

PENENTUAN WAKTU FERMENTASI OPTIMUM PRODUKSI XILANASE DARI *Trichoderma viride* MENGGUNAKAN SUBSTRAT KULIT PISANG DAN KULIT MELON DENGAN FERMENTASI SEMI PADAT

Ayunda Antika Hastari, Chanif Mahdi* dan Sutrisno

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: chanifmahdi@gmail.com

ABSTRAK

Trichoderma viride merupakan jenis kapang tanah yang mudah didapatkan dan memiliki beberapa keunggulan jika dibanding dengan jenis kapang tanah lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu fermentasi optimum dan jenis substrat terbaik dalam produksi xilanase menggunakan *Trichoderma viride* dengan metode fermentasi semi padat. Waktu fermentasi optimum dan jenis substrat terbaik ditentukan dengan cara mengukur aktivitas enzim dan kadar protein pada berbagai waktu fermentasi (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, dan 96 jam) menggunakan substrat kulit melon dan kulit pisang. Xilanase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis hemiselulosa (xilan) menjadi xilosa. Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara mengukur xilosa yang terbentuk selama reaksi enzimatis menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen DNS. Sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen biuret. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada waktu fermentasi jam ke-60 menghasilkan aktivitas yang optimum pada kulit melon dan kulit pisang berturut-turut sebesar (20,16±8,17) unit dan (19,42±8,00) unit (P<0,01) dan kadar protein berturut-turut sebesar (16,86±8,23) mg/mL dan (16,88±4,32) mg/mL (P<0,01).

Kata kunci: aktivitas, kadar protein, *Trichoderma viride*, Xilanase

ABSTRACT

Trichoderma viride is a type of mold that most available in land and has several more advantages when compared with other types of soil fungi . This reseach is aimed to know optimum fermentation periode and type of optimum substrate in xylanase production from *Trichoderma viride* by semi solid fermentation. Optimum fermentation periode and type of optimum substrate determined by measure of enzyme activity and protein content in various fermentation times (0 , 12 , 24 , 36 , 48 , 60 , 72 . 84 , and 96 hours) using melon peels and banana. Xylanase is type of enzyme that able to hydrolyze hemicellulose (xylan) into xylose . Determination of enzyme activity begins with a solution of pure xylan in 1 % concentration at pH 5 and a temperature of 60 ° C (optimum conditions). Determination of enzyme activity is determined by measure xilosa in enzymatis reaction with spectrofotometri methode and DNS regen. Protein content determined by spetrophotometry methode with biuret reagen. The results fermentation 60 hour showed optimum activity in the melon peel and banana peel, that is (20,16±8,17) unit dan (19,42±8,00) unit (P<0,01) and protein content (16,86±8,23) mg/mL dan (16,88±4,32) mg/mL (P<0,01).

Key words: Activity, Protein, *Trichoderma viride*, Xilanase

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi [1]. Xilanase memiliki banyak manfaat, diantaranya adalah *bleaching* pada pembuatan kertas, meningkatkan kualitas pakan ternak, makanan, dan minuman. Xilan banyak diperoleh dari

limbah pertanian dan industri makanan. Salah satu limbah pertanian adalah kulit pada buah-buahan [2].

Kulit buah merupakan limbah buangan pertanian yang cukup banyak jumlahnya. Pada umumnya kulit buah belum dimanfaatkan secara nyata, hanya dibuang sebagai limbah organik atau digunakan sebagai makanan ternak. Sentra produksi pisang di Indonesia tersebar di 16 provinsi dan 70 kabupaten. Pada tahun 2003 – 2004 produksi pisang cenderung meningkat. Rata-rata produksi dan produktivitas pisang selama periode tahun 1999 sampai tahun 2007 masing-masing sekitar 5 juta ton [3]. Begitu pula dengan produksi melon di Indonesia yang relatif besar yakni sekitar 440.821 ton per tahun [4] dan diasumsikan setiap tahun produksi melon akan meningkat.

Kulit pisang dan kulit melon dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi xilanase karena keduanya memiliki kandungan hemiselulosa. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi, yang biasanya dihasilkan oleh bakteri atau khamir. Pada penelitian sebelumnya banyak referensi yang menyatakan penggunaan tongkol jagung dan klobot jagung sebagai substrat sertanya digunakan bakteri *Aspergillus sp* sedangkan untuk proses fermentasinya menggunakan fermentasi cair. Namun pada penelitian kali ini digunakan substrat kulit pisang dan kulit melon serta digunakan *Trichoderma viride* dengan metode fermentasi semi padat.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni kapang *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa), dan *for microbiology*. Bahan kimia yang memiliki kualitas pro analisis, antara lain: asam oleat, dextrosa, CH_3COOH , CH_3COONa , CaCl_2 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HCl , $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, glukosa anhidrat, asam dinitrosalisilat, dan NaOH . Bahan kimia lain yang digunakan adalah kentang, pepton, tepung agar, xilan, kulit melon dan kulit pisang, sedangkan bahan lainnya adalah akuades.

Peralatan yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas yang meliputi erlenmeyer 100 mL dan 250 mL, pipet tetes, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pengaduk kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas arloji, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 100 mL, jarum ose, ayakan 40

mesh, pengaduk magnet, oven, aluminium foil, kapas steril, pH universal, kertas saring *Whatman* no.40, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Mettmert W 200), autoklaf (All American Model 20X), shaker (Edmund Buhler SM 2524B), sentrifuge dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel) dan Spektrofotometer Visible Single Beam, kuvet.

Produksi dan Isolasi Xilanase

Trichoderma viride yang telah ditumbuhkan dalam media padat miring disuspensikan ke dalam 2 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi ditanam pada 13 mL media cair steril. Optimasi produksi xilanase dilakukan dengan cara: dalam labu Erlenmeyer 250 mL ditambahkan 2mL inoculum *Trichoderma viride*, 13mL larutan garam basal, dan 5 g substrat (kulit psang dan kulit mlon) (rasio substrat: air =1:3). Selanjutnya campuran difermentasi pada temperatur kamar dengan variasi waktu fermentasi 0, 12,24,36, 48, 60,72, 84 dan 96 jam.

Masing-masing campuran substrat yang sudah difermentasi ditambah 10mL larutan buffer asetat pH 5,0, kemudian dihomogenkan dengan vortex supaya enzim xilanase terekstrak, selanjutnya sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit pada temperature 4°C dan supernatant merupakan ekstraks kasar enzim xilanase.

Uji Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan difermentasi selama 30 menit pada temperatur 50°C. Diukur serapan pada panjang gelombang maksimum kasein sehingga kadar protein awal diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein. Sebagai larutan blanko dipipet 2 mL akuades, ditambah 8 mL reagen Biuret, 2 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya.

Uji Aktivitas Xilanase

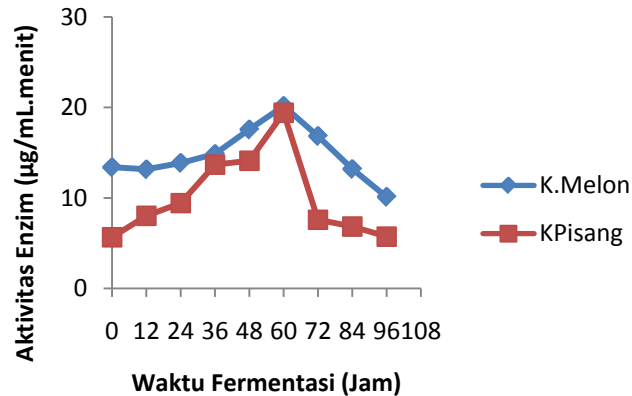
Disiapkan 2 tabung reaksi, masing-masing diisi 1 mL substrat xilan 1% (b/v), 1 mL ekstrak kasar xilanase dan 1 mL buffer asetat, kemudian dipanaskan dalam penangas air

dengan temperatur 60°C selama 50 menit, selanjutnya pada tabung 2 diisi dengan 1 mL aquades dan diberi perlakuan yang sama dengan sampel. Setelah itu ditambah dengan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang maksimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian ini akan dibahas mengenai isolasi dan produksi xilanase dari *Trichoderma viride* dengan menggunakan substrat kulit melon dan kulit pisang dengan menentukan substrat yang terbaik untuk produksi xilanase dan menentukan waktu fermentasi optimum berdasarkan aktivitas, nilai aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan unit aktivitas. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya μg gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh satu mL enzim dalam satu menit.

Berikut merupakan grafik aktivitas enzim dan waktu fermentasi terhadap produksi xilanase dengan substrat kulit melon dan kulit pisang:



Gambar 1. Grafik Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride* dengan Substrat Kulit Melon dan Kulit Pisang

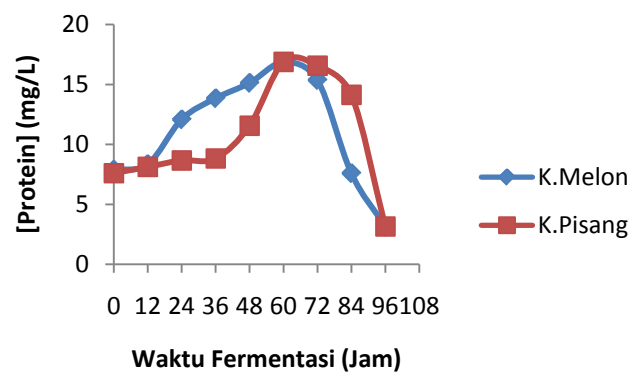
Aktivitas ekstrak kasar xilanase pada kulit melon dan kulit pisang meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi, hingga mencapai aktivitas optimum pada waktu fermentasi jam ke 60 dengan aktivitas rata-rata sebesar 20,16 unit dan 19,42 unit. Penambahan waktu fermentasi akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, sehingga dapat dikatakan bahwa produksi enzim juga meningkat. Namun setelah mencapai aktivitas optimum terjadi penurunan aktivitas, hal ini dapat disebabkan karena xilanase yang dihasilkan mengalami

perubahan menjadi senyawa lain. Selain itu dapat dimungkinkan bahwa xilanase yang dihasilkan terurai karena adanya protease.

Trichoderma viride juga menghasilkan enzim lain, seperti protease yang dapat menghambat kerja enzim xilanase itu sendiri karena protease bersifat merusak protein (enzim). Menurut penelitian yang dilakukan oleh [5] aktivitas protease dari jam ke-12 hingga jam ke-60 semakin menurun. Sehingga aktivitas enzim pada jam tersebut meningkat. Hal ini sesuai dengan penelitian ini, bahwa aktivitas xilanase meningkat dari jam ke-0 hingga jam ke-60.

Aktivitas xilanase yang menurun ini memiliki pola yang hampir sama dengan penelitian [6] yakni xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* memiliki aktivitas yang meningkat dari jam ke-0 hingga jam ke-72 dan menurun dari jam ke-72 hingga 120. Begitu pula dengan penelitian [7] dimana aktivitas enzim *Bacillus* menurun setelah jam ke 48. Pada penelitian yang dilakukan oleh [8] aktivitas enzim yang dihasilkan oleh dari *A. Niger* menurun setelah jam ke-60 karena adanya protease. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh [9] aktivitas amylase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*, *Aspergillus Flavus*, dan *Rhizopus stolonifer* mengalami peningkatan aktivitas dari jam ke-12 hingga jam ke-84 (kondisi optimum) dan mengalami penurunan aktivitas yang cukup signifikan dari jam ke-72 hingga jam ke-144.

Hasil uji statistik berdasarkan analisis pengaruh waktu fermentasi pada aktivitas ekstrak kasar xilanase pada kulit melon diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$ (3507,09 > 3,229) dan pada kulit pisang diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$ (11351,48 > 3,23. Sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan waktu fermentasi pada uji aktivitas ekstrak kasar xilanase pada kulit melon dan kulit pisang. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi waktu fermentasi mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata.



Gambar 2. Grafik Kadar Protein Xilanase dari *Trichoderma viride* dengan substrat Kulit Melon dan Kulit Pisang

Kadar protein pada kulit melon dan kulit pisang memiliki pola yang hampir sama dengan aktivitas ekstrak kasar xilanase. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas dan kadar protein berbanding lurus. Kadar protein terus meningkat bersamaan dengan meningkatnya waktu fermentasi hingga pada keadaan optimum (waktu ke 60 jam) dengan kadar protein sebesar 16,86 mg/mL dan 16,88 mg/mL. Kemudian terjadi penurunan kadar protein. Hal ini kemungkinan disebabkan karena seiring bertambahnya waktu fermentasi, persediaan nutrisi yang digunakan *Trichoderma viride* dalam merombak substrat semakin lama semakin berkurang, sehingga protein yang dihasilkan akan digunakan sebagai sumber nitrogen untuk nutrisi *Trichoderma viride*.

Hasil uji statistik berdasarkan analisis pengaruh waktu fermentasi pada kadar protein ekstrak kasar xilanase pada kulit melon diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$ ($9127,50 > 3,23$) dan pada kulit pisang diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$ ($878,92 > 3,23$), sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan waktu fermentasi pada uji kadar protein ekstrak kasar xilanase pada kulit melon dan kulit pisang. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi waktu fermentasi mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata.

Penentuan Substrat Terbaik

Penentuan substrat terbaik ini didasarkan pada uji aktivitas dan uji kadar protein dari kedua substrat. Berdasarkan hasil uji aktivitas dan uji kadar protein dari masing-masing substrat, dapat diketahui bahwa kulit melon memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada aktivitas pada kulit pisang. Hal ini dikarenakan kadar hemiselulosa pada kulit melon lebih tinggi daripada kulit pisang. Berdasarkan literatur dikatakan bahwa hemiselulosa lebih banyak terdapat pada kulit yang memiliki tekstur keras dan tebal. Pada uji kadar protein dapat diketahui bahwa kulit melon memiliki kadar protein yang lebih tinggi daripada kulit pisang. Hal ini sesuai dengan literatur yang ada, bahwa kulit melon memiliki protein yang lebih tinggi daripada kulit pisang.

Dari analisa statistika menunjukkan bahwa terdapat pengaruh penggunaan substrat pada uji aktivitas dan uji kadar protein. Hal ini dapat dibuktikan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ dari masing-masing uji, yakni terhadap uji aktivitas dan uji kadar protein.

KESIMPULAN

Waktu fermentasi *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap produksi xilanase. Waktu fermentasi optimum produksi xilanase dengan menggunakan substrat kulit melon dan kulit

pisang dicapai pada jam ke-60 dengan aktivitas masing-masing sebesar (20,16±8,17) unit dan (19,42±8,00) unit serta kadar protein masing-masing sebesar (16,86±8,23) mg/mL dan (16,88±4,32). Jenis substrat berpengaruh terhadap produksi xylanase. Substrat kulit melon menunjukkan hasil yang lebih baik daripada kulit pisang dalam produksi xylanase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal. 2000. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*56:326- 338.
2. Richana, Nur. 2002. *Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*. Bogor: BuletinAgroBio 5(1):29-36
3. Suyantodan Ahmad Supriyadi, 2008, *Pisang, Budi Daya, dan Porspek Pasar*, Jakarta, PenerbarSwadaya
4. Setiadi dan Parimin, S.P, 2001, *Bertanam Melon*, Penebar Swadaya, Jakarta
5. Sinha, Pallavi., Rahul Kunwar Singh, Rishi Srivastva, Rajesh Sharma, Shree Prakash Tiwari, 2013, Characterization And Optimization Of Alkaline Protease Enzyme Produced By Soil Borne Bacteria, *Trends in Life Sciences An International Peer-Reviewed Journal Vol.2 Issue 2*
6. Verma, Vipul, Alpika Verma and Akhilesh Kushwaha, 2012, *Isolation & Production Of Cellulase Enzyme From Bacteria Isolated From Agricultural Fields In District Hardoi, Uttar Pradesh, India*, Amity Institute of Biotechnology, India
7. Cordeiro, Carlos Alberto Martins., Meire Lelis Leal Martins, Angelica Barbara Luciano, Roberta Freitas da Salvia, 2002, Production and Properties of Xylanase from Thermofilic *Bacillus sp.*, *Brazilian Archieve of Biology and Technology an International Journal Vol.45*
8. Devi, M.Kalpana., A. Rasheedha Banu, G.R. Gnanaprabhal, B.V. Pradeep and M. Palaniswamy, 2008, Purification, Characterization Of Alkaline Protease Enzyme From Native Isolate *Aspergillus Niger* And Its Compatibility With Commercial Detergents, *Indian Journal of Science and Technology Vol.1 No.7, India*
9. F.J, Okoko and Ogbomo, O., 2010, Amylolytic Properties Of Fungi Associated With Spoilage In Bread, *Continental J. Microbiology 4: 1 – 7, Wilolud Journals, Nigeria*