

Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Suhu Terhadap Pembentukan Enzim Selulase dari *Trichoderma Reesei* pada Media Jerami Padi

Maria Makrina Milenium¹⁾, Jasman², Kasimir Sarifudin³
Prodi Pendidikan Kimia, Universitas Nusa Cendana
Jl. Adisucipto, Kupang, Provinsi Nusa Tenggara Timur, Indonesia
E-mail korespondensi: maria.m.milenium@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat dan suhu yang optimal, serta untuk mengetahui ada tidaknya interaksi pengaruh konsentrasi substrat dan suhu dari *T.reesei* pada media jerami padi. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu persiapan sampel, perlakuan kimia (basa), peremajaan jamur *T.reesei*, penyiapan larutan nutrisi, produksi ekstrak kasar enzim selulase, pemanenan enzim dan uji aktivitas enzim selulase menggunakan metode DNS. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu konsentrasi substrat dan suhu, dengan pengulangan sebanyak dua kali. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dua arah dengan taraf signifikansi 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat dan suhu memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Konsentrasi substrat dan suhu yang memproduksi enzim selulase secara maksimal adalah pada konsentrasi substrat 25% dan suhu 35°C yaitu sebesar, 1,850 U/mL dan interaksi antara konsentrasi substrat dan suhu memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

Kata kunci : Jerami Padi, Enzim Selulase, Aktivitas Enzim

ABSTRAC

*This research aims to determine the optimal substrate concentration and temperature, as well as to determine incubation on the interaction between the influence of substrate concentration and temperature. This research was carried out in several stages, namely sample preparation, chemical (alkaline) treatment, refreshing the rejuvenation *T.reesei*, preparing nutrient solutions, producing the crude extracts of enzymes, harvesting enzymes and testing the enzyme activity of using the DNS method. The experimental design is the factorial design. The data obtained were analyzed using two-way ANOVA with a significance level of 5%. The results showed that variations in substrate concentration and temperature had an influence on the activity of the cellulase enzyme produced. The substrate concentration and temperature that produces the maximum cellulase enzyme is 25% and 35°C respectively. There is an interaction between substrate concentration and temperature in influencing on the activity of the cellulase enzyme.*

Key word: Rice Straw, Cellulase Enzyme, Enzyme Activity

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris yang sebagian besar penduduknya berprofesi sebagai Petani. Salah satu penghasilan pertanian adalah padi. Berdasarkan data statistik (BPS) produksi padi pada tahun 2021 diperkirakan sebesar 55,27 juta ton gabah kering giling (GKG). Salah satu hasil dari produksi padi adalah jerami padi. Jerami adalah tanaman padi bagian batang dan tangkai tanaman padi setelah dipanen butir-butir buahnya. Biasanya jerami digunakan untuk pakan ternak dan sisanya dibiarkan membusuk atau dibakar. Hal ini akan menghasilkan polutan yang dapat merusak lingkungan [1].

Diketahui jerami padi merupakan bahan berlignoselulosa yang memiliki kandungan lignin 23,4 %, hemiselulosa 24,5 %, dan kandungan selulosa yang tinggi mencapai 34,2 % berat kering [2]. Lignin terbentuk dari fenil propana, unit-unit fenil propana terikat satu dengan lainnya dengan ikatan ester (C-O-C) maupun ikatan karbon-karbon[2]. Lignin bersifat hidrofobik dan melindungi selulosa sehingga strukturnya bersifat kaku (rigid). Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida sedangkan selulosa merupakan homopolisakarida. Selulosa adalah polimer tak bercabang dari glukosa yang dihubungkan melalui ikatan beta 1,4 atau 1,4 beta glukosidase. Molekul lurus dengan unit glukosa rata-rata sebanyak 5000 ini beragregasi membentuk fibril yang terikat melalui ikatan hidrogen di antara gugus hidroksil pada rantai di sebelahnya. Serat selulosa yang mempunyai kekuatan fisik yang tinggi terbentuk dari fibril-fibril ini, tergulung seperti spiral dengan arah-arah yang berlawanan menurut satu sumbu. Selulosa cenderung membentuk mikrofibril melalui ikatan inter dan intra molekuler sehingga memberikan struktur yang kuat. Mikrofibril selulosa terdiri dari 2 tipe, yaitu kristalin dan amorf. Salah satu jenis jamur *Trichoderma* yang dapat mendegradasi selulosa adalah *T.reesei*[3].

T.reesei adalah jamur mesofilik yang termasuk dalam jenis jamur berbentuk filamen. *T.reesei* merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan untuk mendegradasi lignin. *T.reesei* memiliki kemampuan mensekresikan sejumlah besar enzim selulolitik, seperti selulase dan hemiselulase. Komponen utama dari sistem selulase *T.reesei* adalah kedua jenis enzim selobiohidrolasenyanya, yaitu CBHI dan CBHII, yang berjumlah total 80 % dari total protein selulase yang dihasilkan[3]. *T.reesei* dapat ditemui hampir semua jenis tanah dan pada berbagai habitat. Jamur ini dapat berkembang biak dengan cepat pada daerah perakaran. *T.reesei* tumbuh pada kisaran suhu optimal 25-32 °C dengan pH 4-5,5. *T.reesei* merupakan kelompok jamur tanah sebagai penghasil selulase yang paling efisien[5]. Selulase adalah nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik β -1,4 di dalam selulosa, sedodeksrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya

Enzim selulase sangat berperan penting dalam industri seperti industri tekstil, industri deterjen, industri makanan dan minuman. Kendala yang terjadi adalah harga enzim selulase di pasaran mahal sehingga tidak efektif jika digunakan untuk skala besar. Selain itu, enzim selulase yang dijual dipasaran memiliki karakteristik yang tidak seragam, yaitu hanya dapat memutus di salah satu bagian rantai saja pada selulosa, sehingga kerja enzim tidak optimal. Untuk mendapatkan enzim selulase yang dapat meghidrolisis selulosa secara optimal, maka dilakukan produksi enzim selulase yang dimodifikasi[6].

Produksi enzim selulase dipengaruhi oleh beberapa factor diantaranya kandungan karbohidrat bahan baku, waktu, pH, suhu, katalisator, dan konsentrasi substrat. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kontak enzim-substrat yaitu enzim substrat mempunyai spesifitas yang tinggi. Apabila substrat cocok dengan enzim, maka kinerja enzim juga akan optimal. Pada konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya akan menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang akan bergabung dengan enzim pada sisi aktif tersebut. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim yaitu pada suhu rendah aktivitas enzim kecil karena tumbukan antar partikel rendah kenaikan suhu dapat meningkatkan aktivitas enzim. Namun, jika suhu melebihi batas optimum enzim dapat mengalami denaturasi atau kerusakan[7]. Suhu optimum untuk menghasilkan enzim selulase dari *Trichoderma sp.* adalah berkisar dari 40- 50 °C namun tidak menutup kemungkinan tetap memiliki aktivitas pada suhu 20-50 °C, karena enzim selulolitik yang dihasilkan *Trichoderma sp.* tergolong dalam golongan mesozim pembentukan glukosa semakin berkurang pula [8].

Penelitian sebelumnya belum melakukan penelitian Pengaruh Konsentrasi Substrat dan suhu terhadap produksi enzim selulase Oleh karena itu, akan dilakukan suatu kajian untuk mengetahui Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Suhu Terhadap Pembentukan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* pada media jerami padi.

METODE

Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat Penelitian

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, blender, toples kaca, tabung reaksi, gelas kimia, kertas saring whatman, *magnetic stirrer*, bunsen, kawat ose, spektrofotometer UV-Vis, lemari pendingin, inkubator, sentrifuge, *laminar air flow*, neraca

analitik, *autoclave*, *hot plate*, oven, pipet tetes, botol kimia 100 mL dan peralatan gelas (gelas kimia dan erlenmeyer).

b. Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jerami padi, aquadest, *Trichoderma reesei*, yeast extract, H₂SO₄, KH₂PO₄, NaOH, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, PDA, larutan CMC (*carboxy methyl cellulose*) 1 %, reagen DNS (*dinitro salisilic acid*), Na-K tartrat, Na-metabisulfit, buffer sitrat, *bacteriological peptone*, glukosa p.a dan fenol.

Desain Penelitian

Dalam penelitian ini desain penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu suhu dengan variasi (27; 30; 35; dan 40°C) dengan variasi konsentrasi substrat yakni (5; 10; 15; 20; 25; dan 30 % b/v).

Prosedur Penelitian

Persiapan dan *pre-treatment* Bahan Baku

a. Persiapan Sampel

Jerami padi dicuci sampai bersih, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari setelah itu dihancurkan menggunakan alat pencacah.

b. Perlakuan Kimia (Basa)

Potongan jerami padi diblender untuk memperkecil ukurandiyak untuk memperoleh ukuran yang sama yaitu 100 mesh. Direndam dengan NaOH 6 % perbandingan 1 :10 selama 12 jam disaring dan dicuci berulang kali hingga pH netral setelah itu dikeringkan.

Persiapan Jamur *Trichoderma Reesei*

a. Peremajaan Jamur *Trichoderma Reesei*

Jamur diambil dengan menggunakan kawat ose yang telah dipijarkan dengan api dengan cara dikerik. Lalu jamur yang telah diambil dengan ose tersebut ditanam dengan cara menggores secara zig-zag pada permukaan media PDA. Jamur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari. Selama pengerjaan dilakukan di *Laminar Air Flow* dalam kondisi aseptis.

b. Penyiapan Larutan Nutrisi

Larutan nutrisi dibuat dengan mencampurkan 1 L larutan buffer sitrat pH 3,5 dengan 1,0 g ekstrak ragi (*yeast extract*), 1,5 g *bacteriological pepton*; 1,4 g (NH₄)₂SO₄; 2,0 g KH₂PO₄; 0,005 g FeSO₄.7H₂O dan 5 mL. Larutan kemudian diaduk hingga homogen. Dimasukan kedalam autoclave untuk disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Produksi Enzim Selulase

a. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dimulai dengan dicampurkan variasi substrat 10, 15, 20, 25, dan 30 gr bubuk jerami dengan 130 mL larutan nutrisi ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi aluminium foil, kertas, dan diikat dengan benang. Campuran substrat dan media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Media kemudian didinginkan hingga suhu ruang sebelum proses inokulasi mikroba secara aseptik dilakukan. Spora yang tumbuh di dalam satu tabung reaksi disuspensikan kedalam 1mL larutan 0,1 % tween 80 kemudian diinokulasikan secara aseptik ke dalam media. Hasil dari proses tersebut kemudian diinkubasi selama 8 hari pada dengan variasi suhu 27; 30; 35; dan 40 °C serta pH 6 pada media cair.

b. Pemanenan Enzim

Enzim dipanen dengan cara disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 4500 rpm pada suhu 4 °C kemudian disaring dengan menggunkan kertas saring agar terpisah dengan residu padatan [9].

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan metode DNS. Sebanyak 1 mL CMC 1 % yang dicampur dengan 0,8 mL buffer natrium sitrat (50mM; pH 5), ditambahkan dengan 0,2 mL ekstrak kasar enzim selulase kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi. Sampel diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan reagen 3,5- *dinitrosalicilic acid* (DNS) ke dalam tabung reaksi. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis[10].

Nilai aktivasi selulase ditentukan berdasarkan perhitungan berikut [11].

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \quad (\text{Pers 1})$$

Dimana :

AE	=Aktivitas enzim (Unit/mL)
C	=Konsentrasi glukosa (ppm)
BM	=Berat Molekul glukosa (180 gram/mol)
t	=Waktu inkubasi (menit)
H	=Volume total substrat (mL)
E	=Volume enzim (mL)

HASIL

Persiapan Substrat

Biomassa berupa limbah jerami padi diperoleh dari salah satu tempat persawahan yang terletak di Desa Nualise, Kecamatan Wolowaru Kabupaten Ende. Sampel berupa jerami padi yang diperoleh sebanyak 5 kg dicuci sampai bersih untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada sampel tersebut. Selanjutnya sampel dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Pengeringan ini dilakukan untuk menghilangkan kandungan air didalam limbah jerami padi tersebut. Selain itu pengeringan juga akan membuat sampel lebih tahan lama dan tidak cepat rusak. Setelah sampel dilakukan pencucian dan pengeringan berat sampel yang semula adalah 5 kg menurun menjadi 4 kg. Menurunnya berat sampel diduga disebabkan karena pengotor dan kandungan air didalam sampel sudah berkurang. Sampel selanjutnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau. Hal ini dilakukan untuk mempermudah proses penghancuran.

Perlakuan Awal

Jerami padi termasuk bahan baku lignoselulosa yang mengandung komponen lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Lignin berfungsi sebagai pengikat selulosa dan hemiselulosa pada tanaman lignoselulosa. Komponen lignin dapat menghalangi proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Oleh sebab itu, perlakuan awal penghilangan lignin merupakan tahapan penting untuk mempengaruhi perolehan gula monomer. Kandungan lignin dihilangkan dengan melakukan 2 perlakuan yaitu perlakuan milling dan perlakuan kimia basa.

Perlakuan milling pada jerami padi diawali dengan menghancurkan potongan jerami padi dengan cara diblender untuk memperkecil ukuran. Tujuan mengecilkan ukuran partikel adalah meningkatkan luas permukaan dan mengurangi kristalinitas selulosa yang mengakibatkan terputusnya rantai polimer yang panjang menjadi rantai-rantai polimer yang pendek sehingga reaksi hidrolisis dapat berlangsung lebih efektif dan lebih cepat dalam menghasilkan gula. Jerami padi yang telah diblender kemudian diayak untuk memperoleh ukuran yang sama yaitu 100 mesh. Tujuan dilakukan pengayakan untuk memperoleh ukuran maksimal sampel yang sama. Hasil pengayakan yang diperoleh yaitu berkurangnya berat sampel dan terjadinya perubahan fisik pada jerami padi yakni menjadi serbuk atau tepung. Hal ini disebabkan karena terputusnya kandungan lignin yang melindungi selulosa dan hemiselulosa. Perlakuan milling menyebabkan penurunan kristalinitas selulosa. Meningkatkan luas permukaan substrat, mempengaruhi porositas partikel yang akan mempengaruhi efektivitas hidrolisis jerami padi, serta meningkatkan aksesibilitas enzim ke permukaan biomassa. Reaksi hidrolisis berlangsung lebih cepat dan menghasilkan gula lebih banyak pada ukuran partikel kecil dibandingkan partikel yang lebih besar.

Perlakuan secara basa dapat dilakukan dengan cara serbuk jerami padi direndam dengan pelarut NaOH 6 % dengan perbandingan 1:10 (1 gram 10 mL) selama 12 jam. Perendaman dengan pelarut NaOH bertujuan untuk merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf sehingga penggunaan NaOH dapat menghilangkan struktur lignin sekaligus mengekstraksi hemiselulosa [12]. Perendaman menggunakan NaOH 6 % selama 12 jam adalah waktu yang optimum yang dapat merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf sehingga mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selain itu hemiselulosa akan ikut terurai menjadi senyawa gula sederhana, seperti glukosa, galaktosa, manosa heksosa, pentosa, xilosa, dan arabinosa.

Serbuk jerami padi yang telah direndam kemudian disaring menggunakan kain flanel untuk memisahkan sampel dengan pelarut. Sampel setelah disaring memiliki pH 11,3. Sampel selanjutnya dicuci berulang kali hingga pH sampel menjadi netral yaitu pH 7,0. Selanjutnya sampel dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 6 jam. Hasil yang diperoleh yaitu berkurangnya berat sampel dan terjadi perubahan fisik serta berubahnya warna serbuk jerami

padi dari warna putih menjadi coklat tua. Perubahan warna pada sampel menunjukkan terjadinya reaksi pada saat perendaman dengan pelarut NaOH. Ion OH⁻ dari NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion Na⁺ akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Garam fenolat ini bersifat mudah larut. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam (*black liquer*). Warna hitam pada larutan menandakan bahwa kandungan lignin yang terdapat pada jerami padi telah hilang dan lepas sehingga didapatkan sampel selulosa yang akan digunakan untuk proses hidrolisis menjadi glukosa [13].

Peremajaan Jamur *Trichoderma Reesei*

Pada proses peremajaan, isolat *T. reesei* diambil dengan menggunakan kawat ose yang dipijarkan, lalu ditanam pada media PDA dengan cara zig zag dalam kondisi aseptis. Isolat jamur kemudian diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Selama pengerjaan dilakukan di *laminar air flow* dalam kondisi aseptis. Media yang digunakan untuk peremajaan jamur adalah media PDA (*Potato dextrose agar*), mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh jamur yaitu *potato* (kentang), *dextrose* dan *agar*. Berdasarkan komposisinya, PDA termasuk dalam media semi sintetik karena tersusun atas bahan alami (kentang) dan bahan sintetik (*dextrose* dan *agar*). Kentang merupakan sumber karbon (karbohidrat), vitamin dan energi, *dextrose* sebagai sumber gula dan energi, dan komponen agar berguna untuk memadatkan medium PDA. Ketiga komponen tersebut sangat dibutuhkan bagi pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme terutama jamur [14]. Media PDA juga mengandung antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga diharapkan tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri dan hanya jamur saja yang dapat tumbuh didalamnya. Berdasarkan pengamatan setelah peremajaan selama 7 hari terdapat biakan jamur berwarna putih agak kehijauan yang berbentuk zig zag. Biakan jamur yang tumbuh pada media PDA merupakan biakan jamur *T. reesei* yang sudah tumbuh dengan baik. Secara makroskopis, morfologi jamur *T. reesei* mengalami perkembangan warna koloni dari hari pertama sampai hari ketujuh. Perkembangan warna koloni diawali dengan warna putih, putih agak kehijauan, hijau muda, hijau dan hijau tua [15].

Pembuatan Larutan Nutrisi

Larutan nutrisi dibuat dengan mencampurkan 1 L larutan buffer sitrat dengan 1,0 gram ekstrak ragi (*yeast extract*); 1,5 gram *bacteriological peptone*; 1,4 gram (NH₄)₂SO₄; 2,0 g KH₂PO₄; 0,005 gram FeSO₄.7H₂O; 5 mL larutan CMC (Carboxy Methyl Cellulose) 1 %. Larutan kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya larutan nutrisi disetrilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit untuk membunuh mikroorganisme yang tak diinginkan. Pembuatan larutan nutrisi ini bertujuan untuk memenuhi kebutuhan dari jamur dimana jamur memerlukan nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan sebagai bahan pembangun sel dan pembentukan spora. Jamur *T. reesei* memerlukan suplai nutrisi untuk pertumbuhan selnya, ketiadaan atau kekurangan sumber-sumber nutrisi dapat mempengaruhi pertumbuhan dari jamur hingga pada akhirnya dapat menyebabkan kematian. Peran utama nutrisi adalah sebagai sumber energi, bahan pembangun sel dan sebagai asektor elektron dalam reaksi bioenergetik [16].

Pembiakan jamur *T. reesei* ini dilakukan didalam erlenmeyer 250 mL yang telah berisi larutan nutrisi. Isolat *T. reesei* diambil pada media agar miring dengan cara menggoreskan dengan menggunakan jarum ose yang telah dipanaskan dengan api bunsen pada permukaan media agar miring. Proses pemanasan ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi, kemudian jarum ose yang berisi isolate *T. reesei* dipindahkan ke erlenmeyer yang berisi larutan nutrisi. Selanjutnya erlenmeyer ditutup rapat menggunakan kapas dan disimpan selama 5 hari pada *laminar air flow* agar tetap steril dan terhindar dari kontaminasi. Berdasarkan pengamatan selama 5 hari, terjadi pertumbuhan spora *T. reesei* pada media cair ditandai dengan adanya warna putih dari miselium yang lama kelamaan akan berubah menjadi hijau dan membentuk lingkaran menyebar seperti permadani. Setelah spora pada larutan nutrisi tumbuh kemudian melakukan uji molish bertujuan untuk menunjukkan adanya karbohidrat yaitu dengan cara memasukan 2 mL larutan nutrisi dan 2 mL CMC 1 % kedalam tabung reaksi kemudian tetes dengan 2 tetes reagen molish (alfa-naftol dan etanol 96 %), miringkan tabung reaksi dan tuang 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung setelah diamati terdapat cincin berwarna ungu. Mekanisme terbentuknya cincin ungu adalah pertama-tama karbohidrat terhidrolisis oleh H₂SO₄ terkondensasi membentuk furfural yang kemudian bereaksi dengan alfa-naftol sehingga membentuk senyawa kompleks ungu (cincin ungu) sehingga larutan akan terlihat menjadi 3 bagian yaitu bagian paling bawah berwarna bening dimana larutan

tersebut adalah asam bagian tengah berwarna ungu yang disebut sebagai cincin ungu dan paling atas adalah sampel yang mengandung karbohidrat.

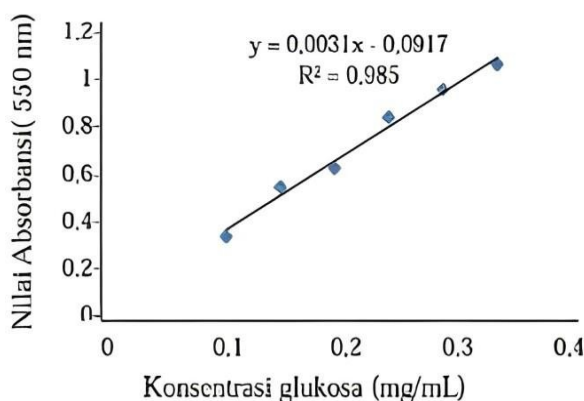
Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dimulai dengan mencampurkan substrat yang konsentrasinya bervariasi yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25 gr bubuk jerami dengan 130 mL larutan nutrisi ke dalam botol kaca 150 mL kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi aluminium foil bertujuan untuk menghindari kontaminasi yaitu masuknya mikroorganisme yang tak diinginkan. Campuran substrat dan media kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada temperatur 121 °C selama 15 menit untuk membunuh mikroorganisme yang tidak dibutuhkan. Media kemudian didinginkan hingga suhu ruang sebelum proses inokulasi mikroba secara aseptik dilakukan. Spora yang tumbuh dalam satu tabung reaksi disuspensikan kedalam 1 mL larutan 0,1 % tween 80 kemudian diinokulasikan secara aseptik ke dalam media. Hasil dari proses tersebut kemudian diinkubasi selama 8 hari pada dengan variasi suhu 27; 30; 35; dan 40°C serta pH 6 pada media cair.

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Kurva Standar Glukosa

Sebelum mengukur kadar gula reduksi sampel, terlebih dahulu dilakukan pengukuran larutan standar glukosa untuk dibuat kurva standar sehingga diperoleh persamaan regresi. Kadar gula pada sampel jerami padi ditentukan melalui kurva kalibrasi. Tujuan dibuat kurva standar adalah untuk mengetahui persamaan regresi dimana dapat dilihat hubungan linearitas antara konsentrasi larutan standar dengan kadar gula. Larutan glukosa dipilih sebagai larutan untuk pembuatan kurva standar karena glukosa termasuk gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat oleh enzim selulase. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan dalam kurva. Hasilnya digunakan untuk membuat kurva standar dan persamaan regresi. Kurva standar yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva standar plot konsentrasi terhadap absorbansi pada 550 nm Pengukuran

kadar gula reduksi dilakukan terhadap hasil hidrolisis menggunakan spektrofotometri UV-VIS. Sebanyak 1 mL larutan CMC 1 % yang dicampur dengan 0,8 mL buffer natrium sitrat (50 mM ; pH 5), ditambahkan dengan 0,2 mL ekstrak kasar enzim selulase kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel diinkubasi pada suhu 50 °C selama 10 menit. Ditambahkan dengan 2 mL pereaksi DNS, kemudian Sampel dipanaskan pada penangas air mendidih selama 10 menit (suhu 100°C). Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna orange kemerahan [17]. Larutan kemudian didinginkan dan dipindahkan ke dalam kuvet yang telah dicuci dengan aquades dan dikeringkan, absorbansi diukur pada panjang gelombang 550 nm. Penambahan DNS berfungsi sebagai senyawa bersifat oksidator yang dapat mengoksidasi gula pereduksi sekaligus sebagai senyawa kompleks berwarna kuning yang akan memberikan warna pada larutan sehingga dapat diukur oleh spektrofotometer uv-vis. Perlakuan pemanasan setelah penambahan DNS bertujuan untuk terjadinya reaksi oksidasi gugus aldehida yang dimiliki oleh glukosa akan mereduksi asam 3,5 dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Hal ini ditandai dengan perubahan warna larutan glukosa yang telah dipanaskan menjadi orange kemerahan. Banyaknya DNS yang tereduksi sebanding dengan

absorbansi. Adapun kadar gula reduksi yang diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan Uv-vis dengan panjang gelombang 550 nm dapat dilihat pada tabel 1. berikut.

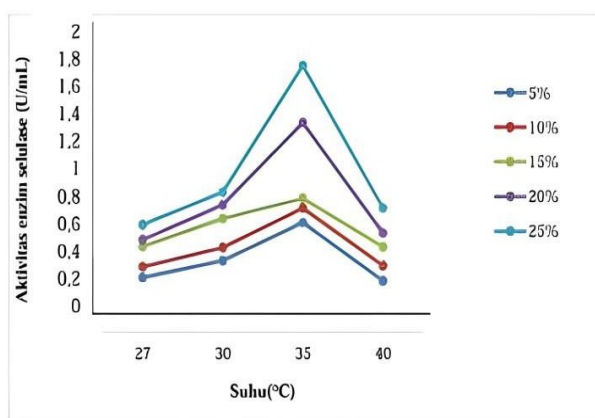
Tabel 1. Hasil analisis aktivitas enzim selulase pada media jerami padi

Suhu (°C)	Konsentrasi Substrat (% bv)				
	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
27	0,378	0,452	0,593	0,639	0,745
30	0,495	0,587	0,787	0,882	0,970
35	0,760	0,859	0,926	1,452	1,850
40	0,356	0,460	0,590	0,687	0,860

Dari data diatas terlihat bahwa nilai aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 1,850 U/mL. Nilai aktivitas tersebut terdapat pada sampel dengan konsentrasi substrat 25 % dan pada suhu 35°C. Nilai aktivitas meningkat dari suhu 27°C sampai suhu 35°C namun mengalami penurunan pada suhu 40°C. Pada suhu 27°C aktivitas pada masing-masing konsentrasi substrat lebih rendah hal ini disebabkan karena pada suhu 27 °C interaksi antara substrat dengan enzim sangat kecil. Pada suhu 35°C aktivitas enzim selulase yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi substrat lebih tinggi karena suhu 35°C adalah suhu optimum.

Pengaruh Suhu dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Selulase yang Dihasilkan Oleh *T.Reesei* pada Media Jerami Padi.

Berdasarkan analisis data statistik menggunakan uji ANOVA dua arah pada penelitian ini dapat diketahui bahwa konsentrasi substrat dan suhu berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *T. reesei* pada media jerami padi. Hubungan antara konsentrasi substrat dan suhu terhadap aktivitas enzim selulase dapat diperhatikan pada gambar berikut



Gambar 2. Hubungan antara konsentrasi substrat dan suhu terhadap aktivitas enzim selulase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa pengaruh suhu dan konsentrasi substrat terhadap konsentrasi enzim yaitu semakin besar suhu dan konsentrasi substrat maka aktivitasnya semakin besar. Suhu yang paling optimal untuk dapat menghasilkan enzim selulase dari *T.reesei* pada media jerami padi adalah pada suhu 35 °C nilai aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 1,850 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Muliarta, I. N. "Pengetahuan dan persepsi petani terhadap pengomposan limbahjeramipadi" *Jurnal Agrisep*, vol. 20 no 1, pp 81–94, 2021.
- [2] Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., dan Zhou, Q. "Evaluation of Pretreatment Methods on Mixed Inoculum for Both Batch and Continuous Thermophilic Biohydrogen Production from Cassava Stillage". *Bioresource Technology*, vol. 101 no. 3, pp 959–964, 2019.
- [3] Sjostrom, S." Interactions and Constitutive Models for Calculating Quench Stresses calculating quench stresses in steel". *Materials Science and Technology*, vol. 1 no 1, pp 823–829, 1985.
- [4] Anindyawati, T. "Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian untuk Pupuk Organik". *Jurnal Selulosa*, vol. 45, no.2, pp70–77,2010.
- [5] Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, willem H. Van, dan Pretorius, I. S. "Microbial Cellulose Utilization Fundamentals and Biotechnology". *Microbiology and Molecular BiologyReviews*, vol. 66, no. 3, pp 506–577, 2002.
- [6] Lini, F. Z. "Studi Teknik Produksi Etanol Dari Limbah Kulit Buah Kopi (Parchmenthull/Endocarp)"vol. 23, no 2, pp 23-25, 2015
- [7] Melati, I., Mulyasari, M., Sunarno, M. T. D., Bintang, M., dan Kurniasih, T. "Produksi Enzim Selulase Dari Bakteri Ts2b yang Diisolasi dari Rumput Laut dan Pemanfaatannya dalam Menghidrolisis Kulit Ubi Kayu dan Daun Ubi Kayu sebagai Bahan Baku Pakan Ikan". *Jurnal Riset Akuakultur*, vol. 9, no. 2, pp 263-265 2014
- [8] Seiboth, B., Ivanova, C. dan Seidl-Seiboth, V. 2011. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. *Biofuel ProductionRecent Developments and Prospects*
- [9] Wahyuningtyas, P., Argo, B. D., dan Nugroho, W. A." Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatik Pada Produksi Bioetanol." *Jurnal BioprosesKomoditasTropis*, vol. 1, no.1, pp. 21–25, 2013.
- [10] Kumar, S., dan Pandey, A. K. "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview". *The Scientific World Journal*, vol. 2, no. 1 pp 11-12, 2013
- [11] Poedjiadi, A. 1994. *Dasar - Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press
- [12] Soebijanto, T. Sonia, Nenu, M. O., dan Jony, K. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim 60 Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, vol. 3 ,no. 4 pp 11–19 2015.
- [13] Susilowati. 2011. *Pemanfaatan Tongkol Jagung Sebagai Bahan Baku Bioetanol Dengan Proses H₂SO₄ Dan Fermentasi Saccharomyces Cereviceae*. Universitas Diponegoro.
- [14] Howard, R. L., Abotsi, E., Van Rensburg, E. L. J., dan Howard, S. "Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production." *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 12, pp 702–733, 2013.
- [15] Azis, P. 2012. *Enzim dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim*. Addition materials for FIK Biochemical Experiment Class.
- [16] Grethlein, H. E. "Pretreatment for Enhanced Hydrolysis of Cellulosic Biomass. *Biotechnology Advances*," vol. 2 no. 4, pp 43–62, 1984.
- [17] Putri, S." Karakterisasi Enzim Selulase Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus Plantarum* Pada Variasi Suhu, pH, dan Konsentrasi Substrat. Skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.