

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

Dihan Laziba, Sutrisno*, Suratmo

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

Amobilisasi xilanase dengan metode adsorpsi fisik pada matriks pasir laut dilakukan agar stabilitas enzim meningkat dan dapat digunakan kembali. Xilanase diisolasi dari *Trichoderma viride*, dimurnikan dengan metode pengendapan menggunakan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 40-80%. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu pengocokan dan konsentrasi xilanase optimum amobilisasi. Variasi waktu pengocokan yang digunakan yaitu (1, 2, 3, 4, 5) jam dan variasi konsentrasi xilanase (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) mg/mL pada 0,1 g pasir pada temperatur ruang. Kadar enzim xilanase yang digunakan untuk amobilisasi sebesar 4,517 mg/mL dengan aktivitas 17,029 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi xilanase dicapai pada saat waktu pengocokan 2 jam dan konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi 205,120 mg/g dan aktivitas xilanase amobil sebesar 135,886 unit.

Katakunci: aktivitas, konsentrasi xilanase, pasir laut, *Trichoderma viride*, waktu pengocokan.

ABSTRACT

Immobilization of xylanase with physical adsorption method on sea sand matrix is carried out to increase stabilization of enzyme and can be reused. Xylanase is isolated from *Trichoderma viride*, purified by precipitation method by using ammonium sulfate with saturated level of 40-80%. This research is to know the shaking time and optimum concentration of xylanase. Variance of shaking time is (1,2,3,4,5) hour and variance concentrate of xylanase (0.5; 1.5; 2.5; 3.5; 4.5) mg/mL on 0.1 g of sand at room temperature. Content of xylanase enzyme used for immobilization is 4.517 mg/ml with activity was 17.029 units. The results of the research showed that the optimum condition of immobilization xylanase is achieved when shaking time is 2 hours and concentrate of xylanase is 4.5 mg/mL within absorbed xylanase is 205.120 mg/g and activity of immobilized xylanase is 135.886 units.

Keywords: activities, concentration of xylanase, sea sand, shaking time, *Trichoderma viride*.

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa (gula pereduksi) [1]. Xilanase dapat dihasilkan dari beberapa organisme seperti bakteri, protozoa, alga, aktinomisetes, ragi, jamur, gastropoda dan artropoda [2]. Salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan xilanase adalah *Trichoderma viride* [3]. Kapang jenis ini dapat berkembang biak pada kondisi pH asam (2,1 - 2,5) dan dapat tumbuh maksimum pada temperatur 50-60⁰C [4].

Teknik amobilisasi diperlukan agar enzim dapat digunakan secara berulang [5]. Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan metode adsorpsi. Metode ini menggunakan bahan penyangga yang berupa padatan untuk menyerap enzim di permukaannya. Enzim yang telah diamobilisasi memiliki stabilitas dan aktivitas yang tinggi [6].

Silika (SiO_2) merupakan mineral yang tersebar secara luas di alam, dimana banyak ditemukan dalam bentuk pasir [7]. Pasir laut memiliki kandungan silika lebih dari 50% sehingga dapat digunakan sebagai adsorben alami karena memiliki ukuran pori yang besar [8]. Silika mempunyai luas permukaan yang besar yang dapat digunakan sebagai media pengadsorpsi [9]. Untuk meningkatkan kualitas penyerapan pasir laut, maka perlu dilakukan proses aktivasi yang dapat dilaksanakan baik secara fisik maupun kimia. Aktivasi secara fisik dapat dilakukan melalui proses pemanasan sedangkan secara kimia dapat dilakukan dengan penambahan HCl.

Aktivitas dan jumlah enzim yang teradsorpsi dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan waktu pengocokan saat amobilisasi, semakin besar konsentrasi enzim dan semakin lama waktu pengocokan saat amobilisasi maka akan meningkatkan jumlah enzim yang teradsorpsi sehingga aktivitas enzim juga akan meningkat [10].

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni *Trichoderma viride* yang diperoleh di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya, klobot jagung yang diperoleh di Pasar Blimbing Malang, dan pasir laut sebagai matriks amobilisasi enzim yang diperoleh dari Pantai Tanjung Aan Lombok. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah bahan yang memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a.) antara lain dekstrosa, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa anhidrat, HCl, padatan BaCl_2 , DNS (asam dinitrosalisilat), padatan NaOH, kristalin fenol, KMnO_4 dan sodium sulfit. Bahan-bahan *for microbiology* antara lain kentang, pepton, asam oleat, kasein (Merck), tepung agar, xilan, tepung klobot jagung, dan akuades.

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, inkubator (Heraus tipe B 50 Memmert), autoklav (Tipe LS-C35L), jarum ose, mortar, cawan porselen, tanur (Nabertherm), sentrifuse dingin (Denley), shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), oven (Mempert), neraca analitik (Mettler

Todelo AL 204), lemari pendingin, *spectronic* genesys 20, kuvet, kantong selofan, alumunium foil, kertas *Whatman* no. 40, kapas steril, pH universal, corong vakum buchner dan penangas air (Mommert W 200), ayakan 120 dan 150 mesh.

Prosedur

Preparasi Xilanase

Inokulum yang mengandung *Trichoderma viride* ditumbuhkan dalam 13 mL media cair dan diinkubasi dengan kecepatan putar 125 rpm pada temperatur ruang selama 36 jam. Inokulum diambil sebanyak 15 mL dimasukkan ke dalam 250 mL media pertumbuhan kemudian diinkubasi dengan shaker pada kecepatan 150 rpm selama 60 jam pada temperatur ruang, kemudian media hasil fermentasi ditambah dengan 15 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada temperatur 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar dimurnikan dengan metode pengendapan menggunakan amonium sulfat pada fraksi 40-80%, kemudian didialisis menggunakan kantong selofan. Xilanase hasil pemurnian diuji kadar enzim dan aktivitasnya.

Uji Kadar Enzim

Kadar enzim ditentukan secara spektrofotometri dengan menggunakan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL enzim fraksi 40-80% ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, lalu diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein (550 nm). Kadar enzim diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein yang telah dibuat.

Uji Aktivitas Xilanase

Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara mengukur jumlah gula pereduksi yang terbentuk selama reaksi enzimatik. Disiapkan sebuah tabung reaksi yang telah berisi 1 mL substrat xilan 1%, kemudian diinkubasi dalam penangas air 60°C selama 15 menit. Kedalamnya ditambahkan 1 mL xilanase, 5 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor dan diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit, didinginkan dengan air mengalir. Setelah dingin ditambahkan 2 mL reagen DNS, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit, setelah itu didinginkan dengan air mengalir. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, kemudian diukur absorbansinya pada panjang

gelombang 540 nm dengan spektrometri UV-Vis. Absorbansi yang terukur diplotkan ke dalam persamaan regresi kurva baku gula pereduksi.

Satu unit aktivitas enzim (U) diartikan sebagai 1 μ gram dari xilosa yang dihasilkan tiap menitnya per mL enzim, sedangkan untuk aktivitas xilanase amobil volume enzim (mL) diganti dengan berat (gram) enzim amobil.

Amobilisasi Xilanase dengan Matriks Pasir Laut

Preparasi Matriks sebagai Media Amobilisasi

Pasir ditumbuk halus dan diayak dengan ayakan 120 mesh. Pasir yang lolos diayak kembali dengan ayakan 150 mesh, pasir yang tertahan dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan dalam oven pada temperatur 105°C. Pasir yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 10 g, direndam dalam 200 mL larutan HCl 0,4 M dan dikocok selama empat jam pada temperatur ruang dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Pasir hasil perendaman disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 dan dicuci dengan akuades hingga pH filtrat netral. Pasir dikeringkan pada temperatur 105°C hingga berat konstan. Pasir laut hasil aktivasi kemudian dikalsinasi pada temperatur 500°C selama empat jam.

Penentuan Waktu Pengocokan Optimum Amobilisasi Xilanase

Xilanase hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL, ditambah buffer asetat 0,2 M pH 5 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g pasir yang telah diaktivasi. Masing-masing campuran diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang selama 1, 2, 3, 4, dan 5 jam, kemudian disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 sehingga terpisah antara filtrat dengan xilanase amobil. Filtrat diuji kadar enzimnya dan xilanase amobil diuji aktivitasnya.

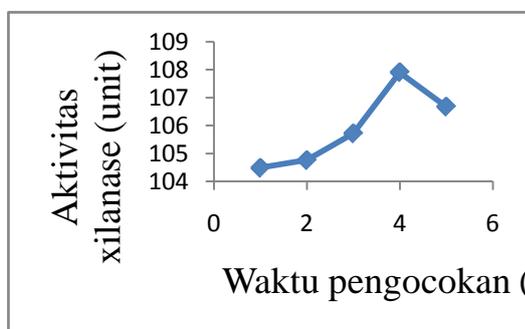
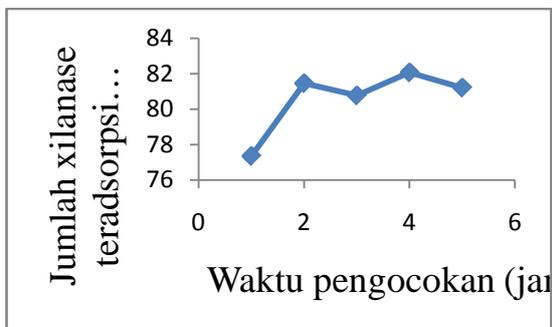
Penentuan Konsentrasi Xilanase Optimum

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi xilanase dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi waktu pengocokan. Perbedaannya ada pada volume xilanase yang digunakan yaitu 0,55; 1,66; 2,77; 3,87 dan 4,98 mL, selanjutnya campuran diinkubasi selama waktu pengocokan optimum dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm, kemudian disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 sehingga terpisah antara filtrat dengan xilanase amobil. Filtrat diuji kadar enzimnya dan xilanase amobil diuji aktivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Pengocokan Optimum

Waktu pengocokan optimum amobilisasi xilanase ditentukan dengan cara menghitung jumlah xilanase yang teradsorpsi dalam pasir laut dan aktivitas xilanase pada variasi waktu pengocokan (1, 2, 3, 4 dan 5) jam sehingga dapat diketahui waktu yang dibutuhkan enzim untuk berinteraksi dengan matriks pasir laut selama proses amobilisasi. Pengocokan dapat menyebabkan laju difusi xilanase menuju pasir akan semakin cepat sehingga akan semakin cepat pula kesetimbangan adsorpsi tercapai. Untuk meningkatkan kualitas penyerapan pada pasir maka terlebih dahulu perlu dilakukan proses aktivasi dengan menambahkan HCl akan melarutkan pengotor seperti oksida Al, oksida Fe dan oksida Ti [13] sehingga permukaan pasir akan semakin luas dan daya adsorpsinya semakin besar.



(a)

(b)

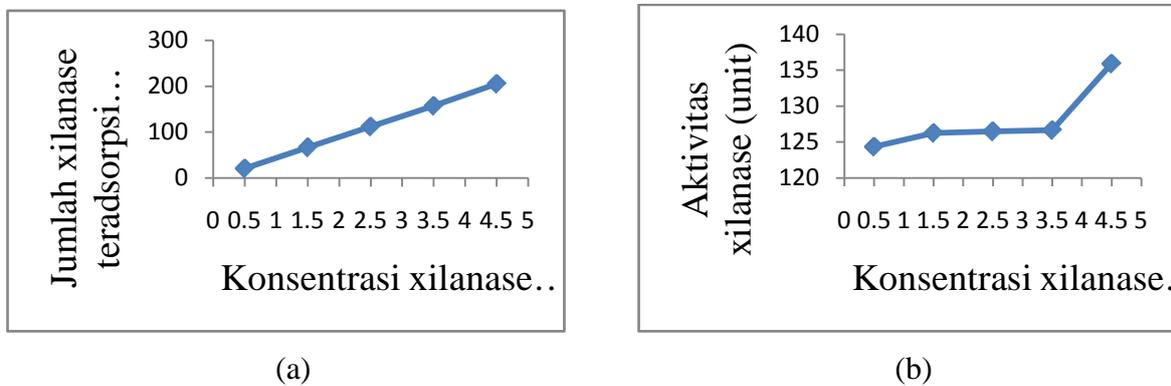
Gambar 1. (a) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap jumlah xilanase teradsorpsi (b) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap aktivitas xilanase amobil

Jumlah xilanase yang teradsorpsi oleh matriks pasir laut mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan waktu pengocokan 1 hingga 2 jam (Gambar 1a). Semakin lama waktu pengocokan maka aktivitas xilanase amobil juga akan semakin meningkat (Gambar 1b). Hal ini dimungkinkan karena semakin banyak jumlah xilanase yang teradsorpsi oleh pasir laut maka akan meningkatkan aktivitas xilanase amobil.

Waktu pengocokan optimum terjadi pada waktu pengocokan 2 jam dengan menghasilkan jumlah xilanase teradsorpsi sebesar 81,450 mg/g dan aktivitas maksimum diperoleh pada waktu pengocokan 4 jam dengan aktivitas 107,903 unit.

Penentuan Konsentrasi Xilanase Optimum

Konsentrasi xilanase dapat mempengaruhi jumlah xilanase teradsorpsi dalam matriks pasir laut, dimana semakin besar konsentrasi xilanase maka jumlah xilanase teradsorpsi yang dihasilkan juga semakin banyak. Penentuan konsentrasi xilanase optimum ditentukan dengan cara menghitung jumlah dan aktivitas xilanase yang teradsorpsi dalam pasir laut dengan variasi konsentrasi (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) mg/mL, massa matriks pasir laut (0,1 g) dan waktu pengocokan selama 2 jam yang diperoleh dari waktu pengocokan optimum dan temperatur ruang.



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

Peningkatan jumlah xilanase teradsorpsi terjadi pada konsentrasi xilanase 0,5 hingga 4,5 mg/mL (Gambar 2a), hal ini dapat terjadi dimungkinkan karena laju difusi xilanase ke permukaan pasir tinggi dan akan menyebabkan meningkatnya jumlah xilanase yang teradsorpsi sehingga aktivitas xilanase amobil juga akan meningkat (Gambar 2b). Pada kisaran konsentrasi 0,5 hingga 4,5 mg/mL, konsentrasi optimum terjadi pada 4,5 mg/mL. Konsentrasi optimum ini menghasilkan jumlah xilanase yang teradsorpsi sebanyak 205,120 mg/g dan aktivitas xilanase amobil sebesar 135,886 unit.

KESIMPULAN

Waktu pengocokan dan konsentrasi enzim berpengaruh terhadap jumlah xilanase yang teradsorpsi dan aktivitas xilanase amobil. Kondisi optimum amobilisasi xilanase pada matriks

pasir laut dicapai pada saat waktu pengocokan dua jam dan konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL dengan jumlah xilanase teradsorpsi dalam pasir laut sebesar 205,120 mg/g dan aktivitas xilanase amobil sebesar 135,886 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Haryati, T., P. A. Marbun, dan T. Purwadaria, 2010, *Preservasi Xilanase Bacillus pumilus PU4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation*, JTTV, 15, pp. 63-71.
2. Septiningrum, K., dan Moeis, M.R., 2008, *Isolasi Dan Karakterisasi Xilanase dari Bacillus circulans*, SITH ITB, Bandung.
3. Wahyudi, P., U. Suwahyono, dan S. Mulyati, 2010, *Pertumbuhan Trichoderma Harzianum pada Medium yang Mengandung Xilan*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, Universitas Negeri Jakarta*, p. 1-7.
4. Waksman, S. A., 1961, *Soil Microbiology*, John Willey and Sons, London, pp. 48.
5. Gusmawati, N.F., 2008, *Amobilisasi Xilanase Ekstraseluler dari Streptomyces Sp 45I-3*, [http:// repository.ipb.ac.id](http://repository.ipb.ac.id), diakses tanggal 4 Maret 2013.
6. Bayramol, G., Akgol S., Bulut A., Denizli A., dan Yakup A. M., 2003, *Covalent Immobilization of Invertase Into a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate*, *Journal Biochemical Engineering*, 14, pp. 117-126.
7. Anwar, K. P., 1985, *Prospek Pemakaian Zeolit bayah sebagai Penyerap NH₄⁺ dalam Limbah*, Laporan Teknik Pengembangan No. 69 Dirjen Pertambangan Umum PPTM, Bandung.
8. Hadi, S., 2011, *Sintesis Silika Berbasis Pasir Alam Bancar menggunakan Metode Kopersipitasi*, Tesis, ITS, Surabaya.
9. Hatiaman, E, K., 2002, *Studi Pengaruh Jenis Fosfat Terhadap Fosfatasi Zeolit Alam Turen*, Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Brawijaya, Malang.

10. Agustiawan H., 2010, *Amobilisasi Lipase dari Mucor Miehei menggunakan Matriks Oxidized Polypropilene (OPP)*, Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Brawijaya, Malang.