

PENGARUH KONSENTRASI DAN LAMA INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM SELULASE DARI KAPANG *Aspergillus niger*

Pujiati¹⁾, R. Bakti Kiswardianta²⁾, Wiwin Solikati³⁾

1FPMIPA IKIP PGRI MADIUN

email: poesky86@gmail.com

2FPMIPA IKIP PGRI MADIUN

email: kiswardianta.biomipa@gmail.com

2FPMIPA IKIP PGRI MADIUN

email: wsolikati@yahoo.com

Abstract

Aspergillus niger is one type of mold that has a high ability to produce cellulases. Cellulases in the manufacturing process required the right conditions in order to obtain optimum quality and quantity. This study aims to determine the effect of different concentrations of inoculum and incubation time on cellulases activity of *Aspergillus niger*. The method used was a quantitative experiment with pattern completely randomized design (CRD) two factorial. Treatment research includes different of inoculum (K) which are 10% (K1), 15% (K2), 20% (K3) and incubation times (T) are 5 days (T1), 7 days (T2), 9 days (T3). The data were taken from the treatment is glucose levels of cellulases activity using the Nelson Somogyi method. Analysis data using ANOVA two lanes with 5% of a significance level and continued to test Honestly Significant Difference (HSD). The results showed that: $F_{hit} > F_{tab}$ so that there are significant differences in inoculum concentrations and incubation time of cellulolytic activity from *Aspergillus niger*. The highest glucose levels obtained in K3T1 treatment (20% of concentration and 5 days of incubation time) with 0.072%.

Keywords: *Aspergillus niger*, glucose, cellulases activity

1. PENDAHULUAN

Kapang *Aspergillus niger* adalah mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase. Menurut Yuniarti (2004: 35-36) *Aspergillus niger* telah dikenal sebagai salah satu mikroorganisme yang memiliki kemampuan yang tinggi untuk menghasilkan berbagai enzim yang penting penerapannya dalam industri pangan seperti enzim selulase, amilase, amiloglukosidase. Menurut Hieronymus (2010: 4) menyatakan bahwa kehidupan mikroskopik dalam tanah meliputi yeast, fungi, alga, diatom, dan protozoa. Jamur yang mendiami tanah terutama jamur tingkat rendah yaitu kapang.

Aspergillus niger merupakan fungi dari *ascomycota* yang berfilamen, mempunyai hifa, bercabang-cabang dan bersekat, dan ditemukan melimpah di alam. Fungi diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. *Aspergillus niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C. Proses pertumbuhan fungi

ini adalah aerobik. *Aspergillus niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal, berwarna coklat gelap (Maria & Suharto, 2012: 10).

Berikut ini adalah klasifikasi ilmiah *Aspergillus niger*:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Kelas	: Eurotiomycetes
Ordo	: Eurotiales
Family	: Trichocomaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus niger</i>

(Maria & Suharto, 2012: 11)

Tanah hutan yang dipenuhi guguran daun dan ranting-ranting membuat tanahnya subur. Tanah yang subur akibat dekomposisi dan penguraian daun beserta ranting-ranting oleh mikroorganisme menjadi unsur hara yang diperlukan oleh tumbuhan. Tanah yang subur diindikasikan populasi mikroorganisme

melimpah karena banyaknya sumber energi dari reduksi senyawa-senyawa organik yang dibutuhkan oleh mikroorganisme tersebut.

Produksi enzim selulase dalam skala industri membutuhkan biaya produksi tinggi sehingga enzim yang dihasilkan mahal, untuk mengatasi masalah dalam produksi enzim digunakan substrat dari limbah pertanian. Menurut Puspita, Bambang, Wahyunanato (2013: 22) menyatakan produksi enzim memerlukan substrat yang biasanya berasal dari bahan berpati maupun berselulosa. Jerami merupakan limbah pertanian yang sangat melimpah di Indonesia. Jerami hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak, sisanya yang tidak dimanfaatkan dibakar begitu saja sehingga dapat menimbulkan polusi udara. Jerami belum dimanfaatkan secara optimal. Limbah pertanian tersebut dapat dijadikan substrat dalam pembuatan enzim selulase karena mengandung selulosa.

Menurut Nadiem, Arief, Sugeng (2010: 131) menyatakan Indonesia menghasilkan 180 juta ton jerami padi tiap tahun yang terdiri dari 38% selulosa, 24% hemiselulosa, dan 8% lignin.

1) Selulosa

Selulosa merupakan senyawa organik yang paling banyak di alam, karena struktur bahan seluruh tumbuhan sebagian besar terdiri atas selulosa. Suatu jaringan yang terdiri atas beberapa lapis serat selulosa adalah unsur penguat utama dinding sel tumbuhan. Selulosa merupakan senyawa polisakarida yang mempunyai rumus $(C_6H_{10}O_5)_n$ dimana n berkisar dari 2000 sampai 3000, selulosa terdapat dalam tanaman sebagai komponen penyusun dinding sel (Harunsyah dan Ridwan, 2012: 49).

2) Hemiselulosa

Hemiselulosa termasuk polisakarida yang terdapat bersama-sama dengan selulosa, bila di hidrolisa menghasilkan bermacam-macam sakarida seperti hektosa dan pentosa (Pandey, dalam Harunsyah & Ridwan, 2012: 49).

3) Lignin

Lignin adalah penyusun jaringan tumbuhan selain selulosa dan hemiselulosa. Fungsi dari lignin untuk memberi kekakuan pada jaringan pengangkut tumbuhan dan melindungi struktur yang tersusun dari polisakarida (selulosa dan hemiselulosa) dari serangan organisme lain sehingga lignin bersifat rekalsitran (Hammel dalam Subowo, 2010: 1).

Menurut Judoamidjojo, dkk. (dalam Gunam, Buda, Yoga, 2010: 56) menyatakan hambatan proses hidrolisis selulosa baik secara

asam maupun enzimatik adalah adanya struktur kristalin dan lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa. Menurut Gunam, Redi, Bagus (2011: 30) menyatakan untuk memecah pelindung lignin perlu dilakukan perlakuan terlebih dahulu terhadap bahan baku yaitu dengan proses delignifikasi. Delignifikasi merupakan suatu proses pembebasan lignin dari suatu senyawa kompleks. Dengan pemberian perlakuan delignifikasi pada substrat maka selulosa alami diharapkan menjadi mudah dihidrolisis oleh enzim selulolitik.

Enzim selulase merupakan enzim yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri. Sinatari, Aminin, Sarjono (2013: 131) mengemukakan enzim selulase umumnya digunakan dalam berbagai industri seperti bioteknologi makanan, tekstil, pakan ternak, kertas, dan pertanian. Banyaknya kebutuhan akan enzim selulase diperlukan jumlah inokulum dan waktu inkubasi (fermentasi) dalam jumlah yang sesuai agar mendapatkan enzim selulase yang optimal, sehingga aktivitas enzim selulase maksimal. Konsentrasi inokulum adalah jumlah mikroorganisme yang ditambahkan dalam substrat dan nutrisi untuk proses pembuatan enzim selulase. Jumlah mikroorganisme sangat berpengaruh dalam proses fermentasi. Proses fermentasi dapat optimal dengan menambahkan jumlah inokulum dengan konsentrasi yang tepat, sehingga didapatkan enzim selulase dengan aktivitas enzim yang maksimal. Menurut Widya, Anthoni, Yetria (2013: 36-37) menyatakan besar kecilnya jumlah inokulum mempengaruhi aktivitas enzim.

Menurut Abdul Aziz (dalam Zulfatus, dkk., 2008: 13) Pada awal fermentasi aktivitas enzim masih sangat rendah. Aktivitas enzim akan meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi dan menurun pada hari ke-10. Hal ini mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme yang mengalami beberapa fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Organisme pembentuk spora biasanya memproduksi enzim pada fase pasca eksponensial. Jadi dapat diduga bahwa pada saat aktivitas enzim yang dihasilkan tinggi, maka kapang telah berada pada fase tersebut. Pada temperatur 31°C aktivitas tertinggi diperoleh setelah hari ke-4 fermentasi, akan tetapi pada hari ke-6 mengalami penurunan aktivitas enzim dan pada hari ke-8 mengalami kenaikan kembali.

Produksi enzim selulase diperlukan

proses dan lama fermentasi untuk menghasilkan enzim selulase dengan optimal. Enzim selulase yang didapat sebelum digunakan diuji aktivitas enzimnya terlebih dahulu. Aktivitas enzim yang telah diketahui kemampuannya dapat langsung diaplikasikan sehingga mendapatkan hasil yang maksimal.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alumunium foil, wrapping plastic; autoklaf; ayakan; sentrifugasi; timbangan listrik; oven; gelas beaker; pipet ukur; rak tabung reaksi; spatula; spektrofotometer; tabung reaksi; ose; kompor listrik; bunsen; erlenmeyer; gelas ukur; tip; mikropipet; cawan petri; gelas ukur; *shaker*, korek api, botol spray.

PDA (Potato Dextrose Agar); akuades; alkohol 70%; NaOH 6%; amonium *sulfat* $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 10 g/L; urea $(\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ 3 g/L; kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 3 g/L; magnesium sulfat heptahidrat $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 0,5 g/L; kalsium klorida monohidrat $(\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 0,5 g/L; substrat jerami; reagensia Nelson; reagen Arsenomolibdat; glukosa standar; KOH 2 M, *Aspergillus niger*.

Cara Kerja

Ambil sampel tanah sebanyak 1g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-9} . Siapkan PDA (Potato Dextrose Agar) 1,75g dilarutkan dengan aquades dalam erlenmeyer dan dipanaskan di atas kompor listrik sampai larutan homogen. Sumbat mulut erlenmeyer yang sudah terdapat media PDA dengan kapas kasa 100% dan dilapisi dengan alumunium foil. Siapkan 3 pasang cawan petri yang dibungkus kertas koran. sterilkan erlenmeyer dan cawan petri dimasukkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20menit. Ambil 1mL dari 3 pengenceran terakhir untuk ditanam secara spread plate pada medium PDA yang telah dituang dalam cawan petri $\pm 15\text{mL}$, kemudian digoyang membentuk angka 8 sampai mengeras. Bungkus cawan petri dengan wrapping plastic kemudian diinkubasi selama 7 hari.

Pengkulturan murni dengan agar miring

Siapkan PDA 1,95g dilarutkan dengan 50mL aquades dan dipanaskan di atas kompor listrik sampai homogen. Masukkan $\pm 5\text{mL}$ media PDA dalam tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan dilapisi alumunium foil. Sterilkan media PDA dalam tabung reaksi dengan autoklaf

dengan suhu 121°C selama 20 menit. Media agar dimiringkan sampai mengeras supaya terbentuk agar miring. Ambil spora *Aspergillus niger* dengan ose dari isolasi mikroba dan di tumbuhkan di media agar miring dengan metode zig-zag.

Penyiapan substrat

Siapkan jerami padi yang telah di keringkan selama 4hari di bawah matahari. Hancurkan jerami padi kemudian diayak. Melakukan delignifikasi dengan perbandingan 1:15 antara serbuk jerami dan NaOH selama 12 jam, kemudian dicuci sampai netral setelah itu dilakukan pengeringan.

Pembuatan larutan nutrisi

Melarutkan urea (3g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10g/L), KH_2PO_4 (3g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g/L) dengan akuades dalam erlenmeyer.

Pembuatan enzim selulase

Sebanyak 5g serbuk jerami dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 50 mL larutan nutrisi kemudian ditutup. Campuran (media) tersebut disterilkan pada temperatur 121°C selama 20 menit kemudian didinginkan. Menginokulasi bibit *Aspergillus niger* sesuai dengan variabel yang telah ditentukan pada media dan dinkubasi sesuai dengan variabel yang telah ditentukan. Media yang telah dinokulasi sesuai variabel yang telah ditentukan dipanen pada lama inkubasi 5,7, dan 9 hari. Menshaker media enzim selulase selama 2 jam. Memanen enzim dengan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian didapat supernatan (*crude enzim selulase*). Mengukur enzimselulase 5ml dan dicampur dengan substrat jerami 1% dari banyak larutan enzim diamkan selama 30 menitenzim siap diuji dengan menggunakan metode Nelson Somogyi.

Uji aktivitas enzim dengan analisa glukosa menggunakan metode Nelson Somogyi (Dyah, 2012:40).

Preparasi sampel dan pembuatan kurva standar

Menyediakan larutan sampel sebanyak 0,5ml. Siapkan 6 tabung reaksi masing-masing diisi dengan 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 ml larutan glukosa standar. Tambahkan akuades dalam tiap tabung tersebut sehingga volume untuk tiap-tiap tabung mencapai 1ml. Tambahkan 1ml reagensia Nelson pada tiap-tiap tabung dan panaskan

dalam air mendidih selama 20 menit. Dinginkan semua tabung dengan cara direndam dalam air dingin hingga suhu mencapai 25°C. Tambahkan 1 ml reagen Arsenomolibdat pada tiap-tiap tabung, kocok homogen sampai semua endapan Cuprooksida larut semua. Tera absorbansinya pada λ 540nm dengan spektrofotometer. Buat kurva standar hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi. Tentukan persamaan kurva standarnya.

Penentuan kadar gula reduksi sampel

Penentuan kadar gula reduksi sampel dengan menggunakan persamaan kurva standar. Kadar gula reduksi (Sudarmadji, 1997):

$$\frac{x.f.p}{b. sampel (mg)} \cdot 100$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil uji kadar glukosa dari aktivitas enzim selulase kapang *Aspergillus niger* dengan substrat jerami dengan metode *Nelson Somogyi* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Penghitungan kadar glukosa dari aktivitas enzim selulase

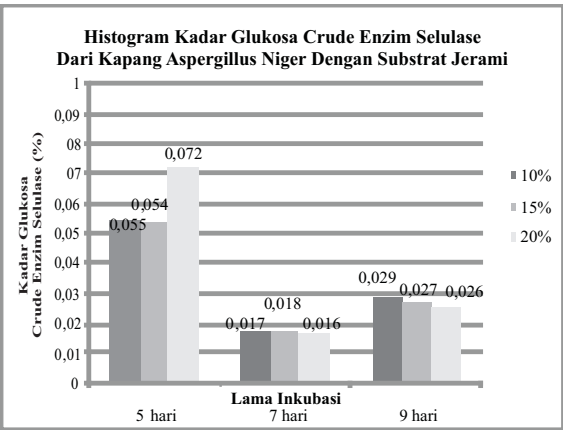
Perlakuan	Kadar Glukosa		Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	
K1T1	0,053	0,057	0,055
K1T2	0.019	0,015	0,017
K1T3	0,029	0,027	0,029
K2T1	0,053	0,055	0,054
K2T2	0,017	0,018	0,018
K2T3	0,027	0,027	0,027
K3T1	0,075	0,069	0,072
K3T2	0,016	0,016	0,016
K3T3	0,025	0,027	0,026

Tabel 1. menunjukkan bahwa rata-rata kadar glukosa tertinggi adalah 0,072 pada perlakuan konsentrasi inokulum 20% lama inkubasi 5 hari (K3T1), sedangkan rerata kadar glukosa terendah adalah 0,016 pada perlakuan

konsentrasi 20% lama inkubasi 7 hari (K3T2).

Perbedaan konsentrasi inokulum dan lama inkubasi berpengaruh pada aktivitas enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger* dengan substrat jerami dari masing-masingperlakuan.

Berdasarkan tabel 1 dibuat histogram seperti pada gambar 1



Gambar 1. Rata-rata kadar glukosa enzimselulase dari kapang *Aspergillus niger*

Berdasarkan gambar 4.1 menunjukkan bahwa kadar glukosa paling tinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi 20% dengan lama inkubasi 5 hari (K3T1) sebesar 0,072% sedangkan kadar terendah pada perlakuan dengan konsentrasi 20% dengan lama inkubasi 7 hari (K3T2) sebesar 0,016%. Konsentrasi inokulum dan lama inkubasi mempengaruhi kadar glukosa enzim selulase. Bila dikaitkan dengan tabel sidik ragam konsentrasi inokulum mempengaruhi kadar glukosa, hal ini dikarenakan dalam proses fermentasi inokulum yang lebih kecil dari 15% tidak sesuai untuk produksi enzim selulase karena inokulum yang digunakan jumlahnya tidak optimum (Fransiska, dkk., 2011: 5-6), sehingga konsentrasi 20% cukup optimum untuk menghasilkan enzimselulase dengan aktivitas tertinggi yaitu 0,072%.

Bila dikaitkan dengan tabel sidik ragam lama inkubasi mempengaruhi kadar glukosa enzimselulase bahwa lama inkubasi 5 hari memperoleh kadar glukosa tertinggi yaitu 0,072%, hal ini sesuai dengan pernyataan Abdul Aziz dalam Zulfatus, dkk. (2008: 13) aktivitas enzim diperoleh pada saat pasca eksponensial (stasioner) yaitu setelah hari ke 4 fermentasi. Pada lama inkubasi tersebut menunjukkan bahwa enzim selulase bekerja secara optimal dalam menghidrolisis substratnya yaitu selulosa yang terdapat pada jerami menjadi glukosa.

Bila dikaitkan dengan tabel sidik ragam konsentrasi inokulum dan lama inkubasi

(<http://repository.unhas.ac.id>, Diunduh 12 Maret 2014).

- Nadiem Anwar dan Arief Widjaja. 2010. *Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar Dari Trichoderma Reesei Dan Aspergillus niger*. Makara Sains (Online), Vol. 14 No. 2, (<http://journal.Ui.ac.id>, Diunduh 6 Maret 2014).
- Nana Sudjana. 2011. *Penilaian Hasil Proses Belajar Mengajar*. Bandung: PT REMAJAROSDAKARYA
- Nasrul Rofiah Hidayati. 2010. *Buku Petunjuk Kimia Dasar I*. Madiun: IKIP PGRI MADIUN
- Nova Aulia Rohana, dkk. 2013. *Produksi Selulase Dari Aspergillus niger Dan Kemampuannya Menghidrolisis Ampas Tebu*. Jurnal Kimia Unand (Online), Vol. 2 No. 2, (<http://Jurnalsain-unand.com>, Diunduh 29 Januari 2014).
- Nuryani. 2005. *Strategi Belajar Mengajar Biologi*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Poltekkes Surakarta. 2012. *Praktikum dan PKL*. (Online), (<http://www.poltekkes-solo.ac.id>, Diunduh 17 Maret 2014).
- Puspita Wahyuningtyas, dkk. 2013. *Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi Trichoderma reesei Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatis Pada Produksi Bioetanol*. Jurnal Bioproses Komoditas Tropis (Online), Vol. 1 No. 1, (<http://jbkt.ub.ac.id>, Diunduh 24 Januari 2014).
- Rizka Anindyah Novitasari. 2013. *Identifikasi Keanekaragaman Zooplankton Di Waduk Bening Saradan Sebagai Bahan Penyusun Panduan Praktikum Materi Klasifikasi Makhluk Hidup Di SMA*. Skripsi tidak diterbitkan. Madiun: Program Studi Pendidikan Biologi IKIP PGRI Madiun.
- Selviza Safaria, dkk. 2013. *Efektivitas Campuran Enzim Selulase Dari Aspergillus niger Dan Trichoderma*

- reesei* Dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. Jurnal Kimia Khatulistiwa (Online), Vol. 2 No. 1, (<http://jurnal.untan.ac.ad>, Diunduh tanggal 29 Januari 2014).
- Sinantari, dkk. 2013. *Pemurnian Selulase Dari Isolat Kb Kompos Termofilik Desa Bayat Klaten Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat*. Chem Info (Online), Vol. 1 No.1, (<http://portalgaruda.org>, Diunduh tanggal 29 Januari 2014).
- Subowo. 2010. *Uji Aktivitas Enzim Selulase Dan Ligninase Dari Beberapa Jamur Dan Potensinya Sebagai Pendukung Pertumbuhan Tanaman Terong (Solanum melongena)*. Berita Biologi, 10(1): 1.
- Sugiyono. 2012. *Metode Penelitian Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif, R & D*. Bandung: Alfabeta.
- Widya Lestari, dkk. 2013. *Pengaruh Konsentrasi Inokulum Dan Induser Terhadap Produksi Protease Alkali Bacillus Sp. Isolat Mi.2.3 Termofilik*. Jurnal Biologika (Online), Vol. 2 No. 1, (<http://jurnalbiologika.files.wordpress.com>, Diunduh 10 Maret 2014).
- WildanYatim. 2003. *Biologi Modern Biologi Sel*. Bandung: Tarsito.
- Yuniarti Yusak. 2004. *Pengaruh Suhu Dan Ph Bufer Asetat Terhadap Hidrolisa Cmc Oleh Enzim Selulase Dari Ekstrak Aspergillus Niger Dalam Media Campuran Onggok Dan Dedak*. Jurnal Sains Kimia (Online), Vol.8 no.2, (<http://repository.Usu.ac.id>, Diunduh 24 Januari 2014).
- Zulfatus Sa'adah, dkk. 2008. *Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*. (Online), (<http://eprints.undip.ac.id>, Diunduh 12 Maret 2014).