

**PENGARUH PERLAKUAN DELIGNIFIKASI DENGAN LARUTAN NaOH
DAN KONSENTRASI SUBSTRAT JERAMI PADI TERHADAP PRODUKSI
ENZIM SELULASE DARI *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264**

**EFFECT OF DELIGNIFICATION WITH NaOH SOLUTION AND RICE STRAW SUBSTRATE
CONCENTRATION ON PRODUCTION OF CELLULASE ENZYME FROM *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264**

IDA BAGUS WAYAN GUNAM, KETUT BUDA, I MADE YOGA SEMARA GUNA

*Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian,
Universitas Udayana
ibwgunam@yahoo.com*

INTISARI

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan memanfaatkan limbah pertanian (jerami padi) sebagai substrat dalam produksi enzim kasar selulase dari *Aspergillus niger*. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama penentuan pH awal media dan lama fermentasi dengan perlakuan pH (5, 6 dan 7) serta lama fermentasi (7, 9 dan 11 hari). Tahap ke-2 adalah penentuan perlakuan konsentrasi NaOH dan konsentrasi substrat yaitu: konsentrasi NaOH (2, 4 dan 6%), konsentrasi substrat (1, 2 dan 3% (b/v)). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada lama fermentasi 9 hari dengan pH awal media 6,0 merupakan kondisi optimal untuk produksi enzim selulase dari *A. niger* dengan jerami padi sebagai substratnya. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh dari interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH 6% dan konsentrasi substrat jerami padi 2% yaitu menghasilkan aktivitas enzim endoglukanase (0,037 unit/ml), aktivitas filter paperase (0,033 unit/ml), protein terlarut (0,362 mg/ml), aktivitas spesifik filter paperase (0,123 unit/mg).

Kata kunci: Jerami padi, lignoselulosa, selulase, Aspergillus niger

ABSTRACT

This research was done in order to utilize agricultural waste (rice straw) as substrate to produce crude cellulase enzyme from *Aspergillus niger*. This research was conducted in two stages; the first stage was determination of the initial pH and fermentation time by pH treatment (5, 6 and 7) and fermentation time (7, 9 and 11 days). The second stage was determination of concentration of NaOH treatment and concentration of substrate, namely: concentrations of NaOH (2, 4 and 6%) and concentrations of substrate (1, 2 and 3% (w/v)). The results showed that the fermentation time of 9 days with the initial pH 6.0 was the optimal condition for production of crude cellulase enzyme from *A. niger* with rice straw as a substrate. The highest enzyme activity derived from interaction of delignification treatment with NaOH concentration of 6% and 2% rice straw substrate which produces endoglukanase enzyme activity (0.037 units/ml), filter paperase activity (0.033 units/ml), soluble protein (0.362 mg/ml), and specific activity of filter paperase (0.123 units/mg).

Keywords: Rice straw, lignocellulose, cellulase, Aspergillus niger

PENDAHULUAN

Pemanfaatan enzim sebagai katalisator reaksi-reaksi biologi dalam bidang industri pertanian termasuk pangan, farmasi dan kedokteran terbukti memberikan manfaat dan keuntungan yang luar biasa bagi manusia (Reed, 1975; Wyk *et al.*, 2003). Teknologi pemanfaatan enzim berkembang dengan sangat pesat dan mendapat prioritas untuk dikembangkan di Indonesia.

Hambatan utama dalam pengembangan teknologi pemanfaatan enzim dalam skala industri terletak pada tingginya biaya produksi. Untuk itu, pemanfaatan

substrat jerami padi sebagai media fermentasi yang banyak mengandung selulosa untuk pertumbuhan mikroorganisme memiliki prospek yang cerah di masa yang akan datang, karena memberikan alternatif biaya yang lebih murah jika dibandingkan dengan pembuatan enzim dengan menggunakan bahan-bahan kimia sintetik sebagai media pertumbuhan mikroorganisme. Produksi enzim selulase dengan menggunakan substrat jerami padi yang mengandung selulosa ini juga akan menghasilkan produk-produk lain yang berguna bagi manusia seperti glukosa, etanol, protein sel tunggal dan lain-lain (Darwis dan Sukara, 1990). Enzim selulase sendiri sangat penting

perannya dalam hidrolisis selulosa untuk menghasilkan glukosa, yang laku dipasaran dan dibutuhkan untuk berbagai keperluan baik untuk keperluan pembuatan zat-zat kimia yang lain yang bernilai ekonomis lebih tinggi seperti etanol, aseton, dan asam-asam organik, maupun digunakan sebagai sumber karbon pengusahaan mikroba untuk produksi enzim dan antibiotik (Gunam, 1997; Wyk *et al.*, 2003; Gunam *et al.*, 2004).

Jerami padi yang merupakan limbah pertanian memiliki kandungan selulosa cukup tinggi (Juliano, 1985), memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme untuk memproduksi enzim selulase. Sejauh ini, konsentrasi substrat jerami padi yang dibutuhkan untuk produksi enzim selulase yang optimal dari mikroorganisme pada fermentasi dengan menggunakan media dari serbuk jerami padi belum diketahui secara pasti.

Pembuatan enzim selulase dari limbah jerami padi sebagai substrat dengan menggunakan mikroorganisme sebagai penghasil enzim, selain mudah dibiakan, mikroorganisme juga mempunyai kecepatan tumbuh yang tinggi dan mudah dikontrol pertumbuhannya (Reed, 1975).

Aspergillus niger adalah salah satu jenis mikroorganisme yang berkemampuan baik dalam menghasilkan enzim. Beberapa jenis enzim yang penting penerapannya dalam bidang industri pertanian yang dapat dihasilkan oleh *Aspergillus niger* adalah amilase, selulase (Frasier dan Westhoff, 1981) dan amiloglukosidase (Blain, 1975).

Produksi enzim selama fermentasi dapat mencapai maksimum dalam jangka waktu tertentu, kemudian mengalami penurunan secara cepat atau perlahan-lahan, demikian juga aktivitas enzim dapat mengalami penurunan yang tajam sehingga waktu pemanenan harus diketahui dengan tepat untuk mendapatkan aktivitas yang optimal (Rahayu, 1990).

Pada umumnya hidrolisis bahan lignoselulosa dapat digunakan dengan dua cara, yaitu: hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis. Hambatan proses hidrolisis selulosa baik secara asam maupun enzimatis adalah adanya struktur kristalin dan lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Masalah tersebut dapat diatasi dengan pemberian perlakuan pendahuluan terhadap bahan yang akan dihidrolisis. Salah satu metode perlakuan pendahuluan secara kimia adalah perlakuan delignifikasi menggunakan NaOH. Delignifikasi dilakukan dengan larutan NaOH, karena larutan ini dapat menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa (Enari, 1983; Marsden dan Grey, 1986; Gunam dan Antara 1999). Disamping itu juga perlu dilakukan pengaturan konsentrasi substrat. Substrat yang terlalu tinggi dapat menyebabkan media fermentasi menjadi agak pekat, sehingga menimbulkan masalah dalam sirkulasi udara, penurunan tingkat homogenitas dan penyebaran kapang (Hardjo *et al.*, 1989).

Berdasarkan hal tersebut di atas maka dilakukan penelitian tentang pengaruh perlakuan delignifikasi dengan NaOH dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase dari *A. niger* pada fermentasi menggunakan jerami padi sebagai substratnya.

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: serbuk jerami padi (varietas C4, umur jerami sehari setelah panen) dengan ukuran 100 mesh, biakan murni *Aspergillus niger* L51/NRRL A-II,264 diperoleh dari Lab. Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Untuk pemeliharaan kultur digunakan media *Malt Extract Agar* (MEA) yang diperoleh dari Lab. Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Udayana. Bahan kimia yang digunakan untuk delignifikasi adalah NaOH. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk pengujian protein terlarut adalah Bovin Serum Albumin (BSA), *Trichloro Acetic Acid* (TCA), dan lain-lain. Bahan untuk analisis kimia terhadap substrat seperti: H_2SO_4 1 N, H_2SO_4 72% dan Aquades. Larutan mineral untuk media fermentasi yang terdiri dari NaH_2PO_4 4,7%, CaCl_2 0,1%, KH_2PO_4 1,02%, MgCl_2 0,02% dan urea 0,3%. Untuk pengujian aktifitas enzim digunakan *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), *carboxymethyl Cellulose* (CMC), larutan buffer sitrat 0,05M pH 4,8 dan lain-lain.

Penelitian ini terdiri dari dua bagian yaitu: penelitian pendahuluan, dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mengetahui pH awal media dan lama fermentasi yang baik untuk produksi enzim selulase dengan aktivitas yang optimal dan kapang *Aspergillus niger*, sedangkan penelitian utama bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat jerami padi yang baik dan pengaruh perlakuan delignifikasi untuk produksi enzim selulase dengan aktivitas yang optimal dari *Aspergillus niger* pada lama fermentasi dan pH awal media yang ditetapkan berdasarkan penelitian pendahuluan, dimana medium yang digunakan adalah media cair.

Penelitian Tahap Pertama

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pH awal dan lama fermentasi yang baik untuk produksi enzim selulase dengan aktivitas yang optimal dari kapang *Aspergillus niger*. Substrat yang digunakan pada pendahuluan ini tanpa perlakuan delignifikasi, dengan konsentrasi substrat 1%. Lama proses fermentasi dalam penelitian ini adalah 11 hari dengan selang waktu pengamatan tiap 2 hari sekali. Pengamatan mulai dilakukan pada hari ke-7. Uji yang dilakukan adalah uji aktivitas endoglukanase.

Penelitian tahap pertama menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu: Faktor pertama adalah pH awal media yang terdiri dari 3 level yaitu pH 5, 6, dan 7. Sedangkan

faktor kedua adalah lama fermentasi yang terdiri dari 3 level yaitu: 7, 9, dan 11 hari.

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak dua kali sehingga diperoleh 18 unit percobaan. Data yang diperoleh pada masing-masing kombinasi perlakuan dianalisis dengan sidik ragam dan yang menghasilkan aktivitas endoglukanase tertinggi selanjutnya dipergunakan pada penelitian tahap kedua.

Penelitian Tahap Kedua

Penelitian utama bertujuan untuk mengetahui perlakuan delignifikasi dan substrat jerami padi yang optimal untuk produksi enzim selulase dengan aktivitas yang maksimal dari kapang *Aspergillus niger* dengan lama fermentasi yang menunjukkan aktivitas enzim selulase tertinggi, yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan. Penelitian tahap kedua menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah proses delignifikasi dengan NaOH yang terdiri dari 4 level yaitu: 0, 2, 4 dan 6%. Faktor kedua adalah konsentrasi substrat jerami padi yang terdiri dari 3 level yaitu : 1, 2 dan 3%.

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali, sehingga diperoleh 24 unit percobaan. Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan dianalisis dengan sidik ragam, apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter yang diamati maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Gomez dan Gomez, 1976).

Penyiapan Stok *Aspergillus niger*

Disiapkan media Malt Extrat Agar (MEA) dengan cara melarutkan 39 g MEA dalam 1 liter air kemudian dididihkan sambil diaduk. Media kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 3 ml dan tabung ditutup dengan kapas selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Tabung media yang telah disterilisasi kemudian dibuat posisi miring sampai media menjadi padat dan disimpan selama 2 hari. Spora biakan murni *Aspergillus niger* ditumbuhkan dengan cara menggores pada permukaan media (1 ose per tabung). Biakan murni tersebut diinkubasi pada 25-27°C selama 7 hari.

Proses Delignifikasi Jerami Padi

Delignifikasi merupakan suatu proses pembebasan lignin dari suatu senyawa kompleks. Proses ini penting dilakukan sebelum hidrolisis bahan selulotik, sebab lignin dapat menghambat penetrasi asam atau enzim sebelum hidrolisis berlangsung. Dengan pemberian perlakuan delignifikasi pada substrat maka selulosa alami diharapkan menjadi mudah dihidrolisis oleh enzim selulotik. Substrat didegnifikasi dengan larutan NaOH sesuai dengan perlakuan. Dicampur dengan perbandingan 1:5, kemudian dipanaskan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Disaring

dengan kain saring dan dicuci dengan air sampai netral (pH 7). Selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C selama 10 jam. Bubuk jerami siap digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim selulase.

Proses Fermentasi

Sebanyak 10 ml aquades steril dituangkan ke dalam biakan *Aspergillus niger* dalam agar miring, kemudian dikocok agar spora terlepas ke dalam fase cair. Kemudian disiapkan sebanyak 1% (b/v) substrat jerami padi dalam erlenmeyer 100 ml dan ditambahkan larutan nutrisi dan mineral dengan perbandingan 1 : 1 terhadap substrat. Larutan nutrisi dan mineral ini mengandung NaH_2PO_4 4,7%, CaCl_2 0,1%, KH_2PO_4 1,02%, MgCl_2 0,02% dan urea 0,3% (b/v). Media yang telah berisi larutan nutrisi dan mineral dilakukan pengaturan pH awal yang telah ditetapkan pada penelitian tahap pertama, selanjutnya ditutup dengan kapas, disterilisasi pada 121°C selama 15 menit dalam autoclave.

Suspensi spora yang dibuat dari *Aspergillus niger* yang berumur 7 hari, dipindahkan ke dalam medium fermentasi pada konsentrasi 10% (b/v) dan diaduk secara aseptis di atas shaker, selanjutnya dilakukan fermentasi.

Pemanenan dan Pengujian aktivitas Enzim

Pemanenan enzim dilakukan pada akhir fermentasi. Enzim kasar dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian diaduk dan dikocok, lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat yang sudah dipisahkan dari substratnya merupakan enzim kasar yang siap dianalisis.

Dalam penelitian ini parameter yang diamati antara lain: pengujian aktivitas enzim endoglukanase (Darwis dan Sukara, 1990), pengujian filter paperase (Darwis dan Sukara, 1990), analisis protein terlarut metode biuret (Apriyanto *et al.*, 1989), aktivitas spesifik enzim filter paperase (Machfoed *et al.*, 1989).

Endoglukanase merupakan salah satu dari kompleks enzim selulase yang dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada selulosa secara acak dan menghasilkan selodektrin, selobiosa dan glukosa. Aktivitas enzim endoglukanase merupakan ukuran aktivitas komponen Cx. Pengujian aktivitas enzim endoglukanase dilakukan menurut Darwis dan Sukara (1990) yaitu menggunakan substrat CMC 1%. Hasil pengukuran absorbansi filtrat enzim (dikoreksikan dengan blanko), diplotkan pada kurva standar glukosa maka diperoleh konsentrasi glukosa dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Aktivitas enzim endoglukanase dinyatakan dalam satuan unit/ml filtrat enzim. Satu unit aktivitas enzim endoglukanase sebanding dengan satu mikromol glukosa yang dihasilkan dari perlakuan enzim terhadap substrat larutan CMC 1% selama 1 menit, atau jumlah mg per ml glukosa yang dihasilkan dikalikan dengan 0,185 unit.

Pengukuran aktivitas selulase lengkap dilakukan untuk mengukur aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan

menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Pengujian aktivitas filter paperase dilakukan menurut Darwis dan Sukara (1990) menggunakan kertas Whatman no.1. Hasil pengukuran absorbansi filtrat enzim (dikoreksikan dengan blanko) diplotkan pada kurva standar glukosa, diperoleh konsentrasi glukosa dan dikalikan faktor pengenceran. Aktivitas filter paperase dinyatakan dalam satuan unit per ml filtrat enzim. Satu unit aktivitas filter paperase adalah jumlah mg/ml glukosa yang dihasilkan dikalikan dengan 0,0925 unit.

Kadar protein terlarut ditentukan dengan metode Biuret menurut Apriyanto *et al.* (1989). Pereaksi Biuret dibuat dengan cara melarutkan 3 g $\text{CuCO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 3 g Na-K-tartarat dalam 500 ml NaOH 0,2 N. Selanjutnya ditambahkan 5 g KI kemudian diencerkan sampai 1000 ml dengan menggunakan NaOH 0,2 N). Larutan protein standar dibuat dengan melarutkan bovin serum albumin dalam air dengan konsentrasi 5 mg/ml. Kadar air serum albumin diukur, dan konsentrasi dinyatakan dengan berat kering.

Aktivitas spesifik didefinisikan sebagai unit aktivitas per miligram protein. Perhitungan aktivitas spesifik menurut Machfoed *et al.* (1989) adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{unit aktivitas (unit /ml filtrat)}}{\text{kadar protein (mg/ml)}}$$

HASIL

Penelitian tahap pertama ini bertujuan untuk mengetahui pH awal media dan lama fermentasi yang baik untuk produksi enzim selulase dengan aktivitas yang maksimal dari kapang *A. niger*. Pada tahap ini dicobakan tiga pH awal media yaitu: 5,0, 6,0, dan 7,0 serta dikombinasikan dengan lama fermentasi, yang terdiri dari tiga level yaitu: 7, 9, dan 11 hari. Dari hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan pH awal media dan lama fermentasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas enzim endoglukanase. Nilai rata-rata aktivitas endoglukanase dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai rata-rata aktivitas enzim endoglukanase dari *A. niger* (unit/mg)

pH awal media	Lama Fermentasi		
	7 hari	9 hari	11 hari
5	0,0008 (c)	0,0071 (a)	0,0012 (b)
	(c)	(c)	(c)
6	0,0020 (c)	0,0083 (a)	0,0024 (b)
	(a)	(a)	(a)
7	0,0008 (c)	0,0042 (a)	0,0016 (b)
	(b)	(b)	(b)

Keterangan : Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama di bawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

Aktivitas Enzim Endoglukanase

Dari hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH dengan konsentrasi

substrat berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas enzim endoglukanase. Nilai rata-rata aktivitas endoglukanase dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa nilai rata-rata aktivitas enzim endoglukanase yang paling tinggi didapat dari interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH 6% dengan konsentrasi substrat 2% yaitu sebesar 0,0365 unit/ml. Sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari interaksi perlakuan tanpa delignifikasi dengan konsentrasi substrat 3% yaitu 0,0191 unit/ml.

Tabel 2. Nilai rata-rata aktivitas endoglukanase (unit/ml)

Konsentrasi Substrat	Delignifikasi dengan NaOH			
	0%	2%	4 %	6%
1 %	0,0245 (b)	0,0258 (b)	0,0293 (a)	0,0298 (a)
	(b)	(a)	(a)	(b)
2 %	0,0271 (c)	0,0278 (bc)	0,0298 (b)	0,0365 (a)
	(a)	(a)	(a)	(a)
3%	0,0191 (a)	0,0209 (ab)	0,0213 (ab)	0,0229 (a)
	(c)	(b)	(a)	(c)

Keterangan : Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama di bawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

Aktivitas Filter Paperase (Unit/ml)

Berdasarkan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH dan konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas filter-paperase. Nilai rata-rata aktivitas filter-paperase dapat dilihat pada Tabel 3.

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa nilai rata-rata aktivitas filter-paperase tertinggi adalah 0,0330 unit/ml, diperoleh dari interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH 6% dengan konsentrasi substrat 2% sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari perlakuan interaksi tanpa delignifikasi dengan konsentrasi substrat 1%.

Tabel 3. Nilai rata-rata aktivitas filter paperase (unit/ml)

Konsentrasi Substrat	Delignifikasi dengan NaOH			
	0%	2%	4 %	6%
1 %	0,0157 (c)	0,0167 (bc)	0,0178 (b)	0,0200 (a)
	(b)	(b)	(b)	(b)
2 %	0,0172 (d)	0,0193 (c)	0,0225 (b)	0,0330 (a)
	(a)	(a)	(a)	(a)
3%	0,0159 (b)	0,0160 (b)	0,0181 (a)	0,0184 (a)
	(b)	(b)	(b)	(c)

Keterangan : Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama di bawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

Protein Terlarut

Berdasarkan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH dengan konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap kadar protein terlarut. Nilai rata-rata protein terlarut dalam filtrat enzim kasar dapat dilihat dalam Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat bahwa kadar protein terlarut dalam filtrat enzim kasar yang tertinggi didapat dari perlakuan interaksi delignifikasi 6% dengan konsentrasi substrat 2% sebesar 0,362 mg/ml, sedangkan

nilai terendah didapat dari perlakuan interaksi tanpa delignifikasi dengan konsentrasi substrat 3%.

Tabel 4. Nilai rata-rata kadar protein terlarut filtrat enzim kasar (mg/ml)

Konsentrasi Substrat	Delignifikasi dengan NaOH			
	0%	2%	4 %	6%
1 %	0,215 (b) (a)	0,237 (b) (a)	0,243 (b) (a)	0,321 (a) (b)
2 %	0,228 (b) (a)	0,246 (b) (a)	0,250 (b) (a)	0,362 (a) (a)
3%	0,170(a) (b)	0,189 (a) (b)	0,192 (a) (b)	0,208 (a) (c)

Keterangan : Huruf yang sama dibelakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama dibawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

Aktifitas Spesifik Endoglukanase

Berdasarkan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH dan konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktifitas spesifik endoglukanase. Nilai rata-rata aktifitas spesifik endoglukanase dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 5 dapat dilihat bahwa nilai rata rata aktifitas spesifik endoglukanase yang tertinggi 0,1456 unit/mg diperoleh dari interaksi perlakuan delignifikasi NaOH 6% dengan konsentrasi substrat 2%, sedangkan nilai rata-rata terendah 0,0675 unit/mg, diperoleh dari delignifikasi 6% dengan konsentasi substrat 2%, lebih tinggi daripada peningkatan kadar protein terlarut, sehingga menghasilkan nilai perbandingan yang tinggi sebagai aktivitas spesifiknya.

Tabel 5. Nilai rata-rata aktifitas spesifik endoglukanase (unit/mg)

Konsentrasi Substrat	Delignifikasi dengan NaOH			
	0%	2%	4 %	6%
1 %	0,0133(a) (b)	0,1137 (a) (b)	0,1258 (a) (a)	0,0675 (b) (c)
2 %	0,1285 (b) (a)	0,1150 (b) (b)	0,1221 (b) (b)	0,1456 (a) (a)
3%	0,1378(a) (a)	0,1422 (a) (a)	0,0956 (c) (b)	0,1113 (b) (b)

Keterangan : Huruf yang sama dibelakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama dibawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

Aktifitas Spesifik Filter Paparase (unit/mg)

Berdasarkan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH dan konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktifitas spesifik filter paperase. Nilai rata-rata aktifitas spesifik filter paperase dapat dilihat pada Tabel 6.

PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan terhadap aktivitas enzim endoglukanase, terlihat bahwa aktivitas enzim endoglukanase ini mencapai nilai rata-rata tertinggi pada interaksi perlakuan lama fermentasi 9 hari dengan pH

Tabel 6. Nilai rata-rata aktifitas spesifik filter paparase (unit/mg)

Konsentrasi Substrat (K)	Delignifikasi dengan NaOH (D)			
	0%	2%	4 %	6%
1 % (K1)	0,0720(a) (b)	0,0684 (ab) (b)	0,0605 (ab) (b)	0,0517 (b) (c)
2 % (K2)	0,0707 (c) (b)	0,0885 (b) (a)	0,0887 (b) (a)	0,1232 (a) (a)
3 % (K3)	0,1064(a) (a)	0,0754 (b) (ab)	0,0854 (b) (a)	0,0890 (b) (b)

Keterangan : Huruf yang sama dibelakang nilai rata-rata dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$). Huruf yang sama dibawah nilai rata-rata dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

awal 6,0 yaitu sebesar 0,0283 unit/ml. Kemudian pada lama fermentasi 11 hari aktivitasnya menurun. Hal ini disebabkan karena, pH media mengalami penurunan sehingga tidak sesuai dengan kondisi optimum untuk pertumbuhan *A. niger*. Stanbury dan Whitaker (1984) menyatakan bahwa saat masa fermentasi maksimum telah dilalui diperkirakan substrat enzim itu sendiri telah berkurang. Sedangkan pH awal media 6,0 pada substrat jerami padi yang difermentasi selama 9 hari mengalami perubahan yang mendekati kondisi optimal pertumbuhan *A. niger* yaitu pH 4,0-5,0, sehingga *A. niger* akan dapat melakukan aktivitas yang maksimal. Disamping itu, secara visual pertumbuhan *A. niger* pada pH 6,0 berdasarkan pertumbuhan miseliumnya terlihat lebih baik daripada pH 5,0 dan 7,0. Kulp (1975) menyatakan bahwa enzim selulase yang diproduksi oleh kapang *A. niger* menunjukkan aktivitas yang maksimal pada kisaran pH 4,5-5,5.

Suhartono (1989) menyatakan bahwa nutrisi yang ditambahkan ke dalam media fermentasi akan dihabiskan selama berlangsungnya proses fermentasi sampai dihasilkan aktivitas enzim yang maksimal, kemudian dengan berkurangnya nutrisi akan mengakibatkan aktivitas produksi enzim dan pertumbuhan mikroorganisme akan menurun.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa nilai rata-rata aktivitas enzim endoglukanase tertinggi diperoleh pada lama fermentasi 9 hari dengan pH awal media 6,0. Selanjutnya kondisi ini (lama fermentasi 9 hari dengan pH awal media 6) digunakan pada penelitian tahap selanjutnya.

Perlakuan delignifikasi substrat jerami padi dengan menggunakan NaOH 6% dan konsentrasi substrat 2%, dapat memberikan aktivitas enzim endoglukanase tertinggi. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi larutan NaOH, kemampuan untuk melarutkan lignin dan merusak struktur selulosa akan semakin bertambah, yang mengakibatkan serat-serat selulosa akan semakin longgar sehingga semakin mudah dihidrolisis oleh mikroorganisme baik untuk pertumbuhannya maupun untuk produksi enzim selulase (Gunam, 1997; Gunam *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Disamping itu, apabila konsentrasi substratnya tepat (konsentrasi tidak terlalu rendah atau terlalu pekat), maka aktivitas enzim akan tinggi. Sedangkan interaksi perlakuan tanpa delignifikasi dan konsentrasi substrat 3% akan

menghasilkan aktivitas enzim selulase yang rendah. Hal ini disebabkan oleh selulosa sulit dihidrolisis oleh mikroorganisme karena masih dilindungi oleh lignin dan juga penggunaan konsentrasi substrat 3% pada media fermentasi akan menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas endoglukanase, ini disebabkan oleh konsentrasi substrat yang lebih pekat, sehingga akan menimbulkan masalah terhadap sirkulasi udara, penyebaran kapang dan penurunan tingkat homogenitas. Hal ini pula yang mengakibatkan pertumbuhan kapang menjadi terganggu, sehingga aktivitas enzim endoglukanasenya juga menurun.

Pola aktivitas filter-paprase ini hampir sama dengan pola aktivitas enzim endoglukanase, yaitu nilai rata-rata aktivitas tertinggi diperoleh dari interaksi perlakuan delignifikasi NaOH 6% dengan konsentrasi substrat 2%. Hal ini disebabkan karena penggunaan konsentrasi substrat yang tepat (konsentrasi tidak terlalu rendah atau tidak terlalu pekat) dan juga karena penggunaan konsentrasi larutan NaOH yang lebih tinggi, menyebabkan kemampuan untuk melarutkan lignin dan merusak struktur selulosa akan semakin bertambah, yang mengakibatkan serat-serat selulosa akan semakin longgar, sehingga lebih mudah dihidrolisis oleh mikroorganisme baik untuk pertumbuhannya maupun untuk produksi enzim selulase. Sedangkan aktivitas filter-paprase yang rendah diperoleh dari interaksi perlakuan tanpa delignifikasi dan konsentrasi substrat 1%. Hal ini disebabkan karena selulosa sulit dihidrolisis oleh mikroorganisme karena masih dilindungi oleh lignin dan juga karena media fermentasi konsentrasinya substratnya terlalu rendah sehingga aktivitas enzimnya belum maksimal.

Pada penelitian ini kadar protein terlarut dalam filtrat enzim kasar diasumsikan sebagai protein enzim selulase. Konsentrasi substrat jerami padi mempengaruhi kadar protein terlarut yang dihasilkan *A. niger*. Protein terlarut tertinggi dihasilkan dari perlakuan interaksi konsentrasi substrat 2% yang terdelignifikasi dengan NaOH 6%, dan pada konsentrasi substrat 3% tidak meningkatkan kadar protein terlarut.

Hardjo *et al.*, (1989) menyatakan bahwa *A. niger* dalam media pertumbuhan yang mengandung molekul kompleks dapat mengeluarkan enzim ekstraseluler seperti: α -amilase, β -amilase, glukosaamilase, protease dan selulase. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kenaikan aktivitas enzim selulase (endoglukanase dan filter paprase) sejalan dengan kenaikan kadar protein terlarut. Hal ini mungkin sebagian besar protein terlarut dalam filtrat enzim kasar tersebut terdiri dari enzim selulase.

Pada interaksi perlakuan delignifikasi 6% dan konsentrasi substrat 1% akan menghasilkan nilai perbandingan yang rendah, sehingga menghasilkan aktivitas spesifik yang rendah pula. Hal ini disebabkan karena penurunan aktivitas endoglukanase lebih tinggi daripada penurunan kadar protein terlarutnya sehingga

aktivitas yang dihasilkan menjadi rendah. Nilai aktivitas spesifik endoglukanase ini ditentukan dari nilai aktivitas endoglukanase dengan protein terlarut dalam filtrat enzim kasar (Machfoed *et al.*, 1989).

Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa nilai rata-rata aktivitas spesifik filter paprase yang tertinggi diperoleh dari interaksi perlakuan delignifikasi dengan NaOH 6% dan konsentrasi substrat 2%, yaitu sebesar 0,123 Unit/mg. Sedangkan interaksi perlakuan delignifikasi 6% dengan konsentrasi substrat 1% memberikan nilai rata-rata aktivitas spesifik filter paprase yang terendah yaitu 0,052 unit/mg. Hal ini disebabkan karena peningkatan aktivitas filter paprase pada interaksi perlakuan delignifikasi NaOH 6% dengan konsentrasi substrat 2% lebih tinggi dari pada peningkatan kadar protein terlarut, sehingga menghasilkan nilai perbandingan yang tinggi sebagai aktivitas spesifiknya. Pada interaksi perlakuan delignifikasi 6% dengan konsentrasi substrat 1% menghasilkan aktivitas spesifik yang rendah. Hal ini disebabkan penurunan aktivitas filter paprase yang lebih tinggi daripada penurunan kadar protein terlarutnya sehingga aktivitas spesifik yang dihasilkan lebih rendah.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dengan jerami padi sebagai substrat untuk produksi enzim selulase dari *A. niger* maka dapat disimpulkan bahwa jerami padi dapat dijadikan sebagai substrat untuk produksi enzim selulase dari *A. niger* secara fermentasi media cair. Lama fermentasi selama 9 hari dengan pH awal media 6,0 merupakan kondisi yang optimal untuk produksi enzim selulase dari kapang *A. niger* dengan substrat jerami padi. Konsentrasi substrat jerami padi 2% dengan perlakuan delignifikasi NaOH 6% akan menghasilkan aktivitas enzim selulase yang tertinggi, dimana nilai rata-rata tertinggi dari aktivitas enzim endoglukanase (0,037 unit/ml), aktivitas filter paprase (0,033 unit/ml), protein terlarut (0,036 mg/ml), aktivitas spesifik endoglukanase (0,146 unit/mg) dan aktivitas spesifik filter paprase (0,123 unit/mg).

KEPUSTAKAAN

- Apriantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, S. Budiyo. 1989. Analisis Pangan. Penerbit Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Blain, J.A. 1975. Industrial Enzyme Production. Edward Arnold, London.
- Darwis, A.A., E. Sukara. 1990. Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Enari, T.M. 1983. Microbial Cellulase. Applied Science Publisher, New York.
- Frazier, Westhoff. 1981. Food Microbiology. Tata Mc Graw Hill Publ. Co. Ltd. New York
- Gomes, K. A., A.A. Gomes. 1976. Statistical Procedure for Agriculture Research with Emphasis on Rise. IRRI. Los

- Banos, Philippines.
- Gunam, I.B.W. 1997. Perlakuan Kimiawi Ampas Tebu Tanpa Pencucian Sebagai Perlakuan Pendahuluan Untuk Hidrolisis Enzimatik Selulosanya. Tesis S2. Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Gunam, I.B.W., N.S. Antara. 1999. Study on Sodium Hydroxide Treatment of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of *Trichoderma reesei*. Gitayana (Agric. Technol. J.). 5 (1): 34-38.
- Gunam, I.B.W., Hardiman, T. Utami, 2004. Chemical Pretreatments on Bagasse to Enhance Hydrolysis of Its Cellulose Enzymatically. The 3th Hokkaido Indonesian Student Association Scientific meeting (HISAS 3), Sapporo
- Hardjo, S., N.S. Indrasti., T. Bantacut. 1989. Biokonversi. Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Judoamidjojo, R.M., E.G Said dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. PAU Bioteknologi IPB, Bogor
- Juliano, B.O. 1985. Rise Chemistry and Technology. The American Association of Cereal Chemist, Inc, Minnessota.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrates. Academic Press, New York.
- Lee, SH., T.V. Doherty, R.J. Linhardt, J.S. Dordick. 2009. Ionic Liquid-Mediated Selective Extraction of Lignin From Wood Leading to Enhanced Enzymatic Cellulose Hydrolysis. Biotechnol. and Bioeng, Vol. 102, No. 5:1368-1376.
- Machfoed, E.G. Said, Krisnani. 1989. Fermentor. Petunjuk Laboratorium. PAU Pangan dan Gizi. IPB, Bogor.
- Marsden, W.L and P.P. Gray. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Cellulases in Lignocellulosic Material. *CRC. Critical Rev. in Biotechnol.* 3: 235-276
- Rahayu, K.1990. Tehnologi Enzim. Penerbit Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta
- Reed, G. 1975. Enzyme in Food Processing. Academic Press., New York.
- Stanbury, P.F., A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press.
- Suhartono, M.T . 1989. Enzim dan Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Wyk, J.P.H.V., M. Mohulatsi. 2003. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. Bioresource Technology, 86: 21-23.