

OPTIMASI AMOBILISASI XILANASE DARI *Trichoderma viride* PADA MATRIKS PASIR LAUT TERLAPIS KITOSAN

Hayyunisa Thaati, Sutrisno* dan Anna Roosdiana

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: tris_mc@ub.ac.id

ABSTRAK

Xilanase bebas hanya bisa digunakan satu kali reaksi, sehingga perlu diamobilisasi agar bisa digunakan berulang. Xilanase yang telah diisolasi dari *Trichoderma viride* diendapkan dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejemuhan 40-80% dan dilanjutkan dengan dialisis. Xilanase diamobilisasi dengan metode adsorpsi fisik menggunakan matriks pasir laut terlapis kitosan. Penelitian ini bertujuan mengetahui waktu pengocokan dan konsentrasi xilanase optimum. Pada penelitian ini dilakukan variasi waktu pengocokan (1, 2, 3, 4, 5) jam dan konsentrasi enzim sebesar (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) mg/mL pada 0,1 g pasir pada temperatur ruang dengan konsentrasi larutan kitosan 1,5% dan larutan Na₅P₃O₁₀ 3%. Kadar protein enzim diuji secara spektrofotometri dengan reagen Biuret dan gula pereduksi dengan reagen DNS. Kadar protein xilanase bebas diperoleh sebesar 4,5 mg/mL dengan aktivitas sebesar 17,0 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi xilanase pada pasir laut terlapis kitosan dicapai pada waktu pengocokan 3 jam dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi 16,7 mg/g matriks dan aktivitas 34,5 unit.

Kata kunci: Aktivitas, amobilisasi, pasir laut terlapis kitosan, *Trichoderma viride*, xilanase

ABSTRACT

Free xylanase can be used only in one reaction, so that needs to be immobilized in order to be reused. Xylanase isolated from *Trichoderma viride* was precipitated by using ammonium sulphate at 40-80% saturation level, followed by dialysis. Xylanase was immobilized by physical adsorption on a matrix of chitosan-coated sea sand. This study aimed to determine the optimum shaking time and concentration of xylanase. In this research, the shaking time was (1, 2, 3, 4, 5) hours and variation of xylanase concentration was (0.5; 1.5; 2.5; 3.5; 4.5) mg/mL at 0.1 g of sand, at room temperature, within the matrix of 1.5% chitosan solution and 3% Na₅P₃O₁₀ solution. Protein content was tested spectrophotometrically by using Biuret reagent, while reduced sugar by DNS reagent. Initial protein content was 4.5 mg/mL and free enzyme activity was 17.0 units. The results showed that the optimum condition of xylanase immobilization on chitosan-coated sea sand was achieved on shaking time of 3 hours and xylanase concentration of 3.5 mg/mL yielding in 16.7 mg/g matrix adsorbed xylanase within activity of 34.3 units.

Key words: activity, chitosan-coated sea sand, immobilized, *Trichoderma viride*, xylanase

PENDAHULUAN

Xilanase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa [1]. Xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme yaitu bakteri, ragi dan jamur. Salah satu jamur yang menghasilkan xilanase yaitu *Trichoderma viride*.

Xilanase bersifat induktif, sehingga untuk memperoleh produk yang maksimal, dibutuhkan suatu induser sebagai pemicu produksi xilanase. Salah satu induser yang dapat digunakan yaitu klobot jagung [2].

Pada umumnya, masyarakat menggunakan xilanase dalam bentuk enzim bebas, padahal enzim bebas hanya bisa digunakan satu kali reaksi dan mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan, sehingga sulit dilakukan teknik perolehan kembali. Stabilitas enzim dapat ditingkatkan menggunakan teknik amobilisasi [3]. Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan melekatkan enzim pada penyangga padat. Kelebihan enzim mobil jika dibandingkan enzim bebas yaitu dapat digunakan berulang-ulang, enzim lebih stabil [4], lebih tahan terhadap serangan protease, dan lebih mudah dipisahkan dari campuran untuk selanjutnya dipakai lagi [5].

Salah satu metode amobilisasi yang sederhana yaitu metode adsorpsi dengan menggunakan permukaan padat atau menempelkan enzim pada permukaan adsorben. Padatan yang biasa digunakan sebagai matriks pengadsorp adalah zeolit, alumina, dan silika [6]. Silika dapat diperoleh dari pasir laut dengan kandungan 60-98% [7]. Salah satu kekurangan dari metode adsorpsi yaitu kekuatan ikatannya lemah sehingga enzim yang teradsorpsi pada matriks mudah lepas [8], oleh karena itu matriks pasir laut perlu dilapisi kitosan yang kemudian diikatkan silang dengan reagen tripolifosfat [9].

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase dari *T. viride* menggunakan matriks pasir laut terlapis kitosan yang meliputi waktu pengocokan dan konsentrasi xilanase optimum.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah *T. viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya dan pasir laut yang diperoleh dari Pantai Tanjung Aan, Lombok. 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 ($BJ=1,05 \text{ g/cm}^3$), CH_3COONa , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HCl , BaCl_2 , $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, glukosa anhidrat, Na_2SO_3 , kristalin fenol, asam dinitrosalisilat, NaOH , kitosan, dan natrium tripolifosfat.

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.

Produksi xilanase

T. viride yang ditumbuhkan dalam media padat 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 yang mengandung *T. viride* ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar 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 pada 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.

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.

Penentuan aktivitas xilanase

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 mengeplotkan 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.

Amobilisasi xilanase dengan pasir laut terlapis kitosan

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 pasir laut 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. Padatan yang tersaring dimasukkan ke dalam 2,5 mL larutan kitosan 1,5% selama 15 menit, lalu dimasukkan ke dalam 5 mL larutan natrium tripolifosfat 3% selama 90 menit. Xilanase amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan. Xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan filtrat diukur kadar proteinnya.

Penentuan konsentrasi xilanase optimum

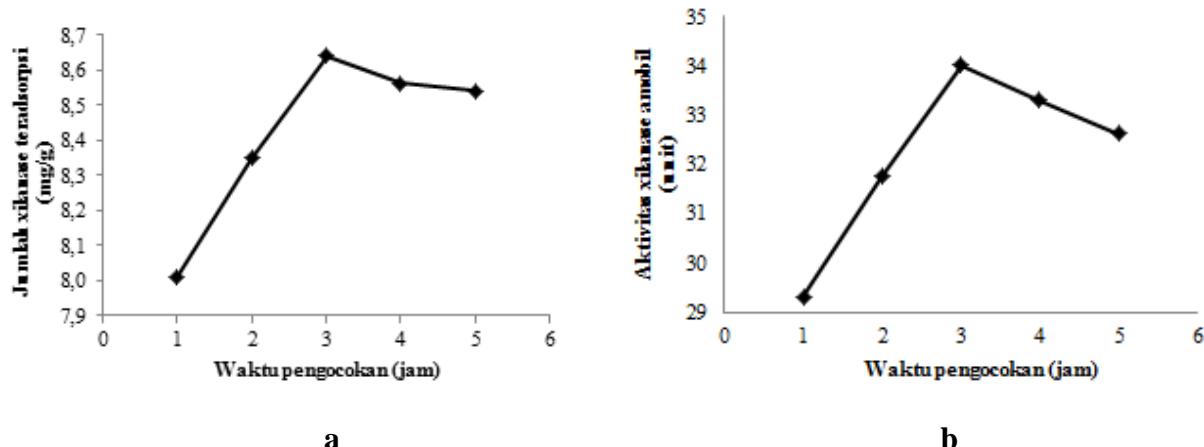
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi lama pengocokan. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang digunakan yaitu (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; dan 4,5) mg/mL. Campuran diinkubasi selama waktu pengocokan optimum dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm. Xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan filtrat diukur kadar proteinnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan waktu pengocokan optimum

Pada penelitian ini xilanase diamobilkan pada berbagai waktu pengocokan. Teknik amobilisasi dilakukan dengan metode adsorpsi pada pasir laut yang dilapisi dengan kitosan. Interaksi yang terjadi antara xilanase dengan pasir laut yaitu ikatan hidrogen akibat adanya kontak antara atom oksigen pada pasir (Si-O-Si) dengan atom H dari gugus amino pada rantai samping residu asam amino penyusun xilanase (-NH₂) maupun dengan atom H pada (-COOH) residu asam amino. Xilanase teradsorpsi selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan kitosan sehingga menjadi terlapis oleh kitosan. Campuran tersebut kemudian diteteskan pada

larutan natrium tripolifosfat sehingga terbentuk ikatan silang antara kitosan dengan natrium tripolifosfat dan enzim tidak mudah lepas. Ikatan silang ini terbentuk karena adanya reaksi antara muatan positif pada kitosan (-NH_3^+) dengan muatan negatif pada natrium tripolifosfat ($\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$). Banyaknya ikatan silang yang terbentuk akan mencegah enzim yang teradsorpsi tidak mudah lepas dari matriks sehingga mempengaruhi kemampuan sisi aktif xilanase untuk bergerak bebas dan berikatan dengan substrat.



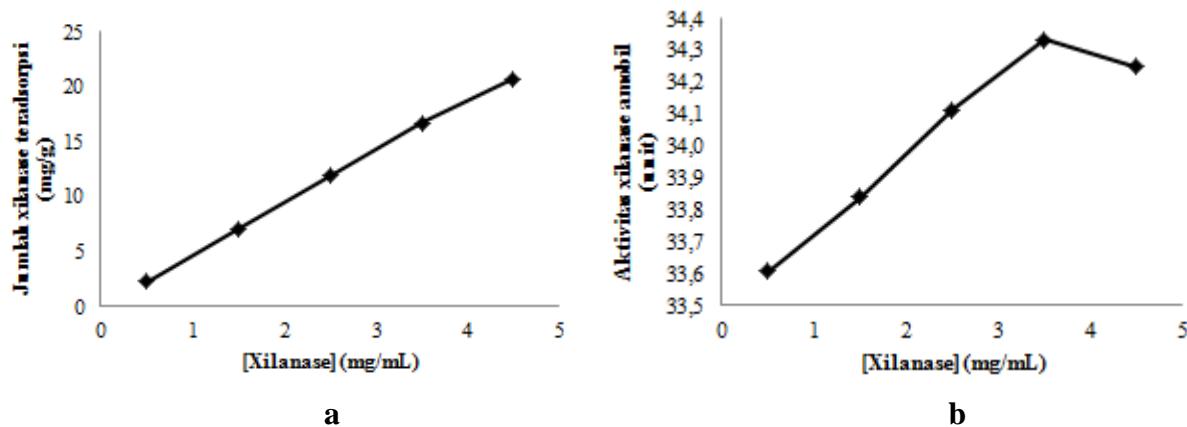
Gambar 1. Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap (a) jumlah xilanase teradsorpsi (b) aktivitas xilanase amobil

Peningkatan xilanase teradsorpsi secara signifikan terjadi seiring bertambahnya waktu pengocokan 1-3 jam (Gambar 1a). Hal ini dikarenakan interaksi antara xilanase dengan pasir laut semakin tinggi. Penurunan tidak signifikan terjadi pada waktu pengocokan 4 jam.

Hasil reaksi enzimatis hidrolisis xilan oleh xilanase yaitu xirosa. Xirosa diukur dengan reagen DNS, sehingga dihasilkan asam xilonat dan asam 3-amino,5-nitrosalisilat yang mempunyai serapan maksimum pada λ 495 nm. Mol xirosa yang dihasilkan sebanding dengan mol asam 3-amino,5-nitrosalisilat sehingga kadar xirosa dapat ditentukan. Aktivitas xilanase dapat ditentukan dengan menghitung jumlah xirosa yang dihasilkan selama reaksi enzimatis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada saat jumlah xilanase yang teradsorpsi maksimum menghasilkan aktivitas xilanase amobil maksimum (Gambar 1b), hal ini dikarenakan semakin banyak xilanase yang berinteraksi dengan substrat sehingga menghasilkan aktivitas yang tinggi. Waktu pengocokan optimum terjadi pada waktu pengocokan 3 jam, karena telah terjadi kesetimbangan dengan menghasilkan jumlah xilanase teradsorpsi sebanyak 8,6 mg/g matriks dan aktivitas 34,0 unit.

Penentuan konsentrasi xilanase optimum

Xilanase diamobilkan pada variasi konsentrasi xilanase dengan waktu pengocokan optimum yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya, yaitu 3 jam. Peningkatan konsentrasi xilanase pada waktu pengocokan optimum akan meningkatkan jumlah xilanase teradsorpsi (Gambar 2a). Pada konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL jumlah xilanase yang teradsorpsi sebesar 20,7 mg/g matriks.



Gambar 2. Grafik hubungan antara konsentrasi xilanase terhadap (a) jumlah xilanase teradsorpsi (b) aktivitas xilanase amobil

Peningkatan jumlah xilanase teradsorpsi ini tidak selalu diiringi dengan peningkatan nilai aktivitas xilanase amobil. Nilai aktivitas xilanase meningkat secara signifikan hingga konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL, sedangkan pada konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL nilai aktivitasnya mengalami penurunan (Gambar 2b). Penurunan aktivitas pada konsentrasi 4,5 mg/mL ini disebabkan oleh jumlah xilanase yang teradsorpsi terlalu banyak, sehingga sisi aktif xilanase dan substrat tidak dapat bergerak bebas, akibatnya substrat susah berikatan dengan sisi aktif xilanase. Konsentrasi xilanase optimum berada pada saat aktivitas xilanase amobil maksimum. Pada variasi konsentrasi xilanase, kondisi optimum berada pada konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan nilai aktivitas xilanase amobil 34,3 unit.

KESIMPULAN

Waktu pengocokan dan konsentrasi xilanase berpengaruh terhadap jumlah xilanase yang teradsorpsi dan aktivitas xilanase. Kondisi optimum amobilisasi xilanase pada pasir laut terlapis kitosan dicapai pada waktu pengocokan 3 jam dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi 16,7 mg/g matriks dan aktivitas 34,5 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Richana, N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, *Buletin AgroBio*, 5, pp. 29-36.
2. Mulyani, N.S., Asy'ari, M., dan Prasetyoningsih, H., 2009, Penentuan Konsentrasi Optimum *Oat Spelt Xylan* pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus niger* dalam Media PDB (*Potato Dextrose Broth*), *J. Kim. Sains & Apl.*, 12, pp. 1-9.
3. Minovska, V., Winkelhausen, E., dan Kuzmanova, S., 2005, Lipase Immobilized by Different Terchiques in Various Support Material Applied in Oil Hydrolisis, *J. Serb. Chem. Soc.*, 70, pp. 609–624.
4. Haryati, T., Marbun P.A., dan Purwadaria T., 2010, Preservasi Xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation, *JTTV*, 15, pp. 63-71.
5. Masyithah, Zuhrina, 2005, Pemodelan Numerik Reaksi Enzimatik Imobilisasi, *J. Tek. Proses*, 4, pp. 18-25.
6. 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*, 12, pp. 1-3.
7. Lesbani, A., 2011, Studi Interaksi Vanadium dan Nikel dengan Pasir Kuarsa, *J. Penelitian Sains*, 14, pp. 43-46.
8. Sadikin, M., 2002, Biokimia Enzim, Widya Medika, Jakarta.
9. Sutrisno, Roosdiana, A., Prasetyawan, S., dan Safitri, A., 2011, Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanase Termoalkalofilik dari *Bacillus sp.*, Laporan Penelitian, UB, Malang.