

PENENTUAN WAKTU FERMENTASI OPTIMUM PRODUKSI XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGGUNAKAN SUBSTRAT KULIT KEDELAI DAN KULIT KACANG HIJAU MELALUI FERMENTASI SEMI PADAT

Hema Aprilia Setyo Windari, Sutrisno* dan Anna Roosdiana

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145*

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: tris_mc@ub.ac.id

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba berupa kapang atau bakteri melalui proses fermentasi. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui waktu fermentasi dan pengaruh dua jenis substrat (substrat kulit kedelai dan kulit kacang hijau) pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* dengan metode fermentasi semi padat. Ekstrak kasar yang diperoleh dari variasi waktu fermentasi (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96) jam diukur kadar protein dan aktivitas secara spektrofotometri dengan reagen Biuret dan gula pereduksi dengan reagen DNS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu fermentasi optimum diperoleh pada 60 jam dengan nilai aktivitas enzim menggunakan substrat kulit Kedelai sebesar 18,71 U dan substrat kulit kacang hijau sebesar 15,57 U. Kadar protein enzim pada substrat kulit kedelai sebesar 15,08 mg/mL dan substrat kulit kacang hijau sebesar 12,81 mg/mL.

Kata kunci: Aktivitas, Kadar Protein, *Trichoderma viride*, Xilanase, Biuret, DNS

ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme that can hydrolyze xylan into xylose and xilo - oligosaccharides. Xylanase can be produced by microbes such as fungi or bacteria on fermentation process. The purposes of this study were to determine the optimal fermentation time and the effect substrate types of soybean and mung bean peel substrates of *Trichoderma viride* xylanase production on semi solid fermentation. The crude extract of xylanase produced from the variations of fermentation time (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96) hours were determined for protein content and xylanase activity. Protein content was tested spectrophotometrically using Biuret reagent and reducing glucose using DNS reagent. The results showed that the optimal fermentation time for xylanase production occurred at 60 hours on both substrates. Soybean peel was more effective as substrate than mung bean peel resulting in 18.71 U and 15.57 U of xylanase activity and, 15.08 mg/mL and 12.81 mg/mL of protein content respectively.

Keywords: Activity, Content of Protein, *Trichoderma viride*, Xylanase, Biuret, DNS

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Produk yang dihasilkan oleh xilanase memiliki kandungan protein tinggi menyebabkan xilanase dapat digunakan dalam bahan pakan ternak. Kebanyakan bahan pakan hasil fermentasi ini memberikan sumbangan penting sebagai sumber protein, energi dan vitamin untuk hewan ternak [1]. Proses fermentasi mendayagunakan aktivitas suatu

mikroba tertentu atau campuran beberapa spesies mikroba. Mikroba yang banyak digunakan dalam proses fermentasi antara lain khamir, kapang dan bakteri [2].

Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah golongan bakteri dan kapang. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang paling banyak ditemukan di antara jenisnya dan dapat digunakan dalam proses produksi xilanase [3]. Pertumbuhannya cepat pada medium sederhana, memiliki kisaran pH asam (2,5-5) dan tidak membutuhkan nutrisi tambahan untuk pertumbuhannya [4], menyebabkan *Trichoderma viride* dapat digunakan dalam fermentasi semi padat.

Teknologi fermentasi merupakan salah satu upaya manusia dalam memanfaatkan bahan-bahan yang berharga murah. Oleh karena itu, penelitian dalam bidang ini diarahkan untuk mencari bahan mentah berharga murah dan banyak tersedia untuk dimanfaatkan sebagai substrat [5]. Salah satu bahan yang dapat digunakan adalah limbah pertanian, yaitu kulit kedelai dan kulit kacang hijau.

Limbah hasil pertanian tersebut secara kimiawi banyak mengandung lignin, hemiselulosa, dan selulosa yang sering disebut sebagai limbah lignoselulotik. Kulit ari kedelai mengandung bobot kering selulosa 42%, hemiselulosa 16% dan lignin 2% [6]. Kulit ari kacang hijau mengandung protein 13,67%, lemak 1,17%, serat kasar 49,44% dan kandungan TDN 64,65% [7]. Memperhatikan hal tersebut berarti limbah lignoselulotik berupa kulit kedelai dan kulit kacang hijau mengandung hemiselulosa yang berpotensi untuk dijadikan sumber bahan baku berbagai produk yang memerlukan bahan berkadar hemiselulosa tinggi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu fermentasi yang optimum dan pengaruh dua jenis substrat pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* menggunakan substrat kulit kedelai dan kacang hijau dengan metode fermentasi semi padat.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah *T. viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti pepton, tepung agar, xilan, dan kasein. Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain asam oleat, dextrosa, asam asetat glasial (BJ=1,05 g/cm³), CH₃COONa, CaCl₂·2H₂O, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, NaCl (Merck), KCl (Merck), MgSO₄ (Merck), NH₄Cl (Merck), K₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck),

H₃BO₃ (Merck), MnCl₂·7H₂O (Merck), FeSO₄·7H₂O (Merck), Na-Tartrat (Merck), CuCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, Na₂MoO₄·2H₂O. Bahan kimia lain yang digunakan adalah kentang, kulit kedelai dan kulit kacang hijau.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), laminar air flow, inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), autoklav (LS-C35L), shaker (Edmund Buhler SM 2524B), sentrifuse dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel), Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific Genesys 20), kuvet, lemari pendingin, jarum ose, ayakan 40 mesh, pengaduk magnet, oven, aluminium foil, kapas steril, pH universal, dan kertas saring *Whatman* no.40.

Produksi xilanase

T. viride yang ditumbuhkan dalam media padat miring selama 144 jam (pH 5 dan 30°C) disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi diambil sebanyak 2 mL dan ditanam pada 13 mL media cair steril. Diinkubasi dengan shaker kecepatan putar 100 rpm pada temperatur ruang selama 36 jam (pertengahan fasa logaritma). Inokulum sebanyak 2 mL yang mengandung *T. viride* ditumbuhkan dalam 5 gram substrat kulit kedelai dan kulit kacang hijau beserta 13 mL larutan garam basal pada temperatur kamar dengan kecepatan 100 rpm dengan variasi waktu fermentasi (0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, 72 jam, 84 jam, 96 jam). Media hasil fermentasi masing-masing ditambahkan 15 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar xilanase diuji kadar protein dan aktivitasnya.

Penentuan aktivitas xilanase

Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara tabung reaksi disiapkan sesuai variasi waktu fermentasi yang ditentukan dan ditambahkan 1 mL substrat xilan 1% (b/v) kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim xilanase dan 1 mL buffer asetat. Selanjutnya diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 50 menit, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100°C selama 15 menit kemudian didinginkan dengan air mengalir. Serapan diukur pada panjang gelombang 485 nm dengan spektroskopik 20 dan diplotkan ke dalam persamaan regresi kurva baku gula pereduksi yang telah dibuat sebelumnya. Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim.

Uji kadar protein

Larutan enzim sebanyak 2 mL ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C. Diukur serapan pada panjang gelombang maksimum kasein (545 nm) sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai serapan pada persamaan regresi kurva baku kasein yang telah dibuat.

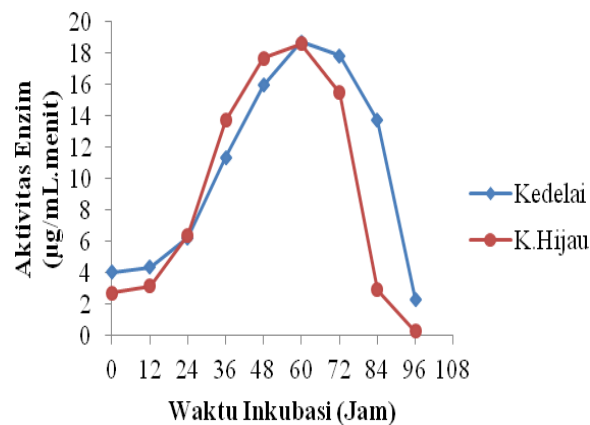
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan waktu fermentasi optimum produksi xilanase dari *Trichoderma viride* melalui fermentasi semi padat

Pada penelitian ini xilanase diproduksi dengan proses fermentasi semi padat berbagai variasi waktu fermentasi, yaitu antara 0-96 jam dengan interval waktu 12 jam. Proses fermentasi semi padat merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memproduksi xilanase yang bersumber dari kapang. Proses fermentasi semi padat juga dipengaruhi oleh waktu fermentasi. Waktu fermentasi yaitu waktu yang dibutuhkan oleh *Trichoderma viride* dalam memproduksi xilanase yang diukur melalui aktivitas xilanase dan kadar proteinnya.

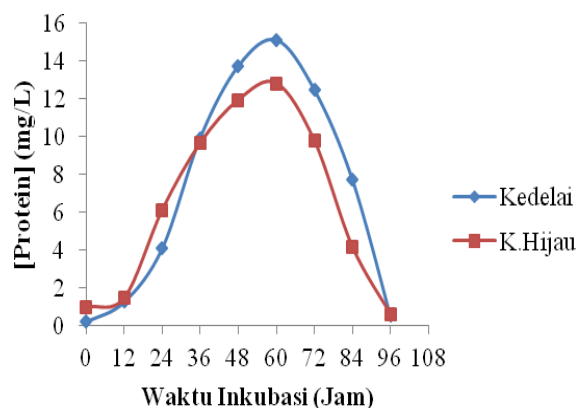
Pada reaksi enzimatik hidrolisis xilan yang berperan sebagai sisi aktif dari xilanase yaitu ion karboksilat dari asam aspartat dan gugus karboksil dari asam glutamat yang mampu menghidrolisis xilan. Ion karboksilat dari asam aspartat akan menyerang atom C pada posisi 1 pada polimer xilan. Selanjutnya pasangan elektron bebas dari atom O ikatan glikosidik polimer xilan menyerang atom H pada gugus karboksil asam glutamat, sehingga terbentuk kompleks enzim substrat, kemudian terjadi pemutusan ikatan enzim-substrat membentuk monomer gula pereduksi karena adanya hidrolisis dari H₂O.

Hasil reaksi enzimatik hidrolisis xilan oleh xilanase yaitu xilosa. Xilosa diukur dengan reagen DNS, sehingga dihasilkan asam xilonat dan asam 3-amino,5-nitrosalisilat yang mempunyai serapan pada λ 485 nm. Mol xilosa yang dihasilkan sebanding dengan mol asam 3-amino,5-nitrosalisilat sehingga kadar xilosa dapat ditentukan. Aktivitas xilanase dapat ditentukan dengan menghitung jumlah xilosa yang dihasilkan selama reaksi enzimatik.



Gambar 1. Grafik Hubungan antara aktivitas enzim dengan waktu fermentasi terhadap produksi xilanase

Berdasarkan Gambar 1 bahwa aktivitas xilanase yang diamati dari berbagai variasi waktu fermentasi didapatkan hasil yang optimum pada 60 jam. Nilai aktivitas xilanase pada 60 jam yaitu sebesar 18,71 U pada substrat kulit kedelai dan 18,57 U pada substrat kulit kacang hijau. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu jam ke-60 xilanase dapat dihasilkan secara optimum. Terjadinya aktivitas enzim yang turun dapat disebabkan oleh xilanase yang mengalami kerusakan karena adanya protease yang secara bersamaan dihasilkan oleh *T.viride* selama proses fermentasi.



Gambar 2. Grafik hubungan antara kadar protein dengan waktu fermentasi terhadap produksi xilanase

Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa kadar protein optimum produksi xilanase dengan substrat kulit kedelai dan kulit kacang hijau terjadi pada waktu fermentasi 60 jam. Hal ini dapat ditunjukkan dengan nilai dari kadar protein pada substrat kulit kedelai sebesar 15,08 mg/mL dan pada kulit substrat kacang hijau sebesar 12,81 mg/mL. Penyebab kadar protein

xilanase yang mengalami penurunan yaitu karena xilanase yang dihasilkan digunakan oleh *T.viride* sebagai nutrisi dalam pertumbuhannya.

Penentuan jenis substrat optimum produksi xilanase dari *Trichoderma viride* melalui fermentasi semi padat

Kapang endofilik pada umumnya mempunyai sifat lambat tumbuh (sekitar 5-7 hari), tetapi lingkungan yang hangat dan lembab akan mempercepat pertumbuhan kapang. Medium fermentasi menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan oleh kapang *Trichoderma viride* untuk memperoleh energi, pertumbuhan bahan pembentuk sel [8]. Substrat merupakan komponen penting dalam produksi enzim selama proses fermentasi. Peningkatan konsentrasi substrat dapat meningkatkan xilanase. Pada waktu fermentasi 60 jam, dihasilkan xilanase dengan aktivitas sebesar 18,71 U dan kadar proteinnya sebesar 15,08 mg/mL untuk substrat kulit kedelai sedangkan untuk kulit kacang hijau dengan aktivitas xilanase sebesar 18,57 U dan kadar protein sebesar 12,81 mg/mL. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa jenis substrat optimum dalam produksi xilanase dari *T.viride* menggunakan fermentasi semi padat adalah kulit kedelai.

Tingginya aktivitas xilanase dan kadar protein saat digunakan substrat kulit kedelai disebabkan oleh kulit kedelai yang mengandung hemiselulosa cukup besar yaitu sebesar 16%, sedangkan pada kulit kacang hijau kandungan hemiselulosanya masih belum diketahui pasti, namun 42% dari kandungannya mengandung karbohidrat yang di dalamnya terdapat sumber karbon atau sumber xilan bagi pertumbuhan kapang *Trichoderma viride*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa waktu fermentasi optimum pada produksi xilanase dari *T.viride* menggunakan fermentasi semi padat dengan substrat kulit kedelai dan kulit kacang hijau terjadi pada waktu fermentasi 60 jam dengan aktivitas xilanase sebesar 18,71 U untuk substrat kulit kedelai dan 18,57 U untuk substrat kulit kacang hijau. Kadar protein sebesar 15,08 mg/mL untuk substrat kulit kedelai dan 12,81 mg/mL untuk substrat kulit kacang hijau.

Jenis substrat terbaik untuk produksi xilanase dari *T.viride* menggunakan fermentasi semi padat adalah kulit kedelai, menghasilkan aktivitas xilanase sebesar 18,71 U dan kadar protein sebesar 15,08 mg/mL yang lebih besar dibandingkan dengan kulit kacang hijau.

DAFTAR PUSTAKA

1. Robert, S. H. dan E. Karmas, 1980, Evaluasi Gizi pada Pengolahan Bahan Pangan, Penerbit ITB, Bandung.
2. Waites, M.J., 2005, Industrial Microbiology, an Introduction. Blackwell Science Ltd. Malden.
3. Bilgrami, K.S. and R.N. Verma., 1978, Physiology of Fungi, Vikas Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi.
4. Alexopoulos, C.J. and C.W. Mims., 1979, Introduction Mycology 3th ed, John Wiley and Sons, New York.
5. Hidayat, Nur., 2006, Mikrobiologi Industri, Penerbit Andi, Yogyakarta.
6. Richana, N dan Lestina P., 2002, Produksi Xilanase untuk Biokonversi Limbah Biji Kedelai, Bulletin *AgroBio*, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, Edisi 5(4): 55-62.
7. Rahayu, S., D. A. Astuti, K. B. Satoto, R. Priyanto, L. Khotijah, T. Suryati, & Baihaqi, 2011, Produksi Domba Balibu UP3 Jonggol melalui Strategi Perbaikan Pakan Berbasis *Indigofera* sp. dan Limbah Tauge, Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan, IPB, Bogor.
8. Kumala, Shirly., Juniarti D.H., Wahyudi, Priyo., 2008, Isolasi Mikroba Endofit Ranting Tumbuhan Trengguli (*Cassia fistula* L.) dan Aktivitas Enzim Xilanase, Jurnal Bahan Alam Indonesia, Vol.6 (4) : 139-144