

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Isolasi Xilanase dari *Trichoderma viride*

Xilanase adalah enzim yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilanase merupakan enzim yang bersifat induktif sehingga membutuhkan induser untuk menghasilkan xilanase. Induser yang digunakan untuk penelitian ini adalah klobot jagung karena pada klobot jagung mengandung hemiselulosa sebesar 32%. Produksi xilanase diawali dengan menumbuhkan jamur *Trichoderma viride* pada media cair selama 36 jam atau sampai pertengahan fasa logaritma. Kemudian produksi xilanase pada fasa akhir logaritma atau fasa awal stasioner (60 jam).

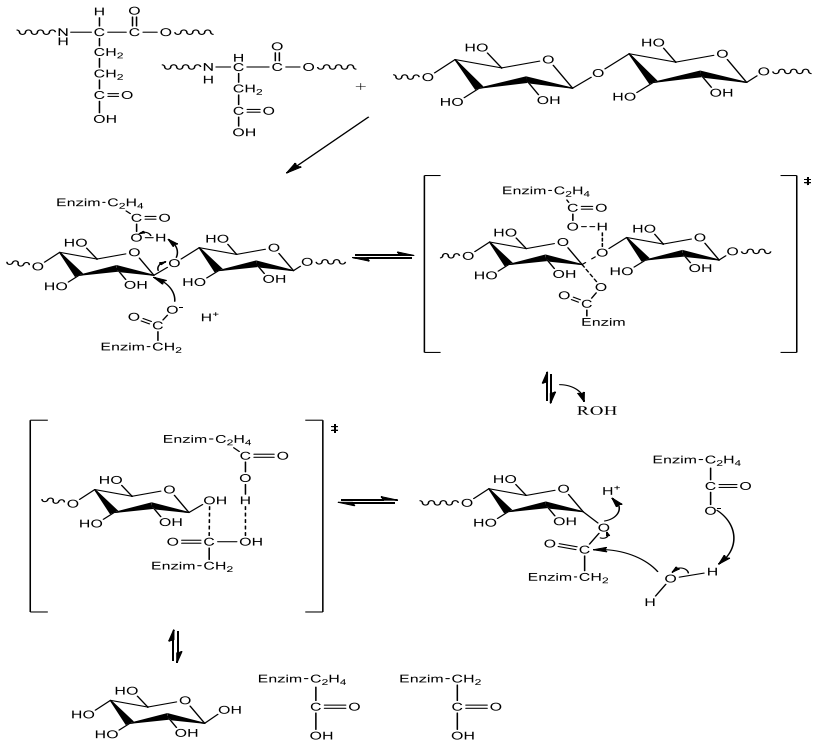
Xilanase merupakan enzim ekstraseluler, sehingga untuk memisahkan enzim dari sel menggunakan metode sentrifugasi pada suhu rendah. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4 °C untuk mencegah terjadinya denaturasi. Hasil sentrifugasi diperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar xilanase.

Fraksinasi menggunakan prinsip *salting out*, yaitu menurunkan kelarutan xilanase dalam larutan garam. Garam yang digunakan yaitu ammonium sulfat. Ekstrak kasar xilanase difraksinasi dengan penambahan ammonium sulfat untuk memperoleh xilanase dengan tingkat kejenuhan 0% - 40%. Kemudian difraksinasi lagi sampai diperoleh fraksi 40% - 80% dan disentrifugasi hingga diperoleh endapan [4]. Endapan tersebut dilarutkan dalam buffer asetat 0,2 M pH 5. Selanjutnya dilakukan dialisis menggunakan membran selofan yang semipermeable. Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam ammonium sulfat yang masih tersisa. Saat dialisis terjadi proses difusi, yaitu garam ammonium sulfat yang ukuran partikelnya lebih kecil dari pori-pori membran selofan akan berpindah keluar ke dalam larutan buffer 0,1 M (perendam). Hal ini terjadi karena konsentrasi larutan diluar membran selofan lebih rendah daripada konsentrasi di dalam

membran selofan. Sedangkan xilanase yang ukuran partikelnya lebih besar dari pori-pori membran akan tertahan di dalam membran selofan. Dialisis akan dihentikan apabila tidak terbentuk edapan putih ketika perendam diuji menggunakan larutan BaCl_2 .

Ekstrak kasar xilanase dan xilanase hasil pemurnian diuji aktivitasnya menggunakan reagen DNS dengan metode spektrofotometri. Xilanase akan menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilosa akan bereaksi dengan reagen DNS yang membentuk senyawa kompleks 3-amino-5-nitrosalisilat. Pada xilanase hasil pemurnian diperoleh aktivitas sebesar $3,22 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan diuji kadar proteinnya menggunakan reagen Biuret diperoleh sebesar $2,544 \text{ mg}/\text{mL}$.

Xilanase memiliki sisi aktif yang berupa asam amino asam aspartat dan asam glutamat. Asam amino asam aspartat dan asam glutamat memiliki gugus karboksil yang mampu menghidrolisis xilan. Gugus karboksil pada asam aspartat akan menyerang ikatan glikosidik atom C_1 xilan yang mengikat atom O. Sedangkan ion H^+ dari gugus karboksi asam glutamat akan menerima pasangan elektron bebas dari atom O dan akan membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks enzim-substrat akan dihidrolisis oleh H_2O yang menyebabkan ikatan hidrogen terputus dan membentuk xilosa. Mekanisme reaksi pembentukan xilosa dapat dilihat pada **Gambar 4.1** [41].



Gambar 4.1 Mekanisme reaksi enzimatik pembentukan xilosa

4.2 Amobilisasi Xilanase

4.2.1 Preparasi dan aktivasi bentonit

Matriks yang digunakan untuk amobilisasi yaitu bentonit. Sebelum digunakan untuk amobilisasi, bentonit diaktivasi terlebih dahulu menggunakan HCl. Aktivasi ini bertujuan untuk memperbesar ukuran pori dan untuk memperbesar luas permukaan pada bentonit. Pengotor yang terdapat pada bentonit akan hilang sehingga luas permukaannya menjadi lebih besar. Luas permukaan yang lebih besar mengakibatkan daya adsorptivitas bentonit menjadi lebih tinggi. Semakin besar luas permukaan bentonit maka enzim xilanase yang teradsorpsi semakin besar.

Bentonit diaktivasi dengan cara penambahan HCl 0,4 M dan dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan 100 rpm selama 4 jam. Bentonit yang digunakan sebanyak 40 g, namun setelah diaktivasi menjadi 32,7 g. Hal ini disebabkan ketika proses penyaringan, banyak bentonit yang tertinggal di kertas saring. Bentonit yang sudah diaktivasi, dikalsinasi menggunakan tanur pada suhu 500 °C selama 4 jam. Kalsinasi dilakukan untuk menghilangkan kandungan air atau hidrat dalam bentuk butiran pada bentonit. Hasil kalsinasi diperoleh bentonit dengan massa 29,4 g. Bentonit yang sudah teraktivasi ditandai dengan perubahan warna dari abu-abu gelap menjadi abu-abu terang. Selain itu, bentonit yang sudah teraktivasi lebih kasar jika dibandingkan dengan bentonit yang belum diaktivasi.

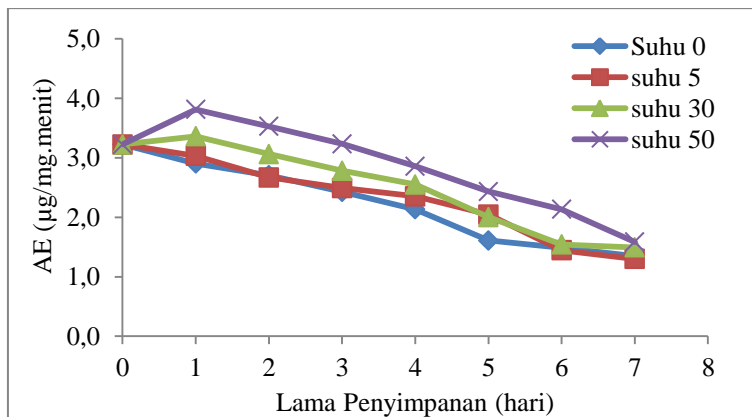
4.2.2 Amobilisasi xilanase pada matriks bentonit

Xilanase diamobilisasi pada matriks bentonit dengan metode adsorpsi fisik. Pada metode adsorpsi fisik, enzim akan terserap atau menempel pada permukaan matriks. Amobilisasi dilakukan dengan cara mencampurkan xilanase hasil pemurnian dengan bentonit teraktivasi yang diinkubasi dalam *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 100 rpm selama 3 jam. Amobilisasi xilanase dengan bentonit menyebabkan terjadinya interaksi antara xilanase dengan bentonit yang membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk karena adanya kontak antara atom oksigen pada bentonit (Si-O-Si) dengan atom H dari gugus amino pada rantai samping asam amino penyusun xilanase (-NH₂) atau dengan atom H pada residu asam amino (-COOH). Amobilisasi menyebabkan xilanase telah terikat pada permukaan matriks dengan ikatan hidrogen tersebut.

Xilanase amobil yang dihasilkan diuji aktivitas enzimnya menggunakan reagen DNS dan kadar proteinnya dengan reagen Biuret secara spektrofotometri. Aktivitas xilanase amobil yang diperoleh sebesar 3,22 µg/mg.menit dengan kadar protein sisa sebesar 0,1 mg/mL. Massa enzim yang teradsorpsi ketika amobil sebesar 114,3 mg.

4.3 Penentuan pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amoil

Enzim yang diamobilkan memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan enzim bebas, salah satu dari kelebihan dari amobilisasi enzim yaitu dapat meningkatkan stabilitas. Kestabilan enzim dipengaruhi oleh pH dan suhu penyimpanan. Penggunaan suhu yang rendah untuk penyimpanan enzim dapat menjaga kestabilan enzim karena kemungkinan terjadinya denaturasi akibat perubahan suhu lebih kecil [40]. Penentuan pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit dengan penyimpanan xilanase amobil pada variasi suhu yang berbeda-beda, yaitu suhu 0 °C (*freezer*), 5 °C (*refrigerator*), 30 °C dan 50 °C. Xilanase amobil disimpan selama 7 hari dan setiap hari xilanase amobil tersebut ditentukan aktivitasnya. **Gambar 4.2** merupakan hasil pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil.



Gambar 4.2 Grafik aktivitas xilanase amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan

Pada **Gambar 4.2**, amobilisasi xilanase pada suhu 0 °C (*freezer*), 5 °C (*refrigerator*), 30 °C dan 50 °C mengalami penurunan seiring bertambahnya lama penyimpanan. Xilanase amobil pada suhu 0 °C dan 5 °C memiliki aktivitas yang rendah. Hal ini disebabkan

oleh suhu penyimpanan yang rendah menyebabkan aktivitas suatu enzim menurun. Aktivitas enzim yang menurun karena kerusakan enzim yang terjadi sangat kecil [36].

Xilanase amobil pada suhu 0 °C tidak stabil. Hal ini disebabkan karena pada suhu 0 °C enzim mengalami pembekuan. Ketika diuji aktivitasnya dicairkan terlebih dahulu. Pencairan ini yang menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan hidrogen antara enzim dengan matriks. Ikatan hidrogen yang putus menandakan bahwa xilanase yang teradsorpsi pada matriks semakin sedikit (banyak enzim xilanase yang lepas dari matriks). Sehingga kestabilan xilanase amobil pada suhu 0 °C menjadi menurun dan aktivitas yang terukur juga semakin kecil. Penyimpanan xilanase pada suhu 5 °C juga memiliki kestabilan yang rendah dan aktivitas enzim yang rendah. Semakin lama penyimpanan maka semakin banyak enzim yang terlepas dari matriks.

Penyimpanan xilanase amobil suhu 30 °C, aktivitasnya dari hari pertama mengalami kenaikan dan terjadi penurunan seiring bertambahnya lama penyimpanan. Pada suhu 30 °C, xilanase amobil tidak stabil. Hal ini terjadi dimungkinkan semakin lama waktu penyimpanan maka semakin banyak xilanase amobil yang mengalami rusak karena adanya protease [4].

Xilanase amobil yang disimpan pada suhu 50 °C, memiliki kestabilan yang baik dan aktivitasnya tinggi. Hal ini terjadi karena pada suhu 50 °C merupakan suhu optimum dari xilanase amobil pada bentonit. Namun seiring bertambahnya lama penyimpanan, aktivitas xilanase semakin menurun karena semakin lama penyimpanan maka xilanase yang teradsorpsi pada matriks banyak yang lepas. Ikatan hidrogen antara xilanase dengan matriks semakin lemah yang menyebabkan ikatan hidrogen tersebut putus dan aktivitas xilanase menjadi menurun.

Kestabilan aktivitas xilanase amobil ditentukan berdasarkan % aktivitas enzim sisa yang diperoleh dari aktivitas enzim setelah penyimpanan dibagi dengan aktivitas enzim sebelum penyimpanan. Enzim akan stabil apabila memiliki aktivitas enzim sisa lebih dari

50% dari aktivitas awal. Pada penelitian ini diperoleh % aktivitas enzim sisa yang ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 % aktivitas xilanae amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan

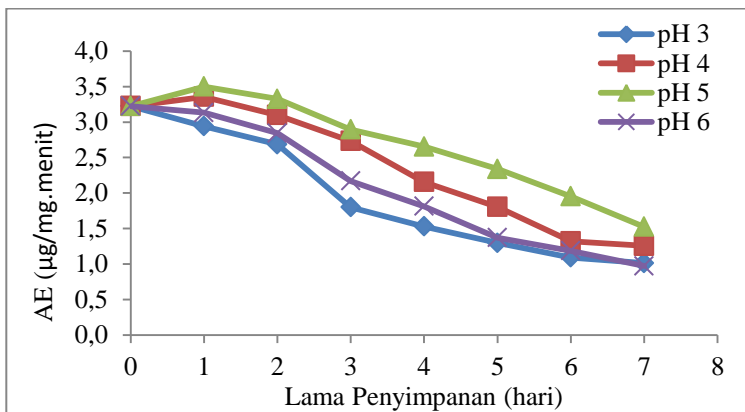
Lama Penyimpanan (Hari)	%			
	0	5	30	50
0	100	100	100	100
1	90,08	94,02	104,21	118,21
2	83,83	82,74	94,21	109,37
3	75,27	77,31	86,28	100,27
4	66,17	72,96	79,08	88,58
5	49,87	63,45	62,09	75,41
6	46,19	44,84	47,83	66,17
7	41,71	40,34	46,33	49,19

Berdasarkan pada **Tabel 4.1**, aktivitas xilanase amobil pada semua variasi suhu yang digunakan mengalami penurunan. Aktivitas xilanase sisa tertinggi pada penyimpanan suhu 50 °C, sedangkan aktivitas xilanase sisa terendah pada penyimpanan suhu 0 °C. Penyimpanan xilanase amobil suhu 0 °C mengalami penurunan dari hari pertama dan stabil sampai hari ke 4 dengan aktivitas sisa sebesar 66,17%. Sedangkan penyimpanan suhu 5 dan 30 °C, stabil sampai hari ke 5 dengan aktivitas sisa sebesar 63,45% dan 62,09%. Penyimpanan xilanase amobil suhu 50 °C stabil sampai hari ke 6 dengan aktivitas sisa sebesar 66,17%.

Pada uji statistik untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil dengan matriks bentonit diperoleh nilai $F_{hitung} > F_{tabel (0,05)}$, sehingga H_0 ditolak. Maka suhu dan lama penyimpanan xilanase amobil berpengaruh terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil pada matriks bentonit. Untuk uji BNJ 5% menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (Lampiran L.1)

4.4 Penentuan pengaruh pH terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil

Pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit. Enzim xilanase amobil diinkubasi pada variasi pH 3, 4, 5 dan 6 dengan waktu penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 hari. Enzim xilanase amobil ditentukan aktivitasnya setiap hari. Dari penelitian diperoleh hasil yang ditunjukkan pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.3 Grafik aktivitas xilanase amobil setelah diinkubasi pada variasi pH dan lama penyimpanan

Berdasarkan pada **Gambar 4.3**, aktivitas xilanase amobil pada pH 3 dan 6 mengalami penurunan. Sedangkan pada pH 4 dan pH 5, aktivitas xilanase amobil mengalami kenaikan pada hari pertama dan turun seiring bertambahnya lama penyimpanan. Aktivitas xilanase amobil penyimpanan pH 5 merupakan aktivitas yang paling tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas xilanase amobil pH 3, 4 dan 6. Hal ini terjadi karena xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit memiliki pH optimum 5, dimana struktur molekul xilanase lebih stabil jika dibandingkan dengan struktur molekul xilanase pH 3, 4 dan 6. Aktivitas xilanase amobil paling kecil pada penyimpanan pH 3.

Penyimpanan xilanase amobil pada pH 3 dan 4 lebih asam dibandingkan dengan penyimpanan pH 5 dan 6, sehingga enzim xilanase lebih asam dan muatan positif (H^+) dalam enzim semakin banyak. Muatan positif yang lebih banyak, menyebabkan terjadinya tolak-menolak antar molekul. Semakin asam pH yang digunakan untuk menyimpan xilanase amobil maka semakin banyak ion H^+ yang mengelilingi xilanase. Sehingga xilanase yang dikelilingi oleh ion H^+ yang banyak akan terjadi protonasi. Protonasi menyebabkan struktur enzim rusak. Struktur enzim yang rusak menyebabkan enzim tidak stabil dan menyebabkan aktivitas enzim yang semakin turun seiring bertambahnya lama penyimpanan.

Selain itu, penyimpanan pada pH 6, aktivitas xilanase amobil semakin turun seiring bertambahnya lama penyimpanan. Aktivitas xilanase amobil pada pH 6 turun karena telah melewati pH optimum dari xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit. Sehingga terjadi kerusakan pada struktur xilanase amobil dan kestabilannya menjadi turun.

Kestabilan xilanase amobil dapat ditentukan berdasarkan % aktivitas enzim sisa. Aktivitas enzim sisa merupakan aktivitas dimana aktivitas enzim setelah penyimpanan dibagi dengan aktivitas enzim sebelum penyimpanan. Enzim akan stabil apabila aktivitas enzim sisa lebih dari 50% dari aktivitas awal. Pada penelitian ini diperoleh % aktivitas enzim sisa yang ditunjukkan pada **Tabel 4.2**.

% aktivitas sisa xilanase amobil pada variasi pH, semakin lama waktu penyimpanan maka semakin turun. Penyimpanan xilanase amobil pH 4 dan 5, hari pertama aktivitasnya sisanya meningkat lebih dari 100%. Penyimpanan xilanase amobil pH 4 stabil sampai hari ke 5 dengan aktivitas sisa sebesar 55,98%. Aktivitas xilanase amobil tertinggi pada penyimpanan pH 5 yang stabil sampai hari ke 6 dengan aktivitas sisa sebesar 60,6%. Sedangkan penyimpanan xilanase amobil pH 6 stabil sampai hari ke 5 dengan aktivitas sisa sebesar 56,25%. Aktivitas xilanase amobil paling rendah pada penyimpanan pH 3, yang stabil sampai hari ke 3 dengan aktivitas sisa sebesar 55,84%.

Tabel 4.2 % aktivitas xilanae amobil setelah diinkubasi pada variasi pH dan lama penyimpanan

Lama Penyimpanan (Hari)	%			
	3	4	5	6
0	100	100	100	100
1	91,17	104,07	108,56	97,14
2	83,29	96,06	103,12	88,18
3	55,84	84,78	89,81	67,25
4	47,42	66,85	82,34	56,25
5	40,22	55,98	72,55	42,53
6	33,83	40,89	60,6	36,82
7	31,38	38,99	47,28	30,17

Berdasarkan hasil penelitian, enzim xilanase yang diamobilkan menggunakan matriks bentonit lebih bagus jika dibandingkan dengan matriks zeolit atau pasir laut. Hal ini terjadi karena enzim yang diamobilkan menggunakan matriks bentonit memiliki kestabilan sampai penyimpanan hari ke 5 dengan aktivitas sisa sebesar 60,6%. Sedangkan pada enzim yang diamobilkan pada matriks zeolit stabil sampai penyimpanan hari ke 5 sebesar 58,18% [42] dan pada matriks pasir laut stabil sampai penyimpanan hari pertama sebesar 50,5% [16].

Pada uji statistik untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil dengan matriks bentonit diperoleh nilai $F_{hitung} > F_{tabel (0,05)}$, sehingga H_0 ditolak. Maka pH dan lama penyimpanan xilanase amobil berpengaruh beda nyata terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil pada matriks bentonit. Untuk uji BNJ 5% menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (Lampiran L.2).