

## PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH FUNGI SELULOTIK YANG DIRADIASI SINAR GAMMA DALAM FERMENTASI JERAMI PADI

T.R.D.Larasati<sup>1</sup>, N.Mulyana<sup>1</sup>, M.Anggriawan<sup>2</sup> dan Y. Effendi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Aplikasi Isotop Radiasi, BATAN

Jl. Lebak Bulus No.49 Jakarta

<sup>2</sup>Fakultas Sains dan Teknologi Program Studi Biologi (Bioteknologi)

Universitas Al Azhar Indonesia, Kebayoran Baru, Jakarta

E-mail: [tremto@batan.go.id](mailto:tremto@batan.go.id)

Diterima: 12 Agustus 2014

Diperbaiki: 18 Februari 2015

Disetujui: 11 Maret 2015

### ABSTRAK

**PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH FUNGI SELULOTIK YANG DIRADIASI SINAR GAMMA DALAM FERMENTASI JERAMI PADI.** Produksi enzim selulase oleh *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* yang dipapari radiasi sinar Gamma dosis rendah telah dilakukan menggunakan substrat jerami padi dengan metode *Solid State Fermentation* (SSF). Iradiasi sinar gamma dosis rendah berpengaruh terhadap percepatan aktivitas *exo*-enzim oleh mikroba. Strain *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* dipapari radiasi sinar Gamma dengan dosis rendah : 0 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 250 Gy dan 350 Gy. Parameter proses SSF yang berkaitan dengan dekomposisi enzimatis adalah total fungi, nilai pH, aktifitas enzim selulase, kadar glukosa, dan protein kasar diamati selama 16 hari. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh iradiasi sinar gamma dosis rendah dan waktu fermentasi terhadap kemampuan enzimatik dengan nilai dosis yang berbeda antar strain. *Aspergillus niger* memiliki dosis iradiasi terbaik 350 Gy dengan peningkatan produksi enzim selulase sebesar 15,23 U/g Bk, kadar glukosa sebesar 6,25 mg/mL dan kadar protein kasar sebesar 10,1 %. Sedangkan *Trichoderma viride* memiliki dosis iradiasi optimal 150 Gy dengan peningkatan produksi enzim selulase sebesar 13,23 U/g Bk, dengan kadar glukosa sebesar 5,61 mg/mL dan kadar protein kasar sebesar 9,63% pada waktu fermentasi terbaik 8 hari.

**Kata kunci :** Enzim selulase, Fungi, Radiasi, Fermentasi

### ABSTRACT

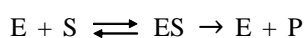
**PRODUCTION OF CELLULASE ENZYMES BY CELLULOTIC FUNGI IRRADIATED GAMMA RAY IN RICE STRAW IN FERMENTATION** .Cellulase enzyme production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger* that are exposed low dose gamma radiation have been conducted using rice straw substrate by using *Solid State Fermentation* (SSF). Low-dose gamma ray irradiation effect on the acceleration of *exo*-enzyme activity by microbes. Strains of *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger* dipapari Gamma ray radiation with low doses: 0, 50, 150, 250 and 350 Gy. Process parameters SSF related to the enzymatic decomposition is total fungi, pH value, the activity of cellulase enzymes, glucose, and crude protein were observed for 16 days. The results showed the effect of low-dose gamma ray irradiation and enzymatic fermentation time on the ability to value different doses between strains. *Aspergillus niger* has the best irradiation dose 350 Gy with increased production of cellulase enzymes at 15.23 U/g Bk, glucose level of 6.25 mg/mL and crude protein level of 10,1%. Whereas *Trichoderma viride* has optimal irradiation dose 150 Gy with increased production of cellulase enzymes at 13.23 U/g Bk, glucose level of 5,61 mg/mL and crude protein level of 9,63% on the best fermentation time of 8 days.

**Keywords:** Cellulose enzyme, Fungal, Radiation, Fermentation

## PENDAHULUAN

Unit penyusun (*building block*) selulosa adalah selobiosa yang dapat dikonversi menjadi glukosa dengan bantuan enzim selulase. Selulosa adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik, bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Enzim merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimia sebagai katalis suatu reaksi. Enzim selulase terdiri dari kompleks eksoglukanase, endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase, yang dapat merombak selulosa menjadi selubiosa hingga akhirnya menjadi glukosa [1]. Sebagian glukosa yang dihasilkan tersebut kemudian digunakan oleh jamur sebagai sumber karbon dan sebagian masih terkandung dalam media tumbuh [2]. Proses perombakan tersebut dikenal sebagai hidrolisis enzimatik. Proses hidrolisis enzimatik selulosa berhubungan dengan nilai aktivitas enzim selulase. Proses hidrolisis enzimatik menggunakan jamur/kapang lebih menguntungkan karena lebih murah dan tidak menimbulkan pencemaran lingkungan [3].

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di luar sel mikroorganisme selulolitik. Interaksi antara substrat selulosa (S) dan enzim selulase (E) akan membentuk kompleks enzim substrat (ES) dan menghasilkan glukosa (P) sebagai produk akhir sesuai dengan reaksi berikut ;



Produksi enzim selulase merupakan enzim yang dihasilkan dari proses fermentasi jerami padi (fasa padat) akibat metabolisme *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger*. Proses fermentasi merupakan proses dekomposisi untuk menghilangkan kandungan lignin yang ada di dalam jerami padi, dimana ikatan silang dari struktur aromatik lignin dapat memperlambat penetrasi oleh enzim, sehingga mempengaruhi proses hidrolisis [1].

Selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas. Selulase juga digunakan dalam pengolahan kopi dan kadang digunakan dalam industri farmasi sebagai zat untuk membantu sistem pencernaan [4]. Selulase juga dimanfaatkan dalam proses fermentasi dari biomassa menjadi biofuel, seperti bioethanol [5].

Salah satu mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase adalah jamur/kapang. Jamur berfilamen seperti *Trichoderma sp.* dan *Aspergillus sp.* adalah penghasil enzim selulase dan *crude enzyme* secara komersial [6]. Baik *Trichoderma sp.* maupun *Aspergillus sp.* merupakan fungi selulolitik yang mempunyai kemampuan mensekresi enzim selulase lebih banyak daripada bakteri [7].

Iradiasi sinar gamma dosis rendah berpengaruh terhadap percepatan aktivitas enzim oleh mikroba [8,9]. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viridie* dan *Trichoderma koningii* yang diiradiasi gamma pada dosis 500 Gray dapat memproduksi exo-enzim yang sa ngat

aktif sehingga mampu menurunkan pertumbuhan patogen dengan prosentase tertinggi [10]. Paparan iradiasi gamma pada dosis 250 Gray berpengaruh terhadap peningkatan bobot kering miselia *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma viridie* masing-masing sekitar 22,8% dan 16,2% [9].

Substrat yang biasa digunakan pada hidrolisis enzimatik untuk memproduksi enzim selulase adalah jerami padi, dengan kandungan selulosa yang relatif tinggi sekitarnya 38% [11]. Produksi enzim selulase menggunakan bahan baku jerami padi melalui proses fermentasi. Metode fermentasi alternative yang digunakan adalah fermentasi fasa padat atau *Solid State Fermentation* (SSF). Metode SSF adalah proses fermentasi di mana mikroorganisme tumbuh pada bahan padat tanpa adanya cairan. Kelebihan dari metode SSF diantaranya adalah meminimalisir kontaminasi dari bakteri atau kapang lain akibat kadar air yang rendah, kondisi media yang mirip dengan habitat fungi, komposisi media yang relatif sederhana serta biaya produksi yang lebih murah [12].

Pada penelitian ini dilakukan iradiasi sinar Gamma dosis rendah pada kapang jenis *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* hasil isolasi mikroba di beberapa lokasi di Jawa Barat (Bogor), Jawa Tengah (Wonosobo) dan Jawa Timur (Cepu dan Bojonegoro) oleh kelompok Lingkungan Bidang Industri dan Lingkungan PAIR – BATAN untuk memproduksi enzim selulase menggunakan substrat jerami padi dengan metode SSF (*Solid State Fermentation*) serta pengaruhnya pada parameter proses. Penelitian ini bertujuan memperoleh kondisi optimal dalam produktivitas enzim selulase oleh *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* yang diiradiasi sinar Gamma dosis rendah dan serta parameter proses yang meliputi : pH, Total Fungi, kadar protein kasar, kadar glukosa dan aktivitas enzim selulase.

## METODE PERCOBAAN

### Bahan dan Alat

#### Bahan

Bahan yang digunakan meliputi jerami padi, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Brooth* (PDB), larutan fisiologis (NaCl 0,85%), *reagent* Nelson, arseno molibdat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 %, DNS, larutan CMC, *buffer* sitrat, jerami padi, akuades, alkohol 70%, plastik tahan panas, molases, urea, kantong plastik hitam besar, isolat cair *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* yang diperoleh dari koleksi kultur mikroorganisme di Kelompok Lingkungan, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional (PAIR – BATAN).

#### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, erlenmeyer, cawan petri, *micropipet*, *microtube*, *Auto-*

Tabel 1. Rancangan Penelitian (Perlakuan)

F1 \ F2	Tanpa Isolat (Kontrol)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>
0 Gy (Tanpa radiasi)	K	An 0	Tv 0
50 Gy	-	An 50	Tv 50
150 Gy	-	An 150	Tv 150
250 Gy	-	An 250	Tv 250
350 Gy	-	An 350	Tv 350

Keterangan : F1 (Faktor pertama), F2 (Faktor kedua) dan K (Kontrol)

*clave*, cawan petri, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, nampan plastik, neraca analitik, Rak SSF, mesin pencacah, oven, *mortar*, *pestle*, corong, gelas ukur, tabung reaksi, pH meter, vortex, rak tabung reaksi, cawan porselen, desikator, ose, bunsen, gunting, *water bath*, *heater*, refraktometer, spektrofotometer, dan Gamma IRKA Chamber 4000A.

Produksi enzim selulase dari *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* yang diradiasi sinar Gamma dosis rendah diamati berdasarkan beberapa parameter yaitu pH, total fungi, protein kasar, aktifitas enzim dan nilai kandungan glukosa. Variasi perlakuan dosis radiasi terdiri dari: 0 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 250 Gy dan 350 Gy. Sampel yang diamati adalah substrat jerami padi hasil *Solid State Fermentation*.

## Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial menggunakan 2 faktor dan 2 ulangan, faktor pertama yaitu dosis iradiasi meliputi tanpa dosis iradiasi (Kontrol) dan dengan iradiasi, sedangkan faktor kedua yaitu jenis *fungi* meliputi tanpa isolat (kontrol), isolat *Aspergillus niger* dan isolat *Trichoderma viride* yang masing-masing terpisah. Tabel perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

## Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dengan 4 tahap yaitu kultivasi, iradiasi, fermentasi dan evaluasi. Parameter yang diukur meliputi pH, viabilitas, aktivitas enzim, gula reduksi, dan protein serat kasar.

### Pembuatan Kultur Cair (Kultivasi)

Kultivasi dilakukan dengan isolat murni yang tersedia di lab Lingkungan dan Kebumihan Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional. Media subkultur dibuat dengan mencampurkan 4,5 g *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan 150 ml *aquades* yang

dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer lalu di *shaker* selama 20 menit. Media yang sudah di *shaker* lalu dimasukkan kedalam dua Erlenmeyer yang berbeda sebanyak 25 mL, ditutup dengan *aluminium foil* dan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril lalu diinokulasi dengan isolat murni sebanyak 5 mL, ditutup rapat kembali, dan dishaker selama 2 hari hingga 3 hari dengan kecepatan 75 rpm. Inokulasi tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) agar tidak terjadi kontaminasi. Kultivasi dilakukan untuk membuat persediaan kapang, agar kapang tersebut bisa bekerja dengan baik pada media penyinaran dan media pertumbuhan.

### Perlakuan Iradiasi Sinar Gamma

Iradiasi dilakukan dengan pembuatan media PDA terlebih dahulu dengan mencampurkan 4,5 g *Potato Dextrose Broth* (PDB), 150 ml akuades dan 1,2 g agar, kemudian dipanaskan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril kemudian dituang ke 8 tabung reaksi yang berbeda. Media yang sudah mengeras lalu diinokulasi dengan dua jenis isolat yang berbeda masing-masing empat tabung, ditutup dan diinkubasi dengan suhu 30 °C selama 5 hari hingga 7 hari. Masing-masing tabung yang sudah diinkubasi tersebut diberi label sesuai dosis radiasi (50 Gy, 150 Gy, 250 Gy, 350 Gy dengan laju dosis 2,1 Kgy / jam) dan kemudian diiradiasi dengan dosis yang berbeda sesuai dengan label menggunakan Gamma IRKA Chamber 4000A. Iradiasi ini diharapkan dapat menstimulasi kapang agar dapat bekerja lebih baik.

### Fermentasi Jerami Padi

Hasil kapang yang diiradiasi tersebut lalu diperbanyak kembali melalui subkultur menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Hasil perbanyakan tersebut kemudian dijadikan starter untuk inokulasi ke jerami padi. Jerami padi yang digunakan sebagai substrat harus dicacah terlebih dahulu hingga berukuran kurang lebih 2 cm. Jerami padi yang sudah dicacah diatur pH hingga 5,5 dengan kadar air 50% hingga 70% dan ditambahkan nutrisi tambahan berupa molases, urea sebanyak 2% dan *trace element*. Jerami tersebut disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121 °C dengan diletakkan ke dalam 33 kantong plastik tahan panas yang berbeda. Berat jerami tiap kantong plastik tahan panas disamakan. Masing-masing kantong plastik tahan panas berisi inokulum yang berbeda dengan dosis perlakuan yang sudah disesuaikan yaitu 0 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 250 Gy dan 350 Gy. Kantong plastik yang sudah diinokulasi diletakkan ke dalam rak SSF dan dipisahkan dengan kantong plastik hitam besar untuk tiap isolat.

## Evaluasi

Pengamatan dilakukan setiap empat hari sekali untuk melihat perkembangan kapang tersebut. Evaluasi dilakukan dalam jangka waktu 0 hari, 4 hari, 8 hari, 12 hari dan 16 hari. Evaluasi yang dilakukan mencakup pengukuran pH dan viabilitas, pengukuran aktivitas enzim, pengukuran kandungan gula, dan protein kasar kemudian dilanjutkan dengan analisis data menggunakan statistik.

## Perhitungan Total Fungi (Viabilitas) dan Pengukuran pH

Perhitungan total *fungi* dilakukan dengan cara sampel ditimbang sebanyak lima gram dan ditambahkan 45 mL NaCl 0,85%, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 15 menit. Sampel yang sudah homogen kemudian diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan *micropipet* dan dimasukkan kedalam *microtube* yang berisi 0,9 ml NaCl 0,85% lalu ditutup untuk kemudian di *vortex*, kemudian sampel yang sudah di *vortex* diambil kembali sebanyak 0,1 mL dan dipindahkan ke *microtube* selanjutnya yang juga berisi NaCl 0,85%, ditutup dan kemudian di *vortex* kembali, cara tersebut diulangi kembali hingga mencapai *microtube* ke enam. Sampel pada *microtube* ke enam kemudian diambil sebanyak 0,1 mL dan dipindahkan ke cawan petri yang sudah berisi media pertumbuhan *Potato Dextrose Agar (PDA)* untuk kemudian diinkubasi selama 2 hari hingga 3 hari pada suhu 37 °C di dalam inkubator.

Perhitungan total *fungi* dilakukan dengan metode *Total Plate Count (TPC)*. Koloni *fungi Aspergillus niger* akan mempunyai warna abu – abu kehitaman sedangkan koloni *fungi Trichoderma viride* akan berwarna kuning. Pengukuran pH dilakukan dengan cara sampel ditimbang sebanyak 2 gram hingga 3 gram dan ditambahkan *aquadest* sebanyak 10 mL hingga 15 mL, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 15 menit dan diukur pHnya menggunakan pH meter.

## Pengukuran Kandungan Protein Kasar

Protein kasar merupakan nilai kandungan total N (nitrogen) suatu bahan dikalikan bilangan 6.25. Kandungan N dianalisis menggunakan metode *Kjeldahl*.

## Pengukuran Kandungan Glukosa

Sebanyak 2 gram sampel ditimbang dan ditambahkan dengan 4 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% kemudian disaring menggunakan kertas saring, filtrat yang didapat kemudian diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL pereaksi nelson dan dipanaskan selama 20 menit. Sampel yang sudah dipanaskan kemudian didinginkan ditambahkan 1 mL larutan arsen, dilakukan pengadukan

dan ditambah dengan 7 mL *aquadest* dan selanjutnya dilakukan pengukuran dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm, pengukuran menggunakan metode *Nelson-Somogyi*.

## Pengukuran Aktifitas Enzim (Metode DNS)

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur jumlah gula tereduksi dengan menggunakan larutan *Carboxyl Methyl Cellulose (CMC)* 1% sebagai substrat dalam buffer sitrat 0,5 M dan pH 4,8. Penentuan gula pereduksi dihitung sebagai glukosa dengan menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid (DNS)* dan selanjutnya diukur menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang,  $\lambda = 540$  nm. Satu unit aktivitas enzim setara dengan satu mikromol ( $\mu\text{mol}$ ) glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis tiap menit.

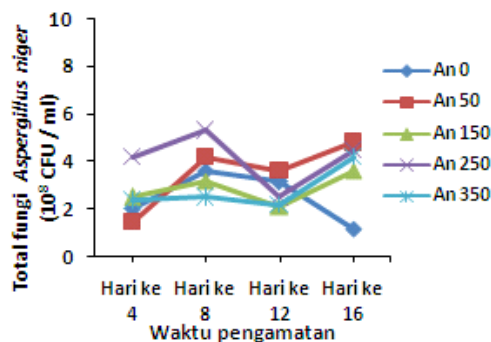
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan *Fungi* Selama Proses Fermentasi

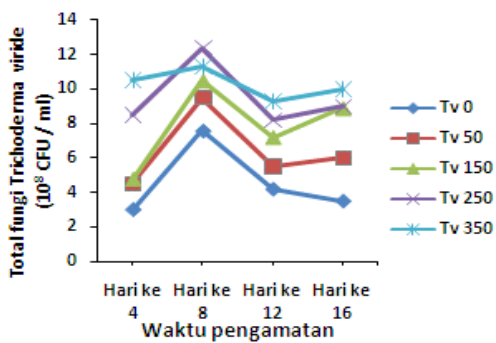
Jumlah total *fungi* mengindikasikan banyaknya koloni dari *fungi Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* yang tumbuh pada media jerami padi. Hasil total pertumbuhan *fungi* diperoleh dengan menggunakan perhitungan *Total Plate Count (TPC)* dalam masa inkubasi selama 4 hari (96 jam). Hasil pertumbuhan *fungi* selama 16 hari dan 4 kali evaluasi disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2 pertumbuhan *fungi* untuk kedua jenis strain mengalami selisih peningkatan paling tinggi pada hari ke-8 untuk semua jenis perlakuan iradiasi. Hasil analisis variansi ( $p < 0,05$ ) menunjukkan interaksi kedua faktor (hari dan dosis iradiasi)

berpengaruh nyata terhadap hasil pertumbuhan kedua jenis *fungi* tersebut. Uji lanjut *Duncan* juga menunjukkan hari terbaik dalam pertumbuhan merupakan hari ke 8. Hal tersebut disebabkan oleh pertumbuhan *fungi* yang makin baik dan tersedianya nutrisi yang masih



Gambar 1. Pertumbuhan *Aspergillus niger* yang diradiasi dengan dosis 0 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 250 Gy dan 350 Gy.



Gambar 2. Pertumbuhan *Aspergillus niger* yang di radiasi dengan dosis 0 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 250 Gy dan 350 Gy

mencukupi. Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2 di atas menunjukkan bahwa pertumbuhan kedua *fungi Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* akan menurun setelah dipapari radiasi sinar Gamma dengan dosis lebih dari 250 Gy. Hal ini sesuai dengan hasil yang telah diperoleh A.M.Affyfi *et.al* yakni radiasi Gamma dengan dosis lebih dari 250 Gy akan menurunkan pertumbuhan *Trichoderma viride* sebesar 24,15% [13].

Penambahan molases pada jerami bertujuan sebagai sumber karbon awal bagi kedua jenis mikroorganisme yang dapat membantu pembelahan sel. Pada hari ke-12 terlihat terjadinya penurunan pertumbuhan kedua jenis strain (*Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*) untuk semua perlakuan iradiasi, hal tersebut disebabkan karena sudah banyak berkurangnya kandungan nutrisi pada jerami perlakuan. Menurut penelitian yang sudah dilakukan oleh Fifendy *et.al.* (2013) bahwa penambahan 5% molases dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme hingga hari ke-10 dan pertumbuhan mengalami penurunan pada hari ke-15 [13]. Penurunan yang terjadi memperlihatkan bahwa semua jenis perlakuan iradiasi tetap memiliki siklus pertumbuhan yang sama, walaupun memiliki nilai penurunan yang bervariasi.

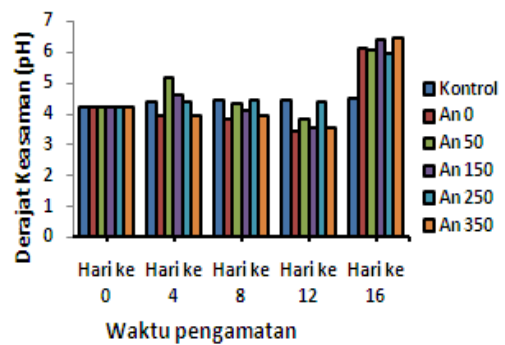
*Fungi* memiliki kemampuan untuk mengubah karbohidrat menjadi suatu bentuk gula sederhana dengan bantuan enzim yang dihasilkannya [14]. Kemampuan *fungi* tersebut mengakibatkan *fungi* dapat tetap bertahan walaupun nutrisi dasar dari molases sudah berkurang. Kemampuan tersebut juga membantu *fungi* memperoleh nutrisi dari jerami padi yaitu dengan memproduksi enzim selulase untuk mencerna selulosa jerami padi. Senyawa karbon yang banyak digunakan oleh *fungi* adalah monosakarida, oligosakarida, asam organik, selulosa dan lignin [15]. Pada hari ke-16 terlihat perbedaan antara perlakuan tanpa iradiasi dan dengan iradiasi yaitu terjadinya sedikit peningkatan pertumbuhan. Peningkatan pertumbuhan tersebut kemungkinan diakibatkan karena terjadinya peningkatan kegiatan selulolitik pada *fungi* sehingga *fungi* dapat bertahan hidup dengan mencerna selulosa yang ada pada jerami sebagai nutrisi pertumbuhan. *Aspergillus niger* dapat menghasilkan konsentrasi glukosa tinggi sebanyak

80 mg/dL dalam waktu fermentasi 7 jam dan merupakan salah satu jenis *fungi* dengan tingkat penghasilan enzim selulase tinggi [16]. *Trichoderma viride* merupakan suatu jenis *fungi* selulolitik yang mampu mengurai ikatan kimia selulosa dan turunannya dengan menghasilkan enzim kompleks selulase [17]. Meningkatnya kemampuan selulolitik juga dipengaruhi oleh fase pertumbuhan dari mikroorganisme. Meningkatnya proses selulolitik menandakan bahwa proses iradiasi dapat menstimulasi mikroorganisme untuk menghasilkan enzim selulolitik yang lebih banyak.

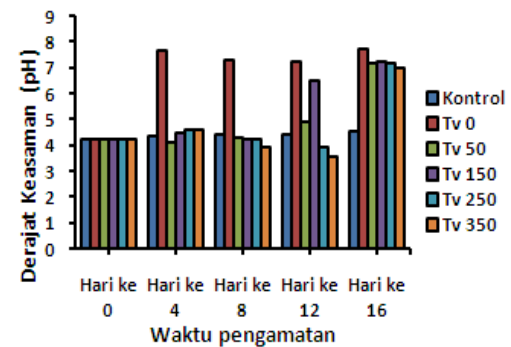
### Nilai pH Selama Proses Fermentasi

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor yang diamati dan merupakan faktor penting yang mempengaruhi beberapa aktivitas dari mikroorganisme. Derajat keasaman juga berpengaruh terhadap proses pemecahan bahan organik. Nilai pH selama proses fermentasi disajikan pada Gambar 3 dan Gambar 4.

Dari Gambar 3 dan Gambar 4, terlihat adanya perbedaan nilai baik berdasarkan strain dan dosis iradiasi. Derajat keasaman (pH) yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme adalah pH dengan sifat asam (rendah) untuk *fungi* memiliki pH optimum 5 hingga 7 tetapi dapat dijumpai dari rentang pH 2 hingga 8,5 hal tersebut disebabkan karena setiap mikroorganisme memiliki tingkat toleransi asam yang berbeda dan enzim yang disekresikan keluar akan rusak jika berada pada pH terlalu asam atau terlalu basa [18]. Pada hari ke 4



Gambar 3. Nilai pH pada strain *Aspergillus niger* berdasarkan waktu pengamatan



Gambar 4. Nilai pH pada strain *Trichoderma viride* berdasarkan waktu pengamatan

strain *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* menunjukkan adanya variasi pH (tidak semua dosis radiasi mengalami hal yang seragam) akan tetapi pada hari ke- 8 dan 12 terjadi keseragaman untuk strain *Aspergillus niger* yaitu penurunan nilai pH.

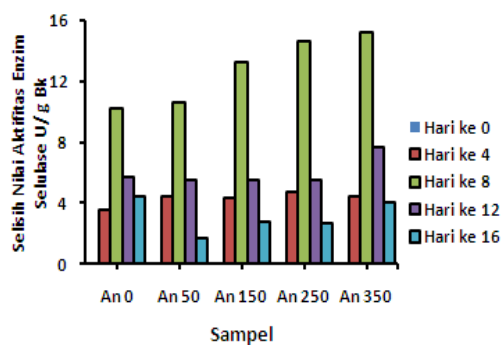
Variasi pada hari ke empat kemungkinan terjadi akibat pengaruh dari dosis iradiasi yang menyebabkan perubahan saat fase lag. Fase lag adalah fase penyesuaian sel – sel dengan lingkungan pembentukan enzim untuk mengurai substrat, sehingga kemungkinan perbedaan dosis iradiasi menyebabkan perbedaan dari fase lag pada strain yang sama [18]. Penurunan pH pada hari ke- 8 dan 12 tersebut sejalan dengan pertumbuhan *fungi* yang makin meningkat dan akibat dari dihasilkannya asam-asam organik sehingga terjadi penurunan pH. Pada hari ke-16 terjadi kenaikan nilai pH pada kedua jenis strain, hal ini kemungkinan terjadi karena adanya aktivitas mikroorganisme yang mengurai asam-asam organik tersebut sesuai dengan adanya peningkatan jumlah mikroorganisme walaupun tidak signifikan.

Pada hari ke empat untuk strain *Trichoderma viride* terdapat satu dosis iradiasi yang mengalami peningkatan pH paling tinggi dan hampir stabil yaitu dosis radiasi 50 Gy, pada dosis ini diperkirakan bahwa *Trichoderma viride* mengalami perubahan kemampuan dalam menghasilkan asam – asam organik sehingga pH pada hari ke empat mengalami kenaikan tinggi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian P.Wahyuningtyas dkk, yang menunjukkan bahwa kondisi optimal pertumbuhan enzim selulase dari *Trichoderma reesei* dicapai pada pH 6 dan waktu inkubasi 8 hari [19]. Nilai pH meningkat juga dimungkinkan karena saat perbanyak kultur strain dengan dosis radiasi tersebut dilakukan penambahan inokulan cair kedalam substrat menyebabkan pH mengalami peningkatan.

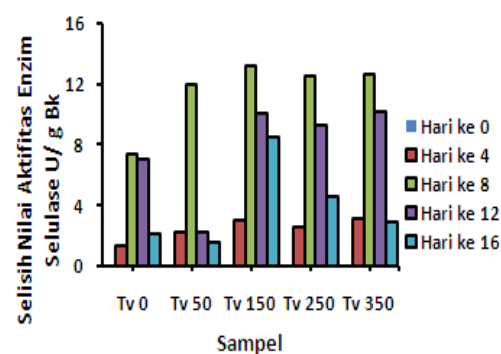
### Nilai Aktivitas Enzim Selulase

Pengukuran nilai aktivitas enzim selulase dalam proses dekomposisi selama 16 hari menggunakan metode *Dinitro Salicylic Acid (DNS)*. *DNS* merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya dan membentuk suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode *DNS* dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang sebesar 540 nm yang menandakan pekat tidaknya kandungan glukosa (senyawa hasil reduksi).

Pada kedua Gambar 5 dan Gambar 6 menunjukkan selisih dari kenaikan nilai aktifitas enzim kedua strain selama 16 hari. Hari ke 8 merupakan selisih nilai kenaikan aktifitas enzim tertinggi, pada strain *Aspergillus niger* selisih nilai aktifitas enzim tertinggi terdapat pada perlakuan dosis radiasi 350 Gy dengan nilai selisih sebesar 15,23, sedangkan untuk strain *Trichoderma viride* pada dosis radiasi 150 Gy dengan nilai selisih sebesar



Gambar 5. Nilai selisih kenaikan aktivitas enzim selama 16 hari dari strain *Aspergillus niger*



Gambar 6. Nilai selisih kenaikan aktivitas enzim selama 16 hari dari strain *Trichoderma viride*

13,23. Kenaikan aktifitas enzim pada hari ke 8 sejalan dengan analisis untuk pH, kandungan air, dan abu. Kenaikan tersebut menunjukkan bahwa pada hari ke 8 nilai gula reduksi yang terdapat pada tiap perlakuan mengalami kenaikan signifikan, hal tersebut sesuai dengan analisis statistik yang dilakukan. Gula -reduksi yang pekat merupakan tanda bahwa proses hidrolisis enzimatik tinggi. Hasil analisis variansi ( $p < 0,05$ ) menunjukkan interaksi antar kedua faktor (hari dan dosis radiasi) berpengaruh nyata terhadap nilai aktivitas enzim kedua jenis strain (*Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*).

Hasil uji lanjut *Duncan* menunjukkan perlakuan iradiasi dosis 350 Gy untuk *Aspergillus niger* dan dosis 150 Gy untuk *Trichoderma viride* merupakan dosis optimal untuk meningkatkan aktifitas enzim. Terdapat perbedaan nilai aktifitas enzim antara perlakuan radiasi dan tidak diradiasi. Perlakuan dengan radiasi mengakibatkan nilai aktifitas enzim lebih tinggi yang berarti jumlah enzim yang dihasilkan lebih banyak, hal ini sesuai dengan penelitian Priyo *et al.* (2005) bahwa dosis radiasi 250, 500 dan 1 kGy dapat meningkatkan aktivitas enzim kitinase pada *Trichoderma harzianum* [19].

Mutasi akibat radiasi dapat memperbaiki kapang terinduksi untuk menghasilkan enzim yang lebih banyak dibandingkan dengan fungsi yang tidak diradiasi [20]. Strain *Aspergillus spp* yang diradiasi dengan sinar gamma dosis 500 Gy menghasilkan enzim selulase lebih besar daripada strain induknya [20]. Perlakuan iradiasi pada

kedua strain menunjukkan dampak positif dalam menghasilkan enzim yang lebih banyak, sehingga didapat hubungan antara penurunan pH, kenaikan kadar air, dan kenaikan kadar abu. Pada hari ke 12 masih terjadi kenaikan nilai absorbansi walaupun tidak signifikan, hal tersebut kemungkinan terjadi karena fase pertumbuhan kapang mendekati stasioner, dan banyaknya enzim yang terakumulasi. Berdasarkan penelitian Abo-State et al. (2011), mengatakan bahwa produksi enzim yang berlangsung selama per-tumbuhan kapang yang berjalan cepat dapat mempercepat titik batas maksimum dalam produksinya dan kemudian akan terjadi penurunan perlahan-lahan maupun cepat dari produksi enzim tersebut setelah adanya akumulasi enzim [21].

Pada hari ke 16 terlihat adanya kenaikan nilai aktifitas enzim. Kenaikan tersebut kemungkinan terjadi akibat adanya akumulasi enzim yang semakin banyak dan proses dekomposisi yang mulai berjalan lambat, meskipun hasil dari perhitungan *Total Plate Count (TPC)* menunjukkan adanya peningkatan tidak signifikan untuk jumlah koloni. Produksi enzim selulase tidak bertambah sesuai bertambahnya dosis radiasi tetapi bersifat random, untuk strain *Trichoderma viride* perlakuan dengan dosis radiasi 150 Gy meningkatkan aktivitas selulase sebesar 13,23 U/g Bk, dan *Aspergillus niger* dengan dosis perlakuan 350 Gy meningkatkan aktivitas selulase sebesar 15,23 U/g Bk. Hasil analisis untuk aktivitas enzim menunjukkan bahwa radiasi Gamma dosis rendah (< 500 Gy) pada *Trichoderma spp* mampu meningkatkan secara signifikan aktivitas *exo-enzymes* (selulase) seperti yang diperoleh oleh M.A.Affyfi et.al [13]. Hal ini juga sesuai dengan hasil yang diperoleh S.A. Alting et.al, yang menyatakan bahwa radiasi Gamma dosis rendah mampu meningkatkan produksi enzim selulase hingga mencapai 96,44 U/g [20].

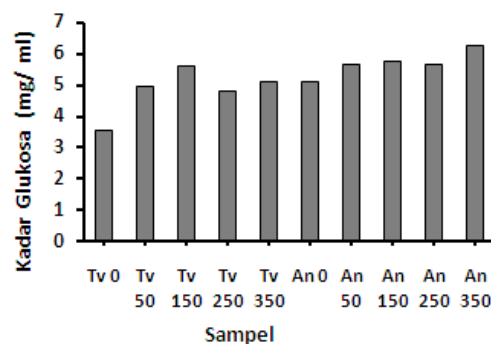
### Nilai Kandungan Glukosa

Glukosa yang terdapat pada sampel berasal dari proses hidrolisis beberapa enzim selulolitik. Enzim selulolitik memiliki tiga kelompok utama yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan  $\beta$ -glukosidase. Ketiga kelompok enzim tersebut bekerja secara sinergis, enzim endoglukanase bekerja dengan cara menghidrolisis secara acak bagian amorf pada serat selulosa sehingga menghasilkan oligosakarida dengan panjang yang berbeda-beda serta terbentuknya ujung rantai baru selulosa [2]. Enzim eksoglukanase bekerja dengan menghidrolisis bagian ujung rantai polisakarida dan menghasilkan selobiosa yang merupakan golongan disakarida. Selobiosa yang sudah dihasilkan kemudian dipecah kembali oleh enzim  $\beta$ -glukosidase menjadi 2 molekul glukosa yang merupakan produk utama dari proses hidrolisis selulosa [7].

Dalam proses hidrolisis biasanya diperlukan perlakuan pendahuluan sebelum proses dimulai, yaitu pencacahan secara fisik. Pencacahan berfungsi untuk

mengecilkan ukuran sampel agar proses hidrolisis lebih mudah terjadi. Perlakuan pendahuluan pencacahan dapat meningkatkan daerah yang mudah dihidrolisis karena rusaknya struktur kristal selulosa, rusaknya struktur tersebut mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa [22].

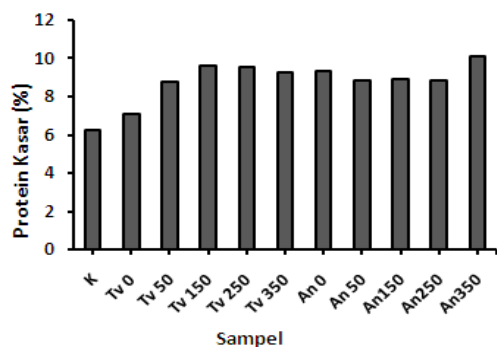
Pada Gambar 7 terlihat adanya variasi nilai kadar glukosa pada masing-masing perlakuan. Pengukuran kadar glukosa menggunakan metode *Nelson-Somogyi* dan dilakukan pada sampel hari ke 8, pengukuran menggunakan sampel pada hari ke 8 didasari pada tingginya beberapa parameter hasil pada hari ke 8. Pada strain *Aspergillus niger* kadar glukosa tertinggi terdapat pada perlakuan 350 Gy, dengan nilai 6,25 mg/mL. Pada strain *Trichoderma viride* kadar glukosa tertinggi terdapat pada perlakuan 150 Gy, dengan nilai 5,61 mg/mL. Penelitian S.Safaria dkk mendapatkan kadar glukosa optimal yang dihasilkan campuran enzim selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* jauh lebih kecil yakni sebesar 22,3 mg/L [18]. Hal ini menunjukkan bahwa radiasi Gamma dosis rendah berpengaruh secara signifikan terhadap kadar glukosa pada proses hidrolisis enzimatik. Hasil pengukuran kadar glukosa menunjukkan kesesuaian dengan aktivitas enzim selulasenya, semakin tinggi nilai aktivitas enzim maka kadar glukosa pada sampel juga akan semakin tinggi.



Gambar 7. Kadar glukosa pada sampel saat hari ke-8

### Kandungan Protein Kasar

Kadar protein merupakan indikator jumlah mikroba dalam enzim. Parameter protein kasar digunakan sebagai acuan untuk analisis bahan pakan. Protein kasar merupakan nilai kandungan total N (nitrogen) suatu bahan dikalikan bilangan 6.25. Protein kasar dihitung melalui pendekatan kandungan total N dari suatu bahan, sehingga hasil identifikasi kadar protein kasar merupakan kadar nitrogen total bahan baik dari sumber protein sejati (*true protein*) maupun dari sumber nitrogen bukan protein (*Non Protein Nitrogen*) [23]. Kandungan protein kasar pada sampel hasil dekomposisi pada strain *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* menunjukkan hasil yang bervariasi untuk setiap perlakuan dosis iradiasi. Hasil analisis pada Gambar 8 menunjukkan bahwa semua sampel yang diinokulasikan dengan *fungi*



Gambar 8. Kadar Protein kasar pada sampel saat hari ke-8

*Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* mengalami peningkatan protein kasar setelah proses dekomposisi selama 8 hari dibandingkan dengan kontrol. Pengukuran kandungan protein pada sampel hari ke 8 juga didasari oleh tingginya beberapa parameter pada hari ke 8. Peningkatan kadar protein kasar tertinggi terdapat pada kode sampel An 350 dengan nilai 10,1 % untuk strain *Aspergillus niger*, sedangkan untuk strain *Trichoderma viride* peningkatan kadar protein kasar tertinggi terdapat pada kode sampel Tv 150 dengan nilai 9,63 %. Peningkatan kadar protein kasar ini sesuai dengan penelitian Mirwandhono & Siregar (2004) yang menyatakan bahwa isolat *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* dapat meningkatkan kandungan protein kasar, hal tersebut dikarenakan kedua jenis strain tersebut mampu mengubah serat kasar menjadi protein akibat adanya aktivitas enzim selulase [24].

*Aspergillus niger* memberikan efek yang lebih baik dibanding *Trichoderma viride*, dan *Rhizopus oligosporus* dalam meningkatkan kandungan protein kasar, hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* dengan dosis radiasi 350 Gy memiliki nilai protein kasar tertinggi yaitu 10,1 % [25]. Limbah jerami padi hasil dekomposisi dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Protein kasar merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk menentukan pakan ternak.

Menurut BSN (2013) dalam SNI 3178-2013 (Dedak Padi Sebagai Bahan Pakan Ternak), kandungan protein kasar minimum untuk mutu I memiliki nilai sebesar 12 % , mutu II sebesar 10% dan mutu III sebesar 8%. Kandungan protein kasar yang didapat dari hasil dekomposisi menunjukkan semua hasil dekomposisi semua perlakuan memenuhi persyaratan sebagai pakan ternak kecuali untuk perlakuan Tv 0 dengan nilai 7,1% dan kontrol dengan nilai 6,24%. Berdasarkan hasil yang didapat maka proses dekomposisi dapat meningkatkan mutu dari bahan mentah awal yang digunakan sebagai pakan ternak.

## KESIMPULAN

Radiasi sinar Gamma dengan dosis rendah pada strain *Aspergillus niger* dan strain *Trichoderma viride*

dapat meningkatkan kemampuan *fungi* tersebut dalam menghasilkan enzim selulase pada proses fermentasi jerami padi. Pada kondisi optimal pH 4 dan waktu fermentasi 8 hari diperoleh strain *Aspergillus niger* dengan dosis radiasi 350 Gy mampu meningkatkan produksi enzim selulase sebesar 15,23 U/g Bk, kadar glukosa sebesar 6,25 mg/mL dan kadar protein kasar sebesar 10,1 %. Sedangkan *Trichoderma viride* dengan dosis radiasi 150 Gy mampu meningkatkan produksi enzim selulase sebesar 13,23 U/g Bk, kadar glukosa sebesar 5,61 mg/mL dan kadar protein kasar sebesar 9,63%.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Sdr.Dadang Sudradjat, Mawardi dan Arief Adhari (PAIR-BATAN) atas bantuannya, sehingga penelitian ini dapat berjalan seperti yang diharapkan.

## DAFTAR ACUAN

- [1]. I.B.W.Gunam, W.R.Aryanta, dan I.B.N.S. Darma, "Produksi selulase kasar dari kapang *Trichoderma viride* dengan perlakuan konsentrasi substrat ampas tebu dan lama fermentasi", *Jurnal Biologi*, vol. XV (2), pp.: 29 - 33, Pebruari 2011.
- [2]. E.A.Adebayo and D.M.Carrera, "Oyster Mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing Lignocellulosic Biomass", *African J.Biotechnol.* vol.4, pp. 52 - 67, January 2015.
- [3]. R.J. Sutarno, T.A. Zaharah dan N. Idiawati, "Hidrolisis Enzimatik Selulosa Dari Ampas Sagu Menggunakan Campuran Selulase Dari *Trichoderma reesei* Dan *Aspergillus niger*", *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, vol.2(1), hal. 52 - 57, 2013.
- [4]. S. Acharya and A.Chaudhary, " Effect of Nutritional and Environmental factors on Cellulase Activity by Thermophilic bacteria Isolated From Hot Spring", *J. Sci. and Res.*, vol.70, pp. 142 - 148, 2011.
- [5]. K.Mojsov, " Application of solid state fermentation for cellulase enzyme production using *Trichoderma viride*. *Perspectives of Innovations, Economic and Business*, vol. 5, pp. 108 - 110, 2010
- [6]. H.L.Hu, J. van den Brink, B.S. Gruben, H.A.B. Wasten, J.D. Gu and R.P. de Vries, " Improved Enzyme Production by cocultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other Fungi", *Int. Biodet&rioration & Biodegradation*, Elsevier Ltd., vol.65, pp: 248-252, 2011.
- [7]. M.C.T. Damaso, S.C. Terzi, A. X. Farias, A. C. P. de Oliveira, M. E. Fraga and S. Conri, "Selection of Cellulotic Fungi Isolated from Diverse Substrates", *Braz. Arch. Biol. Techno.*, vol.55 (4), pp. 513 - 520, August 2012.



- [8]. A.S. Desai and S. Rao, "Effect of gamma radiation on germination and Physiological Aspects of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) Seed lings", *Int. Journ. of Research in Applied, Nat. & Soc. Sciences*, vol.2 (6), pp. 47 - 52, June 2014.
- [9]. A.M.Affyfi, M.A.El-Seoud, G.M.Ibrahim, I.M.M. Helal and B. W. Kassem, "Exposing of *Trichoderma* spp. to gamma radiation for stimulating its pesticide biodegradation activity", *J. Rad. Res. Appl. Sci.*, vol. 5(2), pp.440-454, 2012.
- [10]. S. Abbasi, N. Safaei and M. Shamsbakhsh, "Evaluation of gamma- induced Mutants of *Trichoderma harzianum* for biological Control of charcoal rot of melon (*Macrophomina phaseolina*) in Laboratory and Greenhouse Con-ditions", *J. Crop Prot.*, vol.3 (4), pp. 509-521, 2014.
- [11]. E. B. Belal, "Bioethanol Production from Rice Straw Residues", *Braz. J. of Microbiology*, vol.44 (1), pp. 225-234, 2013.
- [12]. S.B.Mienda, A. Idi, A.Umar, "Microbiological features of solid state fermentation and its applications An overview", *Res.Biotechnol.*, vol. 2 (6), pp.21-26, 2011.
- [13]. A.M.Affyfi, M.A. El Seoud, G.M.Ibrahim and B.W.Kassem, "Stimulating of Biodergadation of Oxamyl Pesticide by Low Dose Gamma Irradiated Fungi", *J.Plant Pathol.Microb.*, vol.4: 201-205, September 2013.
- [14]. M.Fifendy, M. Eldini dan Irdawati, "Pengaruh pemanfaatan molases terhadap jumlah mikroba dan ketebalan nata pada kombucha", *Prosiding semirata*, FMIPA UNILA. Lampung, 2013.
- [14]. Y. Lin and S.Tanaka, "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and pro-spects", *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 69(6), pp.627-642, 2006 in M.A.Abdel-Rahman, Y.Tashiro, K.Sonomoto, "Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits", *Journal of Biotechnology*, vol.156, pp. 286 - 301, 2011.
- [15]. S. Rasmussen, Q. Liu, A. J. Parsons and H. Xue, "Grass-endophyte interactions: a note on the role of monosaccharide Transport in The *Neotyphodium lolii*- *Lolium perenne* Symbiosis", *New Phytologist*, vol.196, pp.7-12, 2012.
- [16]. A.Wezyah, M. Elida dan Afrizal, "Produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger* dan kemampu-annya menghidrolisis jerami padi", *Jurnal Kimia Unand*, vol.2 (2), hal. 103 -108, 2013.
- [17]. P.Karthikeyan, k. Kanimozhi, G. Senthilkumar, A. Panneerselvam, G.Ashok, "Optimization of Enzyme Production in *Trichoderma viride* Using Carbon and Nitrogen Source", *Int. J. Curr. Microbiol.App.Sci.*, vol.3 (1), pp.88-95, 2014.
- [18]. S.Safaria, N.Idiawati dan T.A.Zaharah, "Efektivitas Campuran Enzim Selulase Dari *Aspergillus niger* Dan *Trichoderma reesei* Dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa", *Jurnal Kemasan dan Kimia*, vol.2, hal. 46 - 51, Jan.2013.
- [19]. P.Wahyuningtyas, B.D. Argo dan W.A. Nugroho, "Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatik Pada Produksi Bioetanol", *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, vol.1.no.1, hal.21-25, April 2013.
- [20]. M.S. Awan, N.Tabbasam., N. Ayub., *et al.*, "Gamma radiation induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production" *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, pp.1367-1374, 2011.
- [21]. M.A.M. Abo-State, O. Khatab, A. Abo-El Nasar and B. Mahmoud, "Factors Affecting Laccase Production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleuratus sajor-caju*", *J. of Applied Sciences*, vol.14 (11), pp. 1607 - 1619, 2011.
- [22]. I.Mustika, Noverit dan Yulneriwarni, "Pemanfaatan jerami padi dan alang-alang dalam fermentasi etanol menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan Khamir *Saccharomyces cerevisia*", *Vis Vitalis*, vol. 01 (2), pp. 55 - 62, 2008.
- [23]. D. Ruska and D. Jonkus, "Crude Protein and Non-Protein Nitrogen Content in Diary Cow Milk", *Proc. Latv. Univ. Agr.*, vol.32, pp.37-40, 2014.
- [24]. E.Mirwandhono dan Z. Siregar, Pemanfaatan Hidrolisat Tepung Kepala Udang dan Limbah Kelapa Sawit Yang Difermentasi Dengan *Aspergillus niger*, *Rizhopus oligosporus* dan *Trichoderma viride* Dalam Ransum Ayam Pedaging. Medan, *Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara*, 2004. Medan.
- [25]. N. Supartini dan E. Fitasari, " Penggunaan Beka-tul Fermentasi *Aspergillus niger* Dalam Pakan Terhadap Karakteristik Organ Dalam Ayam Pedaging", *Buana Sains*, vol.11(2), hal.127-136, 2011.