

Optimasi Produksi Selulase dari Kapang Selulolitik yang Diisolasi dari Serasah Daun

Optimization of Cellulase Production of Cellulolytic Carnage Isolated from Leaf Litter

Nahdiyah Vernanda Saputri

Universitas Jember

*vernans18@gmail.com

diterima : 2 Februari 2024; dipublikasi : 31 Maret 2024

DOI: 10.32528/bioma.v9i1.1369

ABSTRAK

Kapang pada serasah sangat berperan dalam menguraikan serasah daun dalam kurun waktu yang singkat, umumnya carnth mempunyai aktivitas selulolitik. Produksi selulase penting dilakukan untuk mencapai hasil yang maksimal. Jenis daun serasah diinokulasi dengan cara disebar pada CMC 0,5% + mineral M9 + streptomisin 1%, diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-7 hari. Skrining isolat selulolitik dengan ditambahkan ±5 ml larutan iodium 0,33% dan diukur zona bening yang terbentuk untuk mengetahui indeks zona beningnya, dipilih 1 jenis isolat dengan indeks zona bening tertinggi. Optimasi kultur awal produksi enzim cetakan selulolitik 1 isolat ose diinokulasi pada media PDA dan dilakukan perhitungan spora dengan haemacytometer. Uji aktivitas selulase dihasilkan dari produksi ikan mas selulolitik dengan pereaksi Somogyi sebanyak 500 µl. Isolat ISD 2 adalah yang terpilih untuk produksi selulolitik mempunyai koloni berwarna hijau kehitaman, zona bening aktivitas enzim dari ISD 2 sebesar 4,868 yang diperoleh selama inkubasi 144 jam.

Kata kunci: Produksi, Selulase, Kapang, Serasah.

ABSTRACT

Carnage in litter play a role in decomposing leaf litter in a short period of time, generally carnth has cellulolytic activity. Cellulase production is important to achieve maximum results. Litter leaf types are inoculated by spreading on CMC 0.5% + mineral M9 + streptomycin 1%, incubated at 30°C for 3-7 days. Cellulolytic isolate screening with ±5 ml of 0.33% iodine solution added and measured the clear zone formed to determine the clear zone index, selected 1 type of isolate with the highest clear zone index. Optimization of initial culture production of cellulolytic mold enzyme 1 ose isolate inoculated on PDA media and spore calculation with haemacytometer. The cellulase activity test was produced from the production of cellulolytic carp with Somogyi reagent as much as 500 µl. ISD 2 isolates selected for cellulolytic production have blackish-green colonies, clear zones of enzyme activity of ISD 2 of 4,868 obtained during 144-hour incubation.

Keywords: Production, Cellulase, Carnage, Litter

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan komponen utama dinding sel tumbuhan, mulai dari pohon hingga organisme primitif seperti alga, flagellata, dan bakteri. Selulosa tersusun dari komponen karbohidrat linier yang mengandung glukosa sebagai komponen monomer, dan monomer tersebut terikat satu sama lain melalui ikatan hydrogen (Fatriasari *et al.*, 2019). Selulase adalah enzim berbentuk protein yang terdapat dalam sel hidup yang bertindak sebagai katalisator reaksi biokimia. Enzim ini mempunyai sifat unik dalam menghidrolisis ikatan $\beta(1-4)$ -glukosidik selulosa untuk menghasilkan selobiosa, yang diubah menjadi monomer glukosa. (Setyoko *et al.*, 2016).

Kapang merupakan salah satu jenis kapang multiseluler yang memiliki struktur berserabut atau miselium. Kapang dapat hidup pada lingkungan yang pertumbuhannya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jumlah unsur hara, kelembapan dibawah 90%, suhu 20-30°C, dan pH 2,0-8,5. Bahan organik yang dapat digunakan sebagai substrat hidup kapang adalah serasah. Kapang yang terdapat pada serasah umumnya memiliki aktivitas selulolitik sehingga berperan sangat penting dalam dekomposisi serasah daun dalam jangka pendek. (Miranti *et al.*, 2015).

Degradasi selulosa atau selulolitik adalah proses penguraian selulosa menjadi senyawa atau unit glukosa yang lebih kecil (Murtianingsih *et al.*, 2017). Beberapa genera kapang yang dapat menghasilkan selulase antara lain *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mucor*, dan *Penicillium*. Kapang selulolitik menghasilkan selulase, yang dapat digunakan untuk menghidrolisis bahan berserat selulosa menjadi glukosa. (Talantan *et al.*, 2018).

Rohma *et al.* (2019), berhasil mengisolasi kapang selulolitik dari serasah daun salak. Produksi enzim selulase oleh *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 diketahui dari aktivitas enzimatik yang dihasilkan. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh sebesar 0,8250 U/mL. Optimalisasi produksi selulase penting dilakukan untuk mencapai hasil yang maksimal. Berdasarkan pemaparan diatas tujuan praktikum ini adalah untuk mengetahui optimasi produksi selulase dari isolat kapang selulolitik serasah daun.

METODE

Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Jember.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan yaitu perangkat kerja mikrobiologi standar, erlenmayer 250 ml, tabung reaksi 15 cm, micropipet dan microtip, vortex, aluminium foil, timbangan digital. Laminar air flow, haemocytometer, hand counter. Pipet volume 10 ml steril 8 buah, kain kasa sintetik, alat penyaring, tube centrifuge 15 ml dan 1,5 ml, waterbath, penutup tabung reaksi, pemanas air. Bahan yang digunakan dalam percobaan yaitu sampel serasah daun yang telah terdekomposisi, medium 0,5% CMC + mineral M9 + streptomycin, Larutan NaCl 0,85%, Mineral M9 terdiri atas (6 gr/L Na₂HPO₄, 3 gr/L KH₂PO₄, 0.5 gr/L NaCl, 1 gr/L NH₄Cl, 0.25 gr/L MgSO₄. Akuades, Isolat kapang selulolitik pada medium PDA terpilih dengan inkubasi 3x24 jam, medium PDA miring sebanyak 16 buah per isolate kapang, larutan 5 ml 0,05% tween 80 sebanyak 14 buah. Inokulum kapang selulolitik terpilih dengan kepadatan spora optimum pada media PDA miring, 10 gram media serbuk gergaji + 23 ml H₂O sebanyak 8 buah x 2 ulangan (16 buah) pada erlenmeyer 250 ml 200 ml H₂O Nahdiyah Vernanda Saputri, Optimasi Produksi...

steril yang mengandung 0,01% Na Azide + 0,1% NaCl, 10 ml H₂O steril, media CMC 0,5% dalam 20 Mm buffer asetat pH 5, crude selulase dari kapang yang terpilih, reagen Nelson-Somogyi.

Isolasi Kapang Selulolitik

Sampel serasah daun ditimbang sebanyak 2,5 gram dan dimasukkan kedalam 25 ml larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) secara aseptis, kemudian divortex selama 5 menit. 1ml sampel diambil dan dimasukkan kedalam 9 ml larutan NaCl 0,85% sehingga terbentuk pengenceran 10⁵ kali, masing-masing seri pengenceran diambil 100 µl kemudian diinokulasikan dengan metode taburan (spread method) pada 0,5% CMC + mineral M9 + 1% streptomycin, dilakukan sebanyak 2 kali ulangan, diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-7 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai batas akhir inkubasi. Pemurnian Isolat dengan diinokulasikan isolat kapang pada medium PDA + 1% streptomycin dengan metode titik (*dot method*) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3x24 jam. Skrining isolat selulolitik dilakukan dengan menumbuhkan pada medium cawan 0,5% CMC + mineral M9, diinkubasi 3x24 jam pada suhu 30°C untuk kapang, ditambahkan ±5 ml larutan iodine 0,33% dan diukur zona bening yang terbentuk untuk menentukan indeks zona beningnya, dipilih 1 isolat kapang dengan indeks zona bening tertinggi untuk digunakan dalam produksi selulase.

Optimasi Kultur Awal Produksi Selulase

Isolat kapang selulolitik diinokulasikan pada medium PDA miring 16 buah, diinkubasi 0-7 hari pada suhu 30°C. Perhitungan spora dilakukan secara langsung setiap hari menggunakan haemocytometer dengan ditambahkan 5 ml larutan 0,05% tween 80 kedalam media miring yang mengandung kapang, kemudian dikerik untuk mendapatkan sporanya. Sebanyak 20 µl dituang ke dalam haemocytometer untuk dilakukan perhitungan sporanya. Hasil perhitungan sel pada ruang hitung haemocytometer dikonversi ke dalam jumlah spora/ml, dengan menggunakan rumus:

$$S (\text{Spora/ml}) = \frac{n}{L \times h \times d}$$

Keterangan :

S = Jumlah spora/ml

n = Rerata jumlah spora pada bidang hitung (kotak sedang)

L = Luas bidang hitung

h = Kedalaman bidang hitung

d = Faktor pengenceran

Produksi Selulase Dari Kapang Selulolitik

5 ml H₂O steril dimasukkan ke dalam isolat kapang selulolitik pada media miring, dikerik untuk mendapatkan sporanya, diinokulasikan 1 ml H₂O steril yang mengandung spora isolat terpilih ke dalam 10 gram media fermentasi padat, diinkubasi 0-8 hari pada suhu 30°C, dan dilakukan pemanenan crude selulase setiap hari dengan ditambahkan 20 ml H₂O steril yang mengandung 0,01% Na Azide + 0,1% NaCl ke dalam sistem fermentasi padat, diinkubasi selama 24 jam pada mesin shaker dengan kecepatan 150 rpm. Penyaringan dengan kain kasa sintetis dan alat penyaring untuk memisahkan komponen cair dan sebagian besar padatan, disentrifugasi pada komponen

Nahdiyah Vernanda Saputri, Optimasi Produksi...

cair dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Supernatan yang berisi crude selulase disimpan pada suhu 5°C untuk uji aktivitas enzim.

Uji Aktivitas Selulase Hasil Produksi Kapang Selulolitik

Sebanyak 500 µl substrat CMC 0,5% dalam 20 mM buffer asetat pH 5 diinkubasi 37°C selama 20 menit pada waterbath, ditambahkan 100 µl crude selulase kapang pada substrat tersebut dan diinkubasi selama 2 jam (perlakuan uji). Untuk perlakuan kontrol, tanpa penambahan crude selulase. 500 µl reagen Somogyi ditambahkan pada perlakuan uji dan kontrol. 100 µl crude selulase ditambahkan pada kontrol untuk kemudian dididihkan selama 15 menit. Setelah dingin, sampel kemudian ditambahkan 500 µl reagen Nelson, divortex selama 1 menit. 2,5 ml akuades ditambahkan pada sampel dan divortex kembali selama 2 menit. Sebanyak 1,3 ml sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tube centrifuge 1,5 ml disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Nilai absorbansi kemudian dikonversi ke dalam konsentrasi gula reduksi dan unit aktivitas enzim dengan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Selulase (U/mL)} = \left\{ \text{Konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{v \times t \times BM} \right\}$$

Ket :

V = volume enzim

t = waktu inkubasi

BM : Berat molekul glukosa (180 g/mol)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi kapang serasah daun (Tabel 1) mendapatkan 10 kapang yaitu ISD 1 merupakan kapang *Cladosporium*, ISD 2, ISD 3, ISD 4, ISD 6, ISD 7, ISD 8, ISD 9 merupakan kapang dari genus *Aspergillus*. ISD 5 merupakan kapang *Pencillium*, ISD 10 merupakan kapang *Trichoderma*. Genus *Cladosporium* secara ekologis terdistribusi luas di alam pada materi organik salah satunya pada serasah daun (Umniyatie *et al.*, 2014). Genus *Aspergillus*, *Pencillium*, *Trichoderma* merupakan kapang serasah daun yang dapat hidup di berbagai tipe habitat atau biasanya bersifat kosmopolit (Ilyas, 2010). Larutan iodin 0,33% ditetaskan ke isolat kapang yang sedang tumbuh untuk memperjelas pengamatan zona bening. Isolat kapang yang mampu menghasilkan selulase dikenali dari terbentuknya zona bening berwarna jingga pucat hingga kekuningan setelah dilakukan pewarnaan dengan larutan iodin. Prinsip kerja larutan iodin adalah bereaksi dengan selulosa yang tidak terhidrolisis. Zona transparan tidak memiliki warna. Hal ini disebabkan selulosa pada zona ini dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti monomer glukosa. Penggunaan larutan iodin akan meningkatkan kejernihan zona bening secara signifikan. Tujuannya agar proses penyaringan lebih mudah, efisien dan cepat dalam produksi mikroorganisme selulase. Penggunaan larutan iodin terletak pada kesederhanaannya, kecepatan pelaksanaannya dan efektivitasnya melawan sejumlah besar mikroorganisme. Selain itu, bahan kimia beracun dapat dihindari dengan menggunakan larutan iodin (Kurniawati *et al.*, 2019).

Hasil pemurnian isolat didapatkan karakter makroskopis kapang serasah daun *Cladosporium* (ISD 1) memiliki ciri warna koloni abu-abu, warna balik (reverse) hitam,

permukaan koloni menggunung dan bentuk koloni kompak. Ciri kapang ISD 1 tersebut sesuai dengan penelitian Islamiati *et al.* (2017) karakter makromorfologis anggota genus *Cladosporium* memiliki koloni berwarna abu-abu dengan warna dasarnya hitam, bentuk koloni bulat dan bertekstur halus seperti bubuk. Isolat ISD 2, ISD 3, ISD 4, ISD 8, dan ISD 9 memiliki ciri warna koloni mirip dengan kapang *Aspergillus* sp. ISD 2 memiliki koloni berwarna hijau kehitaman, *Aspergillus* sp. ISD 3 koloni berwarna putih, *Aspergillus* sp. ISD 4 dan ISD 9 memiliki koloni berwarna coklat keabuan, *Aspergillus* sp. ISD 8 koloni berwarna cream, dan *Aspergillus* sp. Menurut Talantan *et al.* (2018) bahwa makroskopis genus *Aspergillus* bertekstur kasar dan seperti tepung, warna atas permukaan (putih, hitam, hijau muda dan kecoklatan). Tahap awal pengamatan koloni muncul sebagai filament putih dan berubah warna tergantung spesiesnya. *Pencillium* sp. (ISD 5) memiliki ciri warna koloni putih, warna balik koloni (reverse) putih, permukaan koloni seperti kapas. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan pengamatan yang dilakukan Ristiari *et al.* (2018) bahwa koloni *Pencillium* sp. awalnya berwarna putih, dan terdapat struktur seperti serat kapas.

Aspergillus sp. (ISD 6) dan (ISD 7) memiliki ciri-ciri koloni putih dengan warna balik koloni (reverse) cream, permukaan koloni seperti tepung, bentuk koloni kompak, dan tepi koloni rata. Ciri-ciri *Aspergillus* tersebut sesuai dengan pernyataan Ristiari *et al.* (2018) bahwa anggota kapang *Aspergillus* koloninya tampak berwarna hijau kekuningan dengan dasar putih, dan terdapat juga yang tampak berwarna hitam dengan dasar berwarna cream, serta memiliki tekstur seperti tepung. *Trichoderma* sp. (ISD 10) memiliki ciri warna koloni hijau keabuan tepi putih, warna balik koloni (reverse) hitam tepi putih, serta memiliki garis radial/konsentris. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan pengamatan yang dilakukan Ristiari *et al.* (2018) bahwa koloni *Trichoderma* sp. terlihat memiliki struktur garis konsentris teratur dengan warna permukaan koloni didominasi warna hijau pada bagian tengahnya dan putih ditepinya. Isolasi kapang selulolitik indigenous menggudakan medium CMC berfungsi sebagai inducer untuk memproduksi enzim selulase dari kapang. CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) merupakan senyawa turunan dari selulosa (Purkan *et al.*, 2015). Streptomycin 1% dalam medium berfungsi sebagai antibiotik penghambat bakteri kontaminan (Arif *et al.*, 2019). Fungsi mineral M9 pada percobaan ini adalah sebagai nutrisi untuk pertumbuhan kapang dan untuk mengetahui faktor nutrisi apa saja dan berapa jumlahnya yang menentukan laju pertumbuhan mikroorganisme. M9 terdiri dari sejumlah mineral, glukosa sebagai sumber karbon dan asam amino (Safronova *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil skrining zona bening pada 10 isolat kapang (Tabel 2) dapat diketahui bahwa isolate ISD 8 memiliki aktivitas enzim tertinggi (5.095) dan ISD 2 (4.868), sedangkan isolate ISD 4 dan ISD 9 memiliki aktivitas terendah (1.000). Sedangkan 6 isolat lain memiliki aktivitas enzim yaitu 1.114 - 3.158. Besar kecilnya zona bening juga merupakan indikasi awal banyak sedikitnya selulase yang dihasilkan, semakin besar zona bening yang dihasilkan kemungkinan selulase yang dihasilkan semakin besar pula atau aktivitas enzimnya yang lebih tinggi. Hasil percobaan ini diperoleh 10 isolat kapang yang menghasilkan zona bening, maka isolate-isolat ini berpotensi sebagai kapang penghasil selulase. Isolat tersebut dipilih untuk dilakukan seleksi lebih lanjut untuk optimasi kultur awal produksi selulase (Talanatan *et al.*, 2018).

Tabel 1. Karakter Morfologi Makroskopis Kapang Selulolitik dari Serasah Daun

Kode isolat	Warna Koloni	Permukaan Koloni	Bentuk Koloni	Tepi Koloni	Warna balik koloni (<i>reverse</i>)	Garis radial / konsentris
ISD 1	Abu-abu	Seperti gunung	Kompak	Rata	Hitam	Tidak ada
ISD 2	Hijau hitam	Seperti tepung	Kompak	Rata	Hijau	Tidak ada
ISD 3	Putih	Seperti tepung	Kompak	Rata	Putih	Tidak
ISD 4	Coklat keabuan	Seperti tepung	Kompak	Rata	Cokelat	Tidak ada
ISD 5	Putih	Seperti kapas	Kompak	Rata	Putih	Tidak ada
ISD 6	Putih	Seperti tepung	Kompak	Rata	Cream	Radial
ISD 7	Putih	Seperti tepung	Kompak	Rata	Cream	Radial
ISD 8	Cream	Licin	Kompak	Rata	Cream	Tidak ada
ISD 9	Cokelat keabuan	Seperti tepung	Kompak	Rata	Cokelat hitam	Tidak ada
ISD 10	Hijau keabuan tepi putih	Seperti tepung	Kompak	Rata	Hitam tepi putih	konsentris

Tabel 2. Indeks Aktivitas Selolitik 10 Isolat Kapang Selulolitik pada Media CMC 0,5 % Selama 7 Hari Inkubasi

Kode Isolat	Diameter Koloni		Diameter total		Indeks Aktivitas Selulolitik		Rata-rata Indeks aktivitas
	I	II	I	II	I	II	
ISD 1	0.91	1.06	3.16	3.41	3.312	3.005	3.158
	1.095	1.09	3.48	3.05			
ISD 2	1.01	0.85	5.195	4.76	4.531	5.206	4.868
	1.195	0.995	4.795	4.845			
ISD 3	1.62	1.79	2.845	4.01	1.634	2.435	2.035
	1.785	1.35	2.72	3.635			
ISD 4	1.225	1.32	1.225	1.32	1.000	1.000	1.000
	0.83	1.075	0.83	1.075			
ISD 5	5.23	5.165	5.54	5.66	1.073	1.155	1.114
	5.115	4.61	5.56	5.63			
ISD 6	4.025	4.11	5.68	5.63	1.417	1.369	1.393
	3.945	4.05	5.61	5.54			

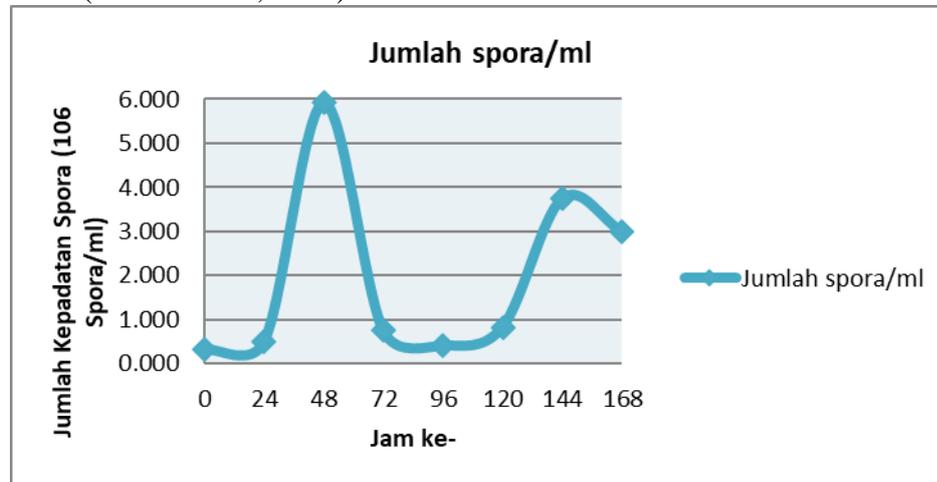
Kode Isolat	Diameter Koloni		Diameter total		Indeks Aktivitas Selulolitik		Rata-rata Indeks aktivitas
	I	II	I	II	I	II	
ISD 7	0.985	0.72	1.25	1.22	1.346	1.772	1.559
	0.895	0.725	1.28	1.34			
ISD 8	0.675	1.135	3.58	6.07	5.565	4.625	5.095
	0.68	1.395	3.96	5.63			
ISD 9	0.56	0.985	0.56	0.985	1.000	1.000	1.000
	0.59	0.45	0.59	0.45			
ISD 10	0.62	0.71	0.92	1.12	1.498	1.570	1.534
	0.515	0.71	0.78	1.11			

Fungsi optimasi kultur produksi selulase adalah untuk mencapai hasil yang maksimal. Waktu inkubasi, suhu dan pH memiliki pengaruh yang signifikan terhadap produksi selulase. Suhu mempengaruhi sekresi enzim ekstraseluler dengan mengubah bentuk fisik membrane sel. pH mempengaruhi pertumbuhan strain mikroba yang berdampak pada pembentukan produk metabolit. Dengan demikian optimasi kultur sangat berpengaruh produksi selulase dari kapang selulolitik untuk memperoleh hasil yang lebih maksimal (Rohmah *et al.*, 2019). Optimasi dilakukan untuk mendapatkan nilai pH awal, suhu inkubasi, dan waktu inkubasi media yang menghasilkan aktivitas spesifik enzim selulase kapang yang optimal. Kondisi optimal ini digunakan pada langkah produksi enzim berikutnya (Rosyida *et al.*, 2018).

Fungsi penambahan larutan tween 80TM sebanyak 5 ml dengan konsentrasi 0,05% adalah sebagai nutrisi untuk sel kapang, Salah satu nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme adalah asam lemak tak jenuh yang merupakan penyusun membran sel. Tween 80TM dapat dimanfaatkan sebagai sumber asam lemak tak jenuh yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Tween 80TM juga bertindak sebagai surfaktan, menurunkan tegangan permukaan cairan di sekitar sel cetakan, memastikan bahwa media fermentasi yang kaya tidak berdampak buruk pada sel. (Yang *et al.*, 2020). Kepadatan spora dapat dihitung menggunakan alat haemocytometer. Prinsip kerja alat ini yaitu dengan menghitung langsung jumlah spora di bawah perbesaran mikroskop. Pengamatan dan perhitungan dalam haemocytometer dengan mengambil 5 sampel kotak yaitu pada ujung kanan atas, ujung kiri atas, ujung kanan bawah, ujung kiri bawah dan di tengah. Spora yang terlihat dalam kotak tersebut dihitung dengan bantuan handcounter (Halwiyah *et al.*, 2019).

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat kapang (Gambar 1) dapat terlihat pergerakan fase-fase pertumbuhan yang terjadi. Fase lag terjadi pada jam ke-0 hingga 1 hari (24 jam). Fase lag (fase adaptasi) merupakan suatu fase dimana kapang menyesuaikan diri karena adanya perubahan media dan lingkungannya. Pertumbuhan kapang hari ke-1 sampai hari ke-2 berada pada fase eksponensial. Kepadatan spora meningkat dari hari ke-1 (24 jam) hingga hari ke-2 (48 jam). Tahap ini merupakan tahap kritis dalam umur kapang, karena merupakan tahap di mana spora sangat melimpah dan aktivitas seluler meningkat pesat. Fase selanjutnya adalah fase diam. Tahap ini merupakan tahap dimana terjadi keseimbangan antara jumlah spora yang tumbuh dan jumlah spora yang mati akibat berkurangnya unsur hara dalam medium. Kurva tahapan ini berupa garis lurus mendatar dilihat dari hari ke 3 (72 jam) hingga hari ke 5 (120 jam). Selain itu, kurva mengalami penurunan pada hari ke 6 (144 jam) dan menurun

pada hari ke 7 (168 jam). Penurunan ini membuktikan bahwa sel-sel sedang memasuki fase kematian (Purkan *et al.*, 2015).



Gambar 1. Jumlah Kepadatan Spora

Optimasi kultur kapang mencapai jumlah spora yang optimum yaitu pada jam ke-48 (hari ke 2) yaitu 6,000 spora/ml. Hasil tersebut tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Utami *et al.* (2019), bahwa pertumbuhan kapang tanah dan waktu inkubasi optimum bagi kapang tanah adalah selama 3 hari atau 72 jam. Spesies *Aspergillus niger* tumbuh optimal pada waktu fermentasi 120 jam (5 hari), yaitu fase eksponensial (perbanyak jumlah sel yang banyak). Menurut Ariyani *et al.* (2014), bahwa dalam menghasilkan enzim selulase dari mikroba, waktu inkubasi optimum adalah 3-5 hari. Menurut Bellaouchi *et al.* (2021), juga mengatakan bahwa produksi maksimal enzim oleh *Aspergillus niger* terjadi setelah 96 jam atau 4 hari. Menurut Astrat dan Abebe (2018), juga menunjukkan hasil yang sama pada optimasi produksi maksimal oleh *Aspergillus niger* didapatkan pada 4 hari. Jumlah spora kapang *Aspergillus niger* yang baik sebagai sumber inoculum untuk produksi enzim yaitu $1,65 \times 10^8$ sel/ml pada inkubasi hari ke-3 (Pangesti *et al.*, 2012).

Metode solid state (SSF), suatu proses fermentasi di mana mikroorganisme ditumbuhkan dalam media padat atau matriks, digunakan untuk menghasilkan enzim dalam percobaan ini.. Media yang digunakan dapat diperoleh dari bahan alami maupun sintesis (Sanchez *et al.*, 2015). Prinsip dasar metode SSF adalah menumbuhkan mikroorganisme pada substrat padat lembab dengan kadar air rendah atau pada pori-pori tanpa pergerakan air yang bebas (Nurhasni *et al.*, 2016).

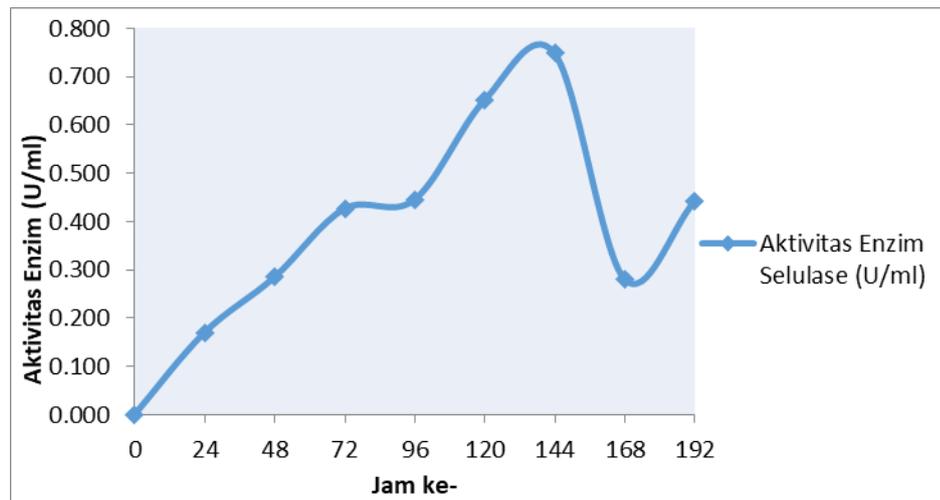
Metode SSF memiliki keuntungan dalam menghasilkan produk yang lebih stabil, mendistribusikan lebih banyak oksigen dalam medium, dan lebih hemat biaya pengoperasian. Metode SSF juga menghasilkan lebih sedikit kontaminasi karena kadar air medium lebih rendah (Sanchez *et al.*, 2015). Metode SSF memiliki kelemahan salah satunya tidak memiliki mekanisme kontrol canggih yang biasanya dikaitkan dengan metode SmF (Submerged Fermentation), sehingga pengendalian media lingkungan dalam bioreactor sulit dicapai, terutama pada suhu dan kelembaban (Maftukhah, 2019). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi produksi enzim yaitu pH awal medium fermentasi. Nilai pH dapat mempengaruhi produksi enzim karena pada kondisi pH basa memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan kapang dan produksi enzim. Waktu inkubasi fermentasi, produksi enzim akan meningkat dengan bertambahnya periode

waktu inkubasi dan menurun setelah mencapai waktu inkubasi maksimum. Suhu inkubasi fermentasi, tinggi rendahnya suhu dapat mempengaruhi sel mikroba dalam transport nutrisi ke dalam sel, sehingga produksi enzim dapat berkurang. Penambahan larutan garam mineral, sebagai nutrisi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolit kapang. Sehingga dapat mempengaruhi produksi enzim (Sugiwati *et al.*, 2018).

Prinsip kerja metode Nelson-Somogyi adalah terjadi reaksi oksidasi dengan pereaksi Somogyi dan gula pereduksi, dan glukosa mereduksi ion Cu^{2+} dari tembaga sulfat menjadi Cu^+ , yang mengendap menjadi Cu_2O berupa endapan berwarna merah bata. Reagen Nelson untuk mengukur kadar gula reduksi menggunakan pereaksi tembaga arsenida molibdat. Cu^{2+} direduksi menjadi Cu^+ dan dilarutkan dengan arsenik molibdat membentuk molibdenum biru. Karena konsentrasi arsenik molibdat tereduksi sebanding dengan konsentrasi oksida tembaga (Cu_2O), dan konsentrasi Cu_2O sebanding dengan konsentrasi gula pereduksi, intensitas perkembangan warna menunjukkan jumlah gula pereduksi dalam sampel. (Sari, 2019). Sehingga dapat diukur absorbansinya setelah penambahan reagen nelson (arsenomolibdat) pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm sebagai indikator penurunan kadar glukosa (Vifta *et al.*, 2018).

Metode Nelson-Somogyi pada pengujian kadar glukosa memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari metode ini adalah memiliki sifat yang lebih efektif, sederhana, mudah dalam mengendalikan faktor pengganggu (Vifta *et al.*, 2018). Menurut Pratiwi *et al.* (2018), bahwa metode Nelson-Somogyi memiliki harga peraksi yang lebih murah. Kelemahan dari metode Nelson-Somogyi adalah metode ini diketahui sensitif terhadap faktor perancu yang dapat mengakibatkan nilai aktivitas enzim menjadi lebih rendah. Kerugian lainnya adalah reagen yang digunakan dalam metode Nelson-Somogyi lebih toksik sehingga lebih sensitif terhadap faktor perancu. Faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, inhibitor dan activator (Risnawati and Sari, 2013). Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan per ml, dimana satu unit enzim (U) adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1,0 mol glukosa per menit pada kondisi pengujian (suhu 37 °C, pH 5.0) (Pratiwi *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil yang didapat (Gambar 2), aktivitas enzim dari isolat kapang ISD 2 mengalami peningkatan setelah waktu inkubasi ke-0 hingga jam ke-144 inkubasi, menurun pada jam ke-168, meningkat lagi pada jam ke-192 inkubasi. Aktivitas enzim tertinggi menunjukkan hasil 0,7490 U/mL yang didapatkan selama 144 jam inkubasi. Aktivitas enzim pada puncak tersebut terjadi pada saat kapang mengalami fase eksponensial. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Rohmah *et al.*, (2019), bahwa Masa inkubasi berhubungan erat dengan metabolisme. Masa inkubasi yang lama mengakibatkan kekurangan nutrisi, menekan kondisi fisiologis kapang, dan menurunkan produksi enzim. Menurut Bellauochi *et al.* (2021), penurunan aktivitas enzim setelah waktu inkubasi produksi maksimum dapat disebabkan oleh menipisnya nutrisi. Menurut Asrat dan Abebe (2018), bahwa aktivitas enzim menurun seiring bertambahnya masa inkubasi, hal ini disebabkan oleh sedikitnya ketersediaan nutrisi dan kelembaban dalam substrat untuk pertumbuhan isolat..



Gambar 2. Aktivitas Enzim Selulase Hasil Optimasi Produksi oleh Isolat ISD₂

Produksi selulase meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi hingga tercapai titik optimum. Setelah titik optimum tercapai, aktivitas enzim selulase mulai menurun secara perlahan. Hal ini disebabkan oleh kematian sel, yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim sehingga produksi glukosa lebih sedikit (Purkan *et al.*, 2015). Aktivitas selulase pada fungi selulolitik dari serasah daun salak didapatkan hasil tertinggi yaitu 0,8250 U/mL selama 10 hari inkubasi. Tujuan dilakukannya optimasi produksi enzim yaitu untuk menghasilkan selulase tertinggi pada isolat kapang selulolitik, sehingga akan diperoleh hasil yang paling optimum pada suhu inkubasi, pH inkubasi, dan waktu inkubasi optimum.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kapang selulolitik yang diisolasi dari serasah daun yang terpilih adalah ISD 2 dengan karakter makroskopis memiliki koloni berwarna hijau kehitaman. Berdasarkan hasil skrining zona bening aktivitas enzim dari ISD 2 sebesar 4.868. Optimasi kultur kapang mencapai jumlah spora yang optimum yaitu pada jam ke-48 (hari ke 2) yaitu 6,000 spora/ml. Kapang selulolitik ISD 2 dapat memproduksi selulase dengan adanya aktivitas enzim tertinggi menunjukkan hasil 0,7490 U/mL yang didapatkan selama 144 jam inkubasi. Saran dari penelitian ini sebaiknya dapat dilakukan menggunakan serasah daun yang lebih baik sehingga akan menghasilkan selulase lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Arif, A., Musrizal, M., Tutik, K., Rahmawati. 2019. Isolasi dan Identifikasi Kapang Kayu dari Hutan Pendidikan Universitas Hasanuddin di Bengo-bengo Kecamatan Cenrana Kabupaten Maros. *Jurnal Perennial*. 5(1):15-22.
- Ariyani, S.B., Asmawit, Pramono, P.U. 2014. Optimasi Waktu Inkubasi Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Fermentasi Substrat Padat. *BIOPROPAL INDUSTRI*. 5(2):61-67.
- Asrat, B., and Abebe, G. 2018. Isolation, Production and Characterization of Amylase Enzyme using the Isolate *Aspergillus niger* FAB-211. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 9(2): 7-14.
- Bellaouchi, R., Houssam, A., Yahya, R., Amina, H., Nabil, G., Abdelkader, H., Abdelmajid, B., Abdelslam, A. 2021. Characterization and Optimization of Nahdiyah Vernanda Saputri, Optimasi Produksi...

- Extracellular Enzymes Production by *Aspergillus niger* Strain Isolated from date by-products. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(50): 1-8.
- Fatriasari, W., Nanang, M., Ewis, H. 2019. *Selulosa Karakteristik dan Pemanfaatannya*. Jakarta : LIPI Press.
- Halwiyah, N., Rejeki, S.F., Budi, R., Susiana, P. 2019. Antagonisme Kapang Patogen *Fussarium solani* Penyebab Penyakit Layu pada Tanaman Cabai dengan Menggunakan *Beauveria bassiana* Secara In Vitro. *Jurnal Akademika Biologi*. 8(2):8-17.
- Ilyas, M. 2010. Isolasi dan Identifikasi Kapang Saprofitik pada Sampel Tanah di Sekitar Kawasan Gunung Gamalama, Ternate. *Biosfera*. 27(3):141-146.
- Islamiati, Intani, Rahmawati, M. Turnip. 2017. Jenis-Jenis Kapang Udara Ruang Baca Di UPT Perpustakaan Universitas Tanjungpura Pontianak. *Protobiont*. 6(3):194-200
- Kurniawati, L., Endang, K., Wijanarka. 2019. Pengaruh Variasi Suhu dan Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Serratia marcescens*. *Jurnal Akademika Biologi*. 8(1):1-9.
- Maftukhah, Siti. 2019. Cellulase Enzyme Production Using Solid State Fermentation Method From Waste. *Jurnal Keilmuan dan Aplikasi Teknik*. 6(2):22-27.
- Miranti, A. K., M. G. I. Rukmini, A. Supriyadi. Diversitas Kapang Serasah Daun Talok (*Muntingia calabura* L.) Di Kawasan Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura. *BIOMA*. 16(2):58-64.
- Murtiyaningsih, Hidayah, M. Hazmi. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Agritrop*. 15(2):293-308.
- Nurhasni, T. R. D. Larasati, A. Iksan. Delignification of Sawdust White Teak (*Gmelina arborea* Roxb.) by Fungi *Phanerochaete chrysosporium* Irradiated Gamma Ray. *Jurnal Kimia Valensi: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*. 2(2):104-113.
- Pangesti, N.W.I., Artini, P., Estu, R. 2012. Pengaruh Penambahan Molase pada Produksi Enzim Xilanase oleh Fungi *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi. *Bioteknologi*. 9(2):41-48.
- Pratiwi, Y. H., O. Ratnayani, I. N. Wirajana. 2018. Perbandingan Metode Uji Gula Pereduksi dalam Penentuan Aktivitas α -L-Arabinofuranosidase dengan Substrat Janur Kelapa (*Cocos Nucifera*). *Jurnal Kimia*. 12(2):134-139.
- Purkan, Purnama, H.D., Sumarsih, S. 2015. Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* Menggunakan Sekam Padi dan Ampas Tebu sebagai Induser. *Jurnal Ilmu Dasar*. 16(2):95-102.
- Risnawati, M. and S. E. Cahyaningrum. 2013. The Addition Effect of The Metal Ions Ca^{2+} on The Papain Activities. *Journal of Chemistry*. 2(1):76-83.
- Ristiari, N.P.N., Ketut, S.M.J., Ida, A.P.S. 2018. Isolasi dan Identifikasi Kapang Mikroskopis pada Rizosfer Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) Di Kecamatan Kintamani, Bali. *Jurnal Penelitian Biologi Undiksha*. 6(1):10-19.
- Rohma, H.N., R. Setyaningsih, A. Pangastuti, S. L. A. Sari. 2019. Optimasi Produksi Selulase dari Fungi Selulolitik *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 yang Diisolasi dari Serasah Daun Salak (*Salacca edulis*). *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 5(2):150-154.
- Rosyida V.T., Hayati, S.N., Indrianingsih, A.W., Maryana, R., Purwestri, Y.A., Ayesda C.S. 2018. Enzim Selulase Kasar *Aspergillus niger* FNCC 6018 untuk Produksi

- Bioetanol Melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak. *Jurnal Mikologi Indonesia*. 2 (2):77-90.
- Safronova, N.A. Koksharova, O.A. 2018. Bacteria *Rhodococcus* sp. as Potential Destructors of Detonation Nanodiamonds. *Nanotechnologies in Russia*. 13(7):439-442.
- Sari, Nurmala. 2019. The Used of Glucose Syrup as Product of Selulosa Hidrolyze from the Jackfruit Rags (*Artocarpus heterophylus* Lamk) as Sweetner on Candies Production from the Coconut Plam (*Cocos nucifera* L). *Journal of Pharmaceutical and Sciences*. 2(1):17-23.
- Sánchez, L. B. R., M. C. C. Quitio, M. C. J. Ricardo, J. Cordova, P. Fickers. 2015. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Bioprocessing & Biotechniques*. 5(2):1-9.
- Setyoko, H., Budi, U. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase Cairan Rumen Sapi untuk Hidrolisis Biomassa. *Proceeding Biologi Education Conference*. 13(1):863-867.
- Sugiwati, S., M. T. Suharto, M. Hanafi, H. N. Lioe. 2018. Produksi β -Glukosidase *Aspergillus niger* Bio 2173 dengan Fermentasi Padat menggunakan Substrat Dedak. *Jurnal Selulosa*. 8(1):33-42.
- Talantan, V.M., Marina, Orryani, L., I, Nengah, S. 2018. Uji Aktivitas Selulase dari Kapang Selulolitik Asal Tanah Danau Kalimpa'a Central Sulawesi. *Natural science : Journal of Science and Technology*.7(3):23-333.
- Umniyatie, S., Victoria, H. 2014. Diversitas Fungi Saprofit pada Tanah Pertanian Di Wukisari, Cangkringan, Sleman, Yogyakarta. *Jurnal Sains Dasar*. 3(1):76-86.
- Utami, A. P., R. Setyaningsih, A. Pangastuti, S. L. A. Sari. 2019. Optimasi Produksi Selulase dari Kapang *Penicillium* sp. SLL06 yang Diisolasi dari Serasah Daun Salak (*Salacca edulis*). *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 5(2):145-149.
- Vifta, Rissa, L., Y. D. Advistasari. 2018. Analisis Penurunan Kadar Glukosa Fraksi n-Heksan Buah Parjoto (*Medinilla speciosa* B) secara in vitro dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 7(3):250-253.
- Yang, X., Yingyin, Y., Yifan, Z., Jiahao, H., Yizhen, X. 2020. Enhanced Exopolysaccharide Production in Submerged Fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 Supplementation. *RESEARCH PAPER : Bioprocess and Biosystems Engineering*.