

OPTIMASI AMOBILISASI XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGGUNAKAN MATRIKS CA-ALGINAT-KITOSAN

Wifda Mesla, Chanif Mahdi*, 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: chanif@ub.ac.id

ABSTRAK

Xilanase bebas tidak dapat digunakan digunakan lebih dari satu kali pemakaian sehingga perlu dilakukan modifikasi enzim dengan metode amobilisasi. Xilanase yang diperoleh dari *Trichoderma viride* diisolasi dengan sentrifuse dingin pada temperatur 4°C. Xilanase diamobilisasi menggunakan metode penjebakan dalam Ca-alginat-kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi alginat optimum dan konsentrasi xilanase optimum dengan cara menentukan kadar protein dan aktivitas optimum xilanase pada variasi konsentrasi alginat dan xilanase, serta menentukan efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil. Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi alginat (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) % dan variasi xilanase (0,157; 0,209; 0,261; 0,314;0,366) mg/mL. Kadar protein xilanase diuji dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen biuret dan aktivitas gula pereduksi dengan reagen DNS. Kondisi optimum amobilisasi xilanase adalah pada konsentrasi alginat 3% dan konsentrasi xilanase 0,314 mg/mL dengan jumlah enzim yang terjebak 0,849 mg dan aktivitas sebesar 17,008 unit (P < 0,01). Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil yang diamobilkan menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan adalah hingga lima kali pemakaian ulang dengan efisiensi sebesar 51,28%.

Kata kunci : Xilanase, *Trichoderma viride*, amobilisasi, Ca-alginat-kitosan, efisiensi

ABSTRACT

Free xylanase can not be used more than once in an application, so that need to modification of enzyme with immobilization method. Xylanase was obtained from *Trichoderma viride* then isolated using ice centrifuge at 4°C temperature. Xylanase was immobilized using trapping Ca-alginat-chitosan method. This research aim to determine optimum alginate concentration and optimum xylanase concentration by determining protein level and optimum xylanase activity in vary concentration of alginate and xylanase, and also to determine reuse efficiency of immobilized xylanase. This research used variation of alginate (1.5; 2; 2.5; 3; and 3.5)% and the xylanase concentration were (0.157; 0.209; 0.261; 0.314; and 0.366 mg/mL). protein level was determined with spectrophotometry method by using biuret reagent and activity of reducing sugar was determined by using DNS reagent. optimum condition of immobilized xylanase was on 3% alginate concentration and xylanase concentration is 0.314 mg/mL with trapped enzyme and activity was 0.849 and 17.008 unit (P < 0.01). Reuse efficiency of xylanase which was immobilized using Ca-alginat-chitosan matrix was five time reuseable with 41.28% efficiency.

Keywords : Xylanase, *Trichoderma viride*, immobilization, Ca-alginate-chitosan, activity, efficiency

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini xilan menjadi xilosa [2]. Salah satu kapang penghasil xilanase adalah *Trichoderma viride*. Pada penelitian ini digunakan induser klobot jagung karena kandungan hemiselulosa pada klobot jagung yaitu mencapai 32% [3].

Secara umum penggunaan enzim bebas sebagai katalis memiliki banyak kelemahan yaitu sulit memperoleh enzim aktif dari campuran untuk digunakan lagi, enzim bebas mudah terdenaturasi dan mengalami inaktivasi. Untuk mengatasi kelemahan-kelemahan tersebut perlu dilakukan modifikasi enzim dengan cara amobilisasi [4].

Salah satu metode amobilisasi adalah metode *entrapment* (penjebakan), yaitu dengan melokalisasi enzim dalam kisi matriks atau mikrokapsul (membran semipermeable) namun tetap mempertahankan kemampuan enzim untuk menerima substrat. Pada metode ini enzim tidak terikat pada matriks gel atau membran [5]. Salah satu matriks yang biasa digunakan untuk metode penjebakan adalah Ca-alginat. Kelebihan Ca-alginat sebagai matriks adalah dapat membentuk gel yang kokoh, tidak beracun, dapat dilakukan pada suhu ruang serta ekonomis dalam pengerjaannya [6]. Namun metode ini memiliki kekurangan yaitu enzim masih dapat berdifusi keluar matriks melalui pori yang terbentuk didalam struktur gel alginat dengan ion kalsium [7]. Untuk meminimalisir proses difusi enzim dari matriks Ca-alginat, manik Ca-alginat dapat dilapisi kembali dengan larutan kitosan yang kemudian diikat silang dengan natrium tripolifosfat. Ca-alginat terlapis kitosan merupakan metode mikroenkapsulasi yang bertujuan untuk meminimalisir proses difusi enzim dari matrik ca-alginat tersebut [8]. Semakin tinggi konsentrasi alginat maka porositas gel semakin rendah sehingga enzim sulit terlepas dari gel [9]. Keuntungan enzim teramobilisasi yaitu dapat digunakan secara berulang, enzim lebih stabil, dan lebih mudah dipisahkan dari campuran untuk selanjutnya digunakan lagi [1].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi xilanase optimum dengan cara menentukan kadar protein dan aktivitas optimum xilanase pada variasi konsentrasi xilanase, serta menentukan efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil.

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti pepton, tepung agar, xilan, kasein, klobot jagung, dan kentang (pasar lokal). Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain asam oleat, dextrosa, asam asetat glasial ($\text{BJ}=1,05 \text{ g/cm}^3$), 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, Na-alginat, CaCl_2 , dan natrium tripolifosfat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), 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, pengaduk magnet, oven, aluminium foil, kapas steril, pH universal, dan kertas saring Whatman no.40.

Produksi dan isolasi xilanase

Trichoderma viride yang telah ditumbuhkan pada media padat miring selama 144 jam pada pH 5 dan temperatur 30 °C disuspensikan secara aseptis pada 10 mL aquades steril. Suspensi kemudian diambil 2 mL dan dimasukkan dalam 13 mL media cair steril selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar selama 36 jam. Inokulum kemudian ditumbuhkan pada media pertumbuhan yang berisi 13 mL larutan garam basal dan campuran tepung klobot jagung : air dengan rasio 1:3. Selanjutnya campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar selama 60 jam. Media hasil fermentasi kemudian ditambah 10 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 selanjutnya disentrifugasi pada temperatur 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatant yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase.

Amobilisasi Xilanase dengan Ca-alginat-kitosan

Penentuan konsentrasi xilanase optimum

Enzim dipipet (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) mL sehingga konsentrasi enzim menjadi bervariasi yaitu (0,157; 0,209; 0,261; 0,314; 0,366) mg/ mL, dimana dilakukan penambahan buffer asetat pH 5

yang bervariasi hingga volume total enzim menjadi 3,5 mL. Dicampurkan dengan 4 mL larutan alginat dengan konsentrasi 3%.

Campuran xilanase dan larutan alginat diteteskan dengan syringe 10 mL pada gelas kimia yang berisi 7,5 mL larutan CaCl_2 sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama satu jam untuk membuat manik-manik menjadi keras. Manik-manik kemudian dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring *Whatman* no 40 sehingga diperoleh xilanase amobil serta filtrat yang merupakan campuran CaCl_2 dengan enzim yang tidak terjebak. Manik-manik selanjutnya disuspensikan dalam larutan kitosan 1,5%. Manik-manik tersebut kemudian dimasukkan ke dalam pipet plastik yang telah dimodifikasi dan diteteskan ke dalam larutan natrium tripolifosfat 3%. Manik-manik disimpan dalam larutan natrium tripolifosfat tersebut selama 90 menit kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no 40. Filtrat selanjutnya dilakukan pengukuran jumlah enzim yang tidak terjebak dengan reagen Biuret. Percobaan di atas diulangi untuk konsentrasi larutan alginat (2; 2,5; 3 dan 3,5)% w/v.

Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil

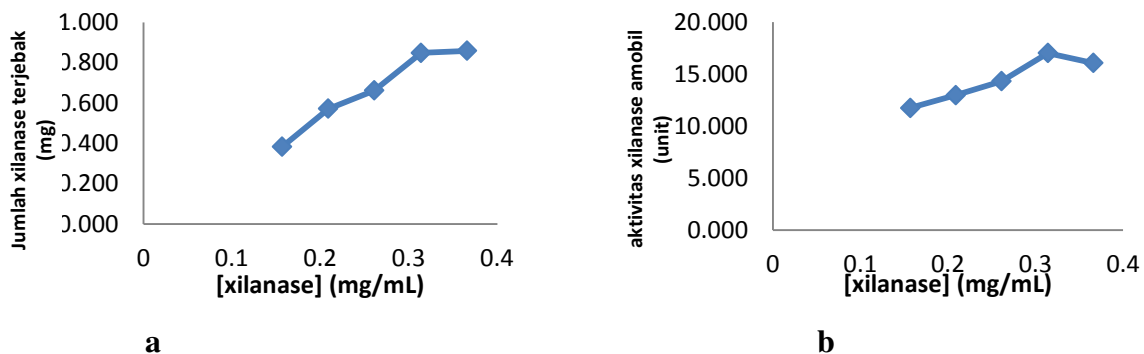
Dilakukan pada pH 5, temperatur 50°C dan lama inkubasi 50 menit. Xilanase amobil dimasukkan ke dalam larutan uji pertama kemudian dipisahkan dengan cara disaring dan langsung dimasukkan ke dalam larutan uji yang baru untuk diproses berikutnya dengan kondisi yang sama. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 0,4 mL reagen DNS dan dipanaskan air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan pada suhu kamar kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 495 nm. Perlakuan ini diulangi sebanyak 5 kali dan dihitung aktivitas enzim pada setiap pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi xilanase optimum

Pada penelitian ini enzim diamobilkan dengan metode penjebakan menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan dengan sistem bilayer. Enzim dijebak dalam manik Ca-alginat kemudian dilapisi oleh kitosan yang bertindak sebagai membran kedua. Alginat akan membentuk manik ketika dicampur dengan larutan CaCl_2 karena adanya kation Ca^{2+} yang akan berikatan silang dengan anion karboksilat (COO^-) dari alginat sehingga terjadi pertukaran antara dua ion Na^+ dengan satu ion Ca^{2+} . Akibat ikatan ini terbentuk manik yang didalamnya terjebak xilanase.

Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 selama satu jam agar manik menjadi keras. Manik-manik yang terbentuk kemudian dipisahkan dengan menggunakan kertas saring *whatman* sehingga diperoleh enzim amobil dan filtrat yang merupakan campuran CaCl_2 dengan enzim yang tidak terjebak. Selanjutnya manik yang telah terbentuk diselubungi dengan larutan kitosan dengan cara mensuspensikan manik kedalam larutan kitosan yang selanjutnya diikat silang oleh natrium tripolifosfat. Sebelumnya larutan kitosan dilarutkan dengan asam asetat. Kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat akan terprotonasi gugus aminonya menjadi ion ammonium $-\text{NH}^{3+}$ sedangkan natrium tripolifosfat yang dilarutkan dengan aquades mengalami disosiasi menjadi $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$ sehingga keduanya akan membentuk ikatan silang antara muatan positif pada kitosan dan muatan negatif pada natrium tripolifosfat. Adanya ikatan silang ini maka akan terbentuk manik dengan sistem bilayer.



Gambar 1: Pengaruh konsentrasi xilanase terhadap jumlah enzim yang terjebak tiap 0,1 gram manik Ca-alginat-kitosan (a) Grafik hubungan antara konsentrasi xilanase terhadap aktivitas enzim amobil (b)

Jumlah enzim yang terjebak dalam manik Ca-alginat-kitosan semakin meningkat dari konsentrasi xilanase 0,157 mg/mL hingga konsentrasi 0,366 mg/mL. Peningkatan ini terjadi karena konsentrasi xilanase yang ditambahkan semakin meningkat. Namun peningkatan jumlah xilanase yang terjebak dalam Ca-alginat tidak diiringi oleh peningkatan aktivitas xilanase amobil. Hal ini dikarenakan semakin banyaknya jumlah xilanase yang terjebak dalam kisi Ca-alginat-kitosan menyebabkan sisi aktif xilanase tidak dapat bergerak bebas sehingga hanya sedikit substrat yang terhidrolisis oleh xilanase menjadi xilosa. Aktivitas xilanase amobil mengalami peningkatan dari konsentrasi 0,157 mg/mL hingga konsentrasi 0,314 mg/mL yaitu dengan

aktivitas 17,131 unit, sedangkan pada konsentrasi xilanase 0,366 mg/mL aktivitas xilanase amobil mengalami penurunan.

Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil

Salah satu kelebihan enzim amobil adalah dapat digunakan secara berulang. Xilanase yang diamobilkan dengan penjebakan dalam manik Ca-alginat-kitosan dapat digunakan hingga lima kali pemakaian ulang dengan aktivitas sebesar 8,627 dan efisiensi sebesar 51,28 %, karena enzim amobil dikatakan masih baik digunakan jika efisiensinya masih diatas 50% [10]. Penurunan aktivitas ini dimungkinkan karena rusaknya pori Ca-alginat-kitosan yang terbentuk akibat pemanasan berulang-ulang. Kerusakan pori ini menyebabkan xilanase yang telah terjebak sebelumnya berdifusi keluar. Pemanasan yang berulang-ulang juga menyebabkan sebagian enzim mengalami denaturasi sehingga dimungkinkan jumlah enzim yang berikatan dengan substrat semakin sedikit.

Tabel 1: Pengaruh pemakaian ulang xilanase amobil

Pemakaian ke	Rata-rata ($\mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$)	efisiensi (%)
1	16,823	100
2	14,528	86,36
3	12,848	76,37
4	10,32	61,39
5	8,627	51,28

KESIMPULAN

Konsentrasi alginat dan konsentrasi kitosan berpengaruh terhadap jumlah dan aktivitas xilanase yang terjebak dalam matriks Ca-alginat-kitosan. Kondisi optimum amobilisasi xilanase adalah pada konsentrasi alginat 3% dan konsentrasi xilanase 0,314 mg/mL dengan jumlah enzim yang terjebak 0,849 mg dan aktivitas sebesar 17,008 unit ($P < 0,01$). Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil yang diamobilkan menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan adalah hingga lima kali pemakaian ulang dengan efisiensi sebesar 51,28%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chibata, I., 1978, **Imobilized Enzyme, Research and Development**, John Wiley and Sons Inc, New York
2. Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, *Buletin AgroBio*, No. 1, Vol. 5, Hal. 29-36, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor
3. Mayasari, Dian, 2009, **Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride***, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
4. Bucke, C., 1982, **Industrial Use of Immobilized Enzymes and Cells, Immobilized Microbial Enzymes and Cells, Proceeding of Regional Workshop**, Mahidol University, Bangkok
5. Naiola, E., dan Widhyastuti, N., 2007, **Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus sp.***, *Berk. Penel. Hayati*, Vol.13, Hal. 51-56, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor
6. Anwar A., Qader S. A. U., Raiz A., Iqbal S. dan Azhar A., 2009, **Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS**, *World Applied Science Journal*, 7, pp. 1281-1286.
7. Brodelius P, EJ Vandamme, 1987, **Immobilized cell systems**, 407–463, In H.J. Rehm and G. Reed (ed) *Biotechnology Chapter 8*. VCH Pub, New , New York
8. Taqqiedin E., Carolin L. dan Mansoor A., 2002, **Perm-Selective Chitosan Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology**, *Off. J. ISPE*, 22, pp. 1–3.
9. Piliang, W. G., 2006, **Fisiologi Nutrisi Volume I**, Institut Pertanian Bogor (IPB)-Press, Bogor.
10. Roosdiana A., Setianingsih T., Mardiana D. dan Suratmo, 2009, **Characterization of Immobilized Lipase in Aluminosilicate for Lactosyl Palmitate Synthesis**, *Indonesia Journal Chemical.*, Vol 9, hal 201-205.