

## **AMOBILISASI XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGGUNAKAN MATRIKS KITOSAN-TRIPOLIFOSFAT**

### **(IMMOBILIZATION OF XYLANASE FROM *Trichoderma viride* USING MATRIX CHITOSAN-TRIPOLIPHOSPHAT**

**Sutrisno\*, Anna Roosdiana, Suratmo, Ilmiyati Sa'idah**  
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang

\*E-mail : tris\_mc@ub.ac.id

#### **ABSTRACT**

*Xylanase is an enzyme that catalyzes the hydrolyzed reaction of xylan into xylose. Free enzyme can be used once only, therefore enzyme immobilization is needed. The aims of this research were to determine the optimum conditions of immobilized xylanase in chitosan-tripolyphosphate matrix and its reuse. Immobilization of xylanase were carried out at various chitosan concentration (0.5 – 4.5)% (w/v) and various xylanase concentration (0.5 to 4.5 mg/mL), at room temperature and 3 % sodium tripolyphosphate solution. The results showed that optimum conditions of xilanase immobilization in chitosan-tripolyphosphate was performed at 2.0% chitosan concentration and 3.5 mg/mL of xilanase concentration. The use of chitosan-tripolyphosphate were produced trapped xilanase of 1.90 mg with the activity 35.628 unit. Furthermore, it was also showed that the reuse efficiency of immobilized enzyme were 5 times with the activity of 63.60%*

*Keywords: trap method, activity, xylan, xylose*

#### **ABSTRAK**

*Xilanase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa. Enzim bebas hanya dapat digunakan sekali, oleh karena itu perlu dibuat dalam bentuk amobil. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase menggunakan matriks kitosan-tripolifosfat serta penggunaan ulang xilanase amobil. Amobilisasi xilanase dilakukan pada variasi konsentrasi kitosan (0,5 - 2,5) % (w/v), variasi konsentrasi xilanase (0,5 - 4,5 mg/mL) dan konsentrasi natrium tripolifosfat 3%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi xilanase pada matriks kitosan-tripolifosfat tercapai pada konsentrasi kitosan 2,0 % dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase yang terjebak pada matriks kitosan-tripolifosfat 1,90 mg dan aktivitas 35,628 unit. Enzim amobil dapat digunakan secara berulang selama lima kali ulangan dengan aktivitas sisa 63,60 %.*

*Kata kunci: metode jebakan, aktivitas, xilan, xilosa*

## 1. PENDAHULUAN

Xilanase adalah enzim yang mampu meningkatkan laju reaksi hidrolisis xilan menjadi gula pereduksi, xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase memiliki peranan penting dalam industri, seperti industri kertas, pakan ternak, makanan dan minuman. Penggunaan xilanase pada industri kertas saat *prebleaching pulp* dapat meningkatkan kecerahan kertas dan dapat menurunkan penggunaan bahan kimia berbahaya seperti klorin dan klorin dioksida sampai dengan 50% [1]

Penggunaan enzim bebas untuk mengkatalisis reaksi memerlukan biaya tinggi, karena enzim bebas tidak stabil dan sulit dipisahkan dari substrat dan produknya, sehingga enzim bebas hanya dapat dipakai untuk satu kali reaksi [2]. Hal ini dapat diatasi dengan cara amobilisasi enzim. Penggunaan enzim amobil sangat menguntungkan karena enzim amobil dapat dengan mudah dipisahkan dari campuran reaksi dan dapat digunakan secara berulang, sehingga biaya produksi rendah [3]

Salah satu metode amobilisasi yang mudah pelaksanaannya adalah metode penjebakan enzim dengan menggunakan kitosan yang diikat silangkan menggunakan ion tripolifosfat. Kitosan dapat digunakan sebagai matrik pada amobilisasi enzim karena kitosan mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dan hidroksil (-OH). Kitosan sebagai media amobilisasi enzim dapat diubah strukturnya oleh adanya senyawa pengikat silang[4]. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat. Dengan menambahkan natrium tripolifosfat maka ukuran pori dan porositas kitosan dapat berubah, sehingga substrat masuk dan produk keluar dapat terjadi lebih mudah.[5]

Dalam keadaan amobil laju reaksi enzimatik dipengaruhi oleh jumlah enzim yang terlibat dan kemudahan reaksi terjadi. Semakin banyak jumlah enzim yang terlibat dalam reaksi maka laju reaksi akan semakin tinggi, namun bila jumlah enzim berlebih justru akan menurunkan laju reaksi. Jumlah enzim yang teramobilisasi dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan dan konsentrasi enzim yang digunakan saat amobilisasi. Pada penelitian akan dipelajari pengaruh konsentrasi kitosan dan konsentrasi xilanase terhadap amobilisasi xilanase dari *T. Viride*.

## 2. METODE PENELITIAN

*T. viride* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti pepton, tepung agar, xilan, kasein, tepung klobot jagung, dan kentang (pasar lokal). Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain asam oleat, dextrosa, asam asetat glasial, CH<sub>3</sub>COONa, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, HCl, BaCl<sub>2</sub>, NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, glukosa anhidrat, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, kristalin fenol, asam dinitrosalisilat, NaOH, kitosan, dan natrium tripolifosfat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), 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, ayakan 120 mesh, 150 mesh, pengaduk magnet, oven, alumunium foil, kapas steril, kantong selofan, pH universal, dan kertas saring *Whatman* no.40.

### **Produksi xilanase**

*T. viride* yang telah ditumbuhkan dalam media padat agar miring selama 144 jam (pH 5 dan 30°C) disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi diambil sebanyak 2 mL dan ditanam pada 13 mL media cair steril. Diinkubasi dengan shaker kecepatan putar 150 rpm pada temperatur ruang selama 36 jam. Inokulum *T. viride* ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar, digoyang dengan kecepatan 150 rpm hingga jam ke-60. Media hasil fermentasi ditambahkan 15 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, temperatur 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar xilanase dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40-80%, dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan. Xilanase hasil pemurnian diuji kadar protein dan aktivitasnya.

### **Uji kadar protein**

Larutan enzim sebanyak 2 mL ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum kasein (550 nm). Kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai serapan pada persamaan regresi kurva baku kasein yang telah dibuat sebelumnya.

### **Penentuan aktivitas xilanase [6]**

Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL substrat xilan 1% (b/v) yang telah diinkubasi pada temperatur 60°C selama 15 menit dengan 1 mL enzim, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran diinkubasi pada temperatur 60°C selama 55 menit selanjutnya dipanaskan dalam penangas air mendidih

selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan air mengalir. Larutan yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 495 nm. Kadar gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi ditentukan dengan cara mengplotkan serapan yang diperoleh ke dalam persamaan regresi kurva baku gula pereduksi yang telah dibuat sebelumnya.

Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas amobil diartikan sebagai 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per gram enzim amobil.

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

#### ***Penentuan konsentrasi kitosan optimum***

Sebanyak 1 ml larutan enzim hasil pemurnian dicampurkan pada berbagai konsentrasi 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 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 hingga volume total menjadi 5 mL. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

#### ***Efisiensi penggunaan xilanase amobil***

Xilanase amobil yang dihasilkan pada kondisi optimum diuji aktivitasnya selama lima kali penggunaan. Xilanase amobil yang telah digunakan pada uji yang pertama disaring, endapannya digunakan untuk pengujian yang kedua dan seterusnya. Xilanase amobil masih efisien digunakan apabila aktivitasnya menunjukkan hasil diatas 50%

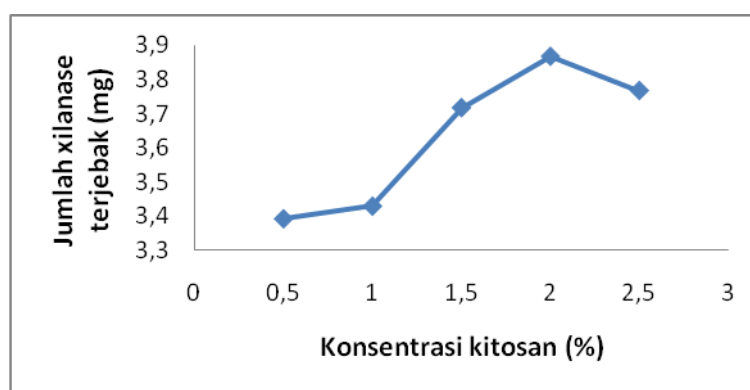
### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### *Amobilisasi Xilanase dalam Kitosan-Tripolifosfat*

##### *Penentuan konsentrasi kitosan optimum*

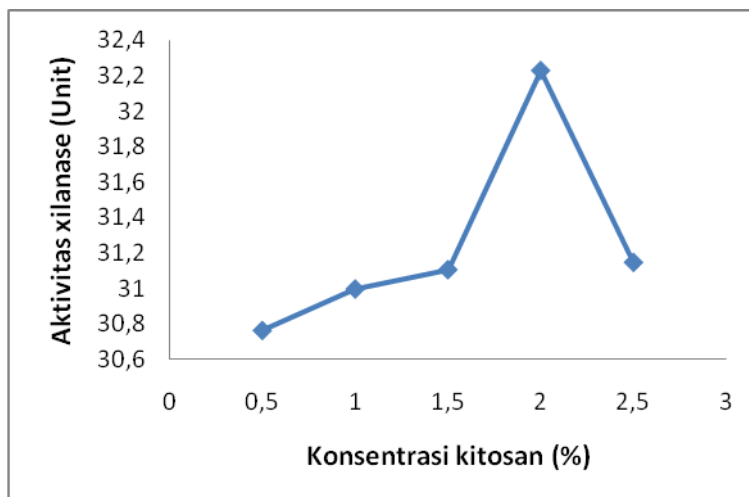
Untuk meningkatkan efisiensi penggunaan xilanase, enzim diamobilkan dengan cara dijebak dalam matrik kitosan-tripolifosfat, sehingga enzim dapat digunakan sampai beberapa kali ulangan. Kitosan dapat digunakan sebagai matrik amobilisasi, setelah kitosan membentuk jebakan berupa manik-manik yang terbentuk karena ikatan silang dengan ion tripolifosfat. Pelarutan kitosan dalam asam asetat akan menyebabkan gugus amino terprotonasi menjadi ion ammonium ( $-NH_3^+$ ) [7], dan garam tripolifosfat dalam air akan terhidrolisis membentuk ion  $H_3P_3O_{10}^{2-}$ . [8] Ikatan silang antara kedua ion ini akan menghasilkan manik-manik, dengan mencampurkan larutan kitosan yang mengandung enzim kedalam larutan natrium tripolifosfat maka enzim akan terjebak di dalam manik-manik yang terbentuk.

Konsentrasi kitosan optimum adalah konsentrasi pada saat jumlah enzim yang terjebak maksimum dan atau enzim amobil menunjukkan aktivitas maksimum. Konsentrasi kitosan optimum ditentukan dengan cara mengukur jumlah enzim yang terjebak dan mengukur aktivitas enzim amobil yang terbentuk pada variasi konsentrasi kitosan. Data yang diperoleh ditampilkan pada gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 1. Jumlah xilanase terjebak pada variasi konsentrasi kitosan

Berdasarkan gambar 1 diketahui bahwa terjadi peningkatan jumlah xilanase yang terjebak dalam matrik kitosan sampai konsentrasi kitosan sebesar 2,0%, sedangkan pada konsentrasi kitosan 2,5% terjadi penurunan. Semakin besar konsentrasi kitosan maka ikatan silang yang terjadi akan menghasilkan matrik dengan pori-pori semakin besar, sehingga jumlah enzim yang terjebak semakin banyak, namun apabila konsentrasi kitosan dibuat lebih besar maka matrik yang terbentuk akan mempunyai pori-pori dengan ukuran lebih besar dari ukuran molekul enzim, sehingga enzim dapat keluar dari matrik.

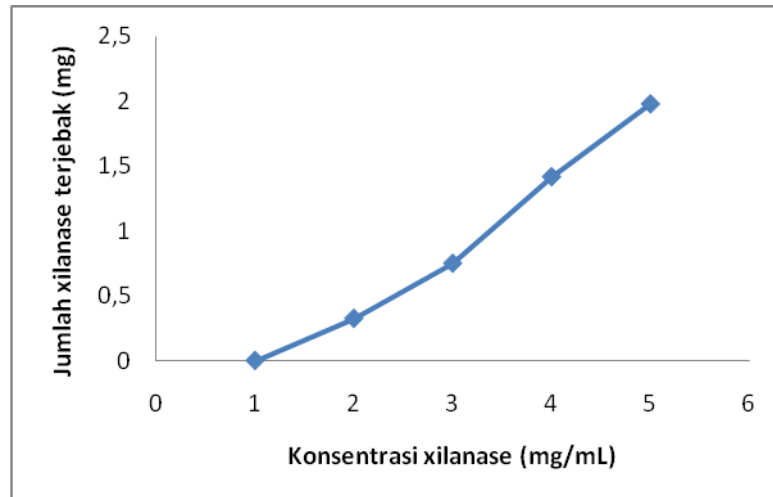


Gambar 2. Aktivitas xilanase amobil pada variasi konsentrasi kitosan

Aktivitas enzim yang diamobilkan dengan cara penjebakan dipengaruhi oleh jumlah enzim dan kemudahan reaksi terjadi. Semakin banyak enzim yang terjebak maka aktivitas enzim semakin tinggi, namun bila enzim yang terjebak lebih banyak dan matrik mempunyai ukuran yang sama, bertambahnya enzim yang terjebak justru akan menurunkan aktivitas enzim. Oleh karena itu pada penelitian ini diamati juga aktivitas xilanase pada variasi konsentrasi kitosan. Berdasarkan gambar 2 diketahui bahwa terjadi peningkatan aktivitas xilanase sampai konsentrasi kitosan sebesar 2,0%, sedangkan pada konsentrasi kitosan 2,5% terjadi penurunan. Gambar 2 mempunyai profil sama dengan gambar 1, ini berarti bahwa ukuran pori-pori matrik masih memungkinkan untuk terjadinya reaksi. Dari data yang diperoleh dapat diketahui bahwa kondisi optimum proses amobilisasi terjadi pada konsentrasi kitosan 2,0% dengan jumlah xilanase yang terjebak sebesar 3.867 mg dan aktivitas xilanase amobil sebesar 32,226 unit.

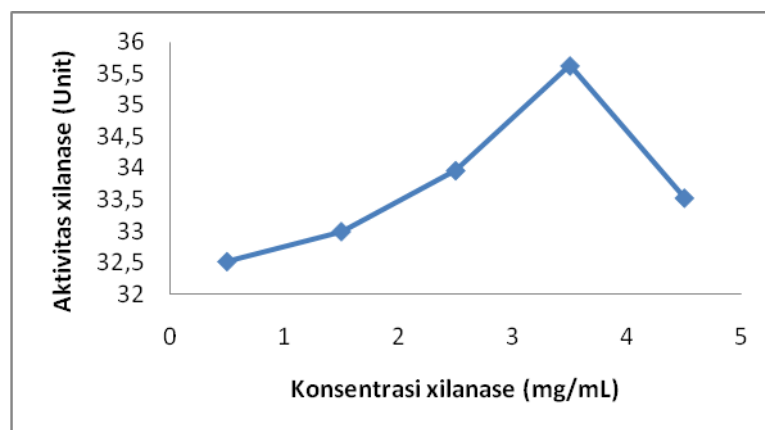
#### ***Penentuan Konsentrasi Xilanase Optimum***

Konsentrasi xilanase optimum ditentukan dengan cara mengukur jumlah xilanase yang terjebak dan aktivitas xilanase amobil pada variasi konsentrasi xilanase, pada konsentrasi kitosan optimum, (2%). Data yang diperoleh disajikan pada gambar 3 dan gambar 4.



Gambar 3. Jumlah xilanase terjebak pada variasi konsentrasi xilanase

Berdasarkan gambar 3, diketahui bahwa pada kisaran konsentrasi xilanase yang diamati (0,5-4,5 mg/mL), semakin tinggi konsentrasi xilanase maka jumlah xilanase yang terjebak di dalam matrik semakin banyak. Sedangkan dari gambar 2. Diketahui bahwa pada kisaran konsentrasi xilanase 0,5 – 3,5 mg/mL, terjadi kenaikan aktivitas xilanase amobil dengan naiknya konsentrasi xilanase, namun pada konsentrasi xilanase yang lebih tinggi, aktivitas xilanase amobil justru menunjukkan penurunan.



Gambar 4. Aktivitas xilanase amobil pada variasi konsentrasi xilanase

Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi xilanase diatas 3,5 mg/mL jumlah xilanase yang terjebak terlalu banyak. Matrik menjadi penuh dengan enzim dan tidak ada tempat lagi bagi substrat. Keadaan ini akan menghambat terjadinya reaksi enzimatik, sehingga aktivitas xilanase amobil turun. Konsentrasi xilanase optimum adalah konsentrasi pada saat jumlah enzim yang terjebak maksimum dan atau enzim amobil menunjukkan aktivitas maksimum. Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa konsentrasi

xilanase optimum terjadi pada konsentrasi 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase terjebak 1,98 mg dan aktivitas xilanase amobil 35,524 unit.

### **Penentuan Efisiensi Pemakaian Ulang xilanase Amobil**

Salah satu tujuan amobilisasi enzim adalah agar enzim dapat digunakan beberapa kali reaksi. Oleh karena itu pada penelitian ini diamati efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil, dengan cara mengukur aktivitas xilanase amobil yang digunakan secara berulang dengan lima kali ulangan. Hasil yang diperoleh disajikan pada tabel berikut:

**Tabel:** Data Efisiensi Pemakaian Ulang Xilanase Amobil

<b>Pemakaian</b>	<b>Aktivitas Rata-Rata</b>	<b>%</b>
I	33.592	100
II	31.475	93.69
III	26.502	78.89
IV	25.587	76.14
V	21.366	63.60

Dari tabel menunjukkan bahwa xilanase amobil mengalami penurunan aktivitas untuk setiap kali ulangan. Penurunan aktivitas ini kemungkinan disebabkan oleh rusaknya enzim selama perlakuan atau karena rusaknya pori-pori matrik sehingga enzim mudah lepas. Namun demikian amobilisasi xilanase menggunakan matrik kitosan-tripolifosfat dikatakan mempunyai efisiensi pemakaian ulang cukup tinggi, karena dapat digunakan sebanyak lima kali ulangan dengan aktivitas sisa di atas 50%, yaitu sebesar 63,60% [10]

### **4. KESIMPULAN**

Konsentrasi kitosan dan konsentrasi xilanase berpengaruh terhadap jumlah xilanase yang terjebak dan aktivitas xilanase amobil. Kondisi optimum amobilisasi xilanase pada kitosan tripolifosfat dicapai pada konsentrasi kitosan 2% dan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dengan jumlah xilanase terjebak 1,98 mg dan aktivitas 35,524 unit. Xilanase yang diamobilkan dalam matrik kitosan-tripolifosfat mempunyai efisiensi penggunaan ulang xilanase amobil cukup tinggi dengan aktivitas sisa 63,60% setelah digunakan selama 5 kali ulangan.



## 5. PUSTAKA

- [1] Sathiyavathi, M. dan Parvatham, R., Industrial Application Of Xylanase In The Crude Enzyme Extract From *Trichoderma Sp.* MS 2010, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2013, Vol. 6
- [2] Amalia, A. dan Nawfa R. Amobilisasi Bromelin dengan Menggunakan Kitosan sebagai Matriks Pendukung. *Prosiding Kimia FMIPA*, Surabaya. 2009.
- [3] Esawy, M. A., Mahmoud D. A. R. dan Fattah A. F. A. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a Levansucrase and Some Studies on Its Properties, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2008. No. 2, Vol. 25, 237-246
- [4] Krajewska, B. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations : A Review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004. Vol. 35 ,126-139.
- [5] Fwu, L. M., Shin S. S., Chin T. C., dan Juin Y. L. Adsorption of Indomethacin onto Chemically Modified Chitosan. *Polymer*. 2002. Vol. 43, 757-765.
- [6] Isil, S. and N. Aksoz. Xylanase Production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources. *Brazilian Journal of Biology and Technology*. 2005; 43(1) 37-40 (2005) UDC 582.282:577.152.321 ISSN 1330-9862.
- [7] Budiman, A., dan Setyawan, S. Pengaruh Kosentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xilanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi. 2012. [http://eprints.undip.ac.id/3650/1/Makalah\\_Penelitian\\_Albar,Sigit\\_pdf.pdf](http://eprints.undip.ac.id/3650/1/Makalah_Penelitian_Albar,Sigit_pdf.pdf), diakses tanggal 2 Maret 2013.
- [8] Astriyani, F. Preparasi Kitosan-Tripolifosfat Sebagai Eksipien dalam Sediaan Tablet Enterik. Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Sarjana Farmasi Universitas Indonesia, Depok. 2011.
- [9] Haneff. Amobilisasi Enzim. 2011 <http://id.shvoong.com/exact-sciences/biochemistry/2175369-amobilisasi-enzim/>, diakses tanggal 18 Februari 2013.
- [10] Roosdiana, A., Setianingsih E., Mardiana D., dan Suratmo. Characterization of Immobilized Lipase in Aluminosilicate for Lactosyl Palmitate Synthesis, *Indonesian Journal of Chemistry*, 2009; 9(2): 201-205