



PENENTUAN KONDISI OPTIMUM AMOBILISASI XILANASE DARI *Trichoderma viride* PADA Matrik ZEOLIT TERAKTIVASI ASAM

Determination of Immobilization Optimum Conditions of Trichoderma viride's Xilanase on Acid-Activated Zeolite Matrix

Sutrisno^{1,2*}, Anna Roosdiana¹, Sasangka Prasetyawan^{1,2} dan Intan Permata Sari¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang, Jawa Timur, Indonesia 65145

² Kelompok Peneliti "Low Cost & Automated Method and Instrumentation Analysis (LCAMIA)",
Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang, Jawa Timur, Indonesia 65145

* Untuk Korespondensi, Telp/Fax : 085649661044, email: ris_mc@ub.ac.id

Received: June 25, 2017

Accepted: August 31, 2017

Online Published: September 7, 2017

DOI : 10.20961/jkpk.v2i2.11912

ABSTRAK

Xilanase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa. Enzim bebas hanya dapat digunakan sekali, oleh karena itu perlu dibuat dalam bentuk amobil. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase menggunakan zeolite teraktivasi asam. Amobilisasi xilanase dilakukan pada variasi waktu pengocokan (1 - 5) jam, variasi konsentrasi xilanase (2 - 4 mg/mL) menggunakan 0,1 g zeolit pada temperatur ruang dan kecepatan pengocokan 100 rpm. Jumlah xilanase yang teradsorpsi pada zeolite ditentukan secara spektrofotometri menggunakan reagen Biuret dan aktivitas xilanase amobil yang terbentuk ditentukan secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi xilanase pada zeolite tercapai pada waktu pengocokan 3 jam dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan xilanase teradsorpsi sebesar 156,5 mg/g zeolit dan aktivitas 26,67 unit.

Kata kunci: metode adsorpsi, aktivitas, gula pereduksi, xilo-oligosakarida

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that catalyzes the reaction of xylan hydrolysis into xylose. The free enzyme can be used only once, therefore it needs to be made in the form of immobilization. This study aims to determine the optimum conditions for immobilization of xylanase using an acid-activated zeolite. The xylanase immobilization was performed on variations of shaking time (1-5) hours, variation of xylanase concentration (2 - 4 mg / mL) using 0.1 g zeolite at room temperature and a shaking rate of 100 rpm. The amount of xylanase adsorbed on the zeolite was determined by spectrophotometry using the Biuret reagent and the immobilized xylanase activity formed was determined spectrophotometrically using a DNS reagent. The results showed that the optimum condition of xylanase immobilization at zeolite was achieved at 3 hrs shaking time and xylanase concentration 3.5 mg / mL with xylanase adsorbed of 156.5 mg/g zeolite and activity 26.67 units.

Keywords: adsorption methods, activity, reducing sugars, xilo-oligosaccharides

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstra-seluler yang mampu meningkatkan reaksi hidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik pada xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida[1]. Xilanase dihasilkan oleh sejumlah mikro-organisme seperti bakteri, ragi dan jamur. Xilanase yang dihasilkan dari jamur *Trichoderma inhamatum* stabil pada temperatur kurang dari 55°C, dan memiliki temperatur optimum 50°C. Stabil pada pH 4,0 - 8,0 dan memiliki pH optimum 5,0 - 5,5 [2]. Xilanase memiliki peranan penting dalam dunia industri, seperti industri kertas, farmasi, pakan dan pangan.

Penggunaan enzim dalam bentuk bebas memerlukan biaya mahal karena enzim mudah rusak dan sulit dipisahkan dari campuran reaksi sehingga tidak dapat digunakan secara berulang. Untuk menekan biaya dapat dilakukan dengan cara membuat enzim dalam bentuk amobil. Cara sederhana untuk membuat enzim amobil yaitu dengan cara menempelkan enzim pada permukaan adsorben [3, sukIha,2003]. Pada penelitian ini xilanase ditempelkan pada permukaan zeolite yang telah diaktivasi dengan HCl. Zeolit adalah mineral dengan struktur Kristal aluminasilikat yang memiliki struktur tiga dimensi, mempunyai rongga dan saluran serta mengandung ion-ion logam seperti Na,K,Mg,Ca dan Fe serta molekul air[4]. Zeolit tahan terhadap panas, selektif permukaan dan mudah dimodifikasi sehingga banyak digunakan sebagai adsorben[5]. Aktivitas zeolite alam cenderung rendah karena masih banyak pengotor, untuk itu perlu dilakukan aktivasi.

Jumlah xilanase yang teradsorpsi pada permukaan zeolite dipengaruhi oleh lama kontak dan banyaknya xilanase yang digunakan saat amobilisasi. Oleh karena itu kedua hal ini dipelajari.

METODE PENELITIAN

T. viride diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya.

Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti pepton, tepung agar, xilan, kasein, tepung klobot jagung, dan kentang (pasar lokal). Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain asam oleat, dextrosa, asam asetat glasial, zeolite, CH₃COONa, CaCl₂.2H₂O, BaCl₂, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, HCl, NaKC₄O₆H₄, glukosa anhidrat, Na₂SO₃, kristalin fenol, asam dinitrosalisilat, NaOH.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), laminar air flow, inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), autoklav (LS-C35L), shaker (Edmund Buhler SM 2524B), sentrifuse dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel), Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific Genesys 20), kuvet, lemari pendingin, jarum ose, ayakan 120 mesh, 150 mesh, pengaduk magnet, oven, alumunium foil, kapas steril, kantong selofan, pH universal, dan kertas saring *Whatman* no.40.

1. Produksi Xilanase

T. viride yang telah ditumbuhkan dalam media padat agar miring selama 144 jam (pH 5 dan 30°C) disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi diambil sebanyak 2 mL dan ditanam pada 13 mL media cair steril. Diinkubasi dengan shaker kecepatan putar 150 rpm pada temperatur ruang selama 36 jam. Inokulum *T. viride* ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar, digoyang dengan kecepatan 150 rpm hingga jam ke-60. Media hasil fermentasi ditambahkan 15 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, temperatur 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar xilanase dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40-80%, dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan. Xilanase hasil pemurnian diuji kadar protein dan aktivitasnya.

2. Uji kadar protein

Larutan enzim sebanyak 2 mL ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum kasein (550 nm). Kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai serapan pada persamaan regresi kurva baku kasein yang telah dibuat sebelumnya.

3. Penentuan aktivitas xilanase [6,7]

Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL substrat xilan

1% (b/v) yang telah diinkubasi pada temperatur 60°C selama 15 menit dengan 1 mL enzim, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran diinkubasi pada temperatur 60°C selama 55 menit selanjutnya dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan air mengalir. Larutan yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 495 nm. Kadar gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi ditentukan dengan cara mengplotkan serapan yang diperoleh ke dalam persamaan regresi kurva baku gula pereduksi yang telah dibuat sebelumnya.

Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas amobil diartikan sebagai 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per gram enzim amobil.

4. Amobilisasi xilanase pada matrik zeolit

a. Aktivasi Zeolit

Zeolit terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada temperatur 105°C. Zeolit yang sudah dioven dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditambahkan 200 mL larutan HCl 0,4 M dan dikocok dengan shaker pada temperatur ruang selama 4 jam dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Kemudian zeolit disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 dan dicuci dengan akuades hingga pH filtrat netral. Setelah itu zeolit dikeringkan pada temperatur 105°C hingga berat konstan. Zeolit yang telah diaktivasi kemudian

dikalsinasi pada temperatur 500 °C selama 4 jam.

b. Penentuan waktu pengocokan optimum amobilisasi xilanase

Xilanase hasil pemurnian dipipet 2 mL, lalu ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL yang berisi 0,1 gram zeolite teraktivasi HCl. Campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama (1, 2, 3, 4, 5) jam, kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 40. Xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan filtrat diukur kadar proteinnya.

c. Penentuan konsentrasi xilanase optimum amobilisasi xilanase

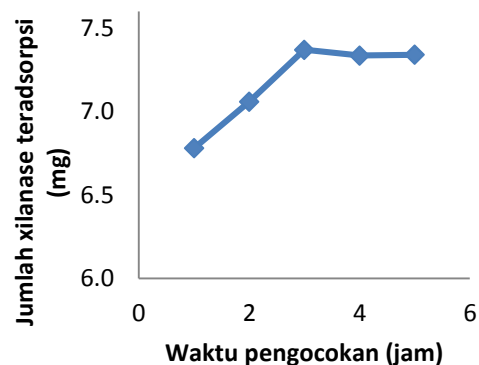
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi lama pengocokan. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang digunakan yaitu (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; dan 4,0) mg/mL. Campuran diinkubasi selama waktu pengocokan optimum dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm. Xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan filtrat diukur kadar proteinnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Pengocokan Optimum

Pada penelitian ini ditentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase meliputi waktu pengocokan optimum dan konsentrasi xilanase optimum. Waktu pengocokan optimum adalah waktu yang diperlukan enzim untuk berinteraksi dengan matriks.

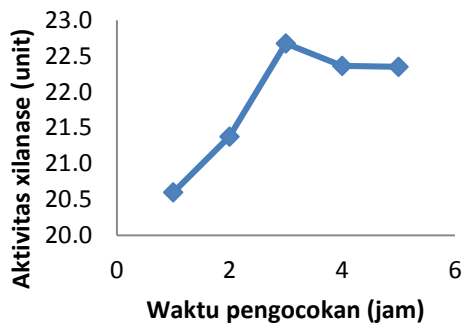
Pengocokan akan menyebabkan laju difusi xilanase menuju matriks akan semakin cepat, sehingga kesetimbangan adsorpsi cepat tercapai. Waktu pengocokan optimum ditentukan dengan cara mengukur banyaknya xilanase yang teradsorpsi pada matrik zeolit dan aktivitas xilanase amobil yang terbentuk pada variasi waktu pengocokan. Hasil yang diperoleh ditampilkan pada Gambar 1 dan 2



Gambar 1. Pengaruh waktu pengocokan terhadap jumlah xilanase teradsorpsi

Gambar 1. menunjukkan bahwa secara umum terjadi peningkatan jumlah xilanase teradsorpsi secara signifikan seiring bertambahnya waktu pengocokan sampai 3 jam dan setelah itu terjadi sedikit penurunan, ini menunjukkan bahwa interaksi antara xilanase dengan matrik zeolite memerlukan waktu dan pada 3 jam waktu pengocokan seluruh permukaan zeolite dipenuhi oleh xilanase. Penurunan tidak signifikan terjadi pada waktu pengocokan melebihi 3 jam, hal ini menunjukkan bahwa pada 3 jam waktu pengocokan sudah terjadi kesetimbangan adsorpsi, sehingga permukaan zeolite tidak mampu lagi mengadsorpsi xilanase dalam jumlah lebih banyak.

Waktu pengocokan optimum amobilisasi xilanase adalah waktu yang diperlukan agar xilanase amobil yang terbentuk mempunyai aktivitas maksimum. Oleh karena itu untuk menentukan waktu pengocokan optimum perlu juga diperhatikan aktivitas xilanase amobil yang terbentuk.

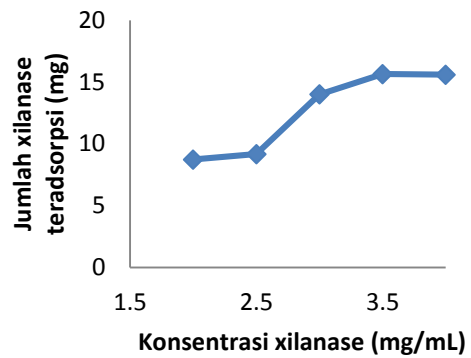


Gambar 2. Pengaruh waktu pengocokan terhadap aktivitas xilanase amobil

Dari Gambar 2. menunjukkan bahwa grafik aktivitas xilanase amobil pada variasi waktu pengocokan mempunyai profil sama dengan grafik jumlah xilanase teradsorpsi. Hal ini menunjukkan aktivitas xilanase amobil sebanding dengan jumlah xilanase amobil dan amobilisasi dengan metode adsorpsi memungkinkan xilanase amobil masih dapat bekerja dengan baik untuk mengkatalisis reaksi. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu pengocokan optimum amobilisasi xilanase terjadi pada 3 jam pengocokan dengan jumlah xilanase teradsorpsi sebanyak 73,70 mg/g zeolit dan aktivitas xilanase amobil 22,677 unit

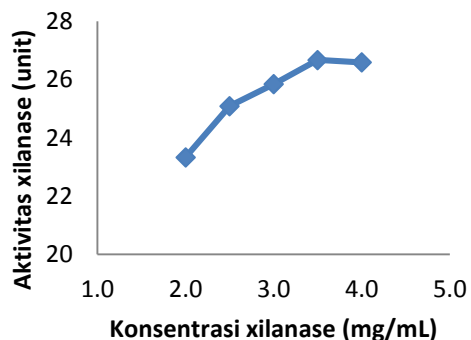
Penentuan konsentrasi xilanase optimum amobilisasi dilakukan dengan mengukur jumlah xilanase yang teradsorpsi pada matriks dan aktivitas xilanase amobil

yang terbentuk pada variasi konsentrasi xilanase dengan waktu pengocokan optimum yang telah diketahui. Data penelitian yang diperoleh ditampilkan pada Gambar 3 dan Gambar 4.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi xilanase terhadap jumlah xilanase teradsorpsi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada waktu pengocokan optimum peningkatan konsentrasi xilanase saat amobilisasi menyebabkan jumlah xilanase yang teradsorpsi pada matriks meningkat. Konsentrasi xilanase optimum adalah konsentrasi xilanase saat xilanase amobil yang dihasilkan mempunyai aktivitas maksimum.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi xilanase terhadap aktivitas xilanase amobil

Dari data diketahui bahwa jumlah xilanase yang teradsorpsi paling tinggi terjadi saat konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL. Pada matriks zeolite teraktivasi asam besarnya aktivitas xilanase amobil sebanding dengan jumlah xilanase yang teradsorpsi pada matrik. Hal ini menunjukkan bahwa kerja enzim tidak mengalami gangguan dan substrat mudah berinteraksi dengan sisi aktif enzim. Konsentrasi xilanase optimum dicapai pada saat aktivitas xilanase amobil maksimum. Dari Gambar 3 dan 4 diketahui bahwa konsentrasi xilanase optimum terjadi saat konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi 156,5 mg/mg zeolit dan aktivitas enzim amobil 26,67 unit.

KESIMPULAN

Waktu pengocokan dan konsentrasi xilanase berpengaruh terhadap jumlah xilanase yang teradsorpsi dan aktivitas xilanase amobil. Kondisi optimum amobilisasi xilanase pada matrik zeolite teraktivasi asam dicapai pada waktu pengocokan 3 jam dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi 156,5 mg/g zeolit dan aktivitas 26,67 unit.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Gaur, R., Tiwari, S., Rai, P. and Srivastava, V., 2015, Isolation, Production, and Characterization of Thermotolerant Xylanase from Solvent Tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15, International Journal of Polymer Science, Volume 2015.
- [2] Silva, L.A.O., Terrasan, C.R.F., Carmona, E.C., 2015, Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*, Electronic Journal of Biotechnology, 18, 307 - 313
- [3] Suklha, S. S., Dorris K. L., Suklha A., dan Margrave J. L., 2003, Adsorption of Chromium from Aqueous Solution by Maple Sawdust, *Journal Haz Mater.*, Vol. 12, hal. 1-3.
- [4] Cheetam, D., A., 1992, Solid State Compound, Oxford university press, 234-237.
- [5] Astarina, N., 2008, Zeolitisasi Mineral Kaolin dengan Metoda Peleburan, *Skripsi*, Universitas Brawijaya, Malang.
- [6] Isil, S. and N. Aksoz, 2005, Xylanase Production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources, Brazilian Journal of Biology and Technology 43(1) 37-40.
- [7] Huang, X., Ge, J., Fan, J., Chen, X., Xu, X., Li, J., Zhang, Y. And Zhou, D., 2013, Characterization and optimization of xylanase and endoglucanase production by *Trichoderma viride* HG 623 using response surface methodology (RSM), African Journal of Microbiology Research, Vol. 7(36), pp. 4521 - 4532