

OPTIMASI PRODUKSI XILANASE OLEH *B.subtilis* AQ1 MENGUNAKAN RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Aidhya Irhash Putra¹, Budiasih Wahyuntari², Aulanni'am³

¹Program Studi Biologi Jurusan Tarbiyah STAIN Batusangkar

Jl. Sudirman No. 137 Kuburajo Lima Kaum Batusangkar Sumatera Barat 27213.

Email: Aidhya@live.com. ²LAPLAB PUSPIPTEK BPPT Serpong Tangerang 15310

³FMIPA Universitas Brawijaya Malang 65415

ABSTRACT

Xylanase is an important enzyme for xylan degradation into xylan derivative compounds such as xylose, xylobiose, xylotriose and other oligoxylan. Xylan derivatives can be bioconverted into bioenergy (ethanol), food ingredients as well as pharmaceutical or nutraceutical goods. Some bacteria have been reported to produce xylanases using different kinds of agricultural wastes as a substrate. The objective of this experiment was to optimize the concentration of corn cobs as a carbon source and liquid tofu waste as nitrogen source on xylanase production by *Bacillus subtilis* AQ-1. A 2² central composite experimental design was performed to optimize the corn cobs and liquid tofu waste concentration. A second order quadratic model and a response surface method showed that the optimum condition for xylanase production was 1.1 % (w/v) corn cobs and 0.00198 % (v/v) total N of liquid tofu waste with the highest xylanase production of 122.99 U/ml.

Key words: *Bacillus subtilis* AQ-1, xylanase, corn cob, liquid tofu waste

PENDAHULUAN

Xilanase adalah enzim ekstraseluler yang menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Enzim ini telah dimanfaatkan dalam proses pangan dan non pangan. Penggunaan xilanase untuk aplikasi bioteknologi dimulai pada tahun 1980 sebagai bahan tambahan pakan ternak, dan kemudian merambah ke berbagai bidang industri, sejak itu kegunaan enzim ini meningkat. Akhir-akhir ini, xilanase menempati 20 % pasar global enzim industri (Polaina *et al*: 2007).

Produksi xilanase skala industri membutuhkan tersedianya substrat yang murah dan mudah didapat. Selama ini untuk menghasilkan enzim xilanase dengan produktifitas tinggi memerlukan xilan sebagai substrat. Penggunaan xilan dalam produksi xilanase skala besar terlalu mahal, untuk mengatasi masalah tersebut perlu dicari bahan baku yang mengandung lignoselulosa tinggi seperti limbah dari tanaman pangan di antaranya ialah tongkol jagung. Tongkol jagung adalah lim-

bah pertanian jagung yang nilai ekonomi yang relatif rendah. Tongkol jagung ini mengandung 391 g selulosa, 421 g hemiselulosa (sebagian besar berupa xilan), 91 g lignin, 17 g protein dan 12 g abu per Kg berat keringnya (Katapodis *et al.*, 2006). Tongkol jagung merupakan limbah pertanian yang kaya lignoselulosa, dapat dijadikan sumber karbon yang murah sebagai substrat untuk produksi xilanase oleh mikroorganisme (Katapodis *et al.*, 2006). Oleh karena itu, pada penelitian ini tongkol jagung dipilih sebagai sumber karbon untuk memproduksi xilanase oleh mikroorganisme.

Bacillus subtilis merupakan bakteri penghasil enzim ekstraseluler yang potensial, umumnya hidup di tanah. Produksi xilanase yang sedang dikembangkan di Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB) BPPT saat ini menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* AQ1. Produksi xilanase oleh *Bacillus* sp biasanya menggunakan medium produksi berdasarkan penelitian Nakamura *et al* (1995) dengan xilan

oat spelt sebagai sumber karbon dan sebagai sumber nitrogen adalah khamir ekstrak dan pepton. Kedua sumber karbon dan sumber nitrogen pada medium Nakamura memiliki harga yang relatif mahal sehingga biaya produksi enzim menjadi tinggi. Oleh karena itu, perlu dicari sumber karbon dan nitrogen alternatif yang murah dan cocok digunakan untuk produksi xilanase. Sumber karbon yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah tongkol jagung, sedangkan untuk sumber nitrogen adalah limbah cair tahu,

Penggantian komposisi medium untuk produksi xilanase akan mengakibatkan perubahan pada mekanisme proses yang akan terjadi sehingga hasil yang akan didapat juga akan berubah. Oleh karena itu, perlu dilakukan proses optimasi konsentrasi sumber karbon dan nitrogen untuk produksi enzim xilanase menggunakan metode respon permukaan (Response Surface Methodology, RSM).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (Laptiab), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPITEK) Serpong, Tangerang - Banten mulai Januari 2009 - Oktober 2009.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi isolat *Bacillus subtilis* AQ 1 koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT. Serbuk tongkol jagung yang dihaluskan dan lolos ayakan 20 mesh, Limbah cair tahu yang telah dipekatkan 10 kali. Bahan untuk pembuatan medium fermentasi merek Pronadisa yang meliputi yeast ekstrak dan pepton. Bahan kimia merek Merck meliputi $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Na_2HPO_4 , NaOH 30% dan HCl 0,001N, larutan Bradford, selenium mixture (Merck), asam borat, NaOH, H_2SO_4 , buffer Na fosfat pH 7, aquades, alcohol, D-Xilosa, Oat spelt xilan dan reagen 3,5 Di Nitro

Salicylic acid dari Sigma digunakan untuk uji aktivitas xilanase.

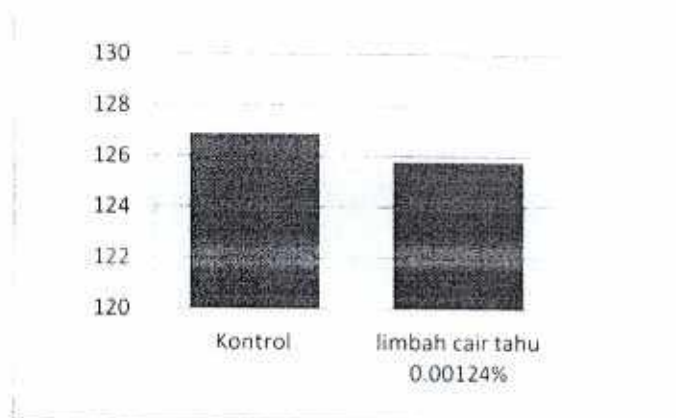
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *glassware* merk Pyrex, Schott duran dan Iwaki yang meliputi labu Erlenmeyer 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml dan 5000 ml, tabung reaksi, gelas ukur 100 ml, beaker gelas, cawan petri, pipet tetes, corong kaca dan corong plastik, strirer magnetik, hot plate, *vortex mixer*, *autoklaf* (Iwaki), *laminar airflow* (Esco), shaker (Kuhner), spektrofotometer, bunsen, ose, spatula, timbangan analitik, *tip pipet*, *incubator* (Mettler), termomixer (Appendorf), microwave (Sharp), sentrifuse dingin (Sorvall), mikropipet (Appendorf), rak tabung dan waterbath.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Produksi Xilanase dari *B. subtilis* AQ1 Menggunakan Limbah Cair Tahu sebagai Sumber N

Pengujian dilakukan dengan cara melakukan produksi enzim xilanase pada medium Nakamura modifikasi (sumber N = limbah cair tahu, sumber karbon = tongkol jagung) dibandingkan dengan medium Nakamura kontrol (Nakamura *et al.*, 1995). Hasil pengujian ditunjukkan pada Gambar 1.

Perbandingan Aktivitas Xilanase Antara Medium Nakamura dengan Sumber N Ekstrak Khamir- Pepton (Kontrol) dan Sumber N Limbah Cair Tahu (Kontrol = Medium Nakamura dengan sumber karbon tongkol jagung 0.5 % sumber N ekstrak khamir 0.5 % (N = 0.05 %) dan pepton 1% (N = 0.14 %), limbah cair tahu (Medium Nakamura modifikasi dengan sumber karbon = tongkol jagung 0.5 %, sumber N limbah cair tahu dengan N total 0.00124%). Gambar 1 menunjukkan bahwa aktifitas xilanase pada kontrol adalah 126, 9 U/ml sedangkan pada medium yang menggunakan limbah cair tahu 0.00124 % (b/v) total N sebagai sumber N nya didapatkan aktivitas xilanase 125, 8 U/ml.



Gambar 1 Hasil Pengujian Enzim Xilanase pada Medium Nakamura

Hasil Optimasi Menggunakan Metode Respon Permukaan (RSM)

Hasil pengamatan aktivitas enzim pada matrik komposit terpusat (CCD)

Proses optimasi produksi xilanase dari *Bacillus subtilis* AQ 1 dilakukan dengan medium produksi Nakamura (1995) yang sumber karbonnya menggunakan tongkol jagung dan

sumber nitrogen menggunakan limbah cair tahu. Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan komposit terpusat (*central composite design/CCD*) faktorial 2². Terdapat dua variabel bebas yaitu konsentrasi tongkol jagung (karbon) dan konsentrasi limbah cair tahu (nitrogen) yang akan mempengaruhi produksi xilanase.

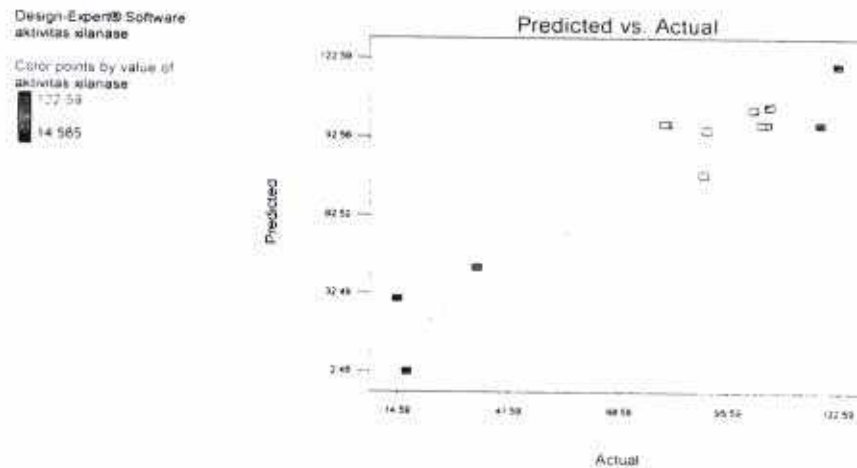
Tabel 1 Data Hasil Aktivitas Enzim pada Rancangan Komposit Pusat

Std	Kode		Konsentrasi		Aktivitas Xilanase	
	X1	X2	Tj (% b/v)	LCT (% b/v N total)	Pengamatan	Prediksi
1	-1	-1	0.4	0.0005	14.585	30.420
2	1	-1	1.1	0.0005	33.902	42.401
3	-1	1	0.4	0.00198	90.665	95.173
4	1	1	1.1	0.00198	122.595	120.162
5	-1.4121	0	0.2550253	0.00124	89.877	78.185
6	1.4121	0	1.2449747	0.00124	105.645	104.327
7	0	-1.4121	0.75	0.000193482	16.950	2.436
8	0	1.4121	0.75	0.002286518	101.703	103.208
9	0	0	0.75	0.00124	104.856	97.518
10	0	0	0.75	0.00124	118.259	97.518
11	0	0	0.75	0.00124	103.645	97.518
12	0	0	0.75	0.00124	80.810	97.518
13	0	0	0.75	0.00124	80.022	97.518

Keterangan Cetak tebal = perlakuan dengan aktivitas enzim tertinggi; X₁ = kode variabel 1 (Tj: Tongkol Jagung); X₂ = kode variabel 2 (LCT: % N total Limbah Cair Tahu)

Dari rancangan komposit pusat didapatkan aktivitas xilanase tertinggi pada konsentrasi tongkol jagung 1.1 % (b/v) dan konsentrasi limbah cair tahu 0.00198 % (b/v).

Keakuratan model juga dapat diketahui dari perbandingan nilai aktual penelitian dengan prediksi dari model.



Gambar 2 Distribusi Sebaran Nilai Aktual Dan Prediksi Produksi Xilanase

Berdasarkan uji ANOVA diperoleh nilai koefisien determinasi $R^2=0.8879$ yang menunjukkan bahwa 88,79% variasi sampel pada produksi xilanase dipengaruhi oleh variabel independen. Nilai R^2 juga menunjukkan bahwa hanya 11,2 % variasi yang tidak dijelaskan oleh model.

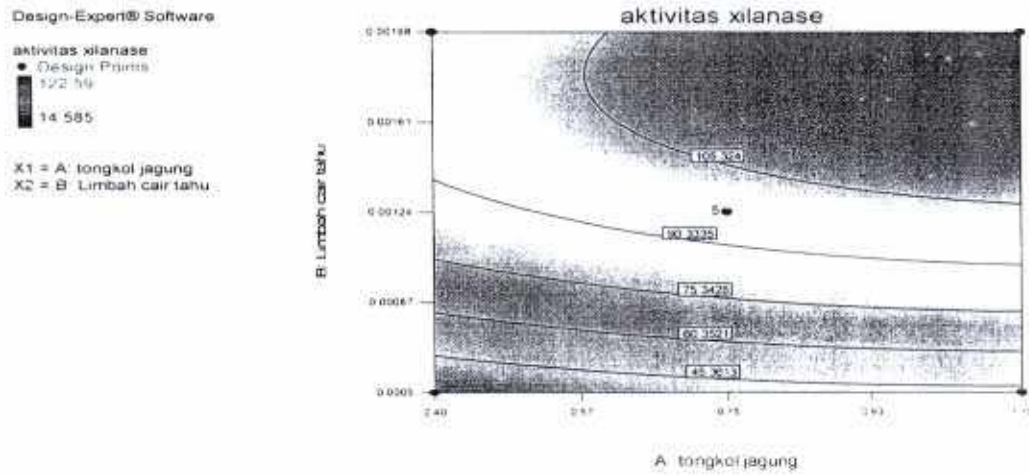
Tabel 2 Uji Analisa Ragam (ANOVA) dari Model

	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Mean Kuadrat	F Hitung	Nilai P Prob > F
Model	14324.84598	5	2864.969196	11.0964440	0.0032
A- TJ	676.03829	1	676.038290	2.61839500	0.1497
B-LCT	10126.55490	1	10126.55490	39.221625	0.0004
AB	39.74041	1	39.74041	0.15392043	0.7065
A ²	69.28188	1	69.28188	0.26833883	0.6204
B ²	3482.11283	1	3482.11283	13.4867314	0.0079
Residual	1807.31632	7	258.18804		
Lack of Fit	700.46607	3	233.48869	0.84379505	0.5371
Galat	1106.85024	4	276.71256		
Cor.Total	16132.16230	12			

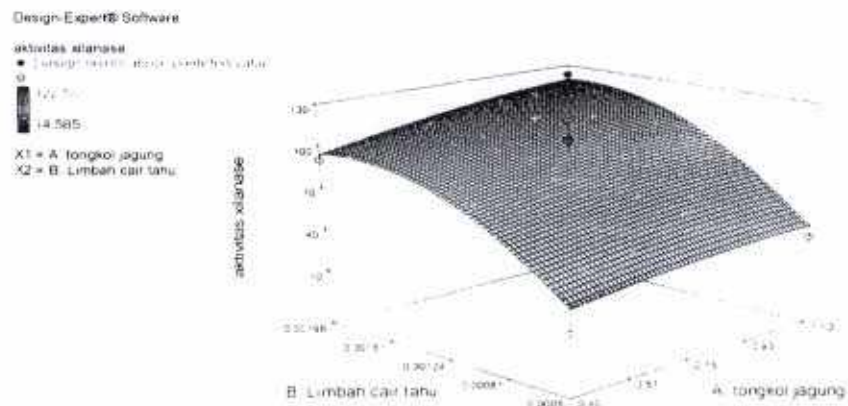
Bentuk umum persamaan regresi untuk model Kuadratik:

$$\hat{Y} = 97.5185 + 9.19 X_1 + 35.578 X_2 + 3.152 X_1 X_2 - 3.155 X_1^2 - 22.373 X_2^2 \dots\dots(3)$$

Koefisien model regresi pada persamaan (3) terdiri atas satu koefisien blok, dua koefisien linier, satu koefisien interaksi dan dua koefisien kuadrat. Model persamaan merupakan interaksi dua faktor dan linier.



Respon Permukaan dan Plot Kontur Tongkol Jagung dan Total Limbah Cair Tahu pada Produksi Xilanase



Gambar 3 Respon Permukaan Dan Plot Kontur Tongkol Jagung dan Total Limbah Cair Tahu pada Produksi Xilanase

Kondisi fermentasi optimum untuk aktivitas xilanase tertinggi dicapai pada konsentrasi tongkol jagung 1,1 % dan total N dari limbah cair tahu 0.00198 %. Pada kondisi op-

timum ini prediksi model pada aktivitas xilanase yang dihasilkan adalah 122.59 U/ml. Titik optimum pada model ini tidak terdapat pada titik tengah maupun titik tertinggi akan

tetapi terdapat pada titik antara titik tengah dan titik tertinggi. Hal ini menjelaskan bahwa pemberian konsentrasi tongkol jagung dan konsentrasi total N pada limbah cair tahu yang lebih tinggi lagi tidak akan berpengaruh pada peningkatan aktivitas xilanase dapat dilihat

dari pelengkungan pada kurva Gambar 3. Pengujian hasil prediksi aktivitas xilanase oleh model selanjutnya diverifikasi dengan melakukan pengujian secara empiris pada uji kondisi optimum.

Tabel 3 Data Analisa Kondisi Optimum

Jam ke	Protein (mg/ml)	Jumlah Sel (sel/ml)	Aktivitas Xilanase (U/ml)
0	0.359	3.50E+07	6.11
3	0.342	7.60E+07	20.49
6	0.344	2.20E+08	63.33
9	0.309	3.80E+08	111.689
12	0.301	3.80E+08	97.564
18	0.393	3.30E+08	119.048
24	0.377	3.50E+08	122.595
30	0.383	3.70E+08	119.048
36	0.425	2.70E+08	111.426
42	0.424	2.40E+08	77.788

Dalam percobaan ini fermentasi produksi xilanase *B.subtilis* AQ1 dengan skala 50 ml dalam Erlenmeyer 250 ml produksi enzim tertinggi didapat pada jam ke 24 yaitu 122.595 U/ml, pada saat itu kadar protein yang terdeteksi adalah 0.377 mg/ml dan jumlah sel *Bacillus subtilis* AQ1 adalah 3.5×10^8 sel/ml. Pada pengamatan ini didapatkan produksi xilanase yang lebih tinggi dan dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bochini (2002) dengan *Bacillus circulans* D1 mendapatkan xilanase 22.54 U/ml dalam waktu 72 jam. Pada penelitian yang dilakukan Bochini tersebut menggunakan medium yang terdiri dari sumber karbon dan sumber nitrogen yang cukup mahal (xilan dan pepton) tetapi membutuhkan waktu fermentasi yang lebih lama. Lama waktu fermentasi akan mempengaruhi keefektifan secara ekonomi (Stanbury *et al.*, 1987).

KESIMPULAN

1. Optimasi produksi xilanase dengan menggunakan metode permukaan respon (RSM) didapatkan kombinasi konsentrasi tongkol jagung (sumber karbon) dan N total limbah cair tahu (sumber nitrogen) yang optimal yaitu: tongkol jagung 1.1 % (g/v) dan 0.00198 % (v/v) dengan aktivitas xilanase tertinggi 122.59 U/ml dengan model matematika yang didapatkan adalah:

$$\hat{Y} = 97.5185 + 9.19 X_1 + 35.578 X_2 + 3.152 X_1 X_2 - 3.155 X_1^2 - 22.373 X_2^2$$
 (4)
2. Tongkol jagung dan limbah cair tahu dapat digunakan sebagai sumber karbon dan sumber nitrogen murah untuk produksi xilanase dari *Bacillus subtilis* AQ1 pengganti sumber karbon xilan oatspelt dan sumber nitrogen ekstrak khamir dan pepton yang mahal.
3. Penggunaan limbah tahu cair mampu menggantikan penggunaan sumber N yang bersifat ekonomis dengan meng-

hasilkan aktivitas enzim sebesar 122.59 U/ml.

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah perlu dilakukan analisa komponen yang terkandung pada limbah cair tahu sehingga menghasilkan xylanase dengan aktivitas tertinggi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi menggunakan fermentor terutama kombinasi antara kecepatan agitasi dan kecepatan aerasi untuk menghasilkan oksigen terlarut yang optimal bagi metabolisme bakteri dalam medium produksi.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Bochini DA, Alves-Prado HF, Baida LC., Roberto IC, Gomes E, Da Silva R. 2002. Optimization of Xylanase Production by *Bacillus circulans* D1 in Submerged fermentation Using Response Surface Methodology. *Journal of Process Biochemistry-Elsevier*: 727-731.
- Katapodis P, Christakopoulou V, Christakopoulos P. 2006. Optimization of Xylanase Production by *Sporotrichum thermophile* Using Corn Cobs and Response Surface Methodology. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Nakamura S, Ishiguro Y, Nakai R., Wakabayashi K, Aono R, Horikoshi K. 1995. Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1. *Journal of Molecular Catalysis-Elsevier* 1: 7-15.
- Polaina J and Andrew P. M. 2007. *Industrial Enzyme: Structure, Function and Applications*. Netherland: Springer.
- Stanbury PF, Whitaker A. 1987. *Principle of Fermentation Technology*. UK: Pergamon Press Ltd.