

OPTIMASI AMOBILISASI XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGGUNAKAN MATRIKS BENTONIT

Mardiana, Sutrisno*, Chanif Mahdi

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

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu pengocokan optimum, konsentrasi xilanase optimum, serta efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil. Kadar dan aktivitas xilanase amobil ditentukan pada variasi waktu pengocokan (1, 2, 3, 4, 5) jam pada 0,1 g bentonit teraktivasi H_2SO_4 . Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Spektrofotometri menggunakan reagen Biuret sedangkan aktivitas xilanase ditentukan dengan mengukur kadar xilosa yang dihasilkan selama reaksi enzimatis secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS. Xilanase yang digunakan untuk amobilisasi mempunyai kadar protein 0,366 mg/mL dengan aktivitas 8,449 unit. Penentuan efisiensi xilanase amobil dilakukan dengan uji aktivitas sebanyak lima kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi xilanase dicapai pada waktu pengocokan 3 jam dengan jumlah xilanase teradsorpsi 0,378 mg/0,1 g bentonit dan aktivitas 10,245 unit. Sedangkan pada variasi konsentrasi didapatkan konsentrasi xilanase 0,261 ppm dan aktivitas 14,528 unit ($P < 0,01$). Xilanase amobil dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas sisa sebesar 51,20%.

Kata Kunci : aktivitas, *Trichoderma viride*, Bentonit teraktivasi H_2SO_4 , Xilanase

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the shaking time, optimum concentration of xilanase, and the reversibility efficiency of immobilized xilanase. In this research, the shaking time (1, 2, 3, 4, 5) hours and at 0.1 g of H_2SO_4 activated bentonit. Determination of protein content is done by using Spectrofotometry method and Biuret reagent, whereas xilosa amount used DNS reagent. Initial protein content of free enzyme was 0,366 mg/mL and the activity was 8.449 units. Determination of the efficiency of immobilization xilanase activity assay performed with five repetitions. The results showed that the optimum condition of immobilization xilanase is achieved on shaking time 3 hours with yielding in 0.378 mg/0,1g bentonit within activity 10.245 units. Variation of xilanase concentration result showed 0.261 ppm and within activity 14.528 units ($P < 0,01$). Immobilized xilanase can be use until five repetition with 51.20% activity.

Keywords : activities, *Trichoderma viride*, H_2SO_4 -activated, bentonit, xilanase.

PENDAHULUAN

Pada tahun terakhir ini kebutuhan terhadap enzim xilanase mengalami peningkatan. Enzim xilanase sering digunakan dalam proses *bleaching* pada pulp [1]. Selain itu dalam

bidang pangan enzim xilanase juga banyak digunakan diantaranya untuk produksi pemanis rendah kalori, pencerah warna jus, *wine* dan ekstraksi minyak tanaman [2]. Menurut Hatrich [3], xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme yaitu bakteri, ragi, dan jamur. Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim xilanase adalah *Trichoderma viride*. Meskipun enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada temperatur yang lebih tinggi dibanding jamur, namun aktifitas xilanase dari golongan jamur jauh lebih tinggi dari bakteri [4]. Sifat xilanase bebas adalah tidak stabil dan sulit untuk dipakai secara berulang, sehingga perlu digunakan metode amobilisasi [5].

Amobilisasi enzim merupakan suatu usaha yang bertujuan untuk memisahkan antara enzim dengan produk selama reaksi dengan menggunakan sistem dua fase, sehingga antara fase yang mengandung enzim dan fase lain yang mengandung produk tidak saling mengkontaminasi [5]. Metode- metode amobilisasi yang telah banyak dikembangkan adalah crosslinking, pengikatan pada carrier (adsorpsi fisik, ikatan ion, ikatan kovalen), dan penjebakan secara fisik [6]. Pada penelitian ini metode amobilisasi yang digunakan adalah metode secara adsorpsi karena metode ini memiliki kelebihan yaitu enzim hanya menempel pada permukaan sehingga enzim dengan enzim bebasnya tidak mengalami perubahan konformasi dan aktivitas yang dihasilkan tidak jauh berbeda, dimana jumlah enzim yang teradsorpsi sangat dipengaruhi oleh lama pengocokan, dimana lama pengocokan mempengaruhi jumlah xilanase yang teradsorpsi [7]. Pada penelitian ini digunakan bentonit sebagai matriks karena bentonit mempunyai luas permukaan yang sangat besar dan mempunyai kemampuan adsorpsi yang tinggi [8].

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang dan klobot jagung yang diperoleh dari Pulosari Malang. Bahan kimia yang digunakan adalah bahan yang memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a.) antara lain dekstrosa, CH_3COOH , CH_3COONa , asam oleat, KH_2PO_4 , CaCl_2 , H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na tartrat, CuCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, , HCl , K_2HPO_4 , DNS (asam dinitrosalisilat), kentang, pepton, tepung agar, xilan, tepung klobot jagung, dan akuades.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, pengaduk kaca, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, bunsen burner, botol semprot, pipet tetes, erlenmeyer 100 mL dan 250 mL, gelas arloji, labu ukur 10 mL dan 100 mL, sentrifuse dingin (Joan MR 1889), jarum ose, inkubator (Heraeus Type B 5042), magnetik stirer, neraca analitik mettler (Bosch PE 620), pH meter (inolab WTW), kuvet, penangas air (Memmert W 200), autoklaf (All American Model 20x0), shaker (Edmund Buhler SM 252413) ayakan 100, 120, dan 150 mesh, pengaduk magnet, oven, alumunium foil, kapas steril, pH universal, kertas saring Whatman no.40, spectronic 20, kuvet.

Prosedur produksi dan isolasi xilanase

Produksi xilanase dilakukan dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 13 mL larutan garam basal, 5 g substrat klobot jagung (rasio substrat: air = 1 : 3) ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya campuran disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C ,tekanan 15 psi dan waktu 15 menit, kemudian ditambahkan secara aseptis 2 mL inokulum *Trichoderma viride*, diinkubasi dalam shaker hingga mencapai awal fase stasioner (jam ke-60) pada temperatur kamar . Media produksi yang sudah diinkubasi ditambah 10 mL larutan buffer asetat pH 5, sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit pada temperatur 4 °C dan supernatan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

Amobilisasi Xilanase dengan Matriks Bentonit

Preparasi matriks sebagai media amobilisasi

Bentonit digerus dan diayak menggunakan ayakan berukuran 100 mesh, padatan yang lolos kemudian diayak dengan ayakan 150 mesh. Padatan yang tertahan pada ayakan 150 mesh digunakan sebagai matriks amobilisasi, dicuci dengan akuades, disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 40 dan dikeringkan pada temperatur 105°C. Bentonit hasil preparasi ditimbang 4 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, selanjutnya bentonit direndam dalam 16 mL H₂SO₄ 2M pada temperatur ruang dan dikocok dengan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama empat jam. Bentonit hasil perendaman disaring dengan kertas *Whatman* no. 40. Endapan yang tersaring dicuci dengan akuades sampai pH filtrat netral. Bentonit dikeringkan pada temperatur 105°C hingga berat konstan.

Penentuan Waktu Pengocokan Optimum Amobilisasi Xilanase

Xilanase hasil pemurnian dipipet 2 mL dan dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 mL, lalu ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke

dalam erlenmeyer 50 mL yang berisi 0,1 gram bentonit teraktivasi H_2SO_4 . Selanjutnya dicuci dengan akuades dan diuapkan. Campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama (1, 2, 3, 4, 5) jam untuk mengetahui waktu pengocokan optimum dari enzim yang teradsorpsi pada bentonit. Campuran disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 40 sehingga terpisah antara filtrat dengan xilanase amobil. Filtrat diuji kadar enzimnya dan xilanase amobil diuji aktivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Matriks Bentonit

Bentonit yang digunakan adalah bentonit jenis Na-bentonit. Langkah awal yang dilakukan adalah preparasi yaitu pengayakan dengan ayakan yang memiliki ukuran 100-150 mesh. Pengayakan dilakukan bertujuan untuk memperkecil kisaran ukuran partikel adsorben. Beda ukuran ayakan yang digunakan ini diharapkan akan memperoleh partikel dengan beda luas permukaan yang kecil, sehingga kemampuan adsorpsi dari tiap partikel relatif sama. Bentonit hasil pengayakan ditimbang sebanyak 4 gram, selanjutnya diaktivasi menggunakan larutan H_2SO_4 2M. Hasil aktivasi menggunakan larutan H_2SO_4 2M diperoleh bentonit sebanyak 3,2 gram yang akan digunakan untuk uji selanjutnya pada proses amobilisasi enzim. Aktivasi bentonit menggunakan larutan H_2SO_4 2M bertujuan untuk mempertukarkan ion-ion alkali Na^+ dengan H^+ sehingga luas permukaan dari bentonit semakin besar karena ukuran H^+ lebih kecil dari Na^+ sehingga pori dapat mengadsorpsi adsorbat lebih banyak.

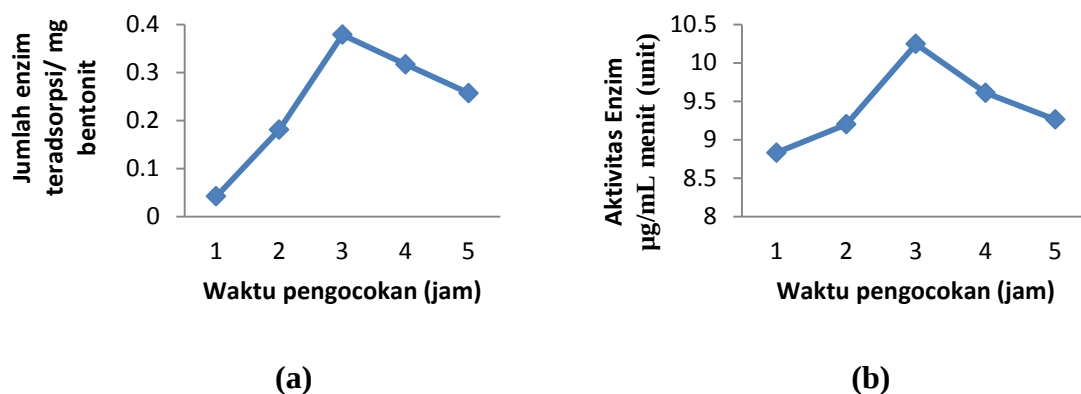
Penentuan Variasi waktu pengocokan enzim amobil

Waktu pengocokan adalah waktu yang dibutuhkan oleh suatu enzim untuk dapat berikatan dengan matriks yang digunakan dimana jumlah enzim yang teradsorpsi sangat dipengaruhi oleh lama pengocokan, tanpa adanya pengocokan maka proses adsorpsi akan berjalan lambat. Peningkatan waktu pengocokan akan meningkatkan massa xilanase teradsorpsi hingga tercapai kesetimbangan. Penentuan waktu pengocokan dilakukan pada variasi waktu 1, 2, 3, 4 dan 5 jam. Dari grafik hubungan antara waktu pengocokan diketahui bahwa waktu pengocokan optimum selama tiga jam, dengan jumlah xilanase teradsorpsi sebanyak 0,378 mg yang ditunjukkan pada Gambar 1 (a).

Dari grafik dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan jumlah xilanase teradsorpsi secara signifikan seiring dengan penambahan waktu amobilisasi dari waktu satu jam hingga tiga jam. Hal ini dimungkinkan karena semakin lama waktu pengocokan yang diberikan maka interaksi

antara bentonit dan xilanase semakin tinggi, sehingga xilanase dapat menempel pada permukaan bentonit. Pada waktu tiga jam merupakan waktu optimum dengan jumlah xilanase teradsorpsi maksimum sebesar 0,378 mg. Kemudian terjadi penurunan signifikan dari xilanase yang teradsorpsi pada waktu pengocokan empat hingga lima jam.

Aktivitas xilanase ditentukan dengan menghitung absorbansi dan mengkonversi ke dalam persamaan unit aktivitas. Berdasarkan grafik pada Gambar 1. (b) terjadi kenaikan aktivitas enzim pada lama pengocokan satu hingga tiga jam. Sehingga dapat diketahui bahwa aktivitas optimumnya pada waktu tiga jam sebesar 10,245 unit. Aktivitas yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah xilanase teradsorpsi.



Gambar 1. (a) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap jumlah enzim teradsorpsi
(b) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap aktivitas enzim

Kesimpulan

Waktu pengocokan optimum pada amobilisasi xilanase menggunakan matriks Na-bentonit teraktivasi H_2SO_4 dicapai pada jam ke-3 dengan jumlah xilanase teradsorpsi sebesar 0,378 mg bentonit dan aktivitas optimum sebesar 10,245 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, Buletin Agrobio 5 (1) 29-35.
2. Muawanah, Anna., 2006, **Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Bagasse Tebu**, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

3. Hatrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupaneie, S., 1996, **Production of Fungal xylanases**, <http://www2.psu.ac.th/PresidentOffice/EduService/journal/27-2-pdf/10xylanase.pdf>, diakses tanggal 10 Februari 2014.
4. Budiman, A., dan Setyawan, 2011, **Pengaruh konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi, dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi**, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
5. Chaplin M.F., dan Bucke C., 1990, **Enzyme Technology**, Cambridge University Press, Cambridge.
6. Susanto, H., Budiyono B., Sumantri I., dan Aryanti N., 2003, **Amobilisasi Enzim dengan Menggunakan Membran Mikrofiltrasi**, Laporan Kegiatan Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
7. Sediawan, W.B., 2000, **Berbagi Teknologi Proses Pemisahan**, Prosiding, Presentasi Ilmiah Daur Ulang Bahan Bakar Nuklir V P2TBDU dan P2BGN, BATAN.
8. Puslitbang, T., 2005, **Bentonit Alam Terpillar Sebagai Material Katalis**, Direktorat Pembinaan Pengusahaan Mineral dan Batubara, Jakarta.