

## PENGARUH $Zn^{2+}$ TERHADAP AKTIVITAS XILANASE HASIL ISOLASI DARI *Trichoderma viride* DENGAN METODE FERMENTASI SEMI PADAT

Janatun Na'imah, Chanif Mahdi(\*), 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: [chanif@ub.ac.id](mailto:chanif@ub.ac.id)

### ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler hasil isolasi dari jamur *Trichoderma viride* yang mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas xilanase. Pada penelitian ini digunakan serbuk kulit pisang sebagai inducer untuk produksi enzim. Aktivitas xilanase ditentukan berdasarkan banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan (xilosa) oleh 1 mL enzim per menit. Pengaruh  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas xilanase dilakukan dengan beberapa konsentrasi, yaitu 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 mM. Analisa data menggunakan analisis ragam Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar xilanase dengan penambahan ion  $Zn^{2+}$  40 mM diperoleh sebesar  $1,821 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan  $Zn^{2+}$  berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase ( $P < 0,01$ ). Penambahan  $Zn^{2+}$  berfungsi sebagai aktivator untuk meningkatkan aktivitas xilanase. Nilai konstanta kinetika tanpa penambahan ion  $Zn^{2+}$  diperoleh  $V_m$  sebesar  $5,32 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan  $K_M$  sebesar 8,05 %, sedangkan pada penambahan  $Zn^{2+}$  diperoleh  $V_m$  sebesar  $6,80 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan  $K_M$  sebesar 2,87 %.

**Kata kunci:** xilanase, *Trichoderma viride*,  $Zn^{2+}$

### ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme produced from *Trichoderma viride* that can hydrolyze xylan become xilosa. The aim of this research was to determine the effect of additional  $Zn^{2+}$  ion towards xylanase activity. In this research, the powder of banana's peel was used as an inducer for producing enzyme. The activity of xylanase was determined by the number of reducing sugar that produced by 1 mL enzyme per minute. The effect of  $Zn^{2+}$  on xylanase activity was tested on various  $Zn^{2+}$  concentrations of 25, 30, 35, 40, 45, and 50 mM. The data were analyzed using completely randomized design (RAL). The result showed that the activity of crude extract xylanase with additional  $Zn^{2+}$  40 mM was  $1.821 \mu\text{g mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$  and  $Zn^{2+}$  have significant effect towards xylanase activity ( $P < 0,01$ ). The function of additional  $Zn^{2+}$  was an activator to increase xylanase activity. The kinetic constant value without  $Zn^{2+}$  additional cased  $V_m$   $5.32 \mu\text{g mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$  and  $K_M$  8.05 %, while  $Zn^{2+}$  additional showed  $V_m$   $6.80 \mu\text{g mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$  and  $K_M$  2.87 %.

**Keywords:** xylanase, *Trichoderma viride*,  $Zn^{2+}$  ion

### PENDAHULUAN

Enzim merupakan suatu molekul yang disusun oleh beberapa asam amino dengan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim juga merupakan suatu katalisator yang sangat dibutuhkan dalam proses metabolisme sel, seperti metabolisme pertahanan sel [1]. Enzim bekerja untuk mempercepat reaksi tanpa mempengaruhi keseimbangan reaksi kimia. Pokok utama kerja enzim didasarkan pada pembentukan kompleks enzim substrat yang bersifat sementara, yaitu setelah terbentuk reaksi yang diinginkan maka kompleks enzim substrat akan terurai kembali [2].

Xilanase adalah enzim yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme seperti jamur, bakteri, khamir, dan protozoa. Salah satu contoh jamur penghasil xilanase yaitu *Trichoderma viride*. Secara umum waktu tumbuh jamur lebih lama dari pada bakteri, tetapi jamur dapat menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi [3]. Berdasarkan pembentukannya, xilanase termasuk kelompok enzim induktif yaitu membutuhkan rangsangan suatu substrat yang mengandung xilan, seperti serbuk kulit pisang. Xilanase mempunyai beberapa manfaat, seperti sebagai tambahan pakan ternak yang dapat meningkatkan daya cerna dan meningkatkan pertumbuhan ternak [4,5].

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah ion logam. Pada penelitian sebelumnya, penambahan  $Zn^{2+}$  25, 50, dan 70 ppm mampu meningkatkan aktivitas enzim fosfatase alkali yang berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan ternak ruminansia [6]. Maka, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* menggunakan metode fermentasi semi padat dengan variasi konsentrasi 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 mM.

## **METODA PENELITIAN**

### **Bahan dan Alat**

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini memiliki derajat kemurnian *for microbiology* dan pro analisis. Bahan-bahan pro analisis antara lain,  $CaCl_2$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , HCl,  $ZnCl_2$ , NaCl, KCl,  $NH_4Cl$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , DNS (Asam dinitrosalisilat),  $CH_3COOH$  100% (Bj: 1,05 g/mL), dan  $CH_3COONa$ . Bahan-bahan *for microbiology* antara lain, pepton, *bacto* agar, urea, sedangkan bahan lainnya adalah aquades.

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

## **Prosedur**

### **Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase**

Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dilakukan dengan pembuatan larutan inokulum terlebih dahulu dengan cara kultur murni *Trichoderma viride* dibiakkan ke dalam media padat *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) miring selama 144 jam (6 hari). Lalu disuspensikan dengan 1 mL aquades steril, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media cair steril dan diinkubasi dengan menggunakan shaker sampai jam ke-36 (pertengahan fase logarima). Selanjutnya, dilakukan produksi dan isolasi xilanase dengan cara 25 gram serbuk kulit pisang dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 65 mL media cair dan disterilkan dengan autoklaf (T=121 °C, P=15 psi) selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan inokulum sebanyak 10 mL dan diinkubasi sampai jam ke-60 dengan menggunakan shaker pada kecepatan 100 rpm. Kemudian ditambahkan 30 mL larutan buffer asetat pH 5 dan dilanjutkan dengan proses sentrifugasi dingin selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, sehingga diperoleh ekstrak kasar xilanase.

### **Penentuan Aktivitas Xilanase**

1 mL xilan 1% (b/v) dipanaskan ke dalam penangas air selama 15 menit dengan temperatur 60 °C, kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5, dan 1 mL air bebas reduktor yang selanjutnya diinkubasi dengan temperatur 60 °C selama 55 menit. Lalu ditambahkan 2 mL larutan DNS dan diinkubasi dengan air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya, larutan diencerkan ke dalam labu ukur 25 mL dan diukur absorbansinya pada  $\lambda$  490 nm.

### **Penentuan Aktivitas Xilanase dengan Penambahan Zn<sup>2+</sup>**

Disiapkan 6 tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi diisi dengan 1 mL substrat xilan 1% (b/v). Lalu dipanaskan ke dalam penangas air dengan temperatur 60 °C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL air bebas reduktor, dan 1 mL larutan Zn<sup>2+</sup> dengan variasi konsentrasi (25; 30; 35; 40; 45; 50) mM. Setelah itu, larutan diinkubasi ke dalam penangas air dengan temperatur 60 °C selama 55 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL larutan DNS ke dalam masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi kembali ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Masing-masing larutan diencerkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  490 nm.

## **Penentuan Parameter Kinetika ( $V_m$ dan $K_M$ ) Enzim Xilanase**

Pada penentuan parameter kinetika ( $V_m$  dan  $K_M$ ) dilakukan dua cara, yaitu tanpa penambahan ion  $Zn^{2+}$  dan penambahan ion  $Zn^{2+}$ . Langkah awal yang dilakukan adalah disiapkan 5 tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi diisi xilan sebanyak 1 mL dengan variasi konsentrasi (0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5) % (b/v) yang kemudian dipanaskan ke dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit. Lalu, ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL larutan buffer asetat pH 5, dan 1 mL air bebas reduktor. Setelah itu, larutan diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60 °C. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan diinkubasi kembali ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit. masing-masing larutan diencerkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  490 nm. Untuk penentuan parameter kinetika dengan penambahan  $Zn^{2+}$  dilakukan dengan perlakuan yang sama, tetapi ditambahkan 1 mL larutan  $Zn^{2+}$ .

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase**

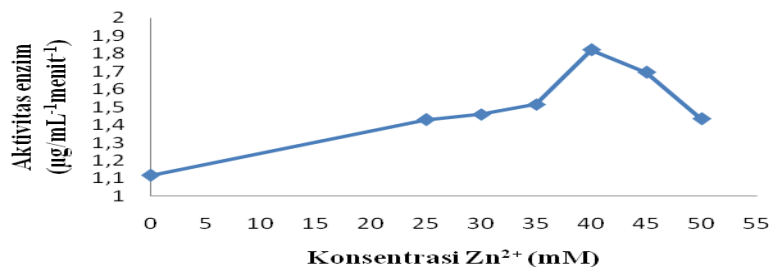
Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilanase termasuk dalam golongan enzim induktif, dimana dalam pembentukannya dibutuhkan adanya rangsangan dari substrat (induser). Proses produksi xilanase ini dilakukan pada fasa awal stasioner yang merupakan fasa pertumbuhan sel yang paling banyak. Pada saat isolasi xilanase, ditambahkan larutan buffer asetat pH 5 yang berfungsi untuk menjaga kestabilan xilanase dan dapat melarutkan enzim xilanase. Xilanase adalah enzim ekstraseluler, sehingga tidak perlu dilakukan pemecahan sel untuk memperoleh enzimnya. Oleh karena itu, dilakukan proses sentrifugasi untuk mengendapkan sisa-sisa komponen selain enzim.

### **Penentuan Aktivitas Xilanase**

Xilanase yang diperoleh berupa ekstrak kasar berwarna coklat yang akan menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi (xilosa). Xilosa yang dihasilkan akan bereaksi dengan asam 3,5-dinitrosalisilat membentuk asam 3-amino-5-dinitrosalisilat dan asam xilamat. Selanjutnya, aktivitas xilanase ditentukan dengan mengukur konsentrasi gula pereduksi secara spektrofotometri yang akan digunakan untuk menghitung nilai aktivitas enzim, sehingga diperoleh aktivitas xilanase sebesar  $1,117 \mu\text{gmL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ .

### Penentuan Aktivitas Xilanase dengan Penambahan Ion $Zn^{2+}$

Untuk mengetahui pengaruh penambahan ion  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas xilanase, digunakan variasi konsentrasi (25; 30; 35; 40; 45; dan 50) mM. Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa semua larutan yang mengandung ion  $Zn^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas xilanase dari aktivitas awalnya. Pada penambahan larutan  $Zn^{2+}$  dengan konsentrasi 25 mM hingga 40 mM, aktivitas xilanase meningkat dan pada konsentrasi 45 mM dan 50 mM aktivitas xilanase menurun. Akan tetapi, penurunan aktivitas tersebut tidak melebihi aktivitas awalnya.

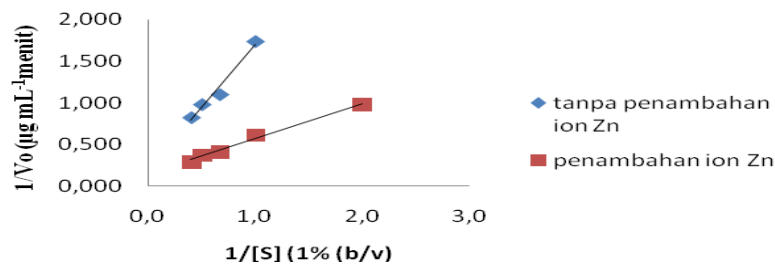


**Gambar 1.** Kurva aktivitas ekstrak kasar xilanase terhadap variasi konsentrasi  $Zn^{2+}$  (mM)

Peningkatan aktivitas xilanase mungkin dikarenakan adanya  $Zn^{2+}$  berikatan dengan sisi aktif dari xilanase yang kemudian membentuk kompleks enzim substrat, sehingga  $Zn^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas dan menstabilkan xilanase. Ion  $Zn^{2+}$  akan terikat dengan sisi aktif dari xilanase (asam glutamat), sehingga dapat mempermudah pengikatan asam aspartat terhadap C1 xilan yang terikat dengan atom O ikatan glikosidik. Ion  $Zn^{2+}$  akan menerima pasangan elektron bebas atom O dan kemudian terbentuk kompleks enzim substrat. Setelah itu, terjadi hidrolisis yang akan memutus ikatan glikosidik polimer xilan dan terbentuk gula pereduksi, yaitu xilosa.

### Penentuan Parameter Kinetika ( $V_m$ dan $K_M$ ) Enzim Xilanase

Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) merupakan konsentrasi substrat ketika kecepatan enzim mencapai setengah kecepatan maksimum, sedangkan  $V_m$  merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim jenuh terhadap substrat. Metode yang digunakan untuk menentukan nilai  $V_m$  dan  $K_M$  adalah dengan persamaan Lineweaver-Burk. Pada Gambar 2 terlihat kurva hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/V_o$  tanpa dan dengan penambahan  $Zn^{2+}$ . Untuk penentuan reaksi enzimatik tanpa penambahan  $Zn^{2+}$  diperoleh persamaan  $y = 1,513x + 0,188$  dengan nilai  $K_M$  8,05 % dan  $V_m$   $5,32 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ . Sedangkan pada penambahan  $Zn^{2+}$  diperoleh persamaan  $y = 0,421x + 0,147$  dengan nilai  $K_M$  sebesar 2,87 % dan  $V_m$  sebesar  $6,80 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ .



**Gambar 2.** Kurva hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/V_0$  xilanase tanpa dan dengan penambahan  $Zn^{2+}$

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang pengaruh penambahan ion  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas xilanase dapat disimpulkan bahwa penambahan ion  $Zn^{2+}$  dengan konsentrasi (25; 30; 35; 40; 45; dan 50) mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada Drs. Sutrisno, M.Si atas support dana pelaksanaan skripsi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Richana, N., dan Lestina P., 2002, *Produksi Xilanase untuk Biokonversi Limbah Biji Kedelai*, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor
2. Tucker, G. A., 1995, *Fundamentals of Enzyme Activity, in Tucker and Wood (Eds.), Enzyme in Food Processing*, Chapman and Hall, India
3. 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
4. Widjaja, S., Purwadaria T., dan Ketaren P. P., 2008, *Apparent Induction of Xilanase by *Bacillus pumilus* PU4-2 Using Pretreated Substrates*, Microbiol Indones, Vol 2: 44-48
5. Srinivasan, M. C., dan Rele M. V., 1995, *Microbial Xilanase for Paper Industry*, Ind. J. Microbiol, 35: 93-101
6. Ardiningsih, P., 2002, *Produksi dan Karakterisasi Xilanase Isolat dari Rayap*, Universitas Indonesia, Depok