

PRODUKSI ENZIM LAKASE OLEH JAMUR *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 DENGAN VARIASI PENAMBAHAN CuSO_4 MENGGUNAKAN BIOREAKTOR TRAY SECARA *SOLID STATE FERMENTATION* (SSF)

Ivanna Nurliati¹, Sri Helianty², Andi Dahliaty³

¹Mahasiswa Jurusan Teknik Kimia S1, ²Dosen Teknik Kimia, ³Dosen FMIPA Kimia

Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler

Program Studi Teknik Kimia S1, Fakultas Teknik Universitas Riau

Kampus Bina Widya Jl. HR. Soebrantas Km 12,5 Simpang Baru, Panam,

Pekanbaru 28293

E-mail: ivannanurliati01@gmail.com

ABSTRACT

Laccase is one of the ligninolytic enzymes that capable to degrade lignin. This ability can be used for the pretreatment of lignocellulosic materials in the bioethanol production and lignin degradation in pulp. There are diverse sources of laccase producing like fungi, plants and bacteria. This research is, conducted to the production of laccase enzyme using Trichoderma asperellum LBKURCC1 with bioreactor tray using solid state fermentation (SSF) method with rice straw substrate. The research was purposed to determine the effect of CuSO_4 inducer and know the best fermentation time on production of enzyme by Trichoderma asperellum LBKURCC1. Fermentation was carried out with time variations that are 5-10 days and variations of CuSO_4 that are 0,25-0,75 g/L with substrate size $\pm 0,5$ cm, the bed depth on the tray 3 cm. Fermentation using room temperature and pH is 5,5. The result showed that the highest laccase enzyme activity was obtained on CuSO_4 inducer 0,50 g/L and 7 days fermentation with average laccase enzyme activity was 19,270 U/L.

Keywords: *Inducer, Laccase, Rice straw, Solid state fermentation, Trichoderma asperellum.*

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara tropis dengan sumber biodiversitas yang beragam, salah satunya adalah mikroba. Mikroba memiliki banyak manfaat dan nilai guna dalam berbagai proses di alam, salah satunya yaitu dengan menghasilkan enzim. Namun, belum banyak eksplorasi terhadap mikroba penghasil enzim untuk kebermanfaatannya lebih lanjut. Padahal, kebutuhan enzim untuk industri di Indonesia 90% masih mengandalkan impor dari negara lain. PT. Petrosida Gresik yang merupakan satu-satunya pabrik enzim di Indonesia, hanya

mampu memenuhi 10% dari kebutuhan enzim.

Salah satu mikroba yang berpotensi menghasilkan enzim adalah jamur. Jamur adalah mikroorganisme yang bersifat heterotrof, hidupnya menyerap zat organik dari lingkungan kemudian menyimpannya dalam bentuk glikogen [Pandey dkk., 2008]. Jamur memiliki banyak peranan, jenis-jenis jamur tertentu dapat dikonsumsi dan beberapa jenis jamur digunakan dalam bidang bioteknologi. Keuntungan penggunaan jamur dalam bidang bioteknologi yaitu mudah dikembangkan, dapat ditemukan dalam

jumlah yang banyak dan ekonomis. Salah satu bioteknologi yang sedang berkembang saat ini adalah produksi enzim lakase.

Lakase merupakan enzim yang dapat mengoksidasi senyawa aromatik sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri seperti pendegradasi lignin pada *pulp*, pendegradasi polutan beracun dalam bioremediasi, sebagai mikroba pada proses fermentasi bahan baku nabati agar menghasilkan bioetanol dan pendegradasi warna pada limbah industri tekstil [Gao dkk., 2013]. Industri tekstil menghasilkan 80% limbah cair berupa senyawa azo yang digunakan pada proses pewarnaan. Senyawa azo ini sulit terdegradasi karena mengandung senyawa fenol.

Lakase dapat dihasilkan dari bakteri, tanaman tingkat tinggi, jamur dan serangga. Bakteri yang menghasilkan lakase antara lain *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus*, dan *Marinomonas mediterranea*. Lakase pada tanaman ditemukan pada kubis, kentang, apel, asparagus, tunas hijau teh, dan pohon dari golongan *Anacardiaceae*. Sedangkan, lakase pada jamur ditemukan pada *Marasmius* sp, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune* dan *Trichoderma* sp [Risdianto dkk., 2012].

Trichoderma sp adalah spesies jamur yang banyak dijumpai hampir pada semua jenis tanah dan pada berbagai habitat, biasanya dimanfaatkan sebagai pengendali hayati patogen tanah. *Trichoderma* sp merupakan jenis jamur yang mudah diisolasi, memiliki daya adaptasi yang luas dan dapat tumbuh cepat pada berbagai substrat. *Trichoderma* sp dapat menghasilkan enzim lakase dengan proses fermentasi. *Solid state fermentation* (SSF) sangat tepat digunakan untuk produksi

enzim lakase oleh jamur berfilamen seperti *Trichoderma* sp. Pada proses fermentasi dibutuhkan substrat sebagai media pertumbuhan yang mampu menyediakan sumber nutrisi utama berupa lignin. Lignin merupakan salah satu komponen penyusun utama biomassa. Substrat alami yang ekonomis adalah biomassa sisa pertanian yaitu jerami padi. Jerami padi sebagai bahan lignoselulosa, memiliki kandungan lignin 20%, hemiselulosa 24%, dan selulosa 32% [Sulardjo, 2013]. Sulardjo [2013] menyatakan bahwa kandungan lignin pada jerami padi dapat terdegradasi lebih cepat dibanding biomassa lainnya, sehingga jerami padi dapat digunakan sebagai media pertumbuhan jamur yang baik.

Produksi enzim secara *solid state fermentation* (SSF) dipengaruhi beberapa parameter seperti pH, suhu, oksigen, kelembaban, jenis mikroba, jenis substrat dan ukuran yang digunakan, nutrisi dan waktu fermentasi. Penelitian telah dilakukan dengan berbagai parameter dan bioreaktor. Bioreaktor *tray* dengan desain yang sederhana mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas tertinggi dan biaya produksi yang rendah [Couto dkk., 2002].

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat, Bahan dan Mikroorganisme

2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah unit bioreaktor *tray*, autoklaf (LDZX-50 FA, China), spektrofotometer UV-Vis *Thermo Scientific Genesys* 10S, kuvet, pH meter (ATC pH-2011), mikrosentrifugal berpendingin Hitachi CT15RE, *cooled incubator* Gallenkamp, *shaker* Daihan Lab Tech LSI-1, *waterbath* (GRANT SUB28), kertas saring *GF/C* whatman (No. Katalog 1822055), *double hygrometer*, cawan petridis, erlenmeyer, *beaker glass*, *vortex*

mixer H-VM-300, Corning syringe filter 0,45 µm PES filter media (No. Katalog 6780-2504), tabung mikro, jarum ose dan peralatan laboratorium standar sesuai dengan prosedur.

2.1.2 Bahan

Bahan lignoselulosa sebagai substrat yaitu jerami padi diperoleh dari pertanian padi di Kabupaten Siak, Provinsi Riau. Bahan-bahan untuk PDA (*potato dextrose agar*) yang terdiri dari kentang, dextrose, agar batang dan asam sitrat. Bahan-bahan sebagai nutrisi, yaitu glukosa, CuSO₄ (Induser), (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KH₂PO₄ dan larutan buffer dengan pH 5,5. Bahan-bahan lain seperti Aqua DM, NaN₃ dan alkohol 70%.

2.1.3 Mikroorganisme

Penelitian ini menggunakan isolat jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 yang diisolasi dari perkebunan coklat di Riau [Nugroho dkk., 2003] yang dipelihara pada media PDA (*potato dextrose agar*). Mikroorganisme ini menjadi koleksi Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi, dan Biomolekuler FMIPA Universitas Riau.

2.2 Variabel

Variabel Penelitian terdiri dari variabel tetap dan variabel berubah. Variabel tetap pada penelitian ini yaitu Variabel tetap pada penelitian ini adalah suhu fermentasi ±30 °C, ukuran substrat ±0.5 cm (dicincang), ketebalan substrat pada tray yaitu 3 cm, dan larutan buffer asetat pH 5,5. Variabel berubah pada penelitian ini adalah Variabel berubah pada penelitian ini adalah penambahan CuSO₄ yaitu 0,25-0,75 gr/l dan waktu fermentasi 5-10 hari.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yaitu pembuatan media PDA (*potato*

dextrose agar), peremajaan isolat jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1, Produksi enzim lakase, ekstraksi enzim lakase dan uji aktivitas enzim lakase.

2.3.1 Pembuatan Media PDA (*potato dextrose agar*)

Pembuatan media PDA diawali dengan pemotongan kentang yang sudah dikupas, kentang dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi aqua DM sebanyak 25 ml. Campuran dididihkan selama 20 menit dan kemudian disaring menggunakan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampurkan dengan *dextrose* dan agar batang, kemudian ditambahkan aqua DM hingga volume 200 mL.

Larutan media PDA dimasukkan ke dalam erlenmeyer (yang telah ditutup dengan kapas dan kasa) untuk disterilisasi pada suhu 121 °C selama 20 menit di dalam autoklaf. Selanjutnya larutan media PDA dimasukkan ke dalam *water batch* dengan suhu 60°C selama 30 menit. Setelah itu, larutan media PDA ditambahkan asam sitrat sebanyak 1 ml, tujuan penambahan asam sitrat adalah untuk mencegah kontaminasi media PDA dari mikroorganisme.

2.3.2 Peremajaan Isolat Jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1

Isolat jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 diremajakan pada agar miring (PDA) didalam tabung reaksi, isolat jamur diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian ditanam pada medium agar miring dengan cara menggoreskan jarum ose tersebut secara zig zag. Jamur pada agar miring diamati sampai tumbuh spora hijau (±5 hari). Spora yang tumbuh pada agar miring akan dipindahkan pada cawan petridis (berisi 2/3 media PDA), dengan tujuan memperluas penyebaran spora yang terbentuk dan memudahkan pada proses produksi enzim.

2.3.3 Produksi Enzim Lakase

Pada produksi enzim, substrat berupa jerami padi dikeringkan dan dicincang terlebih dahulu (ukuran substrat $\pm 0,5$ cm). Setelah itu substrat, *tray* bioreaktor dan nutrisi (glukosa, CuSO_4 (Induser), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 dan larutan buffer dengan pH 5,5. Komposisi terlampir pada Lampiran B) disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Bioreaktor disterilkan dengan menggunakan alkohol 70 %. Kemudian substrat, *tray* bioreaktor dan nutrisi yang telah disterilisasi didinginkan pada suhu ruang. Jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 yang telah diremajakan pada cawan petridis diinokulasi secara aseptis kedalam *tray* bioreaktor yang didalamnya terdapat substrat dan nutrisi yang telah disterilisasi. Selama proses produksi kelembapan dan suhu diamati menggunakan *double hygrometer*.

2.3.4 Ekstraksi Enzim Lakase

Ekstraksi enzim lakase dilakukan dengan penambahan larutan penyangga asetat pH 5,5 sebanyak 50 ml [Hanung dkk., 2013] dan di *shaker* dengan kecepatan 150 rpm [Astina, 2016]. Lalu filtrat dan ampas dipisahkan dengan menggunakan kertas saring Whatman GF/C. Ekstrak kasar enzim dimasukkan kedalam tabung eppendorf untuk disentrifugasi, tujuannya adalah untuk memisahkan enzim dengan miselia jamur, sentrifugasi dalam keadaan dingin pada suhu $5-10^\circ\text{C}$ dengan kecepatan 9500 rpm [Astina, 2016]. Setelah di sentrifugasi, miselia dan ekstrak kasar enzim akan terpisah, bagian bawah merupakan miselia jamur dan bagian atas adalah enzim lakase. Supernatan disimpan didalam tabung eppendorf dan masukkan di dalam *freezer* pada suhu -20°C .

2.3.5 Uji Aktivitas Enzim Lakase

Aktivitas enzim lakase diukur menggunakan spektrofotometer dengan guaiacol sebagai substrat. Untuk menentukan aktivitas enzim lakase, disiapkan blanko dan campuran enzim. Sebanyak 1 mL enzim lakase ditambahkan 3 mL penyangga buffer pH 5,5 dan 1 mL guaiacol (2 mM) dan untuk blanko ditambahkan 1 mL aqua DM sebagai pengganti enzim. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 450 nm [Astina, 2016].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Konsentrasi CuSO_4 pada Proses Produksi Enzim Lakase

Aktivitas enzim lakase tertinggi pada variasi CuSO_4 0,25-0,75 g/L yaitu 16,028-5,436 U/L. Induser ditambahkan pada media dengan tujuan untuk menginduksi agar enzim lakase dapat terbentuk lebih banyak, karena induser erat hubungannya dengan gen yang terdapat didalam DNA jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1, pada konsentrasi CuSO_4 0,50 g/L, atom Cu^{2+} berikatan dengan setiap sisi protein represor yang dihasilkan oleh gen Regulator (R) sehingga protein represor menjadi tidak aktif (inaktif). Hal ini mengakibatkan protein represor tidak dapat berikatan dengan gen operator (O) dan protein represor tidak dapat menghambat transkripsi sehingga mRNA akan terus berjalan dan proses translasi terus terjadi, hal ini akan membuat sintesis enzim terus berjalan. Protein represor merupakan inhibitor (penghambat) pada produksi enzim. Pada konsentrasi CuSO_4 0,25 g/L, atom Cu^{2+} yang tersedia

tidak cukup untuk mengikat sisi protein represor, sehingga protein represor yang tidak berikatan dengan atom Cu^{2+} masih dapat menghambat proses sintesis enzim.

Pada konsentrasi CuSO_4 0,75 g/L, atom Cu^{2+} yang tersedia tidak hanya mampu berikatan dengan protein represor, tetapi juga mulai mendeaktivasi gen-gen tersebut. Hal inilah yang membuat sintesis enzim pada konsentrasi CuSO_4 0,75 g/L sangat menurun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hanung dkk. [2013] bahwa konsentrasi induser yang terlalu tinggi dalam medium fermentasi dapat berdampak negatif karena merupakan racun bagi proses sintesis enzim.

Hal serupa juga dinyatakan oleh Nagar [2014]. Menurut Wang dkk. [2015] waktu memasukkan induser mempengaruhi aktivitas enzim, waktu yang tepat untuk memasukkan induser kedalam media adalah pada hari ke-5, dimana glukosa pada nutrisi telah habis dimakan oleh jamur. Namun, Nagar [2014] melakukan penelitian dengan dua kondisi induser yang berbeda yaitu induser dimasukkan kedalam media produksi bersama nutrisi dan induser dimasukkan kedalam media produksi pada hari ke-5, aktivitas enzim tertinggi pada kedua kondisi tersebut adalah pada kondisi dimana induser dimasukkan kedalam media produksi bersama-sama dengan nutrisi. Menurut Nagar [2014] jika induser dimasukkan pada hari ke-5, akan memberikan komposisi media yang baru dari sebelumnya, hal ini mempengaruhi kondisi jamur dan sintesis enzim sehingga aktivitas enzim menurun.

3.2 Pengaruh Waktu Fermentasi pada Proses Produksi Enzim Lakase

Proses produksi dilakukan dengan variasi waktu 5-10 hari. Untuk produksi enzim menggunakan jamur, enzim akan

terbentuk ketika nutrisi pada media telah habis dikonsumsi, sehingga jamur akan mengkonsumsi senyawa pada substrat dan menghasilkan enzim. Pada fermentasi hari ke-5 merupakan waktu produksi enzim oleh jamur [Nagar, 2014]. Untuk itu, pengambilan sampel untuk mengetahui aktivitas enzim dilakukan pada hari ke-5.

Pada hari 0-5 merupakan fase adaptasi dari jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 ke dalam media baru (*fresh medium*) yaitu media produksi [Patel, dkk., 2009], dimana pada hari ke 0-5 jamur harus menyesuaikan keadaan seperti suhu, pH serta kelembaban. Selain itu, pada hari ke 0-5 nutrisi masih tersedia didalam media produksi, sehingga jamur memakan nutrisi tersebut untuk dapat tumbuh. Pada hari ke 6 dan 7 aktivitas enzim lakase terus meningkat untuk berbagai variasi konsentrasi CuSO_4 , hal tersebut menggambarkan bahwa pada hari ke-6 dan 7 lignin yang tersedia pada substrat mampu didegradasi oleh jamur dengan baik dan akhirnya dikonversi menjadi enzim lakase. Puncak tertinggi aktivitas enzim lakase terjadi pada hari ke-7.

Adanya represi katabolik membuat terjadi penurunan aktivitas enzim, represi katabolik merupakan keadaan dimana glukosa menekan sintesis enzim yang dapat diinduksi meskipun terdapat induser. Pada hari ke-9 dan 10 terjadi penurunan aktivitas enzim lakase yang signifikan, hal ini disebabkan karena represi katabolik yang semakin besar. Selain itu, pada penelitian ini tidak adanya kontrol untuk parameter suhu dan kelembaban. Ketika terjadinya proses produksi enzim, mikroorganisme menghasilkan metabolit yang disertai dengan panas, hal ini membuat suhu menjadi bertambah dan kelembaban semakin berkurang.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa Induser (CuSO_4) berpengaruh terhadap aktivitas enzim lakase yang dihasilkan oleh *Trichoderma asperellum* LBKURCC1. Konsentrasi CuSO_4 terbaik pada 0,50 g/L. Konsentrasi yang terlalu besar membuat aktivitas enzim lakase menurun dan waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim lakase yang dihasilkan, untuk jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1, waktu produksi terbaik pada hari ke-7 dengan aktivitas enzim 19,270 U/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Astina, D. (2016). Uji Aktivitas Enzim Laccase Produksi *Trichoderma asperellum* LBKURCC1. *Tesis*. Pekanbaru, Lembaga Penelitian Universitas Riau.
- Couto, S.R., Moldes, D., Liebanas, A., & Sanroman, A. (2002). Investigation of Several Bioreactor Configurations for Laccase Production Operating in Solid-State Conditions. *Journal of Biochemical Engineering*, 15, 21–26.
- Gao., Huiju., Chu. X., Wang. Y., Zhou. F., Zhao. K., Mu. Z., & Qingsin., H. (2013). Media Optimization of *Trichoderma harzianum* ZF-2 for Laccase Production by Using Respons Surface Methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1757-1764.
- Hanung, C.D., Osmand, R., & Hendro, R. (2013). Optimisasi Produksi Enzim Lakase pada Fermentasi Kultur Padat Menggunakan Jamur Pelapuk Putih *Marasmius sp.* Pengaruh Ukuran Partikel, Kelembapan, dan Konsentrasi Cu. *Journal of Lignocellulose*, 3 (2), 65-72.
- Nagar, Y. (2014). Production and Application of Laccase Enzyme in Pulp and Paper Industry. *Journal of Biotechnology*, 2(4), 153–158.
- Pandey, A., Mardhavan, K.N., T.V. Baiju., C. Sandhya., A. Sabu., & G. Szakacs. (2008). Process Optimization for Antifungal Chitinase Production by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Biochemistry*, 39, 1583-1590.
- Patel, H., Akshaya, G., & Shilpa, G. (2009). Effect of Different Culture and Inducers on Production of Laccase by a Basidiomycete Fungal Isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under Solid State Fermentation. *Journal of Biotechnology*, 4, 268-284.
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., & Setiadi, T. (2012). Optimization of Laccase Production Using White Rot Fungi and Agricultural Wastes in Solid-State Fermentation. *Journal of Engineering Science*, 44(2), 93–105.
- Sulardjo. (2013). *Pemanfaatan Limbah Padi Untuk Industri*. Bahan Ajar Prodi Teknologi Hasil Pertanian, UNWIDHA Klaten, Magistra No. 84 Th. XXV ISSN 0215-9511.
- Wang, J., Feng, J., Jia, W., Chang, S., Li, S., & Li, Y. (2015). Lignin Engineering Through Laccase Modification: a Promising Field for Energy Plant Improvement. *Journal of Biotechnology*, 1–11.