

PENGARUH ION LOGAM Fe^{3+} TERHADAP AKTIVITAS XYLANASE HASIL DARI ISOLASI *Trichoderma viride* DENGAN METODA FERMENTASI SEMI PADAT

Alfi Salamah, Anna Roosdiana* dan Sutrisno

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: aroos@ub.ac.id

ABSTRAK

Xylanase merupakan enzim ekstraseluler yang berfungsi untuk menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xylanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* dengan media yang mengandung serbuk kulit pisang sebagai inducer pada fermentasi semi padat. Ekstrak kasar xylanase dimurnikan melalui pengendapan dengan tingkat kejenuhan 40-80 % dan dilanjutkan dengan dialisis. Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xylanase dengan variasi konsentrasi (25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mM). Aktivitas xylanase ditentukan dengan mengukur gula pereduksi (xilosa) secara spektrofotometri dengan reagen dinitrosalisilat (DNS), sedangkan kadar protein dengan reagen Biuret. Hasil dari penelitian ini menunjukkan aktivitas xylanase kasar $1,229 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan setelah pengendapan sebesar $1,600 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$. Penambahan ion Fe^{3+} dapat menurunkan aktivitas xylanase dan ion Fe^{3+} berperan sebagai inhibitor un-competitive. Parameter kinetika dari xylanase diperoleh nilai V_m $1,072 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$, K_M 1,23 % dan K_I 119,05 mM.

Kata kunci: Aktivitas xylanase, ion logam Fe^{3+} , *Trichoderma viride*.

ABSTRACT

Xylanase is extracellular enzyme for hydrolysis xylan to xylose. The objective of the research is to identify the effect of Fe^{3+} ion to activity of xylanase isolated from *Trichoderma viride* by using media contained banana peel powder as inducer on semi solid fermentation. Crude extract of xylanase was purified by precipitation using 40-80 % and continuation with dialysis. The effect of adding Fe^{3+} ion to xylanase activity was carried out on various Fe^{3+} concentration (25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mM). Activity of xylanase was determined by measuring reducing glucose reacted with dinitrosalicylic acid (DNS) spectrophotometry, where as protein concentration was determined by using Biuret reagent. The result showed that activity of crude xylanase was $1.229 \mu\text{g. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ while the purified xylanase $1.600 \mu\text{g. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. The addition of Fe^{3+} ion can decrease xylanase activity and Fe^{3+} ion acted as un-competitive inhibitor. Kinetic parameter of xylanase V_m $1.072 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, K_M 1.23 % and K_I 119.05 mM.

Key words: Fe^{3+} ion, *Trichoderma viride*, xylanase activity.

PENDAHULUAN

Xylanase merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis xilan (hemisulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Enzim xylanase dapat dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan mikroorganisme [1]. Salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim xylanase adalah kapang *Trichoderma viride*. Enzim ini dapat bertahan pada temperatur

yang tinggi dan memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada enzim yang dihasilkan dari bakteri [2].

Penggunaan enzim memiliki kekurangan karena kestabilan enzim mudah terdenaturasi yang dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah adanya ion logam. Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} berfungsi sebagai aktivator terhadap suatu enzim serta dapat menjadi inhibitor terhadap enzim lain. Hal ini ditunjukkan oleh ion Fe^{3+} yang bertindak sebagai aktivator pada enzim hasil dari bakteri *Bacillus pumilus*, tetapi pada enzim β -mananase dari kapang *Eupenicillium javanicum* BS4 berfungsi sebagai inhibitor. Ion Fe^{3+} dapat menstabilkan enzim β -mananase pada konsentrasi ion Fe^{3+} 0,5 mM [3]. Untuk mengetahui pengaruh dari adanya penambahan ion Fe^{3+} maka perlu diketahui kinetika enzim. Parameter kinetika enzim yang digunakan adalah nilai K_M , V_m dan K_I [4]. Berdasarkan uraian di atas bahwa enzim dipengaruhi oleh adanya ion logam maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis xilan menjadi xilosa.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology*. Bahan-bahan pro analisis antara lain asam asetat glasial, natrium asetat, natrium hidroksida, asam klorida, barium klorida, glukosa anhidrat, natrium kalium tartrat, fenol, natrium sulfit, asam dinitrosalisilat, tembaga sulfat hidrat, besi (III) klorida, pepton, asam oleat, kalium fosfat, kalsium klorida, amonium sulfat, magnesium sulfat hidrat, media basal, dan xilan. Bahan-bahan *for microbiology* antara lain, dextrosa, *bacto agar*, kentang, dan aquades steril.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, magnetic stirrer, pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), kuvet, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 160A double beam), oven (Memmert), *autoklav* (All American Model 20X), *shaker* (Edmund Buhler SM 25 24B), *sentrifuse* dingin (Juan MR 1889), aluminium foil, kapas steril, ayakan 40 mesh, spiritus dan pemanas listrik (Janke-Kunkel).

Produksi xilanase

Trichoderma viride yang telah ditumbuhkan dalam media padat miring disuspensikan ke dalam 2 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi ditanam pada 13 mL media cair steril. Setelah itu, diinkubasi dengan cara dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan putar 150 rpm dan temperatur ruang selama 36 jam. Produksi enzim dilakukan dengan cara inokulum *Trichoderma viride* ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar dengan kecepatan 150 rpm hingga jam ke-60. Kemudian, 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 membran semi permeabel (selofan). Ekstrak kasar dan enzim xilanase hasil pemurnian diuji kadar protein dan aktivitasnya.

Uji kadar protein

Larutan enzim kasar dan enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu, 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 540 nm. Kadar protein dihitung dengan memplotkan nilai serapan pada persamaan regresi kurva baku kasein yang telah dibuat.

Uji aktivitas xilanase

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 2 mL dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi pada temperatur 60°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 mL enzim kasar pada tabung 1 dan 1 mL enzim hasil pemurnian pada tabung 2, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 55 menit, selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS dipanaskan pada 100°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan air mengalir. Larutan yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 490 nm. Aktivitas enzim dapat dihitung dengan mengukur kadar gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi. Nilai serapan yang diperoleh diplotkan ke dalam persamaan regresi kurva baku gula pereduksi yang telah dibuat.

Uji aktivitas enzim xilanase dengan penambahan ion Fe^{3+}

Tabung reaksi disiapkan sebanyak 8 buah, masing-masing diisi substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 2 mL. Kemudian dipanaskan pada temperatur 60 °C selama 15 menit. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL ekstrak murni xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL aquades dan 1 mL larutan Fe^{3+} 25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mM, dan diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Kemudian, masing-masing tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air mengalir hingga mencapai temperatur kamar. Diukur kadar gula pereduksi secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS dan panjang gelombang 490 nm.

Penentuan nilai kinetika enzim xilanase

Nilai V_m dan K_M ditentukan melalui uji aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Fe^{3+} dan uji aktivitas dengan penambahan ion Fe^{3+} . Untuk uji aktivitas xilanase tanpa penambahan Fe^{3+} , substrat xilan dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0, dan 2,5 % (b/v) dipipet 1 mL ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit kemudian didinginkan. Ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi tersebut. Kemudian diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL reagen DNS. Kemudian, masing-masing tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga mencapai temperatur kamar dan iukur kadar gula pereduksi secara spektrofotometri pada panjang gelombang 490 nm. Prosedur diatas juga digunakan untuk uji aktivitas xilanase dengan penambahan ion Fe^{3+} 25 mM. Ion Fe^{3+} yang ditambahkan sebanyak 1 mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Xilanase dari *Trichoderma viride*

Isolasi xilanase dari *Trichoderma viride* dilakukan dengan waktu fermentasi pada fase akhir logaritma yang merupakan fase awal stasioner kapang. Xilanase diisolasi dengan cara disentrifugasi untuk memisahkan ekstrak kasar dari endapan. Penambahan buffer asetat pH 5 pada proses isolasi enzim berfungsi untuk mempertahankan kestabilan dari enzim xilanase dan pH larutan. Enzim xilanase memiliki pH titik isoelektrik pada 9,3 sehingga menyebabkan protein-protein xilanase dapat larut dalam pH 5 [5]. Ekstrak kasar yang dihasilkan berwarna coklat pekat sebanyak 100 mL. Ekstrak kasar merupakan enzim yang masih mengandung

protein-protein non enzim dan mempunyai aktivitas spesifik yang rendah. Oleh karena itu, ekstrak kasar xilanase perlu dilakukan pemurnian. Sebelum dilakukannya pemurnian ekstrak kasar xilanase diuji aktivitasnya dan kadar proteinnya.

Pemurnian ekstrak kasar dilakukan dengan cara pemisahan fraksinasi yang menggunakan prinsip *salting out* dilanjutkan dialysis. Garam yang digunakan adalah amonium sulfat. Endapan dari fraksinasi 40-80 % dimurnikan dengan metoda dialisis menggunakan membran selofan sebagai membran semipermeabel. Fungsi dari dialisis adalah untuk memisahkan enzim dari garamnya yaitu amonium sulfat. Pada dialisis enzim ini digunakan konsentrasi buffer asetat 0,2 M pH 5 untuk menstabilkan enzim dan konsentrasi buffer asetat 0,1 M pH 5 di luar membran selofan. Pada saat proses dialisis ini temperatur diatur pada 4 °C untuk mencegah terjadinya denaturasi protein yang diakibatkan peningkatan temperatur. Hasil dari pemurnian diperoleh xilanase sebanyak 13 mL, kemudian xilanase diuji aktivitas dan kadar protein. Nilai aktivitas dan kadar protein dari enzim xilanase ditampilkan pada Tabel 1.

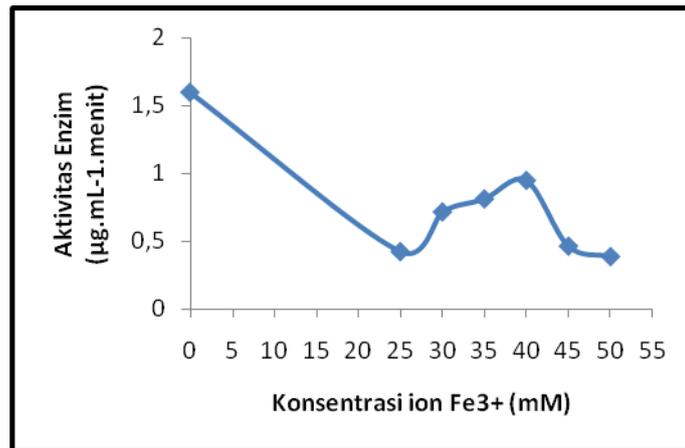
Tabel 1: Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Xilanase

Fraksi Enzim	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik Enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
Enzim kasar	1,229	1,45	0,85
Fraksi 40-80%	1,600	0,225	7,1

Berdasarkan Tabel 1, xilanase hasil pemurnian merupakan enzim yang memiliki tingkat kemurnian tinggi karena aktivitas spesifik yang dihasilkan lebih tinggi dari ekstrak kasar. Kadar protein kecil yang dihasilkan enzim hasil pemurnian dikarenakan protein-protein non enzim sudah tidak ada pada fraksi selain 40-80 %. Aktivitas dari enzim hasil pemurnian memiliki 8 kali dari enzim kasar xilanase.

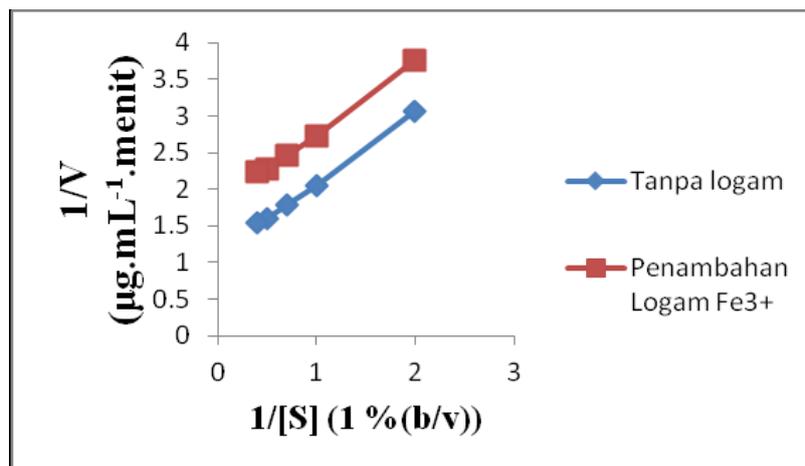
Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas enzim xilanase

Pada penentuan aktivitas xilanase dengan penambahan ion Fe^{3+} dengan variasi 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 mM dapat ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1 bahwa semua sampel yang mengandung ion Fe^{3+} memberikan penurunan pada aktivitas xilanase sehingga Ion Fe^{3+} berperan sebagai inhibitor. Pada penelitian sebelumnya penambahan ion Fe^{3+} pada konsentrasi 25 dan 35 mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase [6]. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan substrat saat produksi xilanase yaitu klobot jagung sehingga xilanase memiliki aktivitas tinggi.



Gambar 1: Kurva aktivitas enzim fraksi 40-80 % terhadap variasi konsentrasi ion Fe³⁺ (mM)

Penentuan nilai parameter kinetika enzim untuk menentukan nilai V_m dan K_M tanpa inhibitor dan adanya inhibitor dilakukan dengan cara memplotkan data kinetik dari perbandingan antara konsentrasi substrat ($[S]$) dengan V_0 . Grafik dari inhibisi penambahan ion Fe³⁺ dapat ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2: Kurva hubungan $1/[S]$ dengan $1/V_0$

Berdasarkan Gambar 2 tanpa adanya inhibitor memiliki nilai V_m 0,886 $\mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan nilai K_M 0,85 % sedangkan adanya inhibitor nilai V_m 1,072 $\mu\text{g.mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan K_M 1,23 %. Nilai V_m dan K_M dari penambahan dan tanpa inhibitor berubah sehingga dapat diketahui bahwa jenis penghambatan ion Fe³⁺ adalah inhibisi un-competitife. Pada penelitian ini diperoleh nilai K_I 119,05 mM.

Pada inhibisi un-competitife adanya ion Fe³⁺ akan berikatan pada sisi alosterik sehingga menyebabkan perubahan konformasi kompleks enzim-substrat dengan menekan gugus aktif dan menghambat pembentukan xilosa. Substrat akan mengalami konformasi sehingga gugus

reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam berikatan sisi aktif enzim [7]. Perubahan ini dapat dilihat dari warna larutan gula pereduksi (xilosa) yang berwarna jingga kecoklatan. Semakin besar konsentrasi ion Fe^{3+} yang ditambahkan maka proses pembentukan gula pereduksi(xilosa) semakin berkurang yang ditandai dengan persentase inhibisi semakin besar yaitu 1,21. Inhibitor akan bereaksi dengan kompleks enzim-substrat dengan membentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor (ESI).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa penambahan ion Fe^{3+} pada konsentrasi 25 mM hingga 50 mM dapat menurunkan aktivitas xilanase. Ion Fe^{3+} berperan sebagai inhibitor un-competitive. Parameter kinetika dari xilanase diperoleh V_m 1,072 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$, K_M 1,23 % dan K_I 119,05 mM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Girindra, 1990, Biokimia, Gramedia, Jakarta
2. Nurlaili, N., 2009, Uji Biologis Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) yang Diolah dengan Ekstrak Metanol dan Fermentasi Menggunakan *Rhizopus oryzae* serta *Trichoderma viride* Pada Ayam Broiler, Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan IPB, Bogor
3. Skripsianti, A, 1996, Kestabilan Enzim β -mananase dengan Penambahan Bufer dan Berbagai Kation Pada Berbagai Suhu Penyimpanan, *Skripsi*. FMIPA-Kimia IPB, Bogor, Indonesia
4. Tucker, G.A, 1995, Fundamentals of Enzyme Activity, In Tucker and Wood (*Eds.*), Enzyme In Food Processing, Chapman and Hall, India
5. Blacon, 1995, Purification and Properties of Xylanase A From Alkali-tolerant *Bacillus sp strain BP-23*, American society for microbiology, Barcelona
6. Sulistyarningsih, A.S, dkk, 2013, Pengaruh Ion Fe^{3+} terhadap Aktivitas Xylanase dari *Trichoderma viride*, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya
7. Suhartono, M.T, 1989, Enzim dan Bioteknologi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor