

## PENGARUH SUHU DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KESTABILAN XILANASE AMOBIL DALAM KITOSAN

Imaroh Mufidah Isya, Anna Roosdiana\*, 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

Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan enzim xilanase. Kestabilan enzim dipengaruhi kondisi lingkungan. Enzim dikatakan stabil bila aktivitas sisa lebih dari 50% dari aktivitas enzim awal. Xilanase diamobilisasi dengan metode penjebakan menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat dan disimpan pada variasi suhu 30,40,50,60,70 (°C) dan variasi lama penyimpanan 0,1,2,3,4,5,6,7 (hari). Aktivitas enzim dapat ditentukan dengan menghitung gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan oleh sejumlah enzim per menit ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ ). Gula pereduksi yang dihasilkan dianalisis menggunakan reagen DNS dan ditentukan dengan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan tingkat kestabilan tertinggi dari enzim xilanase berada pada suhu penyimpanan 50 °C. Enzim xilanase amobil, stabil hingga hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81%. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada efisiensi xilanase amobil menggunakan kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas sebanyak 16,462 unit dan efisiensi sebesar 50,19%.

**Kata kunci:** amobilisasi, kestabilan, kitosan-natrium tripolifosfat, lama penyimpanan, suhu.

### ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzymes group which enable to hydrolyze xylan into xylose. *Trichoderma viride* is one of the mold types that can produce xylanase. The enzyme stability is affected by environmental condition. The enzyme is stable when the remained activity show more than 50% from the initial enzyme activity. Immobilized xylanase in chitosan-sodium tripolyphosphate matrix stored at various temperature of (30, 40, 50, 60, 70) °C and storage time of (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) days. The enzyme activity can be determined by calculating reducing sugar that resulted from hydrolyze xylan by a number of enzyme per minute ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ ). The reducing sugar can be analyzed using DNS reagent and be determined by spectrophotometry method. The results showed that highest level of xylanase stability at storage temperature of 50 °C. The immobilized xylanase remained stable up to 7 days with residual activity 50.81%. The longer of the storage time the xylanase activity decreased. The efficiency of immobilized xylanase in chitosan-sodium tripolyphosphate matrix can be used five times repetitions resulting in activity of 16.462 units and the efficiency of 50.19%.

**Keywords:** chitosan-sodium tripolyphosphate, immobilized, stability, storage time, temperature.

### PENDAHULUAN

Enzim xilanase dalam perkembangannya banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, seperti proses *bio bleaching* pada industri pulp, pembuatan gula xilosa, produksi makanan dan minuman dan produksi makanan ternak [1]. Jenis mikroorganisme yang menghasilkan xilanase ialah dari golongan kapang dan bakteri. Meskipun enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada suhu yang lebih tinggi dibanding kapang, namun

aktivitas xilanase dari golongan kapang jauh lebih tinggi daripada bakteri [2]. Pada proses dan analisa yang melibatkan enzim, umumnya enzim hanya digunakan sekali pakai, karena secara teknis sangat sulit untuk memisahkan enzim dan produk serta kesulitan mendapatkan kembali enzim yang aktif diakhir reaksi [3]. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan amobilisasi enzim[4]. Amobilisasi enzim adalah suatu teknik dimana enzim ditempatkan pada suatu matriks sehingga dapat menjaga aktivitas katalitik enzim tersebut [5].

Kitosan dapat digunakan sebagai matriks karena mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dan hidroksil (-OH), kitosan dengan adanya gugus aktif ini memungkinkan terjadi interaksi dengan enzim baik secara adsorpsi maupun penjerapan [6]. Kitosan sebagai media amobilisasi enzim dapat diubah strukturnya oleh adanya senyawa pengikat silang [6]. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat [7]. Dengan penambahan natrium tripolifosfat, ukuran pori dan porositas kitosan dapat berubah sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matriks [8].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase yang diamobilisasi pada kitosan-natrium tripolifosfat.

## **METODA PENELITIAN**

### **Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan antara lain kultur murni *Trichoderma viride* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, DNS, NaOH 10%, NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> 3%, CH<sub>3</sub>COOH 100% (Bj : 1,05 g/ml), CH<sub>3</sub>COONa (BM: 82,02 g/mol) dan (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub> 3%, serta bahan lainnya adalah kulit pisang dan akuades.

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, kertas saring *Whatman No. 40*, syringe.

## **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 (*Edmund Buhler SM 25 24B*) 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.

### **Amobilisasi xilanase dengan kitosan-natrium tripolifosfat**

Amobilisasi enzim dilakukan dengan cara mencampurkan 20 ml ekstrak kasar xilanase dengan 80 mL kitosan yang telah dipreparasi. Larutan campuran masing-masing dimasukkan ke dalam *syringe* dan ditekan sehingga campuran menetes ke dalam wadah berisi 100-200 mL larutan natrium tripolifosfat 3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan natrium tripolifosfat 3% selama 75 menit. Enzim amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman* No. 40. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan dilanjutkan untuk penentuan kestabilan aktivitas enzim amobil berdasarkan pengaruh suhu dan lama penyimpanan.

### **Penentuan kestabilan aktivitas enzim amobil berdasarkan pengaruh suhu dan lama penyimpanan**

Xilanase hasil amobil ditimbang sebanyak 0,3 g dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi ukuran 5 mL dan di tutup dengan alumunium foil. Kemudian tabung raksi diinkubasi di dalam oven dengan variasi suhu 30, 40, 50, 60, dan 70 °C. Pada lama penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 hari, enzim di uji aktivitasnya dengan menambahkan substrat xilan sebanyak 1 mL, buffer asetat pH 5 sebanyak 5 mL, aquades 1 mL, diinkubasi pada suhu 60 °C selama 50

menit, kemudian ditambahkan 2 mL reagen DNS, dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Sampel dapat diukur kadar gula pereduksinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### Penentuan Aktivitas Enzim Sisa Xilanase

Aktivitas enzim sisa xilanase ditentukan dengan cara mencari persentase hasil bagi aktivitas enzim setelah perlakuan dan sebelum perlakuan, yaitu sebagai berikut :

$$\% \text{ Aktivitas Sisa} = \frac{\text{Aktivitas Enzim setelah Penyimpanan}}{\text{Aktivitas Enzim sebelum Penyimpanan}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilanase termasuk dalam golongan enzim induktif, 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.

Aktivitas dari enzim amobil lebih rendah daripada ekstrak kasar xilanase. Menurunnya aktivitas tersebut di karenakan enzim amobil membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama untuk mencapai aktivitas maksimumnya dibanding enzim bebasnya. Pada enzim amobil terdapat efek tahanan difusi yang diakibatkan oleh adanya bahan pendukung, sehingga

**Tabel 1.** Perbandingan enzim bebas dan enzim amobil

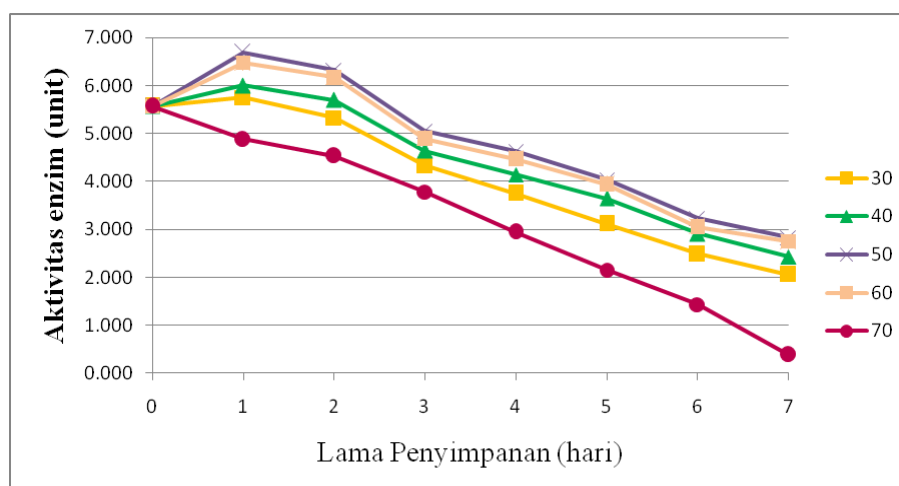
No	Xilanase	Kadar protein (ppm)	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{g}/\text{mL}.\text{menit}$ )
	Enzim Bebas	17.833	9.591
	Enzim Amobil	1.092	5.568

bertemunya substrat dengan enzim memerlukan waktu yang lebih lama, karena substrat

terlebih dahulu harus berdifusi masuk ke bagian dalam partikel enzim amobil, untuk kemudian membentuk produk.

### **Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Xilanase yang diamobilisasi dalam Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

Keuntungan metode amobilisasi yaitu enzim bersifat stabil karena dapat digunakan berulang kali, serta dapat meningkatkan stabilitas. Kestabilan xilanase dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya pengaruh pH, waktu inkubasi, pengaruh suhu dan enzim protease.



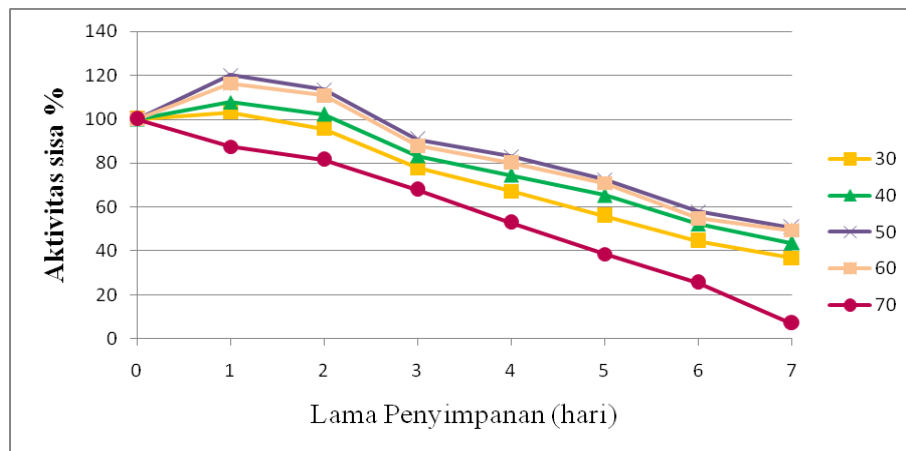
**Gambar 1.** Grafik pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap aktivitas enzim xilanase

Suhu berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Pada Gambar 1 terlihat bahwa aktivitas enzim pada penyimpanan 50 °C mempunyai aktivitas yang paling tinggi, dikarenakan pada suhu 50 °C enzim xilanase tidak terdegradasi oleh protease yang dihasilkan pada saat enzim xilanase disintesis oleh *Trichoderma viride*. Protease merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, disebut juga enzim proteolitik. Sedangkan pada suhu 70 °C xilanase memiliki aktivitas enzim yang paling rendah dikarenakan pada suhu 70 °C xilanase sudah mengalami denaturasi.

Kestabilan enzim xilanase dapat dilihat dari aktivitas enzim sisa dimana enzim dikatakan stabil bila aktivitas enzim sisanya lebih dari 50% dari aktivitas awal enzim. Pada penelitian diperoleh aktivitas enzim sisa yang ditunjukkan pada Gambar 2.

Lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada suhu 50 °C enzim xilanase

amobil stabil sampai hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81%. Pada suhu 70 °C stabil sampai hari ke-4 dengan aktivitas enzim sisa 57,22% dan 53,00%. Pada pada suhu 30 °C xilanase



**Gambar 2.** Grafik % aktivitas enzim sisa xilanase amobil

amobil stabil sampai hari ke-5 dengan aktivitas enzim sisa 52,26%, sedangkan pada suhu 40 dan 60 °C xilanase amobil stabil sampai hari ke-6 dengan aktivitas enzim sisa berturut-turut 58,10; dan 54,89%.

## KESIMPULAN

Lama penyimpanan dan suhu berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada suhu 50 °C enzim xilanase amobil stabil sampai hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81 5%.

## UCAPAN TERIMAKASIH

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

## DAFTAR PUSTAKA

1. Richana N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, *Buletin Agrobio* 5 (1) 29-35.
2. Budiman A., dan Setiawan S., 2010, Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xilanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi, <http://www.undip.ac.id/journal/albar-substrat.pdf>, diakses tanggal 25 september 2013.

3. Sarah A., 2001, Immobilization and Stabilization of Papain on Chelating Sepharose, *Electronic Journal Biotechnology*, Catolica de Velparaaiso Chile.
4. Chibata I., 1978, *Immobilized Enzyme*, Research and Development, John Wiley and Sons Inc, New York.
5. Esawy, M. A., Mahmoud D. A. R. dan Fattah A. F. A., 2008, Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a Levansucrase and Some Studies on Its Properties, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, No. 2, Vol. 25, 237-246.
6. Krajewska B., 2004, Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 35 ,126-139.
7. Aral C. dan Akugba J., 1998, Alternative Approach to The Preparation of Chitosan Beads, *International of Journal Pharmaceutics*, Vol. 168, 9-15.
8. Fwu L. M., Shin S. S., Chin T. C., dan Juin Y. L., 2002, Adsorption of Indomethacin onto Chemically Modified Chitosan, *Polymer*, Vol. 43, 757-765.