

## PEMILAHAN STRAIN *ASPERGILLUS NIGER* DAN *TRICHODERMA REESEI* UNTUK MEMPEROLEH AKTIVITAS SELULASE TINGGI PADA FERMENTASI PADAT MENGGUNAKAN BAGAS

Hamid<sup>1</sup>, Abdullah Busairi<sup>2</sup>, Slamet Priyanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta,  
Jl. A. Yani Pabelan Kartasura, Tromol Pos 1 Surakarta 57102, Telp 0271 717417

<sup>2,3</sup>Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang.

Email: hamid@ums.ac.id

### Abstrak

Enzim selulase merupakan enzim yang sangat penting untuk produksi etanol dari bahan lignoselulosa dan untuk keperluan lainnya. Bagas sangat cocok dipilih sebagai substrat fermentasi untuk produksi selulase karena murah, mudah didapat dan sudah terkumpul dalam jumlah besar. Fermentasi padat mempunyai kelebihan dibandingkan fermentasi terendam yaitu lebih tingginya aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Karena banyaknya jumlah strain fungi, maka diperlukan pemilahan dengan metode yang efisien dan efektif. Penelitian didahului dengan melakukan screening awal dengan perwarnaan Congo red pada tiga strain *Trichoderma reesei* dan lima strain *Aspergillus niger* yang menghasilkan informasi fungi yang potensial yaitu dua strain *A. niger* dan satu strain *T. reesei*. Selanjutnya dilakukan screening lanjutan dengan menguji aktivitas enzim dengan substrat kertas saring dengan metode dinitrosalicylic acid pada fermentasi padat dengan tiga strain ini fermentasi padat selama 5 hari. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas tertinggi sebesar 0,525 unit/gram ditunjukkan oleh strain *A. niger* ITBCC L74 pada hari ketiga.

**Kata kunci:** bagas; Congo red; fermentasi padat; fungi; indeks enzimatis

### Pendahuluan

Peluang pemanfaatan limbah di Indonesia masih terbuka lebar, salah satunya adalah peluang pemanfaatan limbah lignoselulosa. Limbah pertanian ini dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan fungi penghasil enzim selulase sekaligus sebagai substrat untuk dijadikan glukosa. Negara dapat memetik keuntungan yang besar dari produksi bahan bio dan bioenergi dari lignoselulosa, antara lain: kenaikan selisih perdagangan, kualitas lingkungan hidup yang meningkat, dan pasokan sumber energi berkelanjutan (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006).

Salah satu bahan lignoselulosa yang potensial dijadikan bahan baku bioenergi dan produk adalah bagas. Besarnya produksi bagas tercermin dari besarnya luas lahan tebu di Indonesia yang mencapai 444,5 ribu hektar pada tahun 2008 (Mulyadi et al., 2009) dan juga dapat tercermin dari produksi tebu pada tahun 2010 yang mencapai 37,45 juta ton (Ditjen Perkebunan Departemen Pertanian Indonesia, 2012). Bagas dapat dijadikan substrat yang ekonomis bagi pertumbuhan fungi penghasil enzim selulosa yang selanjutnya enzim tersebut dapat dimanfaatkan mengubah selulosa menjadi glukosa.

Beberapa strategi penurunan biaya enzim selulosa antara lain: peningkatan produktivitas volumetrik enzim, produksi enzim dengan substrat yang murah, dan produksi selulase dengan aktivitas yang lebih tinggi (Zhang dkk., 2006). Fermentasi padat (*solid state fermentation*), disingkat FP, dengan fungi menjadi perhatian dari banyak peneliti karena beberapa keunggulannya dibanding fermentasi terendam (*submerged fermentation*). Aktivitas enzim pada fermentasi padat dengan fungi lebih tinggi daripada fermentasi terendam. Aktivitas enzim yang tinggi akan memungkinkan produksi enzim yang lebih murah dan selanjutnya produksi etanol yang lebih murah sehingga harganya dapat bersaing dengan bensin. Strain fungi yang berbeda dapat menghasilkan aktivitas yang berbeda. Pemilahan (screening) fungi untuk memilih fungsi yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi sangat penting dan menjadi langkah awal bagi pengembangan enzim selulosa yang murah.

Enzim selulase merupakan serangkaian enzim yang bekerja pada selulosa yang dapat mengubah selulosa menjadi glukosa. Serangkaian enzim ini diproduksi sebagai sistem selulase berbagai enzim dari berbagai mikroorganisme, tanaman dan binatang. Serangkaian enzim tersebut adalah *endoglucanase* (EC 3.2.1.4), *exoglucanase* atau *cellobio-hydrolase* (EC 3.2.1.91), dan  $\beta$ -glikosidase (EC 3.2.1.21) (Swift, 2008; Zhang dkk., 2006). Serangkaian enzim tersebut terdapat pada fungi. Jenis fungi tertentu telah dilaporkan menghasilkan selulase yang lebih baik dari yang lain yaitu dari genus *Trichoderma* dan *Aspergillus* (Abu Bakar dkk., 2010; Omojasola dkk., 2008; Zhang dkk., 2006). Selain itu *Trichoderma sp.* dan *Aspergillus sp.* yang merupakan fungi berfilamen juga menghasilkan suasana asam yang cocok untuk proses fermentasi menjadi alkohol. Fermentasi padat

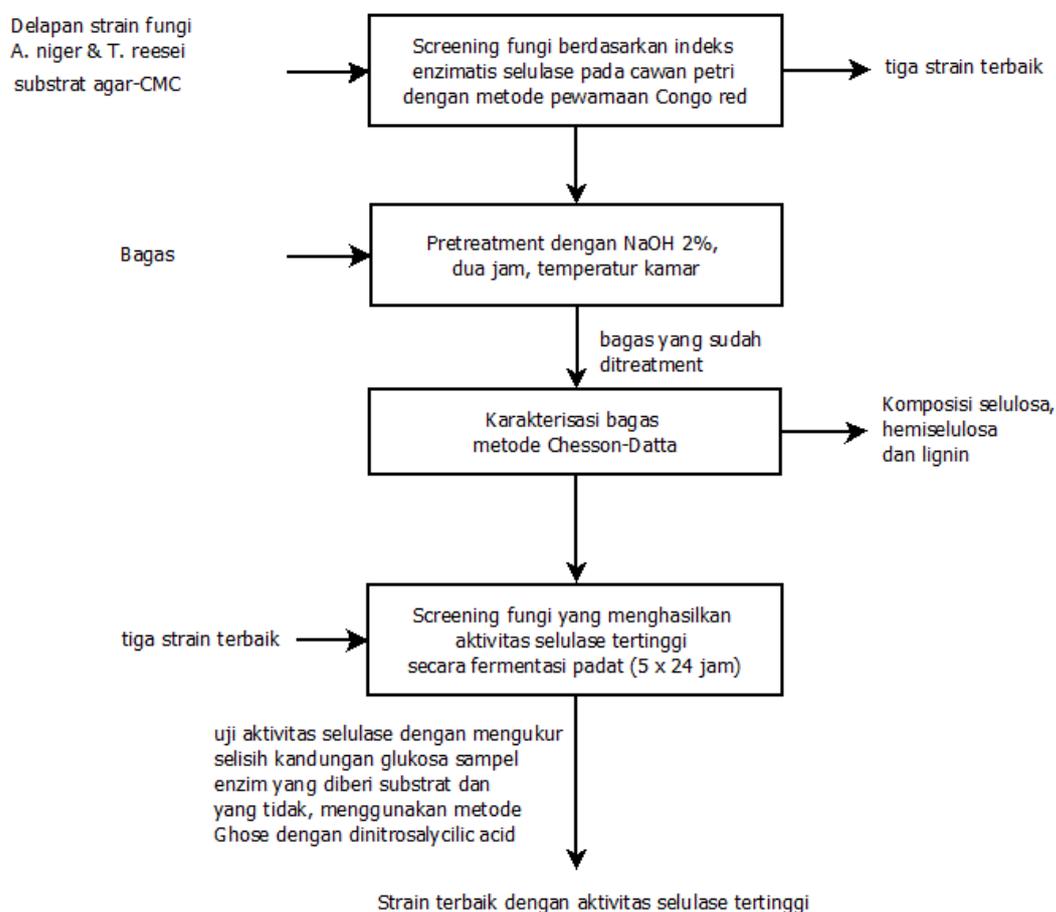
dengan *Aspergillus niger* ITBCC F74 dan *Trichoderma reesei* telah dilaporkan oleh Anwar Widjaja et. al (2010) yang menggunakan substrat jerami yang berhasil menghasilkan enzim dengan aktivitas cukup tinggi (0,21-1,67 unit/ml). Busairi dkk (2010) melaporkan bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan pada fermentasi padat maksimum pada kadar air 80%.

Pemilihan (*screening*) strain fungi untuk memilih strain yang menghasilkan aktivitas selulase yang tinggi biasanya menggunakan cara biasa yaitu fermentasi pada media. Cara ini memerlukan sampel yang banyak, wadah yang besar, pengujian yang lama, dan biaya yang tinggi. Walaupun cara ini adalah satu-satunya cara untuk mengetahui aktivitas nyata, tetapi cara ini memerlukan usaha yang lebih banyak dan lebih lama, serta biaya yang lebih tinggi. Cara ini kurang disukai ketika jumlah strain yang harus diuji cukup banyak. Beberapa peneliti mengembangkan metode pemilihan lain yang lebih mudah dan lebih murah untuk mendekati aktivitas nyata untuk memilih strain yang potensial untuk memproduksi enzim selulase, antara lain dengan cara pewarnaan. Beberapa cara yang sederhana dikembangkan oleh beberapa peneliti yang bisa menunjukkan korelasi penampakan warna dengan aktivitas enzim, diantaranya adalah pewarnaan dengan iodine gram (Kasanadkk., 2008; Yoon dkk., 2007) dan pewarnaan dengan Congo red (Florencio dkk., 2012). Pewarnaan dengan Congo red menghasilkan warna yang terang dan gradien warna yang jelas sehingga lebih mudah untuk diamati dibanding pewarnaan dengan iodine gram. Kombinasi antara pemilihan fungi cepat dengan pewarnaan dan pemilihan fungi dengan fermentasi untuk mengetahui aktivitas nyata menjadi kombinasi yang paling optimal dari segi usaha dan keberhasilan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan pemilihan fungi dengan pewarnaan Congo red untuk memperoleh informasi fungi yang potensial memiliki aktivitas selulase tinggi, dan selanjutnya mencari waktu optimal fermentasi dari strain fungi terpilih yang potensial mempunyai aktivitas enzim tinggi.

**Bahan Dan Metode**

Penelitian menggunakan fermentasi padat dengan media bagas dengan biakan *Aspergillus niger* ITBCC *L*<sub>51</sub>, *L*<sub>74</sub>, *L*<sub>76</sub>, dan *L*<sub>161</sub> yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Departemen Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung, serta *Aspergillus niger* FNCC 6114, *Trichoderma reesei* FNCC 6012, 6013 dan 6131 yang diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi PAU Universitas Gajah Mada. Penelitian dilaksanakan dengan struktur seperti diuraikan dalam Gambar 3.1.



Gambar 2. Diagram alir percobaan

1. Semua biakan strain murni *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* diremajakan dengan mengambil biakan dengan kawat ose dan menginokulasi pada media 2% dekstrosa PDA slant. Agar slant disimpan pada temperatur 4°C. Setiap 4 minggu biakan diremajakan dengan media PDA baru. Delapan jenis fungi yaitu 5 strain *Aspergillus niger* dan 3 strain *Trichoderma reesei* diinokulasikan secara *full streak* secara aseptis pada PDA plate lalu didiamkan dalam waktu yang singkat (kurang lebih 1 jam), lalu agar PDA dipotong dengan ukuran diameter kurang lebih 11,5 cm dan dipindahkan ke atas cawan petri yang telah berisi agar murni (20 gram per liter) yang diberi sumber karbon berupa sodium-CMC dan nutrisi Mandels (Omojasola et al., 2008). Biakan disimpan selama 4 hari pada 35°C. Sampel kemudian diberi larutan 2,5 gram per liter congo red sebanyak 10 ml dan didiamkan selama 10 menit. Sampel dicuci sampel dengan larutan 10 gram per liter NaCl. Penampakan agar plate diamati, diameter warna oranye diukur. Strain fungi yang mempunyai indeks enzimatis tertinggi dipilih sebagai fungi yang akan diteliti lebih lanjut. Indeks enzimatis dalam penelitian adalah perbandingan antara diameter dari warna oranye dengan diameter fungi (Florencio dkk., 2012).
2. Bagas yang telah dihancurkan hingga mencapai ukuran 40 mesh, diproses awal (pretreatment) dengan larutan NaOH 2% dengan perbandingan 1:10 (b:v) selama dua jam. Bagas dibilas dengan air untuk menghilangkan NaOH dan dinetralkan dengan HCl encer hingga pH netral. Bagas dikeringkan hingga benar-benar kering di dalam oven pada temperatur 60°C.
3. Bagas dikarakterisasi kandungan selulosa, hemiselulosa, dan ligninnya, dengan metode Chesson-Datta (Chesson, 1981).
4. Pemilahan fungi dengan aktivitas tertinggi dengan mengamati aktivitas enzim produk fermentasi padat menggunakan bagas selama 5 x 24 jam. Biakan strain murni *Aspergillus niger* pada PDA slant seluas 1 cm<sup>2</sup> dipindahkan ke larutan media inokulum secara aseptis. Media inokulum menggunakan larutan (berdasarkan 1 liter larutan) glukosa 10g/l sebanyak 50 ml. Kemudian nutrisi tambahan 5 ml diberikan menurut Mandels (Omojasola et al., 2008). Inkubasi dilakukan pada pH 5,5 temperatur 35°C selama 2 hari. Inokulum ini diuji optical density (OD) pada 690 nm. Jika OD<sub>690</sub> kurang dari 0,6 maka fermentasi dilanjutkan, apabila OD<sub>690</sub> lebih dari 0,6 maka suspensi spora harus diencerkan dengan aquades secara aseptik. Selanjutnya inkubasi dilakukan pada media fermentasi padat yaitu bagas. Sepuluh gram bagas yang diatur supaya mempunyai kadar air 80% diinkubasi dengan inokulum sebanyak 2 ml di dalam Erlenmeyer 250 ml. Nutrisi yang ditambahkan sesuai dengan nutrisi Mandels. Setelah mencapai waktu yang ditentukan enzim diekstrak dengan larutan buffer sodium sitrat pH 4,5 dengan perbandingan bagas kering terhadap buffer 1:10 b/v. Aktivitas enzim diuji dengan metode Ghose (Ghose, 1987) menggunakan kertas saring Whatman nomer 1 sebagai substrat pada 50°C selama 1 jam dengan reagen dinitrosalicylic acid (DNS).

**Hasil Dan Pembahasan**

**Karakterisasi bagas**

Perlakuan awal pada bagas merubah warna bagas dari coklat khas lignin menjadi lebih kuning cerah. Perubahan warna ini mengindikasikan adanya perubahan pada struktur dan komposisi bagas. Komposisi bagas yang telah mengalami perlakuan awal ditampilkan pada Tabel 1. Pretreatment mengakibatkan peningkatan kandungan selulosa dan abu serta menurunkan kandungan hemiselulosa secara signifikan, sedangkan kadar lignin relatif tetap. Pretreatment juga mengubah warna bagas berubah menjadi kuning cerah. Perubahan ini menunjukkan *pretreatment* telah memberi pengaruh signifikan terhadap komposisi dan struktur bagas. Walaupun kadar lignin relatif tetap, sedangkan lignin merupakan bahan yang menghambat akses menuju selulosa di dalam bagas, tetapi diperkirakan telah terjadi perubahan struktur bagas yang memudahkan selulosa dikonversioleh enzim menjadi gula. Kadar selulosa yang tinggi pada bagas setelah pretreatment menunjukkan bahwa bahan ini layak dijadikan sumber selulosa bagi fermentasi oleh fungi.

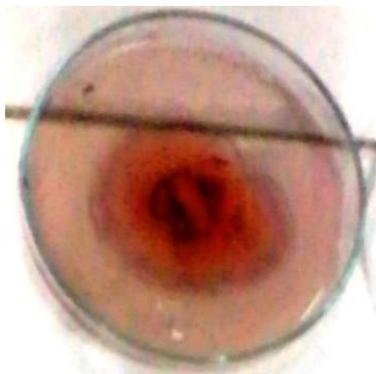
Tabel 1. Hasil uji kandungan bagas sebelum dan setelah mengalami *pretreatment*

Komponen	Sebelum pretreatment	Setelah pretreatment	Perubahan
Selulosa	41,1%	57,76%	40,54%
Hemiselulosa	35,47%	12,94%	-63,52%
Lignin	22,36%	21,34%	-4,56%
Abu dan lain-lain	1,07%	7,96%	643,93%

**Pemilahan awal fungi dengan uji pewarnaan Congo red**

Dalam penelitian ini dilakukan uji pewarnaan Congo red terhadap delapan strain fungi. Pewarnaan menghasilkan warna oranye yang tajam yang dapat dengan mudah dibedakan dengan zona lainnya seperti dapat

dilihat pada Gambar 1. Warna oranye berasal dari interaksi *direct dye* Congo red dengan beta-D-glucan yang ada. Pewarnaan ini merupakan metode yang cepat dan sensitif dalam penilaian keberadaan enzim atau strain yang mempunyai aktivitas enzim endoglucanase (Teather & Wood, 1982). Congo red yang tidak bereaksi larut dalam pembilasan dengan larutan NaCl 1%. Pengaruh dari selulase dianggap diwakili oleh diameter warna oranye. Sehubungan dengan diameter cakram PDA yang diletakkan pada agar CMC tidak seragam maka diameter warna orange dinormalkan dengan membaginya dengan diameter fungi yang menghasilkan indeks enzimatis.



Gambar 3. Contoh hasil pewarnaan Congo red pada agar Na-CMC yang ditumbuhi fungi.

Hasil uji aktivitas enzim menggunakan indikator indeks enzimatis disajikan pada Tabel 2. Tiga strain yang paling baik dalam mengkonversi sodium-CMC adalah *Aspergillus niger* ITBCC L74, *Aspergillus niger* ITBCC L161, dan *Trichoderma reesei* UGM 6131 dengan indeks enzimatis (perbandingan antara diameter pengaruh enzim dan diameter koloni fungi) yang nilainya paling tinggi di antara delapan strain yaitu berturut-turut 1,945, 1,608, dan 1,875. Tingginya indeks enzimatis ketiga strain fungi ini menjadi indikator tingginya aktivitas enzim ketika ketiga enzim tersebut digunakan dalam fermentasi padat dengan bagas, sehingga ketiga fungi dipilih untuk pemilahan selanjutnya.

Tabel 2. Indeks enzimatis delapan strain fungi

Strain	Diameter koloni fungi, $D_k$ (cm)	DiameterWarna Oranye, $D_p$ (cm)	Indeks enzimatis (IE) = $D_p/D_k$
<i>A. niger</i> FNCC 6114	2,23	-	-
<i>A. niger</i> ITBCC L51	2,21	3,36	1,520
<i>A. niger</i> ITBCC L74	1,63	3,17	1,945
<i>A. niger</i> ITBCC L76	1,91	2,17	1,136
<i>A. niger</i> ITBCC L161	1,94	3,12	1,608
<i>T. reesei</i> FNCC 6131	1,84	3,45	1,875
<i>T. reesei</i> FNCC 6012	1,88	2,23	1,186
<i>T. reesei</i> FNCC 6013	1,85	2,47	1,335

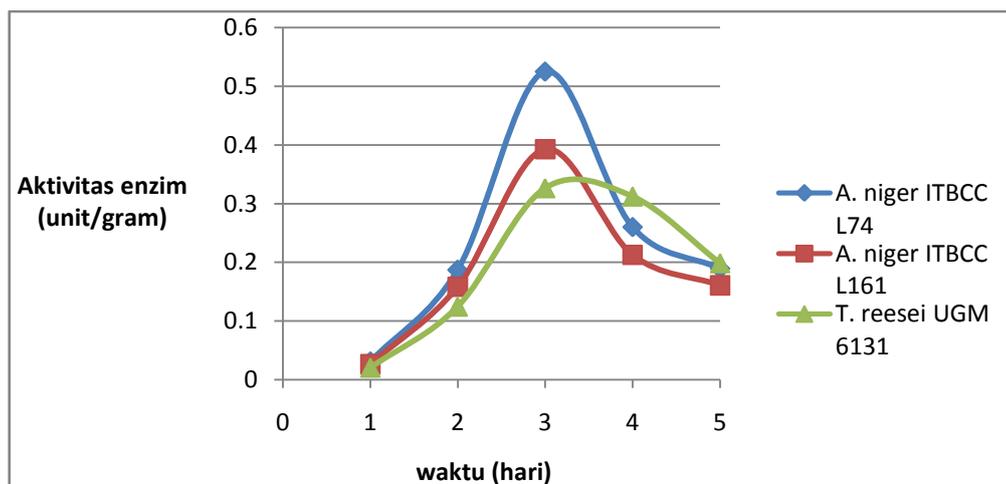
**Pemilahan lanjutan tiga strain fungi terpilih secara fermentasi padat**

Hasil pemilahan lanjutan tiga strain fungi dengan fermentasi padat pada media bagas selama 5x24 jam ditampilkan pada Gambar 2, sedangkan nilainya dapat dilihat pada Tabel 3. Aktivitas tertinggi dari media fermentasi dengan tiga strain fungi terjadi pada hari ketiga. Aktivitas tertinggi dihasilkan oleh *A. niger* ITBCC L74 dengan aktivitas enzim 0,525 unit/gram, disusul oleh *A. niger* ITBCC L161 yaitu 0,393 unit/gram, dan *T. reesei* UGM 6131 sebesar 0,326 unit/gram. Hasil ini lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Arief Widjaja et al (2010) yaitu 0,21-1,69 unit/ml yang terjadi pada hari ke empat-delapan. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan substrat, perbedaan ukuran substrat, perbedaan pretreatment, dan sebagainya.

Hasil penelitian menunjukkan secara jelas bahwa *A. niger* ITBCC L74 mempunyai aktivitas enzim paling tinggi dibandingkan fungi yang lain. Nilai aktivitas maksimum yang dicapai pada hari ketiga sesuai dengan penelitian yang lain yang menggunakan *A. niger* pada dedak gandum (Vu dkk., 2011) dan *A.niger* serta *T. reesei* pada bagas (Lee dkk., 2011).

Tabel 3. Aktivitas enzim (unit per gram bagas kering) tiga fungi terhadap waktu

Waktu (hari)	Aktivitas enzim (unit/gram)		
	A. niger ITBCC L74	A. niger ITBCC L161	T. reesei UGM 6131
1	0,0311	0,0264	0,0208
2	0,1868	0,1585	0,1246
3	0,5251	0,3927	0,3264
4	0,2602	0,2129	0,3122
5	0,1892	0,1608	0,1986



Gambar 4. Aktivitas tiga strain fungi pada fermentasi padat selama lima hari.

**Kesimpulan dan Saran**

Metode pewarnaan dengan Congo red dapat digunakan untuk memilah strain fungi yang memiliki aktivitas selulase tinggi. Aktivitas enzim terbaik diperoleh pada fermentasi padat dengan *Aspergillus niger* ITBCC L74 dengan waktu inkubasi selama 3 hari, yang mempunyai aktivitas enzim 0,525 unit/gram. Penelitian selanjutnya dapat diarahkan pada penelitian pengaruh temperatur, kondisi pretreatment, pH, dan kadar nutrisi terhadap aktivitas enzim dengan berbagai fungi sehingga dapat diperoleh aktivitas maksimum. Setelah itu penelitian dapat dilanjutkan dengan penelitian mutasi yang diarahkan (*directed evolution*) dengan tujuan meningkatkan aktivitas enzim berlipat ganda.

**Daftar Pustaka**

Abu Bakar, N. K., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., & Ghazali, F. M., (2010), "Isolation and Selection of Appropriate Cellulolytic Mixed Microbial Cultures for Cellulases Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch". *Biotechnology*, Vol. 9, pp. 73–78.

Anwar, N., Widjaja, A., & Winardi, S. (2010). *Optimasi Produksi Enzim Selulase untuk Hidrolisis Jerami Padi*. Laporan Penelitian, Institut Teknologi Surabaya.

Busairi, A., Saadah, Z., & Ika S., N. (2010), "*Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*", (Laporan Penelitian S1). Jurusan Teknik Kimia UNDIP. Retrieved from <http://eprints.undip.ac.id/13063>

Chesson, A., (1981). "Effects of Sodium Hydroxide on Cereal Straws in Relation to the Enhanced Degradation of Structural Polysaccharides by Rumen Microorganisms". *J. Sci. Food Agric*, Vol. 32, pp. 745–748.

Ditjen Perkebunan Departmen Pertanian Indonesia. (2012), "Paparannya Ditjen Bun pada Musrenbangtan 2012. Unpublished Retrieved from [www.deptan.go.id/musrenbangtan2012/Paparan%20Ditjen%20Bun%20pada%20musrenbangtan%202012.pdf](http://www.deptan.go.id/musrenbangtan2012/Paparan%20Ditjen%20Bun%20pada%20musrenbangtan%202012.pdf)

- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. *Enzyme Research*, 2012.
- Ghose, T. K. (1987), "Measurement of Cellulase Activities". *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 59 (2) pp. 257–268.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A., (2008). "A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine". *Current Microbiology*, Vol. 57 (5) 503–507.
- Lee, C. K., Darah, I., & Ibrahim, C. O., (2011). "Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System". *Biotechnology Research International*.
- Mulyadi, M., Toharisman, A., & Mirzawan., (2009). "Identifikasi Potensi Lahan Untuk Mendukung Pengembangan Agribisnis Tebu Di Wilayah Timur Indonesia". *Potensi Lahan Tebu Indonesia Timur -P3GI, 2009*. Retrieved from [sugarresearch.org/wp-content/uploads/2009/08/potensi-intim.pdf](http://sugarresearch.org/wp-content/uploads/2009/08/potensi-intim.pdf)
- Omojasola, P. F., Jilani, O. P., & Ibiyemi, S. A., (2008). "Cellulase Production by Some Fungi Cultured on Pineapple Waste". *Nature and Science*, 6(2), 64–79.
- Swift, L. M., (2008). "*Enzymatic Degradation of Cellulosic Wastes*". Texas Tech University Graduate Thesis.
- Teather, R. M., & Wood, P. J., (1982). "Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen". *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 43 (4) pp. 777–780.
- Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko, S. J., & Kim, S. H., (2007). "Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi". *Mycobiology*, Vol. 35 (1) 21–24.
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R., (2006), "Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies". *Biotechnology Advance*, Vol. 24, pp. 452–481.