

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Zeolit Alam

Pada penelitian ini, zeolit alam digunakan sebagai matriks amobilisasi enzim xilanase. Zeolit alam memiliki pori yang tidak seragam dan masih mengandung pengotor-pengotor seperti logam K, Ca, Mg, dan Fe. Aktivasi dilakukan untuk menghilangkan pengotor, sehingga memperluas permukaan zeolit dan menyeragamkan pori zeolit. Pada umumnya, aktivasi zeolit menggunakan dua cara yaitu cara kimia dan fisika. Cara kimia dilakukan dengan menambahkan HCl 0,4 M pada zeolit 20 gram. Dilakukan pengocokan selama 4 jam dengan kecepatan 100 rpm. Hasil pengocokan disaring dan dilakukan pemanasan dengan oven untuk menghilangkan cairan. Zeolit yang diperoleh harus melalui cara fisika yaitu dengan dikalsinasi untuk menghilangkan hidrat dan senyawa-senyawa organik, sehingga terbentuk oksidanya. Kalsinasi dilakukan dalam tanur dengan temperatur 500°C selama 4 jam.

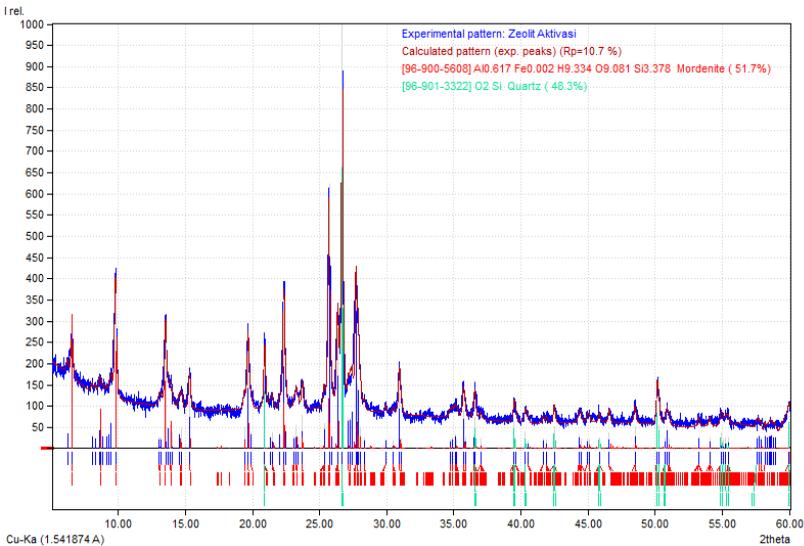
Tabel 4.1 Hasil Analisis XRF Zeolit

Kandungan	Konsentrasi (%)	
	Aktivasi	Non-aktivasi
Al	7,6	7,5
Si	54,8	48,6
K	5,93	5,32
Ca	7,82	11,1
Ti	1,26	1,1
V	0,03	0,03
Cr	0,06	0,067
Mn	0,22	0,47
Fe	19,5	22,5
Ni	1,25	1,33
Cu	0,21	0,23
Zn	0,05	0,08
Sr	0,96	1,1
Eu	0,1	0,2
Re	0,2	0,2
Ba	-	0,1

Zeolit teraktivasi dan non-aktivasi dapat dikarakterisasi menggunakan instrumen *X-ray Fluorescence* (XRF) dan instrumen *X-ray Diffraction* (XRD).

Instumen XRF digunakan untuk mengetahui komposisi logam di dalam zeolit. Berdasarkan hasil XRF diperoleh data penurunan komposisi pengotor atau komponen minor pada zeolit hasil aktivasi. Penurunan komposisi komponen minor ditunjukkan oleh **Tabel 4.1**. Penurunan terjadi pada logam Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, dan Zn. Menurunnya komposisi logam, menunjukkan berkurangnya komponen pengotor pada zeolit teraktivasi yang disebabkan tertukarnya kation-kation logam oleh ion H⁺. [11]. Karakterisasi dengan XRF juga memberikan data Rasio Si/Al. Pada zeolit non-aktivasi diperoleh rasio Si/Al sebesar 6,48 dan pada zeolit teraktivasi diperoleh rasio Si/Al 7,21.

Karakterisasi dengan instrumen XRD digunakan untuk mengetahui ciri utama kristal, seperti parameter kisi dan tipe struktur. Karakterisasi menggunakan XRD ditunjukkan oleh **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1 Difraktogram Zeolit Hasil Analisis

Analisis dilakukan menggunakan *software Match!* dengan data referensi ICSD menunjukkan komponen utama dari zeolit alam

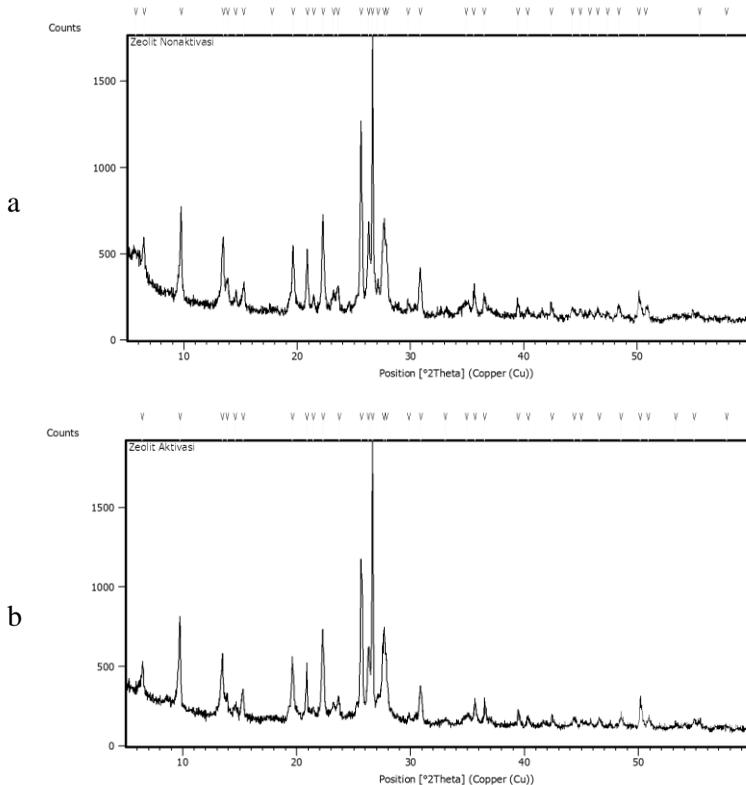
yang digunakan adalah mordenit sebesar 51,7% dan Kuarsa sebagai pengotor sebesar 48,3% seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 4.1**. Berdasarkan data JCPDS dalam Srihapsari [21], puncak khas yang muncul pada 2θ $20,9064^{\circ}$; $26,6800^{\circ}$; $36,5700^{\circ}$, merupakan puncak untuk Kuarsa (*Quartz*) pada JCPDS no 5-0490. Puncak khas pada 2θ $6,4800^{\circ}$; $14,4400^{\circ}$; $19,1720^{\circ}$; $22,3418^{\circ}$; $25,3200^{\circ}$ dan $27,7989^{\circ}$ merupakan puncak untuk mineral mordenit (kristal zeolit) pada JCPDS no 6-239. Perbandingan antara zeolit sampel dan JCPDS dapat dilihat pada **Tabel 4.2**

Tabel 4.2 Perbandingan antara zeolit sampel dan JCPDS

No	Peak Sampel	Data JCPDS	Kandungan
1	$6,4877^{\circ}$	$6,4800^{\circ}$	Mordenit
2	$14,5487^{\circ}$	$14,4400^{\circ}$	Mordenit
3	$19,6243^{\circ}$	$19,1720^{\circ}$	Mordenit
4	$20,8625^{\circ}$	$20,9064^{\circ}$	Kuarsa
5	$22,2693^{\circ}$	$22,3418^{\circ}$	Mordenit
6	$25,6003^{\circ}$	$25,3200^{\circ}$	Mordenit
7	$26,6089^{\circ}$	$26,6800^{\circ}$	Kuarsa
8	$27,6489^{\circ}$	$27,7989^{\circ}$	Mordenit
9	$36,4869^{\circ}$	$36,5700^{\circ}$	Kuarsa

Pada **Gambar 4.2** menunjukkan difraktogram zeolit aktivasi dan non-aktivasi, munculnya puncak pada difraktogram zeolit alam non-aktivasi yang ada pada difraktogram zeolit alam aktivasi menandakan bahwa penggunaan HCl selama proses aktivasi tidak merusak kerangka zeolit [46]. Hilangnya beberapa pengotor ditunjukkan dengan menurunnya puncak difraktogram dari 38 puncak menjadi 34 sesudah proses aktivasi.

Dilakukan analisis lebih lanjut terhadap zeolit untuk membandingkan zeolit teraktivasi, teraktivasi tersisipi enzim, non-aktivasi dan non-aktivasi tersisipi enzim. Difraktogram perbandingan keempat zeolit ini ditunjukkan pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.2 Difraktogram Zeolit Alam (a) Non-aktivasi (b) Aktivasi

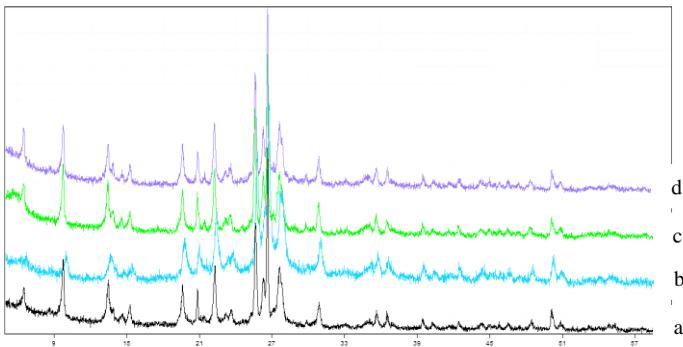
Berdasarkan data yang ditunjukkan pada **Tabel 4.3**, dapat dibandingkan hasil karakterisasi XRD antara keempat sampel. Perbedaan puncak zeolit yang diaktivasi dan non-aktivasi menunjukkan semakin besar 2θ semakin besar pula pergeserannya. Pergeseran ini menuju ke arah 2θ yang lebih besar, walaupun perbedaannya tidak terlalu signifikan, seperti yang dicantumkan Srihapsari [21] dalam penelitiannya. Hal ini menunjukkan semakin menyempitnya kisi zeolit. Penyempitan ini dimungkinkan terjadi akibat hilangnya komponen pengotor.

Perbandingan dilakukan juga terhadap zeolit dan zeolit yang tersisipi enzim. Semakin besar 2θ semakin besar pula pergeseran yang menandakan mengecilnya kisi kristal. Mengecilnya kisi kristal ini

dimungkinkan terjadi akibat asam amino pada enzim seperti Asn124, His22, dan Gln125 yang berikatan hidrogen dengan atom O dari zeolit [47]. Sementara zeolit non-aktivasi yang tersisipi enzim hanya sedikit memberikan perbedaan pada 2θ yang diduga akibat kurangnya enzim yang teradsorpsi pada zeolit non-aktivasi.

Tabel 4.3 Perbandingan 2θ zeolit (a) aktivasi, aktivasi tersisipi enzim, non-aktivasi dan non-aktivasi tersisipi enzim

No	Z. Aktiv.	Z. Akt. Enz.	Z. Non.	Z. Non. Enz.
1	6.4727 ⁰	6.4550 ⁰	6.4877 ⁰	6.5132 ⁰
2	14.6066 ⁰	15.4778 ⁰	14.5487 ⁰	14.6105 ⁰
3	19.5968 ⁰	19.7993 ⁰	19.6243 ⁰	19.6238 ⁰
5	22.2924 ⁰	22.4158 ⁰	22.2693 ⁰	22.2348 ⁰
6	25.6445 ⁰	25.8103 ⁰	25.6003 ⁰	25.1672 ⁰
8	27.6244 ⁰	27.6838 ⁰	27.6489 ⁰	27.6039 ⁰



Gambar 4.3 Perbandingan Difraktogram zeolit (a) aktivasi (b) aktivasi tersisipi enzim (c) non-aktivasi (d) non-aktivasi tersisipi enzim

4.2 Pengaruh Aktivasi Zeolit dengan HCl Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

Setelah dilakukan isolasi, diperoleh hasil berupa supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim xilanase dengan warna kuning kecoklatan. Enzim ekstrak kasar kemudian diukur aktivitasnya untuk mengetahui kerja enzim terhadap substrat yaitu xilan. Pengujian aktivitas enzim didasarkan pada jumlah gula pereduksi atau xilosa yang dihasilkan sebagai produk dari hidrolisis xilan oleh enzim

xilanase. Pengukuran xilosa menggunakan prinsip spektrofotometri dengan reagen Dinitrosalisilat (metode Miller-Bailey) pada panjang gelombang 495 nm. Selain pengukuran aktivitas enzim bebas, dilakukan juga uji kadar protein pada enzim bebas xilanase. Pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks biru antara ion Cu^{2+} dengan gugus $-\text{NH}$ dan $-\text{CO}$ dari rantai peptida dalam suasana basa. Pengukuran menggunakan prinsip spektrofotometri dengan reagen Biuret pada panjang gelombang 540 nm. Menurut Sutrisno [48], panjang gelombang yang digunakan dalam pengujian aktivitas adalah panjang gelombang maksimum gula pereduksi yaitu sebesar 495 nm. Sementara panjang gelombang pengukuran kadar protein adalah panjang gelombang maksimum standar kasein yang diperoleh sebesar 550 nm.

Enzim bebas yang rawan terhadap kerusakan dan kurang stabil perlu dilakukan amobilisasi untuk membuat enzim lebih efisien dan dapat digunakan berulang-ulang. Enzim bebas dan enzim hasil amobilisasi diukur aktivitasnya pada panjang gelombang 490 nm. Berdasarkan pengukuran, data enzim xilanase ditunjukkan pada **Tabel 4.2**. Secara umum, enzim bebas memiliki nilai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim amobil. Menurut Krees dkk [46], jika dibandingkan dengan enzim bebas dalam larutan, enzim amobil lebih kuat dan lebih tahan terhadap perubahan lingkungan. Selain itu, sistem enzim amobil yang heterogen memungkinkan penggunaan kembali enzim secara berulang, operasi proses enzimatik, penghentian reaksi yang cepat, dan variasi desain bioreaktor yang lebih beragam. Namun, kekurangan enzim amobil dibandingkan dengan enzim bebas adalah kebanyakan enzim yang diamobilisasi menunjukkan aktivitas yang lebih rendah karena relatif kesulitan dalam mengakses substrat dengan gerakannya yang terhambat.

Berdasarkan **Tabel 4.4**, dibandingkan aktivitas antara enzim xilanase amobil pada zeolit teraktivasi dan zeolit non-aktivasi. Diperoleh hasil zeolit aktivasi memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan zeolit non-aktivasi. Perbedaan aktivitas ini dapat dibuktikan dengan jumlah protein yang terikat pada matriks. Jumlah protein yang terikat pada matriks merupakan selisih antara kadar protein awal sebagai kadar protein total enzim dan kadar protein sisa sebagai jumlah enzim yang lepas dalam proses amobilisasi. Pada **Tabel 4.5** dapat dilihat perbedaan kadar protein sisa dari xilanase

amobil dengan zeolit teraktivasi dan non aktivasi. Kadar protein sisa enzim amobil dengan zeolit yang teraktivasi lebih kecil dibandingkan kadar zeolit non-aktivasi. Hal ini menunjukkan bahwa matriks zeolit teraktivasi memiliki daya adsorpsi yang lebih baik dibandingkan dengan zeolit non-aktivasi.

Tabel 4.4 Data Aktivitas Xilanase

Fraksi Xilanase	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
Xilanase Bebas	$5,411 \pm 0,053$
Xilanase Amobil (Matriks Teraktivasi)	$0,465 \pm 0,015$
Xilanase Amobil (Matriks Non-aktivasi)	$0,427 \pm 0,06$

Hal ini diperkuat dengan hasil uji t dengan menggunakan software *IBM SPSS 23*. Analisis menghasilkan nilai signifikansi $<0,05$ yaitu sebesar 0,006 yang dapat diartikan aktivasi HCl berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim amobil.

Tabel 4.5 Data Kadar Protein Xilanase

Fraksi Xilanase	Kadar Protein (mg/mL)	Protein yang terikat (mg/mL)
Kadar Protein awal	$1,522 \pm 0,17$	-
Kadar Protein Sisa (Zeolit Teraktivasi)	$0,278 \pm 0,019$	1,244
Kadar Protein Sisa (Zeolit Nonaktivasi)	$0,811 \pm 0,019$	0,711

Perbedaan aktivitas enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit teraktivasi dan non-aktivasi dapat dijelaskan dengan hasil karakterisasi kedua matriks menggunakan instrumen *X-ray Fluorescence* (XRF). Hal ini mengakibatkan zeolit teraktivasi memiliki luas permukaan yang lebih besar dibandingkan zeolit non aktivasi. Jumlah enzim yang teradsorpsi pada zeolit teraktivasi pun

menjadi lebih banyak dibandingkan zeolit non aktivasi. Jumlah enzim yang teradsorpsi akan berbanding lurus dengan aktivitasnya. Hal ini dapat diperkuat dengan meningkatnya rasio Si/Al setelah diaktivasi seperti yang ditunjukkan pada **Pembahasan 4.1**

Menurut Heraldry [11], naiknya rasio Si/Al menunjukkan terjadinya dealuminasi pada situs aktif Al-OH dan Si-O-Al, dengan lepasnya Al dari situs aktif Si-O-Al akan menyebabkan penataan kembali Si-O-Si dari luar kerangka sehingga menyebabkan jumlah komposisi Si dalam kerangka akan bertambah. Bertambahnya komposisi Si mengakibatkan kerangka utama zeolit bertambah dan memperluas permukaan zeolit. Semakin luas permukaan zeolit, maka semakin besar daya adsorpsi terhadap enzim dan akan meningkatkan aktivitas enzim.

Enzim xilanase yang digunakan dalam penelitian ini berada pada pH 5-6 yang berada dibawah titik isoelektriknya yaitu 9. Hal ini mengakibatkan enzim xilanase bermuatan positif. Menurut Charlena [49], semakin kecil Si/Al menunjukkan muatan negatif zeolit semakin besar, sehingga ion positif akan semakin banyak yang terikat. Hal ini bertentangan dengan hasil penelitian yang diperoleh. Hasil penelitian menunjukkan, rasio Si/Al zeolit yang lebih besar mengikat enzim yang lebih banyak. Fenomena ini diduga akibat rasio Si/Al yang diperoleh pada karakterisasi XRF dipengaruhi oleh adanya pengotor dari Kuarsa (SiO₂) seperti disebutkan pada **Pembahasan 4.1**. Logam Si pada Kuarsa tidak hilang dalam proses aktivasi. Hal ini dibuktikan oleh **Gambar 4.2** yang menunjukkan *framework* zeolit tidak berubah. Namun, diduga dealuminasi tetap terjadi, sehingga peningkatan rasio Si/Al cukup besar.

Penelitian yang dilakukan oleh Heraldry [11] menghasilkan data seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 4.6** yang memuat perbandingan data luas permukaan dan tingkat keasaman antara matriks zeolit teraktivasi dan non-aktivasi.

Tabel 4.6 Karakter Fisik dan Kimia Zeolit Alam Ponorogo [11]

Sampel	Luas Perm. (m ² /g)	Keasaman (mmol/g)
Zeolit Non-aktivasi	0,91	71,89
Zeolit Aktivasi HCl	2,37	73,35

Tingkat keasaman dari suatu adsorben akan menunjukkan banyaknya H^+ dari asam yang terikat pada struktur zeolit. Hasil analisis keasaman menunjukkan bahwa pengaruh aktivasi dengan perlakuan asam akan meningkatkan keasaman dari zeolit alam. Semakin besar keasaman dari suatu adsorben maka akan meningkatkan situs aktif dari adsorpsi [11]

Berdasarkan data pada **Tabel 4.4** perbedaan aktivitas juga dapat ditinjau dari keasaman zeolit. Aktivasi zeolit dengan menggunakan 0,4 M HCl dapat mengubah kation zeolit melalui mekanisme pertukaran ion antara kation logam dari zeolit dengan H dari asam. Aktivasi dengan HCl yang tidak begitu pekat hanya sedikit merusak kerangka O-Si-O dan O-Al-O mengganti gugus silanol ($=SiOH$) dan aluminol ($=AlOH$) serta mengganti sebagian gugus -OH dengan $-OH_2$ [50]. Hal ini akan menyebabkan lepasnya pengotor-pengotor dengan unsur-unsur yang disebutkan pada **Pembahasan 4.1** dan ditunjukkan pada **Tabel 4.1**

4.3 Pengaruh Aktivasi Zeolit dengan HCl terhadap Pemakaian Ulang Enzim Xilanase Amobil

Tujuan utama dilakukan amobilisasi pada enzim bebas adalah agar enzim xilanase dapat dipakai berulang kali, sehingga penggunaan enzim xilanase lebih efektif dan lebih efisien. Efisiensi penggunaan xilanase amobil dilakukan pada kondisi optimumnya, Xilanase hasil amobilisasi baik yang teraktivasi maupun non aktivasi akan diinkubasi selama 55 menit pada $60^\circ C$. Diukur aktivitasnya pada panjang gelombang 490 nm. Perlakuan ini dilakukan sampai aktivitas enzim xilanase amobil 50% dari aktivitas awal. Setiap satu hari diberi satu perlakuan. Hal ini bertujuan untuk mengeringkan dan membuat konstan berat enzim xilanase amobil.

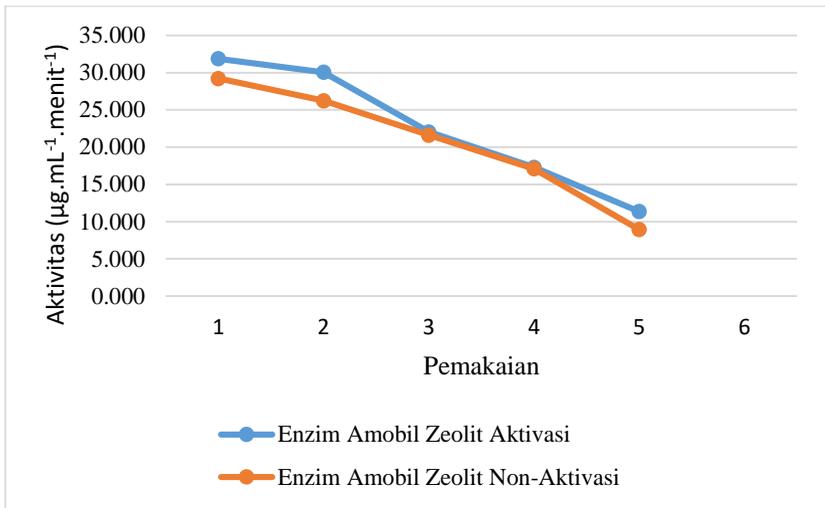
Berdasarkan hasil uji efisiensi pemakaian ulang, aktivitas xilanase amobil baik dengan matriks teraktivasi maupun matriks non-aktivasi menunjukkan tren yang hampir sama yaitu mencapai 50% aktivitas awal pada pengulangan ke-4. Adapun pada pengulangan ke-5 pemakaian ulang enzim berada di bawah 50% seperti yang ditunjukkan **Tabel 4.4**. Merujuk penelitian dari Na'imah [47], penurunan aktivitas tersebut dikarenakan adanya sejumlah xilanase yang terlepas dari permukaan matriks zeolit yang disebabkan oleh

lemahnya daya ikat adsorpsi fisik antar keduanya. Hal ini dapat terlihat dari kadar protein yang diperoleh saat efisiensi penggunaan ulang xilanase amobil yang lebih besar dibandingkan dengan kadar protein amobilisasi sebelum penggunaan ulang xilanase. Kadar protein tersebut menunjukkan bahwa semakin berkurangnya xilanase yang terikat atau menempel di permukaan zeolit, sehingga aktivitas xilanase amobil semakin menurun.

Tabel 4.7 Data Pemakaian Ulang Enzim Amobil

Pemakaian	Aktivitas ($\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$)		Efisiensi (%)	
	ZA	ZNA	ZA	ZNA
1	$32,01 \pm 0,09$	$29,21 \pm 0,36$	100	100
2	$31,86 \pm 0,09$	$29,03 \pm 0,14$	93,89	89,8
3	$22,05 \pm 0,28$	$21,6 \pm 0,19$	68,8	73,9
4	$17,3 \pm 0,51$	$17,09 \pm 0,28$	54,04	58,49
5	$11,34 \pm 0,14$	$8,93 \pm 0,18$	35,4	30,58

Gambar 4.4 menunjukkan adanya sedikit perbedaan aktivitas antara zeolit teraktivasi dan non-aktivasi. Setelah dilakukan uji t dengan *software IBM SPSS 23* diperoleh bahwa data aktivitas pemakaian ulang enzim amobil dengan zeolit teraktivasi dan enzim amobil zeolit non-aktivasi berbeda nyata. Hal ini dibuktikan dengan nilai signifikansi $<0,05$ yaitu $0,045$. Hal ini disebabkan oleh faktor-faktor yang telah dijelaskan pada **Pembahasan 4.2.** seperti luas permukaan dan rasio Si/Al. Pada pemakaian ke-1 dan ke-2, enzim dengan zeolit teraktivasi memiliki aktivitas yang lebih besar. Namun, pada pemakaian ke-3 dan ke-4 aktivitas antara zeolit teraktivasi dan non-aktivasi hampir sama karena zeolit teraktivasi mengalami penurunan aktivitas yang lebih besar dibanding non-aktivasi. Berdasarkan data pada **Tabel 4.7,** data aktivitas tersebut menghasilkan data efisiensi pemakaian ulang dengan pemakaian enzim zeolit teraktivasi ke-1 dan ke-2 memiliki efisiensi yang lebih tinggi dibanding enzim amobil dengan zeolit non-aktivasi. Sementara pada pemakaian ke-3 dan ke-4 efisiensi enzim amobil non-aktivasi lebih tinggi, berbanding lurus dengan aktivitas dari zeolit teraktivasi yang menurun.



Gambar 4.4 Perbandingan Aktivitas Pemakaian Ulang Xilanase Amobil teraktivasi dan non-aktivasi

Efisiensi dari enzim amobil dengan zeolit non-aktivasi lebih stabil. Namun, aktivitas enzim amobil zeolit non-aktivasi lebih kecil dibandingkan zeolit teraktivasi sehingga efisiensi pemakaian ulang dari enzim amobil zeolit non-aktivasi dapat ditingkatkan. Efisiensi yang stabil pada enzim amobil zeolit non-aktivasi diduga akibat adanya aktivator logam yang berasal dari pengotor dalam zeolit non-aktivasi. Data XRF pada **Tabel 4.1.** menunjukkan adanya penurunan dari komponen minor atau pengotor terutama Fe dan Ca. Menurut Haryati [51], penambahan ion logam Fe dan Ca dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase dari *Bacillus pumilus* dan dapat menjaga kestabilannya selama 12 hari. Hasil ini diperkuat oleh [52] bahwa penambahan ion logam Fe dapat meningkatkan aktivitas xilanase yang berasal dari *Trichoderma viride*, terutama pada Fe³⁺.

Aktivitas yang lebih besar menunjukkan bahwa enzim amobil dengan zeolit teraktivasi lebih baik digunakan dalam proses pemakaian ulang karena memiliki aktivitas yang berbeda nyata dengan enzim amobil dengan zeolit non-aktivasi.