan daya cerna bahan kering pakan adalah xilanase yaitu enzim yang dapat menguraikan xilan menjadi xilosa. Kandungan NSP dalam ransum yang mengandung gandum atau barley bersifat antinutrisi karena dapat meningkatkan viskositas digesta sehingga penyerapan nutrisi terhambat, sebagai konsekuensinya pertumbuhan ternak menjadi terganggu. Penambahan xilanase ke dalam ransum berbahan dasar gandum dapat meningkatkan kinerja broiler dan nilai nutrisi pakan (STEINFELD *et al.*, 1998). Suplementasi kombinasi enzim fitase dan xilanase ke dalam ransum broiler berbahan dasar jagung dan gandum dapat berpengaruh terhadap pemanfaatan energi dan menurunkan viskositas digesta (LU *et al.*, 2009)

PURWADARIA *et al.* (2004) mengisolasi bakteri penghasil xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dari usus rayap. Produksi xilanase dari *B. pumilus* PU4-2 mempunyai aktivitas yang cukup besar sehingga dapat ditambahkan ke dalam pakan untuk meningkatkan daya cerna bahan pakan ternak (WIDJAJA *et al.*, 2008). Penggunaan enzim dalam pengolahan pakan mempunyai beberapa keuntungan di antaranya enzim dapat mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi reaksi, sifat kerjanya selektif, dan daya katalitiknya tinggi. Selain itu kecepatan reaksi katalitis

oleh enzim dapat diatur dengan mengubah pH, suhu, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat yang digunakan. Penggunaan enzim dalam campuran pakan akan lebih mudah bila dibuat dalam bentuk padatan. Meskipun demikian, penggunaan enzim harus memperhatikan ketidakstabilan enzim yang dapat terdenaturasi oleh suhu, asam dan alkali. Kenaikan suhu membuka molekul protein enzim sehingga menyebabkan kerusakan sisi aktif enzim dan enzim menjadi tidak aktif. Mengingat pentingnya peranan enzim xilanase dalam campuran pakan yang berasal dari produk samping pertanian, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui cara mempertahankan kestabilan enzim tersebut.

Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas suatu enzim adalah dengan teknik imobilisasi dan modifikasi kimia, rekayasa molekuler, dan penambahan bahan aditif. Dalam penelitian ini digunakan cara imobilisasi enzim dengan mengadsorpsikannya ke dalam polard dan penambahan bahan aditif yaitu kation (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} atau Zn^{2+}) karena cara ini relatif mudah dan biayanya murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penambahan kation dan imobilisasi enzim ke dalam polard terhadap stabilitas xilanase *B. pumilus* PU4-2.

MATERI DAN METODE

Produksi enzim xilanase

Kultur bakteri *B. pumilus* PU4-2 ditumbuhkan pada agar miring NA yang mengandung 0,1% xilan, diinkubasi pada suhu ruang selama 2 hari. Masing-masing kultur pada agar miring ditambahkan 5 ml larutan fisiologis steril dan disuspensikan. Produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan 2 ml inokulum ke dalam 50 ml media PM cair dalam erlenmeyer yang mengandung 0,05% ekstrak khamir, 0,075% pepton, serta polard 3% (WIDJAJA *et al.*, 2008). Erlenmeyer diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm selama 36 jam. Pada waktu pemanenan masing-masing erlenmeyer ditambahkan 0,5 ml natrium azida 20% untuk menghentikan produksi enzim. Pemisahan sel bakteri dari supernatan dilakukan dengan sentrifugasi kultur sel pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 2 x 20 menit. Supernatan yang diperoleh dikumpulkan dan digunakan sebagai ekstrak kasar enzim ekstraseluler dan disimpan pada -20°C.

Uji aktivitas xilanase

Aktivitas xilanase ditentukan berdasarkan metode RICKARD dan LAUGHLIN (1980) dengan modifikasi. Filtrat enzim, bufer, dan substrat xilan 1%

dipreinkubasi pada penangas air selama 10 menit. Campuran reaksi terdiri dari 1 ml filtrat enzim, 1 ml bufer McIlvaine 0,1M (bufer sitrat-fosfat) pH 7,2 dan 1 ml substrat xilan 0,1% dalam tabung McCartney dan divorteks. Kontrol terdiri dari 1 ml bufer dan 1 ml substrat. Sampel dan kontrol diinkubasi pada penangas air bergoyang pada suhu optimum 42°C selama 1 jam, ditambahkan 3 ml pereaksi DNS dan divorteks, untuk kontrol ditambahkan kembali 1 ml filtrat enzim. Blanko terdiri dari 2 ml akuades, 1 ml bufer, dan 3 ml DNS. Campuran reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, disentrifus pada kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit dan absorbans diukur pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 μ mol xilosa dalam 1 menit pada kondisi assay. Aktivitas spesifik ditentukan terhadap kadar protein enzim.

Uji kadar protein

Pengukuran kadar protein dalam sampel ditentukan berdasarkan pengikatan warna Coomassie Brilliant Blue G-250 dengan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar (BRADFORD, 1976). Sebanyak 0,5 ml filtrat (analisis mikro), 0,2 ml filtrat (analisis semimakro), atau 0,1 ml filtrat (analisis makro) ditambahkan dengan 5 ml pereaksi CBB dan divorteks. Absorbans diukur pada panjang gelombang 595 nm setelah 2 menit dan sebelum 1 jam. Blanko dipersiapkan dengan campuran akuades dan 5 ml pereaksi CBB. Kadar protein sampel ditentukan dari kurva standar larutan BSA dengan konsentrasi antara 20-100 μ g/ml, 50-250 μ g/ml atau 150-600 μ g/ml.

Pengendapan enzim dengan garam

Amonium sulfat digunakan untuk mengendapkan enzim kasar (SCOPES 1982). Filtrat enzim yang diperoleh ditambahkan amonium sulfat dengan konsentrasi 75%. Campuran disimpan selama semalam pada suhu 4°C lalu disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, sedangkan endapannya dilarutkan dalam bufer hingga volumenya 1/10 dari volume filtrat enzim awal. Larutan tersebut dianalisis lagi aktivitas xilanase dan kadar proteinnya.

Penambahan kation

Pada enzim kasar cair ditambahkan kation Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , atau Zn^{2+} ditambahkan dalam bentuk garamnya kloridanya (CaCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2 , dan ZnCl_2) dengan konsentrasi akhir 1mM. Sebagai kontrol adalah enzim yang tidak ditambahkan kation. Enzim disimpan pada perlakuan suhu yaitu pada desikator

(suhu ruang) dan 4°C. Pengamatan dilakukan dengan penentuan aktivitas xilanase yang dilakukan setiap hari selama 2 minggu. Aktivitas relatif ditentukan terhadap aktivitas kontrol, aktivitas pada awal sebelum penyimpanan. Optimasi konsentrasi kation dilakukan pada 2 kation yang dipilih. Taraf konsentrasi yang dipakai yaitu 0,5; 1,0; 2,0 dan 4,0 mM.

Imobilisasi enzim dengan polard

Dari percobaan penambahan kation dipilih dua kation terbaik (Ca^{2+} dan Fe^{3+}) untuk ditambahkan ke dalam enzim kering. Filtrat ekstrak enzim kasar, enzim yang ditambah 0,5 mM kation Ca^{2+} , dan enzim yang ditambah 0,5mM kation Fe^{3+} ditambahkan pada polard. Campuran diaduk, dikeringkan dalam oven 37°C selama 2 x 24 jam lalu disimpan dalam desikator (suhu ruang) dan 4°C. Pengamatan dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim xilanase setiap minggu selama tiga bulan. Sebanyak 0,5 g serbuk enzim diekstrak dengan 5 ml bufer McIlvaine pH 7,2 dan ditentukan aktivitas xilanasenya. Perhitungan perolehan kembali didapatkan setelah pengurangan aktifitas xilanase imobilisasi dengan aktifitas xilanase kontrol ekstrak polard tanpa penambahan enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengendapan enzim dengan Amonium Sulfat

Konsentrasi protein sesudah pengendapan ialah 0,87 mg/ml dan sebelum pengendapan 0,25 mg/ml, sedangkan perolehan kembali protein ialah 60,2% (Tabel 1). Pengendapan protein dengan amonium sulfat yang kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi akan memisahkan protein dari kontaminan non protein seperti karbohidrat dan lipid. Kelarutan amonium yang lebih tinggi dari protein akan menyebabkan protein terendapkan dan dapat dipisahkan dengan sentrifugasi. Kenaikan kadar protein disebabkan terjadinya proses pemekatan sedangkan perolehan kembali protein yang tidak mencapai 100% karena tidak semua protein yang terdapat dalam ekstrak enzim kasar terendapkan oleh amonium sulfat, hanya protein yang menyusun dan mendukung aktivitas enzim xilanase serta protein lain yang kelarutannya lebih kecil dari kelarutan amonium sulfat 75%.

Perolehan kembali aktivitas xilanase *B. pumilus* PU4-2 hasil pengendapan dengan amonium sulfat lebih tinggi daripada enzim kasar sebelum pengendapan (Tabel 1). Nilai perolehan yang lebih dari 100% kemungkinan karena ekstrak enzim kasar awal sebelum pengendapan mengandung komponen terlarut seperti monosakarida dan kation yang dapat menghambat

Tabel 1. Aktifitas xilanase dan kadar protein pada pengendapan dengan amonium sulfat kadar 75%

Kondisi	Protein (mg/ml)	Perolehan kembali protein (%)	Aktivitas xilanase (U/ml)	Perolehan kembali aktivitas (%)	Aktivitas spesifik xilanase (U/mg protein)	Kemurnian (kali)
Sebelum pengendapan	0,25	100,0	102,9	100,0	420,3	1,0
Setelah pengendapan	0,87	60,2	666,6	109,6	765,2	1,8

aktivitas xilanase yang kemudian terbuang pada proses pengendapan, sehingga sesudah pengendapan aktivitas xilanase menjadi meningkat.

Aktifitas spesifik dapat menjadi ukuran kemurnian hasil pengendapan enzim. Aktivitas xilanase spesifik setelah pengendapan meningkat hampir dua kali lipat dibandingkan dengan sebelum pengendapan. Hal ini karena adanya kenaikan aktivitas xilanase dan penurunan jumlah protein. Kemurnian juga meningkat hampir dua kali lipat dan hal ini terjadi karena protein yang terendapkan hanya berasal dari protein penyusun enzim.

Pengaruh kation terhadap kestabilan enzim xilanase

Penambahan kation memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kestabilan enzim xilanase *B. pumilus* PU4-2 (Gambar 1). Kation Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , dan Zn^{2+} menjadi aktivator pada hari ke 0 dan mempunyai aktivitas relatif masing-masing meningkat 30,6; 39,0; 3,8; dan 63,5%. Hasil ini sesuai dengan yang menyatakan bahwa keempat kation dapat bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi 1mM. Penyimpanan pada 4°C dengan penambahan ion Fe^{3+} memberikan hasil yang relatif lebih stabil dibandingkan dengan penambahan ion-ion lain. Penyimpanan hari ke-4 masih mempunyai aktifitas relatif yang lebih tinggi dibanding dengan perlakuan lainnya.

Penambahan ion Ca^{2+} menyebabkan aktivitas yang relatif stabil, meskipun nilainya tidak terlalu tinggi. Sampai pada hari ke-7, aktivitas relatifnya masih terjaga dan memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

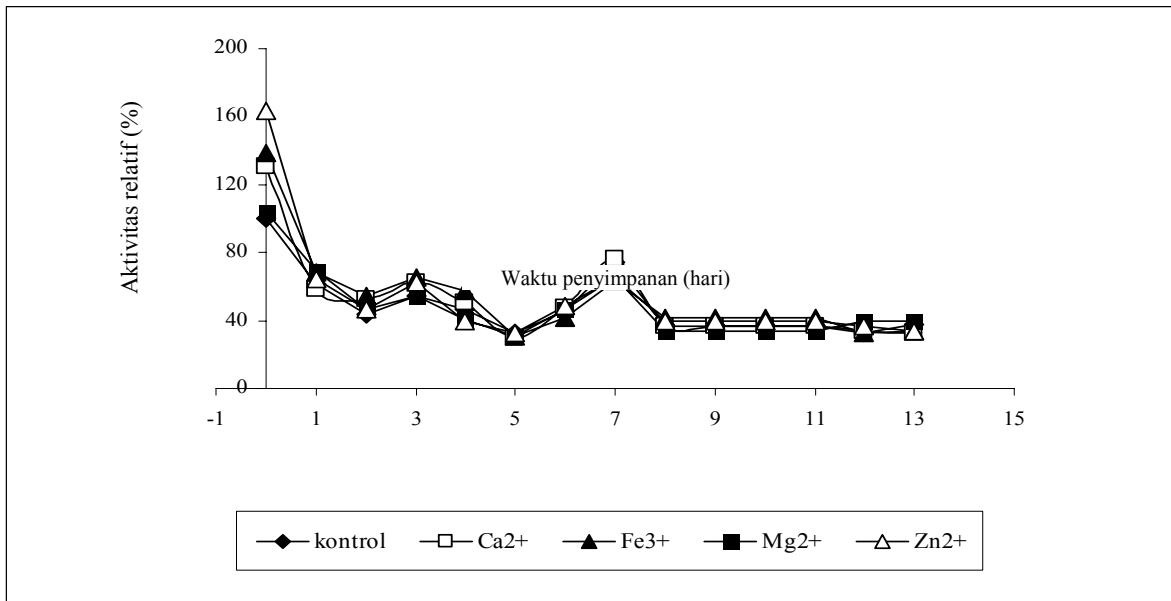
Pada penyimpanan 27°C enzim yang ditambah ion Ca^{2+} dan Fe^{3+} juga relatif stabil. Penambahan ion Fe^{3+} menyebabkan kestabilan terjaga sampai hari ke-3 dengan aktivitas relatif hari ke-1-3 masing-masing 61,9; 58,0; dan 61,9%. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas relatif enzim dengan perlakuan lainnya. Enzim dengan penambahan ion Ca^{2+} memiliki aktivitas relatif yang juga relatif stabil, sampai hari ke-6 dan memiliki aktifitas yang terbesar (47,2%). Enzim dengan penambahan kation Zn^{2+} dan Mg^{2+} memberikan hasil yang sama seperti pada penyimpanan 4°C, yaitu tidak dapat mempertahankan kestabilan

aktivitasnya meskipun pada hari ke 0 bertindak sebagai aktivator.

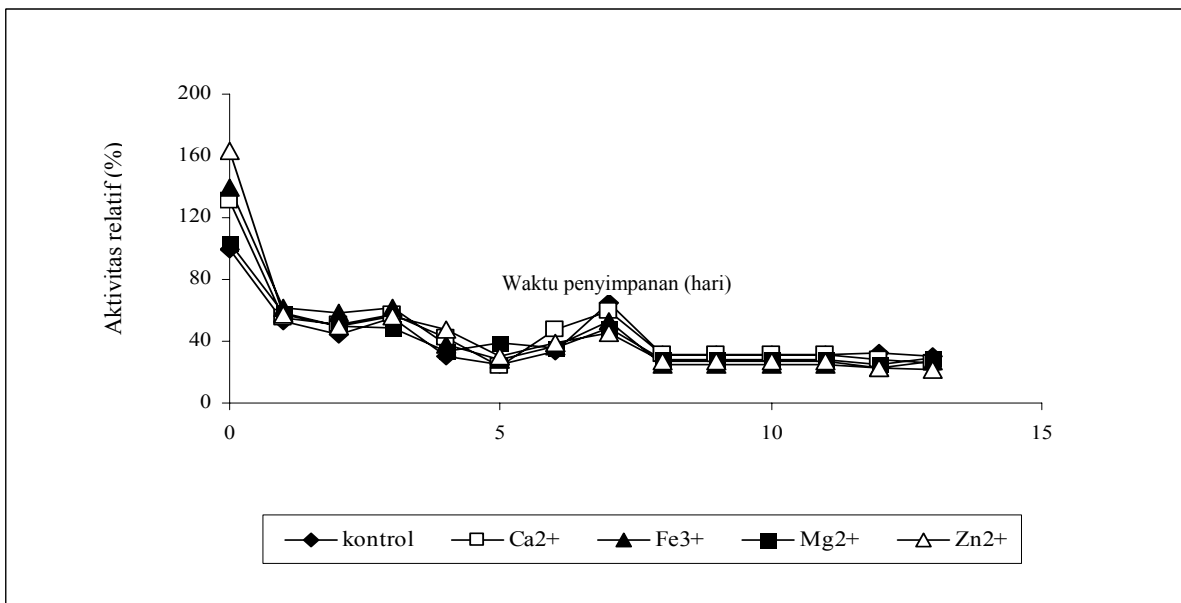
Aktivitas enzim antara dua perlakuan suhu juga memberikan perbedaan. Enzim yang disimpan pada suhu 4°C lebih dapat mempertahankan aktivitasnya dibandingkan dengan enzim yang disimpan pada suhu ruang (27°C). Perbedaan aktivitas relatif antara 2 perlakuan suhu penyimpanan dapat dilihat sejak hari ke-8 sampai hari ke-13. Penyimpanan enzim pada suhu dingin lebih terjaga dari pada suhu ruang karena pertumbuhan mikroba kontaminan yang dapat merusak enzim terhambat. Suhu yang tinggi akan merusak struktur tiga dimensi enzim dan menurunkan aktivitas.

Pengaruh ion logam terhadap stabilitas aktivitas suatu enzim sangat spesifik dan dipengaruhi banyak faktor. Meskipun pada awalnya ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} berfungsi sebagai aktivator, tetapi ke-2 ion ini belum dapat menjaga kestabilan aktivitas enzim. Ion yang berfungsi sebagai aktivator terhadap suatu enzim dapat menjadi inhibitor terhadap enzim lain. Hal ini ditunjukkan oleh ion Fe^{2+} yang bertindak sebagai aktivator pada PU4-2, tetapi pada enzim β -mananase dari kapang *Eupenicillium javanicum* BS4 akan menjadi inhibitor (SKRIPSIANTI, 1996). Sementara itu, ion Ca^{2+} yang mampu menjadi aktivator, terhadap xilanase *B. pumilus* PU4-2 juga menjadi aktivator sekaligus mempertahankan aktivitas enzim mananase BS4 sampai pada hari ke-8 pada penyimpanan 27°C dengan konsentrasi 10 mM. Penelitian PAL *et al.* (2006) menunjukkan penambahan Co^{2+} dan Mg^{2+} dengan konsentrasi 10mM dapat menstimulasi aktivitas enzim cair dan enzim xilanase dari *Aspergillus terreus* yang diimobilisasi, sementara kation Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+} akan menginhibisi aktivitas enzim. Menurut SUHARTONO (1998), 6 mM CaCl_2 juga mampu menjaga kestabilan enzim protease *B. pumilus* Y1 pada penyimpanan selama 18 hari. Ion Ca^{2+} ini berpengaruh terhadap aktivitas protease terutama protease logam. Ion ini diperkirakan mampu memelihara lipatan molekuler maksimum dari enzim protease *B. pumilus* Y1 dengan menginduksi formasi inti hidrofobik, sehingga mendorong pelipatan enzim ke dalam bentuk sisi aktifnya.

Hasil optimasi konsentrasi kation yang ditambahkan menunjukkan penambahan Ca^{2+} 0,5mM meningkatkan



a



b

Gambar 1. Pengaruh penambahan berbagai kation terhadap kestabilan enzim xilanase cair pada penyimpanan 4°C (a) dan 27°C (b)

aktivitas sebesar 24,3%, sedangkan untuk penambahan dengan konsentrasi 1,0 dan 2,0 mM masing-masing dapat meningkatkan aktivitas sebesar 4,2 dan 5,7 %, penambahan dengan konsentrasi 4,0 mM akan menurunkan aktivitas enzim sebesar 0,7% (Tabel 2).

Pengaruh konsentrasi ion terhadap berbagai enzim berbeda-beda. Menurut THONTOWI (2001), pada

konsentrasi 0,5 mM dan 1,0 mM, Ca²⁺ dapat berfungsi sebagai aktivator terhadap enzim fitase *B. coagulans* dengan peningkatan aktivitas masing-masing sebesar 50 dan 143,8%, tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi (2,0 mM) dapat menurunkan aktivitas. Konsentrasi 3,0 mM Ca²⁺ dapat mempertahankan kestabilan aktivitas enzim β-mananase dari kapang *Eupenicillium*

javanicum (SKRIPSIANTI, 1996) dan pada konsentrasi 5 mM dapat mengaktifasi enzim α -amilase *B. stearothermophilus* TII₁₂ (ROSMIMIK, 2001).

Tabel 2. Aktivitas relatif xilanase hasil penambahan berbagai konsentrasi Ca²⁺ dan Fe³⁺

Kadar ion (mM)	Aktivitas relatif (%)	
	Ca ²⁺	Fe ³⁺
0,0	100,0	100,0
0,5	124,3	147,3
1,0	104,2	111,4
2,0	105,7	111,7
4,0	99,3	91,7

Penambahan Fe³⁺ dengan konsentrasi 4,0 mM menurunkan aktivitas relatif enzim. Hal serupa dilaporkan pula oleh THONTOWI, (2001), yakni penambahan Fe³⁺ pada konsentrasi 0,5 dan 1,5 mM pada enzim fitase *B. coagulans* dapat menaikkan aktivitas masing-masing sebesar 250,0 dan 43,8%, tetapi penambahan pada konsentrasi yang lebih tinggi menurunkan aktivitas. Penurunan ini disebabkan karena terjadinya pengendapan substrat yang berikatan dengan Fe³⁺. SKRIPSIANTI (1996) mengatakan bahwa Fe³⁺ tidak efektif mempertahankan kestabilan β -mananase pada konsentrasi 3,0 mM atau lebih. Adanya pengaruh konsentrasi ion yang berbeda terhadap aktivitas enzim diakibatkan oleh perubahan kesetimbangan dan potensial elektrokinetik dari enzim. Penambahan ion logam dengan konsentrasi optimum akan meningkatkan konsentrasi kompleks logam substrat, kemudian membuat kesetimbangan pada daerah yang diinginkan dan merubah potensial elektrokinetik enzim, sehingga proses aktivasi dapat terjadi dengan optimal. Sebaliknya jika konsentrasi di atas atau di bawah konsentrasi optimum, maka kesetimbangan dan potensial elektrokinetik tidak mencapai atau melebihi daerah yang diinginkan dan menyebabkan proses aktivasi tidak optimal bahkan mungkin akan menginhibisi enzim dan berakibat terhadap penurunan aktivitas.

Imobilisasi pada polard

Imobilisasi enzim pada polard merupakan imobilisasi adsorpsi dan terikat pada polard. Volume enzim yang optimum diperoleh hasil penambahan enzim 0,3 ml/g polard memberikan nilai perolehan kembali yang paling tinggi yaitu sebesar 80,2% (Tabel 3). Pada suhu penyimpanan 27 dan 4°C aktivitas enzim imobilisasi yang ditambah kation Ca²⁺ dan Fe³⁺ lebih kecil dari aktivitas enzim imobilisasi tanpa kation (Gambar 2). Setelah dilakukan analisis kadar Ca dan Fe

pada polard, diperoleh kadar Ca sebesar 900 ppm dan kadar Fe sebesar 108 ppm. Nilai ini ternyata melebihi nilai optimum Ca²⁺ dan Fe³⁺ terhadap peningkatan aktivitas xilanase cair yaitu konsentrasi 0,5 mM atau 20 ppm untuk Ca²⁺ dan 28 ppm untuk Fe³⁺. Kadar Ca²⁺ dan Fe³⁺ yang lebih tinggi di polard kemungkinan berpengaruh terhadap enzim xilanase yang telah ditambahkan kation yang sama, sehingga menyebabkan turunnya aktifitas xilanase. Penambahan Ca²⁺ dan Fe³⁺ terhadap enzim mungkin merubah kekuatan ionik enzim dan pH optimumnya. Menurut FARDIAZ (1988), perubahan kekuatan ion atau pH enzim dapat menyebabkan kebocoran enzim dari matriks, sehingga kehilangan aktivitasnya. Pada penyimpanan 27°C enzim imobilisasi yang ditambahkan Ca²⁺ memiliki aktivitas yang lebih rendah dari yang ditambahkan Fe³⁺, sedangkan selama penyimpanan pada 4°C aktivitas keduanya hampir sama. Berarti penambahan Fe³⁺ dapat membantu stabilitas enzim xilanase terhadap panas atau suhu yang lebih tinggi (Gambar 2).

Tabel 3. Aktivitas xilanase hasil imobilisasi pada polard

Volume enzim (ml/g polard)*	Aktivitas xilanase enzim imobilisasi (U/g polard)	Perolehan kembali (%)
0,1	11,7	71,6
0,2	25,5	78,1
0,3	39,3	80,2
0,4	49,8	76,1

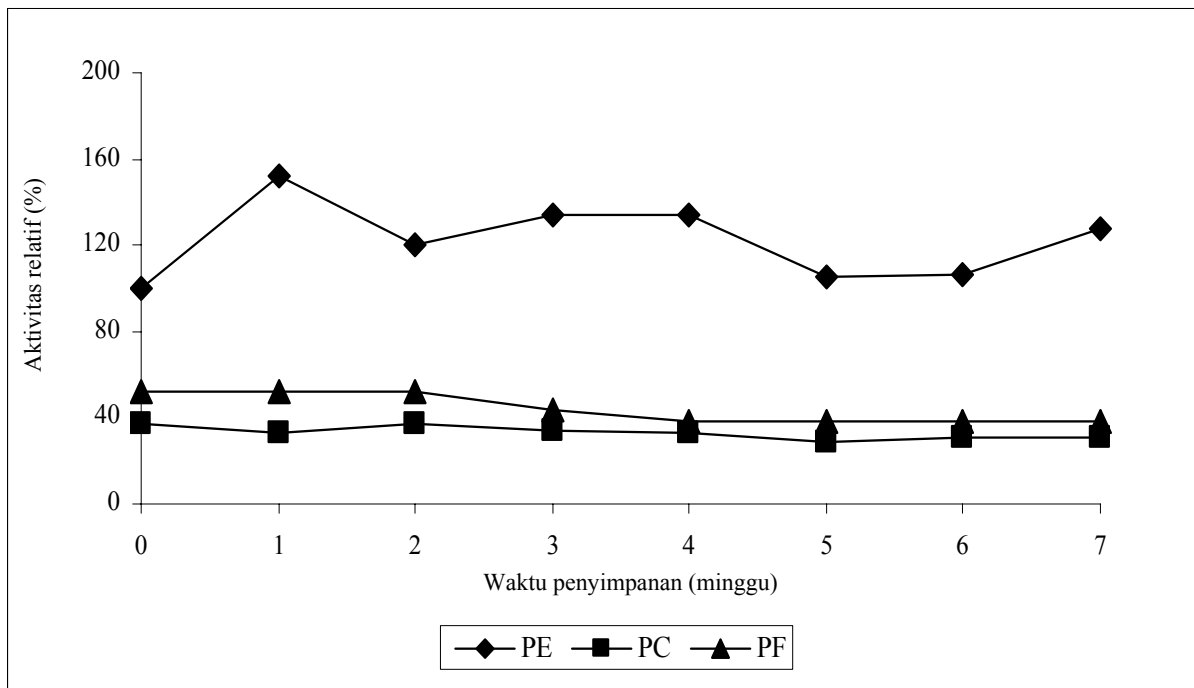
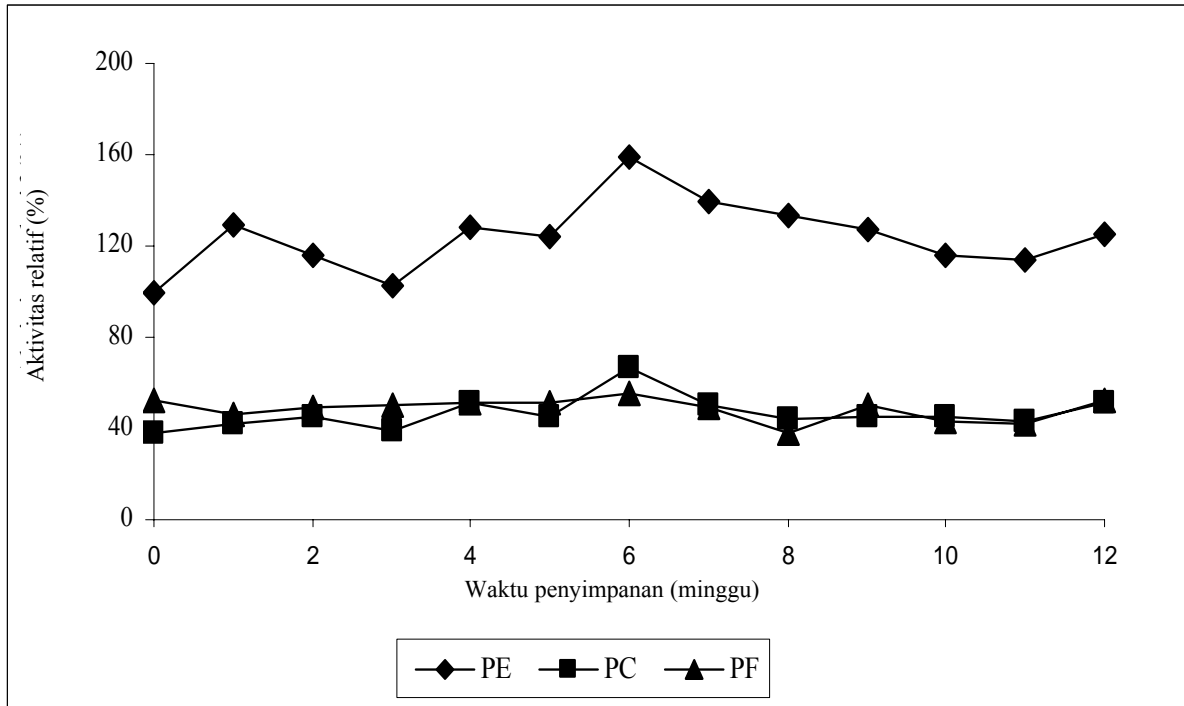
*Aktivitas enzim yang ditambahkan 163,4 U/ml

Perbandingan kestabilan enzim cair dan imobilisasi pada polard

Kestabilan aktivitas enzim lebih terjaga pada penyimpanan dalam bentuk terimobilisasi (kering) daripada tanpa terimobilisasi (cair), baik pada suhu 4°C dan 27°C (Gambar 3). Enzim cair hanya terjaga kestabilannya selama 7 hari pada 27°C dan 13 hari pada 4°C, sedangkan enzim kering selama 7 minggu pada 27°C dan 12 minggu pada 4°C. Pada penelitian lain enzim kering dapat disimpan selama 6 bulan (data tidak dipublikasi). Kestabilan dalam bentuk kering dapat tercapai karena enzim tidak mudah terkontaminasi mikroba kontaminan.

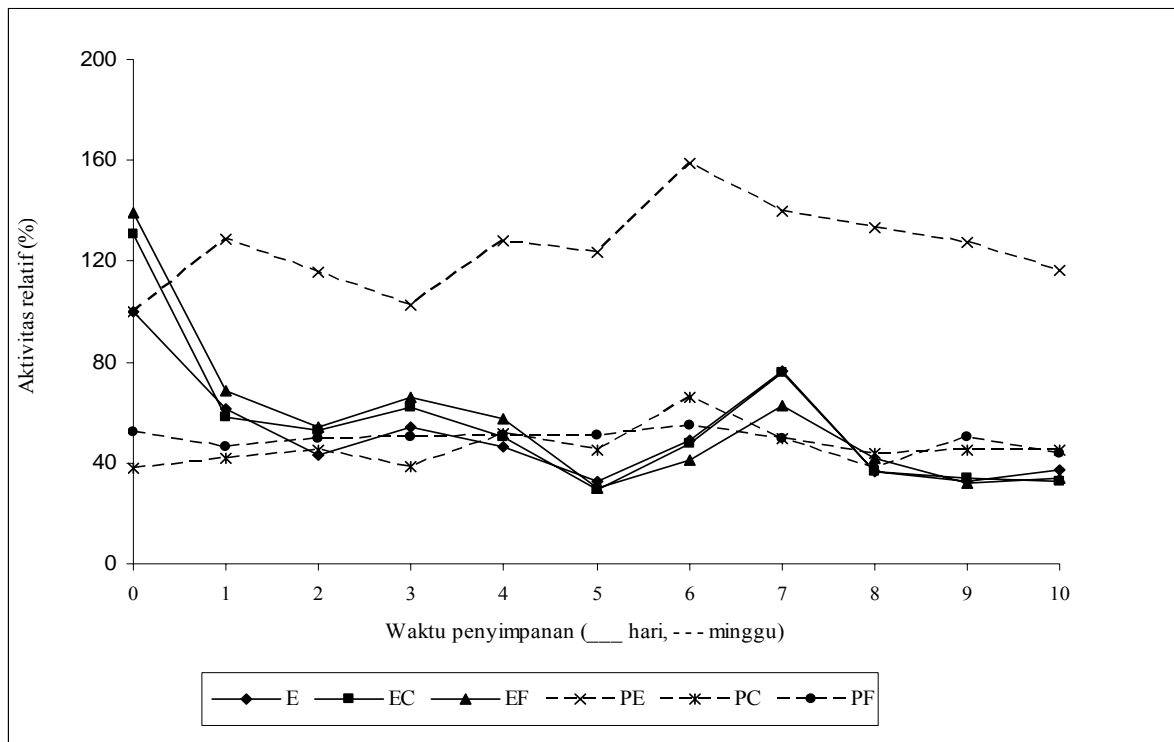
KESIMPULAN

Pengendapan enzim xilanase menggunakan amonium sulfat 75% akan meningkatkan aktivitas enzim dan aktivitas spesifiknya sehingga kemurniannya meningkat 1,8 kali dari awal sebelum pengendapan.



Ket.: PE : Polard + Enzim; PC : Polard + Enzim + Ca; PF : Polard + Enzim + Fe

Gambar 2. Pengaruh imobilisasi pada polard terhadap kestabilan enzim xilanase pada penyimpanan 4°C (a) dan 27°C (b)



E = Enzim cair tanpa penambahan kation
 EC = Enzim cair + Ca
 EF = Enzim cair + Fe
 PE = Polard + Enzim
 PC = Polard + Enzim + Ca
 PF = Polard + Enzim + Fe

Gambar 3. Perbandingan aktivitas enzim imobilisasi pada polard dengan enzim tanpa imobilisasi (cair) pada suhu 4°C

Kation Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , dan Zn^{2+} berfungsi sebagai aktivator pada hari ke-0, namun ion logam yang paling dapat menjaga stabilitas aktivasi yaitu Ca^{2+} dan Fe^{3+} sampai hari ke-12, konsentrasi optimum Ca^{2+} dan Fe^{3+} terhadap enzim xilanase *B. pumilus* yaitu 0,5mM. Enzim yang ditambahkan kation lebih terjaga stabilitasnya pada penyimpanan suhu dingin 4°C. Penambahan kation pada enzim imobilisasi akan menurunkan aktivitas enzim sehingga penambahan kation pada enzim kering kurang menguntungkan. Daya simpan enzim cair maupun enzim kering lebih tinggi bila disimpan pada suhu 4°C dibanding dengan suhu kamar. Enzim kering lebih stabil dibandingkan dengan enzim cair.

DAFTAR PUSTAKA

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
 FARDIAZ, S. 1988. Fisiologi fermentasi. Bogor: PAU, IPB.
 HETLAND, D.H., M. CHOCT and B. SVIHUS. 2004. Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *World Poult. Sci. J.* 60: 415-422.

LU, M, D. LI, L. GONG, Y. RU and V. RAVINDRAN. 2009. Effects of supplemental microbial phytase and xylanase on the performance of broiler fed based on corn and wheat. *J. Poult. Sci.* 46: 217-223.
 PAL, A., L. RAY and P. CHATTOPADHYAY. 2006. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized column reactor. *Ind. J. Biotechnol.* 5: 163-168.
 PURWADARIA, T, P. ARDININGSIH, P.P. KETAREN dan A.P. SINURAT. 2004. Isolasi dan penapisan bakteri xilanolitik mesofil dari rayap. *J. Mikrobiol. Indones.* 9: 59-62
 RICKARD, P.A.D. and T.A. LAUGHLIN. 1980. Detection and assay of xylanolytic enzymes in a *Cellulomonas* isolate. *Biotechnol. Lett.* 2: 363-368.
 ROSMIMIK, N., RICHANA, P. LESTARI dan D.S. DAMARDJATI. 2001. Studi penambahan ion kalsium terhadap aktifitas dan stabilitas α -amilase *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂. *J. Mikrobiol. Indon.* 6: 12-14.
 SCOPES, R. 1982. Protein purification: Principles and Practice. New York: Springer-Verlag.
 SKRIPSANTI, A. 1996. Kestabilan enzim β -mananase dengan penambahan bufer dan berbagai kation pada berbagai suhu penyimpanan. *Skripsi.* FMIPA-KIMIA IPB. Bogor. Indonesia.

- STEENFELDT, S., A. MÜLLERTZ and J. FRIS. JENSEN. 1998. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broiler. 1. Effect on growth performance and intestinal viscosity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 75: 27-43.
- SUHARTONO, M.T. 1998. Effect of calcium chloride and propanol upon the stability of protease from *B. pumilus* Y1. *Hayati* 5: 14-16.
- SWICK, A.R and P.H. TAN. 1995. Consideration in using common asian protein meals. *Tech. Bull. ASA*. Vol. P. 025. MITA(P). No. 083/12/94.
- THONTOWI, A., E.I. RIYANTI, S. WIDOWATI dan H. HERAWATI. 2001. Penambahan mineral untuk meningkatkan aktivitas dan stabilitas fitase *Bacillus coagulans* E1.4.4. *J. Mikrobiol. Indones.* 6: 27-30.
- WIDJAJA, S., T. PURWADARIA and P.P. KETAREN. 2008. Apparent induction of xylanase by *Bacillus pumilus* PU4-2 using pretreated substrates. *Microbiol. Indones.* 2: 44-48.