

OPTIMASI AMOBILISASI ENZIM XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGUNAKAN MATRIKS KITOSAN-TRIPOLIFOSFAT

Ilmiyati Sa'idah, Sutrisno* dan 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

Xilanase merupakan enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dan memiliki peranan penting dalam berbagai industri, sehingga perlu dilakukan amobilisasi agar dapat digunakan berulang kali serta mudah untuk dilepaskan dari produknya. Pada penelitian ini, xilanase diisolasi dari kapang *Trichoderma viride* dan dimurnikan dengan menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40-80%. Metode yang digunakan dalam proses amobilisasi xilanase ini adalah metode penjebakan menggunakan matriks kitosan-tripolifosfat dengan bervariasi konsentrasi kitosan (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5) % (w/v) dan bervariasi konsentrasi enzim (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum berada pada konsentrasi 2,0 % dengan jumlah xilanase yang terjebak sebesar 3.867 mg. Konsentrasi enzim optimum berada pada konsentrasi 4,5 mg/mL dengan jumlah xilanase yang terjebak sebesar 18,942 mg.

Kata kunci: Amobilisasi, kitosan-tripolifosfat, *Trichoderma viride*, xilanase.

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that has an ability to hydrolyze hemicellulose and has an important act in such as industries, so that should be immobilized so that it can be used repeatedly and easy to removed from the product. In this study, xylanase isolated from the fungus *Trichoderma viride* and purified by using ammonium sulfate saturation levels 40-80%. The method that used in the immobilization of xylanase is a method of trapping using a matrix of chitosan-tripolyphosphate with make a variation to chitosan concentration (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5)% (w / v) and make a variation to enzyme concentration (0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5) mg / mL. The results showed that the chitosan concentration optimum is at a concentration 2.0% with the amount of xylanase stuck at such as 3.867 mg. Enzyme concentration optimum is at a concentration of 4.5 mg / mL with the amount of xylanase stuck such as 18.942 mg.

Key words: Amobilization, chitosan-tripolyphosphate, *Trichoderma viride*, xylanase.

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa yang dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida.

Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Dalton, aktif pada suhu 55°C [3]. Xilanase dapat dihasilkan dari sejumlah mikroorganisme golongan jamur dan bakteri, salah satu contohnya adalah *Trichoderma viride* [1].

Trichoderma viride merupakan jenis yang paling banyak dijumpai diantara genusnya dan mempunyai kelimpahan yang tinggi pada tanah dan bahan yang mengalami dekomposisi [2]. Kegunaan xilanase sangat bermacam-macam, sehingga perlu diamobilkan untuk meningkatkan efisiensi pemakaian enzim agar dapat dipakai berulang kali. Salah satu metode amobilisasi enzim adalah dengan pengikatan silang (crosslinked) menggunakan matriks penyangga [3].

Kitosan merupakan polimer polikationik turunan dari kitin yang diperoleh melalui proses deasetilasi dengan menggunakan alkali kuat [3]. Penggunaan kitosan sebagai matriks memiliki beberapa keuntungan misalnya mengandung sejumlah gugus amino bebas yang dapat terprotonasi menghasilkan muatan positif yang dapat digunakan untuk reaksi sambung silang dengan gugus lain yang bermuatan negatif, disamping itu kitosan mempunyai toksisitas rendah [4]. Tripolifosfat merupakan anion multivalen non-toksik yang dapat membentuk gel dengan reaksi sambung silang ionik antara gugus anion dari tripolifosfat dengan gugus amino bebas bermuatan positif dari kitosan [4]. Dengan penambahan tripolifosfat pada kitosan menyebabkan terbentuk manik-manik yang berpori [5], sehingga mengakibatkan enzim terjebak didalamnya.

Pada penelitian ini akan dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi kitosan dan konsentrasi xilanase terhadap amobilisasi enzim xilanase dari *Trichoderma viride* dan ditentukan konsentrasi kitosan optimum, konsentrasi xilanase optimum.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah kultur murni *Trichoderma viride* yang diperoleh di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya, klobot jagung dan kentang. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain adalah *bacto* agar, xilan, pepton (Oxoid), kasein, dan *yeast extract* (Difco), natrium tripolifosfat dan aquades. Sedangkan bahan kimia lain yang memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a.) antara lain adalah Na_2HPO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , Glukosa, Asam dinitrosalisilat, NaOH, kristalin fenol, natrium sulfat,

NaKC₄O₆H₄, CuSO₄.5H₂O, HCl (37% w/w ; bj= 1,19 g/cm³), asam asetat glacial (bj= 1,05 g/cm³) dan kitosan.

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), penangas air (Mettmert W 200), oven, kapas steril, autoklav (Tipe LS-C35L), *shaker* (Edmund Buhler SM 2524B), *sentrifuse* dingin (Denley), *Spectronic-20* (Bausch & Lomb), *refrigerator*, kantong selofan, aluminium foil, kertas saring *Whatman* No. 40, *syringe*.

Prosedur preparasi xilanase

Trichoderma viride ditumbuhkan dalam media padat miring sebanyak satu mata ose dan diinkubasi selama 144 jam pada temperature 30°C, selanjutnya diambil spora dari biakan murni *Trichoderma viride* dan ditanam dalam 13 mL media cair steril, diinkubasi dalam *shaker* selama 36 jam, dilakukan produksi xilanase sebanyak 15 mL inokulum dalam 150 mL media cair steril dan diinkubasi dalam *shaker* selama 60 jam. Selanjutnya dilakukan isolasi dengan menggunakan metode sentrifugasi serta pemurnian ekstrak kasar xilanase dengan menggunakan amonium sulfat dan dilakukan dialisis enzim dalam kantong selofan.

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menambahkan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL enzim fraksi 40-80% dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, lalu diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein (550 nm). Kadar protein awal diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yang telah dibuat. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer asetat pH 5 selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

Uji aktivitas xilanase

Disiapkan 2 buah tabung reaksi lalu masing-masing diisi dengan 1 mL substrat xilan 1% (b/v). Kemudian diinkubasi dalam penangas air 60°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase dalam tabung 1 dan 1 mL xilanase (fraksi 40-80%) dalam tabung 2. Lalu masing-masing tabung ditambahkan dengan 5 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran ini diinkubasi pada temperatur 60°C selama 55 menit, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit, kemudian 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. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrometri Genesys-20 pada panjang gelombang maksimum.

Amobilisasi xilanase dengan kitosan-natrium tripolifosfat

Penentuan konsentrasi kitosan optimum

Sebanyak 1 ml larutan enzim hasil pemurnian dicampurkan pada berbagai perlakuan kitosan (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 %) sebanyak 4 mL. Larutan campuran masing-masing dimasukkan ke dalam *syringe* dan ditekan sehingga campuran menetes ke dalam wadah berisi 10 mL larutan tripolifosfat 3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan tripolifosfat 3% selama 75 menit. Enzim amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

Penentuan konsentrasi enzim xilanase optimum

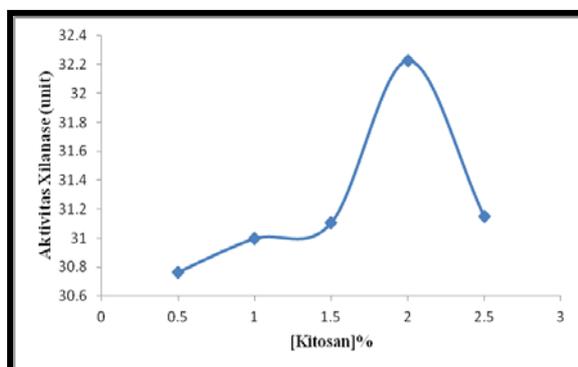
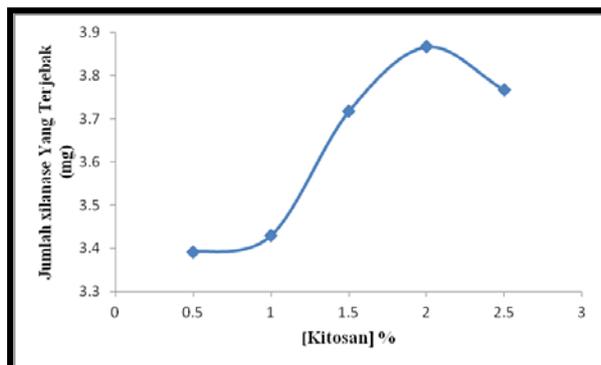
Amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi optimum kitosan yang hasilnya didapatkan dari tahapan sebelumnya. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang dipipet dan ditambahkan larutan buffer asetat pH 5 hingga volume total menjadi 5 mL. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi kitosan optimum amobilisasi xilanase

Penentuan konsentrasi kitosan optimum ditentukan dengan cara menghitung jumlah xilanase yang terjebak dan aktivitasnya. Dari hasil penelitian ini terjadi peningkatan aktivitas (Gambar 1 (a)) dan jumlah xilanase yang terjebak dalam kitosan (Gambar 1 (b)) sampai konsentrasi kitosan sebesar 2,0%, sedangkan pada konsentrasi kitosan 2,5% terjadi penurunan. Pada konsentrasi kitosan 2,0% jumlah xilanase yang terjebak dalam kitosan-tripolifosfat yaitu sebesar 3.867 mg, sedangkan nilai aktivitas xilanasenya sebesar 32,226 unit. Semakin besar konsentrasi kitosan maka ikatan silang yang terjadi juga akan semakin besar, sehingga kerapatan pori-porinya juga akan semakin besar. Kerapatan pori ini akan mencegah xilanase yang terjebak untuk lepas kembali, selain itu kerapatan pori mempengaruhi kemampuan sisi aktif xilanase untuk bergerak bebas dan berikatan dengan

substrat. Untuk penurunan pada konsentrasi kitosan 2,5% dimungkinkan ada xilanase yang terlepas dari matriks karena proses penjebakan telah mencapai titik optimum.



(a)

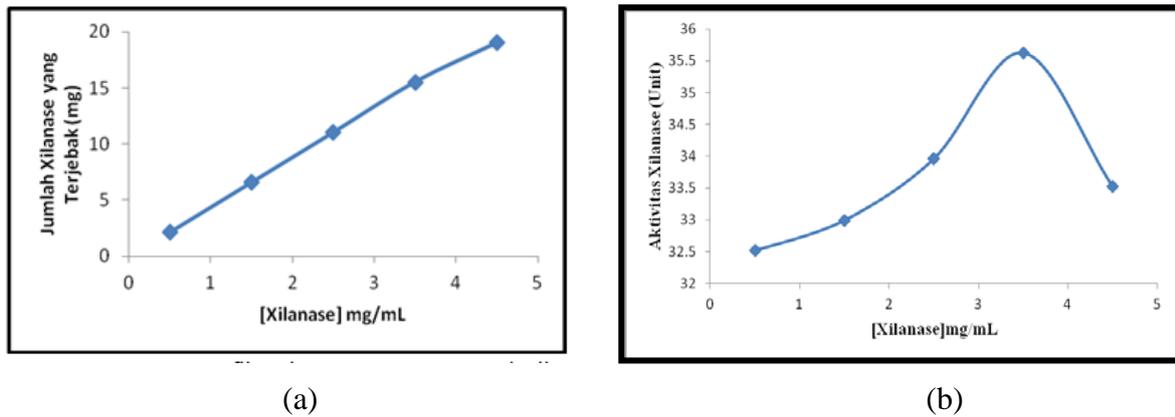
(b)

Gambar 1. (a) Grafik hubungan antara konsentrasi kitosan terhadap jumlah xilanase yang terjebak (b) Grafik hubungan antara konsentrasi kitosan terhadap aktivitas xilanase amobil

Penentuan konsentrasi xilanase optimum amobilisasi xilanase

Penentuan konsentrasi xilanase amobil optimum didapatkan dari konsentrasi kitosan optimum, dimana konsentrasi kitosan optimum tersebut digunakan untuk mencari konsentrasi xilanase optimum. Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 2,0%. Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi xilanase maka jumlah xilanase yang terjebak dalam kitosan-tripolifosfat juga semakin besar, pada konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL jumlah xilanase yang terjebak dalam kitosan-tripolifosfat adalah sebesar 18,942 mg. Sehingga konsentrasi xilanase maksimum berada pada konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL (Gambar 2 (a)). Peningkatan konsentrasi xilanase akan mengakibatkan meningkatnya jumlah xilanase yang terjebak, sedangkan aktivitas xilanase akan semakin meningkat sampai konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dan terjadi penurunan pada konsentrasi xilanase 4,5 mg/mL. Hal ini dikarenakan adanya enzim xilanase yang sudah terjebak dalam kitosan yang disebabkan proses penjebakan suatu enzim tersebut telah mencapai titik yang optimum. Aktivitas xilanase terbesar berada

pada konsentrasi xilanase sebesar 3,5 mg/mL dengan aktivitas xilanasenya sebesar 35,524 unit (Gambar 2 (b)).



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

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kitosan dan konsentrasi xilanase berpengaruh terhadap jumlah xilanase yang terjebak dalam kitosan dan aktivitas xilanasenya. Konsentrasi kitosan optimum berada pada konsentrasi kitosan sebesar 2,0%, sedangkan konsentrasi xilanase optimum berada pada konsentrasi xilanase sebesar 4,5%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan yang diberikan oleh berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak Drs. Sutrisno, M.Si, dan bapak Drs. Suratmo, MSc selaku dosen pembimbing I dan II, kedua orang tua dan keluarga serta teman teman dan semua pihak yang mendukung selama penyusunan skripsi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Haltrich, D., B. Nidetzky, K.D. Kulbe, W. Steiner and S. Zupaneie, 1996, **Production of Fungal Xylanase**, <http://www.psu.ac.th/Presidentoffice>, tanggal akses 11 Januari 2013.
2. Niken, 2009, **Mengenal Lebih Jelas Trichoderma viride**, <http://www.ayyaa.multiply.com>, diakses tanggal 11 Januari 2013.

3. Ferdiansyah, V., 2005, **Pemanfaatan Kitosan dari Cangkang Udang Sebagai Matriks Penyangga Pada Imobilisasi Enzim Protease**, Skripsi, Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
4. Rijal, A.S., Aga M., dan Retno S., 2010, **Pengaruh pH Larutan Tripolifosfat Terhadap Karakteristik Fisik Profil Pelepasan Mikromolekul Teofilin-Chitosan**, Majalah Farmasi Airlangga, Vol. 8 No.2.
5. Fwu, L. M., Shin S. S., Chin T. C., dan Juin Y. L., 2002, **Adsorption of Indhomethacin onto Chemically Modified Chitosan**, Polymer, Vol. 43, 757-765.