

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

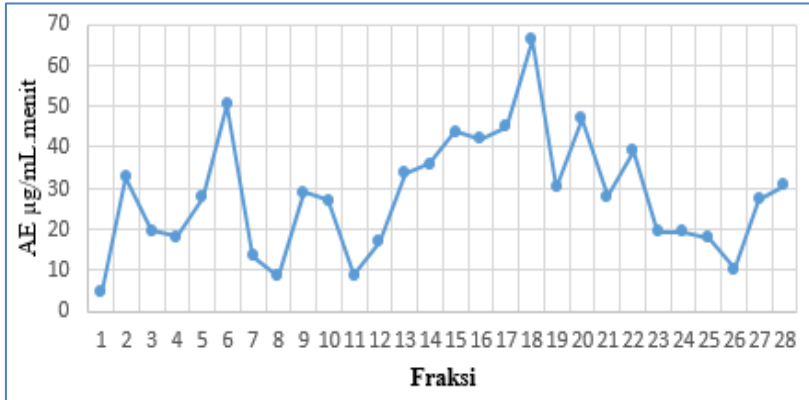
#### 4.1 Produksi dan Isolasi Xilanase dari *Trichoderma viride*

Xilanase merupakan tipe enzim golongan hidrolase yang mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Dibutuhkan sebuah induser untuk mendapatkan enzim xilanase secara maksimal, karena sifat dari enzim xilanase adalah induktif. Induser pada penelitian ini serbuk dari klobot jagung. Klobot jagung dipilih karena kandungan hemiselulosanya yang cukup tinggi. Proses produksi enzim meliputi menumbuhkan jamur pada media cair hingga mencapai pertengahan fase log (36 jam), fase ini merupakan fase aktif jamur dalam hal produksi enzim. Proses produksi berlangsung hingga hampir mencapai fase akhir logaritma atau awal fase stasioner (60 jam), pada fase ini diharapkan isolat diharapkan mampu untuk membelah diri dan beradaptasi pada media xilan. Xilanase tergolong dalam enzim ekstra seluler, yang mana dalam proses pemisahan harus menggunakan sentrifugasi. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan berdasarkan ukuran dan berat molekul dari suatu zat. Hasil dari sentrifugasi berupa 2 lapisan, yakni supernatan (atas), berisi enzim ekstrak kasar dan endapan (bawah), yang merupakan sisa komponen mediantan sel jamur.

Pemurnian enzim dilakukan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa lain yang mengganggu dan untuk meningkatkan aktivitas enzim. Ekstrak kasar enzim xilanase dimurnikan dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40%-80% amonium sulfat. Metode ini berdasarkan peristiwa penurunan kelarutan protein dalam larutan garam disebut *salting out*. Selajutnya, proses dialisis menggunakan kantong selofan sebagai membrane semipermeabel. Pada proses dialisis ini terjadi difusi garam ammonium sulfat yang berada pada larutan enzim (di dalam membran) berpindah ke larutan buffer asetat 0,2 M (di luar membran) yang konsentrasi garamnya lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi garam dalam larutan enzim. Berakhirnya proses dialisis ditandai dengan terbentuk endapan putih ( $\text{BaSO}_4$ ) pada pengujian larutan buffer asetat hasil perendaman dengan  $\text{BaCl}_2$ . Setelah itu dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan proses kromatografi filtrasi gel menggunakan gel *Sephadex G-100* sebagai gel dekstran yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Gel *Sephadex G-100* dialiri atau dilusi dengan buffer asetat 0,2 M pH 5.

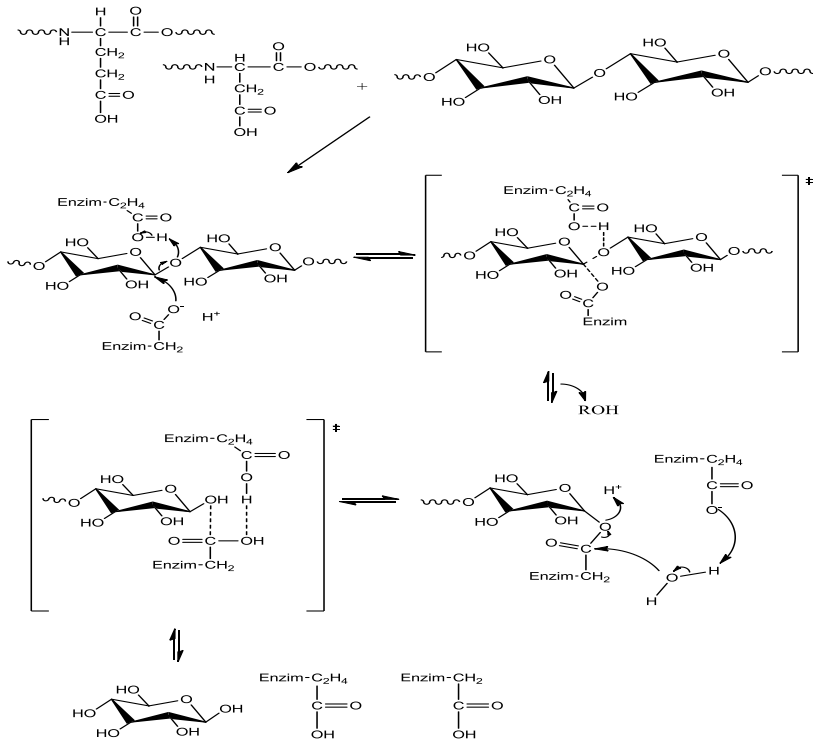
Setiap 10 mL eluen yang keluar dari dalam kolom ditampung pada botol sampel hingga dihasilkan beberapa fraksi. Berikut adalah grafik dari fraksi eluen yang dihasilkan ditunjukkan pada **Gambar 4.1**. Fraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi 13 hingga 23.

**Gambar 4.1** Aktivitas enzim xilanase hasil filtrasi gel



Fraksi yang digunakan adalah fraksi 13 sampai 23 karena fraksi 1 sampai 22 dimungkinkan adalah molekul protein lain yang ukurannya lebih besar daripada xilanase. Spesialisasi dari *Sephadex G-100* adalah memisahkan atau mengisolasi molekul yang berukuran 100-100.000 dalton (xilanase : 22.000 Dalton). Sehingga, molekul yang lebih besar tidak terperangkap di dalam gel.

Aktivitas enzim xilanase merupakan jumlah gula pereduksi (xilosa) yang dihasilkan oleh xilanase per menit. Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa disajikan pada **Gambar 4.2** [58].



**Gambar 4.2** Mekanisme reaksi enzimatik yang terjadi pada pembentukan xilosa

Gugus karboksil rantai samping residu asam amino aspartat mengalami ionisasi membentuk ion karboksilat dan menyerang ikatan glikosidik pada atom C<sub>1</sub> pada xilan sehingga terbentuk xilosa. Atom O sehingga terbentuk kompleks enzim-substrat setelah atom H dari gugus karboksil residu asam amino glutamat akan menerima pasangan elektron bebas (PEB). Setelah itu kompleks enzim-substrat dihidrolisis, sehingga ikatan hidrogen terputus dan terbentuk xilosa kembali.

Penentuan aktivitas enzim xilanase dengan reagen DNS menggunakan metode spektrofotometri. Xilosa yang dihasilkan oleh hidrolisis xilanase dengan xilan akan bereaksi dengan reagen DNS membentuk senyawa 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna kuning kecoklatan. Selanjutnya, 3-amino-5-nitrosalisilat diukur dengan menggunakan *Spectronic 20* pada panjang gelombang 490 nm. Aktivitas xilanase bebas dapat ditentukan dengan mengkonversi nilai

absorbansi pada persamaan kurva baku gula pereduksi. Konsentrasi xilosa yang diperoleh adalah 230  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan aktivitas xilanase sebesar 27,86  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ . Pengukuran kadar protein xilanase dapat ditentukan dengan reagen Biuret yang didasarkan pada pembentukan kompleks ion  $\text{Cu}^{2+}$  dengan gugus  $-\text{CO}$  dan  $-\text{NH}$  dari rantai peptida dalam suasana basa yang berwarna biru sehingga diperoleh kadar protein (awal) xilanase secara spektrofotometri sebesar 3133,33  $\mu\text{g/mL}$ .

## **4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase**

### **4.2.1 Preparasi dan Aktivasi Matriks Zeolit**

Pada penelitian ini matriks yang digunakan adalah zeolit alam. Zeolit yang digunakan sudah dalam bentuk serbuk halus berukuran 150 mesh. Zeolit terlebih dulu diaktivasi menggunakan HCl 0,4 M yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor dan memperbesar pori pada permukaan zeolit sehingga memiliki kemampuan adsorpsi dan nilai tukar kation (KTK) yang tinggi. Semakin luas permukaan pori zeolit, semakin besar pula xilanase yang terserap atau terperangkap pada matriks. Zeolit yang telah diaktivasi dilanjutkan dengan proses kalsinasi di dalam tanur bersuhu 500 °C, kalsinasi yaitu proses pemanasan pada suhu tinggi dibawah titik leleh zeolit yang bertujuan untuk menghilangkan kristal (hidrat) dalam butiran sehingga dapat terbentuk oksidanya berupa  $\text{SiO}_2$ .

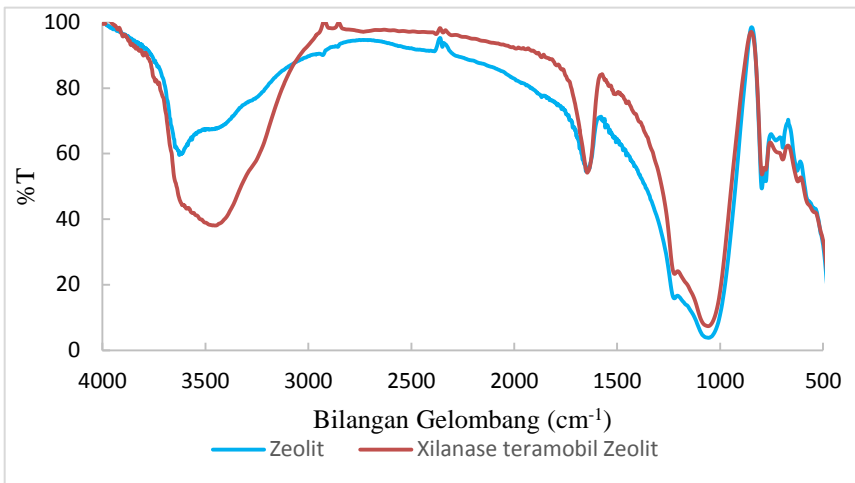
### **4.2.2 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Zeolit**

Pada penelitian ini, xilanase diamobilisasi dengan menggunakan metode adsorpsi fisik dengan matriks zeolit yang telah teraktivasi. Jumlah atau kadar xilanase yang teradsorpsi oleh matriks dipengaruhi oleh waktu kontak antara enzim dan matriks zeolit. Ikatan yang terbentuk antara xilanase dan zeolit adalah ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen tergolong ikatan yang lemah. Interaksi xilanase yang teradsorpsi dalam zeolit membentuk ikatan hidrogen akibat adanya kontak antara atom oksigen pada zeolit (Si-O-Al) dengan atom H dari gugus amino dari rantai samping residu asam amino ( $-\text{NH}_2$ ) maupun dengan atom H pada gugus karboksil ( $-\text{COOH}$ ) residu asam amino. Kelebihan xilanase amobil dengan metode adsorpsi fisik ini yaitu dapat mempertahankan aktivitasnya dan dapat diregenerasi. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas xilanase amobil sebesar 69,68  $\mu\text{g g}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ , dengan kadar protein yang terikat sebesar 866.67  $\mu\text{g/mL}$  dan massa enzim yang terikat dalam permukaan zeolit sebesar 0,81

mg. Aktivitas xilanase amobil lebih besar daripada aktivitas xilanase bebas, hal ini dikarenakan beberapa faktor, antara lain kontak xilanase dengan matriks hanya sebentar sehingga enzim xilanase yang teradsorp ke dalam matriks tidak secara keseluruhan, ikatan hidrogen yang terbentuk antara xilanase dan zeolit tergolong ikatan yang lemah dan mudah lepas. Kemungkinan terjadi pelepasan enzim dari matriks juga sangat besar. Xilanase yang terlepas inilah yang menyebabkan aktivitas enzim xilanase amobil menjadi besar. Juga bias disebabkan oleh peran komponen Si/Al yang membantu menarik substrat lebih dekat dengan enzim-zeolit dan mempercepat interaksi keduanya.

### 4.3 Identifikasi Xilanase Amobil dengan FT-IR

Reaksi pengikatan antara xilanase dan zeolit dapat ditinjau dari identifikasi gugus FTIR antara zeolit dengan xilanase-zeolit hasil amobilisasi. Hasil identifikasi kedua senyawa seperti sesuai **Gambar 4.3**



**Gambar 4.3** Overlay spektra FTIR Zeolit dengan Xilanase-Zeolit

**Tabel 4.1** Hasil interpretasi spektra FTIR Zeolit dan Xilanase-Zeolit

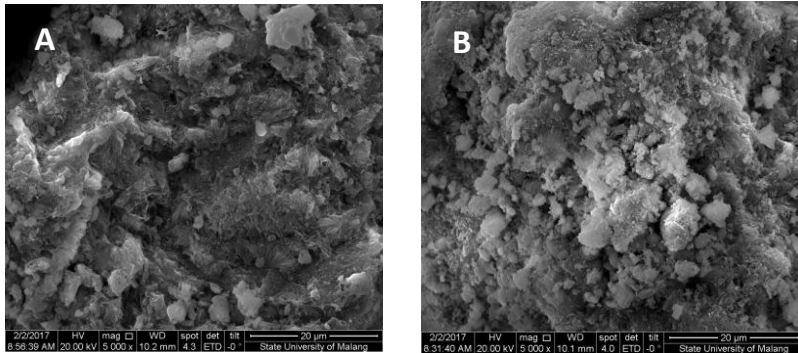
No	Gugus Fungsi	Rentang Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	
			Zeolit	Xilanase-Zeolit
1	O – H alkohol	3200-3550	3419,56	3454,27
2	O – H karboksilat	2500-3000	-	2883,83
3	C–O	1080-1300	1054,99	1058,85
4	C–H Aromatik	3000-3100, 670-870	-	796,55
5	Si – O	830-1000	1054,99	1058,85
6	Si – O – Al	425-520	445,53	453,24
7	C-H $\text{sp}^3$	2850-2960	2929,67	2883,38
8	C-H $\text{sp}^2$	3020-3080, 675-995	-	696,26
9	C = O	1630 – 1680	-	1645,17
10	N–H	3300 – 3500	-	3454,27

Dari perbandingan hasil interpretasi spektra IR zeolit dan kompleks xilanase-zeolit, diketahui bahwa ada beberapa gugus fungsi yang ada pada xilanase-zeolit, namun tidak pada zeolit, hal ini menunjukkan adanya perbedaan mendasar antara keduanya. Pada xilanase-zeolit terdapat spektrum O – H karboksilat yang tidak dipunyai zeolit, karena memang pada kompleks xilanase-zeolit terdapat O – H karboksilat (pada –COOH) yang bilangan gelombangnya  $2883,83 \text{ cm}^{-1}$ . Pada kompleks xilanase-zeolit juga didapat spektrum N–H dengan bilangan gelombang  $3454,27 \text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan spektra Si – O dan Si – O – Al dimiliki keduanya, hal ini

dikarenakan keduanya terdapat komponen penyusun zeolit di dalamnya.

#### 4.4 Identifikasi Xilanase Amobil dengan SEM

Selain dilakukan identifikasi dengan menggunakan FTIR, dilakukan pula karakterisasi menggunakan Mikroskop Pemindai Elektron (SEM) untuk mengetahui secara umum morfologi dari adsorben xilanase-zeolit yang telah dibuat. Hasil SEM pada **Gambar 4.4** menunjukkan morfologi permukaan yang kasar dan tidak teratur.



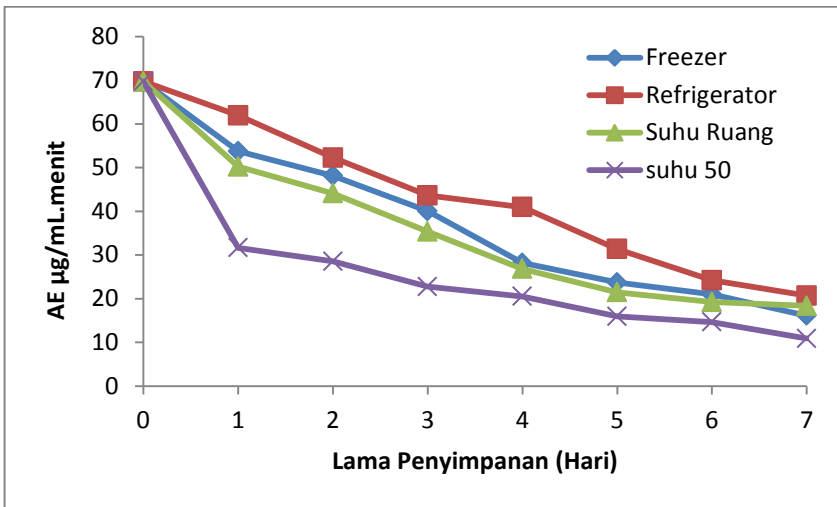
**Gambar 4.4** Hasil SEM pada perbesaran 5.000x, zeolit (A) dan xilanase-zeolit (B)

Dapat dilihat pada **Gambar 4.4** hasil SEM dari xilanase-zeolit (B) dan zeolit (A). Pada perbesaran 5000x terlihat pada keduanya ada perbedaan mendasar yakni pada penampang xilanase-zeolit terlihat bahwa butiran/ partikel berwarna putih tulang tidak beraturan tersebar di permukaan. Hal tersebut bersesuaian dengan penelitian lain yaitu pada adsorben yang mengikat xilanase tampak adanya partikel padat berwarna putih tulang tidak merata yang tersebar dan mengisi pori-pori terbuka dari matriks. Hanya ada perbedaan dalam hal matriks yang digunakan, yakni matriks NpG (*Nano-porous Gold*) [58].

#### 4.5 Penentuan Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase yang Diamobilisasi dengan Matriks Zeolit Hasil Filtrasi Gel

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. Namun pada suhu yang rendah, aktivitas dari enzim akan menurun [36]. Pada penentuan pengaruh suhu terhadap kestabilan xilanase yang diamobilisasi dengan matriks zeolit hasil filtrasi gel dilakukan dengan cara menyimpan xilanase amobil pada variasi suhu 0°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), suhu ruang 27°C, dan 50°C. Xilanase ditentukan aktivitasnya pada waktu penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 hari. Dari penelitian ini, diperoleh hasil yang ditunjukkan pada **Gambar 4.5**



**Gambar 4.5** Grafik aktivitas xilanase hasil filtrasi gel setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan

Dari **Gambar 4.5** dapat dilihat bahwa aktivitas xilanase amobil pada suhu 0°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), suhu ruang 27°C, dan 50°C turun dengan seiring bertambahnya lama penyimpanan. Dari data tersebut kita dapat menarik kesimpulan bahwa semakin lama waktu penyimpanan, semakin banyak xilanase amobil yang mengalami kerusakan. Penyimpanan enzim pada jangka waktu tertentu dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim, sehingga ada beberapa molekul enzim yang terlepas dari substrat.

Aktivitas xilanase amobil mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan. Hal ini dimungkinkan



karena adanya aktivitas protease yang terbentuk. Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi molekul yang lebih kecil [59]. Pada setiap suhu penyimpanan tidak terjadi reaksi jadi dilakukannya percobaan pengaruh lama penyimpanan dalam beberapa variasi suhu ini untuk melihat tingkat kestabilan enzim. Pada percobaan ini aktivitas enzim amobil yang ditempatkan pada *refrigerator* (4 °C) menjadi perlakuan yang terbaik yang ditunjukkan dengan aktivitas enzim yang lebih besar daripada perlakuan suhu yang lain. Dapat dilihat juga di grafik bahwa enzim yang disimpan di dalam *refrigerator* tingkat penurunan aktivitasnya cenderung kecil, dari sini dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan dengan *refrigerator* adalah yang terbaik dalam menjaga kestabilan aktivitas enzim amobil. Sedangkan pada penyimpanan yang lain terjadi penurunan aktivitas enzim yang cukup tajam dari hari ke hari, khususnya pada penyimpanan suhu 50 °C. Pada penyimpanan di dalam *freezer* aktivitas yang ditunjukkan cukup besar dan stabil, tapi kemampuannya untuk menjaga kestabilan enzim masih dibawah *refrigerator*, hal ini dikarenakan, enzim yang disimpan di dalam *freezer* dalam kondisi beku dan kemudian jika akan dipakai atau diuji aktivitasnya lagi, enzim yang beku ini harus dilelehkan dahulu dengan merendamnya dengan air, hal inilah yang diduga dapat menyebabkan ikatan hidrogen antara xilanase dan matriks merenggang dan menyebabkan menurunnya aktivitas enzim. Pada penyimpanan dengan suhu 50 °C dimungkinkan terjadi denaturasi enzim mengingat batas suhu optimum enzim xilanase adalah 50 – 60 °C. Karena pada dasarnya tujuan dari proses amobilisasi adalah untuk mempertahankan stabilitas enzim yang kemudian dapat digunakan kembali pada waktu yang diinginkan.

Kestabilan enzim dapat diketahui dengan mengukur aktivitas enzim sisa. Apabila aktivitas enzim sisa terdapat lebih dari 50% dari aktivitas awal enzim, maka menandakan enzim tersebut stabil [60]. Pada penelitian ini diperoleh aktivitas enzim sisa yang ditunjukkan pada **Tabel 4.2**

**Tabel 4.2** Tabel aktivitas sisa xilanase amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan

Hari	<i>Freezer</i>	<i>Refrigerator</i>	Suhu Ruang	Suhu 50 °C
	%AE			
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	77.10	88.87	72.03	45.40
2	69.04	74.99	63.28	40.93
3	57.43	62.57	50.69	32.63
4	40.42	58.75	38.45	29.43
5	34.00	44.99	30.78	22.87
6	30.12	34.75	27.55	21.01
7	23.10	29.67	26.33	15.61

Berdasarkan pada **Tabel 4.2**, aktivitas sisa xilanase amobil pada semua variasi suhu yang digunakan mengalami penurunan. Pada hari pertama hingga hari ketujuh % aktivitas sisa enzim mengalami tren menurun. Pada semua variasi suhu stabil sampai hari ketujuh. Aktivitas sisa xilanase amobil pada suhu *freezer* dan *refrigerator* sebesar 23,1% dan 29,67%. Sedangkan pada suhu ruang dan 50 °C di hari ke 6, aktivitas sisanya sebesar 26,33% dan 15,61%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Cahyawati [63], enzim amobil disimpan dalam beberapa variasi suhu dan lama penyimpanan, namun proses pemurniannya hanya sampai tahap fraksinasi dengan ammonium sulfat. Didapat hasil, penyimpanan pada suhu 50 °C adalah perlakuan yang terbaik. Aktivitas enzim stabil hingga hari ke-5. Hal ini berbanding terbalik dengan enzim amobil yang melewati proses pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi filtrasi gel, perlakuan dengan suhu yang sama didapatkan hasil yang paling tidak stabil. Dapat ditarik kesimpulan, ada pengaruh dari pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel, sehingga perlakuan penyimpanan pada suhu 4 °C jauh lebih baik daripada suhu 50 °C,

#### 4.6 Efisiensi Penggunaan Xilanase Amobil

Penggunaan xilanase bebas hanya dapat dilakukan sekali penggunaan saja. Xilanase dapat digunakan berulang-ulang dengan cara dilakukan peningkatan efisiensi penggunaannya. Setelah itu disaring dan diperoleh filtrat yang kemudian diuji kadar protein sisanya, endapan hasil filtrasi diperlakukan seperti pengukuran aktivitas enzim amobil sebelumnya. Akan tetapi, setelah inkubasi selama 55 menit dilakukan penyaringan hingga didapat endapan dan filtrat. Endapan yang diperoleh diperlakukan sama seperti tahapan sebelumnya, sedangkan filtratnya diuji aktivitasnya. Setiap dilakukan penyaringan endapan, endapan dicuci atau dialiri dengan buffer asetat dengan tujuan melarutkan xilosa yang masih tersisa di dalam endapan.

Proses ini dilakukan sampai 6 kali pengulangan yang bertujuan untuk mengetahui berapa kali xilanase amobil dapat dipakai dalam keadaan yang stabil. Efisiensi penggunaan xilanase amobil dapat diketahui dengan menghitung nilai aktivitas enzimnya. Semakin bertambah kuantitas penggunaan xilanase amobil, dapat menyebabkan penurunan aktivitas. Penurunan aktivitas ini dikarenakan adanya sejumlah enzim yang ikatannya terlepas dari permukaan matriks mengingat daya ikat adsorpsi fisik yang lemah. Pengujian efisiensi dilakukan hingga aktivitasnya menurun 50% dari aktivitas awalnya, hal ini karena pada %aktivitas diatas 50%, enzim masih layak dan mampu bekerja sebagai biokatalisator.

Berdasarkan penelitian efisiensi penggunaan xilanase amobil yang dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan, dapat dilihat pada **Tabel 4.3** bahwa dalam pengulangan ke-3, hasilnya sudah menurun hingga 50% dari aktivitas awalnya, pada pengulangan ke-3 ini diperoleh aktivitas sebesar  $41,75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$  dengan persentase efisiensi 50,65%. Presentase efisiensi tersebut menunjukkan bahwa xilanase yang diamobil dengan matriks zeolit teraktivasi HCl masih stabil ketika dipakai sampai 3 kali pakai. Berdasarkan penelitian Setiawan (2016), xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dengan zeolit dapat digunakan ulang sebanyak 3 kali dengan aktivitas  $122,44 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$  dan efisiensi 85,20 %

**Tabel 4.3** Data Pemakaian Ulang Xilanase Amobil

Pemakaian	AE	% Aktivitas Sisa Enzim
1	82.44	100.00
2	63.99	77.62
3	41.75	50.65
4	15.20	18.44
5	5.78	7.01

Berdasarkan hasil uji statistik diperoleh nilai  $F_{hitung} (47,075) > F_{tabel} (2,901)$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan pada pengaruh pH dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil terdapat perbedaan nyata. Uji BNP 5% juga menunjukkan perbedaan nyata.