

**PRODUKSI ENZIM SELULASE DAN XILANASE DARI *EUPENICILLIUM JAVANICUM* DENGAN SUBSTRAT KULIT NANAS MENGGUNAKAN *SOLID-STATE FERMENTATION***

**Ullia Nurul Ismala<sup>1)</sup>, Evelyn<sup>2)</sup>, Said Zul Amraini<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Mahasiswa Program Studi Sarjana Teknik Kimia, <sup>2)</sup>Dosen Jurusan Teknik Kimia  
Laboratorium Teknologi Bioproses  
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau  
Kampus Bina Widya Jl. HR Soebrantas KM 12,5 Pekanbaru, 28293  
Email: ullianurul@gmail.com

**ABSTRACT**

*The utilization of enzymes in bioprocess industry increases annually. Enzyme ability to accelerate the reaction and its biodegradability make it preferable to be utilized as catalyst. Cellulase and xylanase are ones of common enzymes that used in industries, such as pulp and paper, detergent, syrup and more. Pineapple peel waste has potential lignocellulose content to substitute pure substrate such as cellulose and xylan which is not efficient in cost. Solid-state fermentation allows the microorganism to live in condition that suits its habitat. This research aims to investigate temperature of fermentation's (25, 30 and 35 °C) effect on cellulase and xylanase enzyme production in solid-state and comparing the enzyme activities resulted with submerged fermentation method ones. Fermentation for enzyme production was done for 96 h and the pH of medium was adjusted at 4. Enzyme activity was obtained with DNS method using spectrophotometry visible at 540 nm. The highest enzyme activities were obtained at temperature 30 °C which resulted 0,054 U/mL for cellulase and 0,077 U/mL for xylanase.*

**Keywords** : cellulase, enzyme, solid-state fermentation, submerged fermentation, xylanase

## 1. PENDAHULUAN

Sebagai dampak berkembangnya bioindustri, kebutuhan enzim cenderung meningkat, penggunaan enzim dalam industri seperti makanan, agrikultur, kimia dan farmasi untuk meningkatkan efektifitas proses dengan mengurangi waktu produksi, input energi serta biaya produksi semakin diminati. Selain itu penggunaan enzim memiliki beberapa kelebihan, sifat spesifik dan enzim mikrobial dapat mengurai senyawa toksik atau limbah-limbah industri [Singh *et al.*, 2016]. Pada tahun 2017

kebutuhan enzim Indonesia mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar 200 miliar Rupiah, dengan laju pertumbuhan kebutuhan enzim di Indonesia meningkat 5 – 7 % tiap tahun [Kemenristekdikti, 2017]. Besarnya kebutuhan enzim ini tidak diimbangi dengan produksi enzim yang mencukupi, akibatnya Indonesia mengimpor enzim. Hal ini berdampak pada lambatnya pertumbuhan bioindustri di Indonesia. Menurut Kepala BPPT Unggul Prayitno,

Indonesia mengimpor 99% kebutuhan enzim dari India, Cina dan Eropa [Republika, 2016].

Enzim untuk kebutuhan industri umumnya diproduksi dari mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. *Eupenicillium javanicum* merupakan salah satu jenis jamur berfilamen yang mampu menghasilkan enzim selulolitik seperti selulase dan hemiselulosa [Purwadaria *et al.*, 2003]. Enzim selulase dan xilanase merupakan enzim yang paling banyak digunakan di industry saat ini. Enzim selulase digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi molekul glukosa dan xilanase digunakan untuk mendegradasi xilan dan karbohidrat hemiselulosa menjadi molekul xilosa [Ritter *et al.*, 2013].

Oleh karena itu, produksi enzim selulase dan xilanase menggunakan mikroorganisme membutuhkan substrat dengan kandungan selulosa dan xilan. Menurut Pardo *et al.* [2014] kulit nanas memiliki kandungan selulosa sebesar 40,55 g; hemiselulosa sebesar 28,69 g; lignin sebesar 10,01 g dalam 100 gram kulit nanas, sehingga menjadikan kulit nanas potensial sebagai substitusi substrat dalam fermentasi produksi enzim selulase dan xilanase yang lebih murah dibanding selulosa dan xilan murni.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi enzim selulase dan xilanase dari isolat kapang *Eupenicillium javanicum* menggunakan substrat kulit nanas, serta mempelajari pengaruh kondisi pH dan temperatur terhadap produksi enzim selulase dan xilanase.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1 Bahan dan alat yang digunakan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu agar batang, *chloroamphenicol* (Indofarma), kentang (Pasar lokal, Pekanbaru), *dextrose*

(Brataco), akua dm (Brataco), alkohol 96% (Brataco),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck), NaCl (Merck), KCl (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), kulit nanas (Pasar lokal, Pekanbaru), tepung kedelai (Quadri Foglio),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{NaNO}_3$  (Merck),  $\text{CaCl}_2$  (Merck), isolat *E. javanicum* kultur koleksi InaCC LIPI, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) (Sigma-Aldrich), NaOH (Merck),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Merck), garam *Rochelle* (Merck). Na-CMC (Brataco), *beechwood xylan* (Sigma-Aldrich), D-glukosa (Merck) dan D-xilosa (Satou Lab).

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *hot plate magnetic stirrer*, *magnetic bar*, timbangan analitik, *oven*, *autoclave*, spatula, batang pengaduk, corong, gelas ukur, kertas saring, cawan petri, pembakar bunsen, jarum ose, inkubator, mikropipet, batang L, erlenmeyer, pH meter, *shaker*, *centrifuge* dan spektrofotometer *visible*.

### 2.2 Variabel Penelitian

Variabel tetap pada penelitian ini adalah komposisi media (2,0 gram substrat kulit nanas; 0,5 gram tepung kedelai; 0,05 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,05 gram  $\text{NaNO}_3$ ; 0,1 gram  $\text{CaCl}_2$  dan 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) dan suspensi inokulum ( $10^6$  -  $10^7$  cfu/mL). Sementara variabel berubah pada penelitian ini adalah temperatur fermentasi produksi enzim (25, 30 dan 35 °C).

### 2.3 Prosedur Penelitian

Isolat jamur *Eupenicillium javanicum* didapatkan dari kultur InaCC LIPI diinokulasi pada media PDA untuk membuat kultur kerja. Kultur kerja diinkubasi selama 3 – 4 hari untuk peremajaan inokulum pada 28 °C. Kemudian inokulum dipanen dan disuspensikan ke dalam larutan *buffer phosphate saline* (BPS). Konsentrasi suspensi diatur  $10^6$  –  $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup> menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC), lalu digunakan untuk inokulasi pada medium produksi enzim.

Kemudian dilakukan preparasi kulit nanas. Kulit nanas didapatkan dari limbah nanas yang dijual di pasar pagi Arengka dan diproduksi di Desa Kualu Nenas, Kecamatan Tambang, Kabupaten Kampar. Sebelum digunakan sebagai substrat, kulit nanas dibersihkan dan dihaluskan menggunakan blender dapur, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 50 °C hingga berat konstan. Setelah itu disimpan di dalam plastik yang tertutup rapat pada suhu ruang hingga digunakan.

Pada produksi enzim dilakukan pada medium *solid-state*, sebanyak 2,0 gram substrat kulit nanas; 0,5 gram tepung kedelai; 0,05 gram (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,05 gram NaNO<sub>3</sub>; 0,1 gram CaCl<sub>2</sub> dan 5 mL H<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang sudah disterilisasi. Medium kemudian diatur pada pH 4 dengan menambahkan 1 M HCl ke dalam medium, lalu medium disterilisasi. Masing-masing erlenmeyer diinokulasikan dengan 1 mL suspensi kapang dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> cfu/mL. Suhu inkubasi diatur pada 25, 30 dan 35 °C dan inkubasi dilakukan selama 96 jam. Sementara untuk medium *submerged* dilakukan dengan prosedur yang sama dan ditambahkan H<sub>2</sub>O sebanyak 50 mL sebelum sterilisasi medium dan diinkubasi pada *shaker* pada temperatur dan pH optimum dari produksi menggunakan *solid state fermentation* sebelumnya.

Setelah produksi enzim selama 96 jam, sebanyak 50 mL akuades ditambahkan ke dalam masing-masing erlenmeyer untuk mengekstraksi *crude* enzim di dalam kultur. Kemudian erlenmeyer ditempatkan pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 1 jam pada temperatur ruang. *Slurry* kemudian diperas dan disaring menggunakan kain saringan. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan dimurnikan dengan menggunakan

sentrifuse selama 25 menit pada temperatur 4 °C dan 1000 rpm. Supernatan digunakan pada analisis aktifitas enzim. Kemudian aktivitas ekstrak kasar enzim dianalisis menggunakan metode DNS berdasarkan Ghose (1987) untuk selulase dan Bailey *et al.* (1992) untuk xilanase.

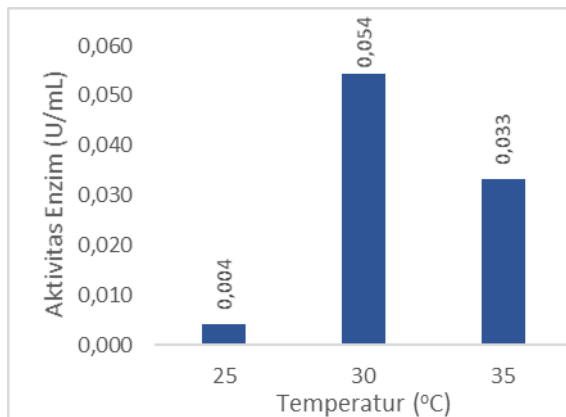
Pengujian selulase dilakukan menggunakan substrat *carboxymethyl cellulose* (CMC) dan xilanase menggunakan *beechwood xylan*, substrat tersebut masing-masing dilarutkan menggunakan larutan buffer natirum asetat 0,1 M untuk membentuk 1% substrat. Ekstrak enzim kasar diencerkan dengan faktor pengenceran 10<sup>0</sup> dan 10<sup>-1</sup> untuk selulase dan 10<sup>-1</sup> untuk xilanase menggunakan larutan buffer natirum asetat. Sebanyak 1 mL ekstrak enzim kasar ditambahkan ke dalam 1 mL substrat dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Kemudian reagen DNS ditambahkan sebanyak 1,5 mL ke dalam masing-masing sampel dan sampel dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit. Pendinginan dilakukan sesegera mungkin setelah pemanasan dengan menempatkan sampel ke dalam air dingin hingga temperatur sampel turun. Sampel kemudian diencerkan dengan 25 mL akuades dan dilakukan pengujian menggunakan spektrofotometer *visible* pada λ 540 nm. Enzim blank atau absorbansi kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama dengan sampel enzim, namun 1 mL ekstrak enzim kasar ditambahkan setelah dilakukan penambahan reagen DNS. Konsentrasi gula yang terbentuk ditentukan dengan menghitung selisih absorbansi sampel dan enzim blank. Aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan persamaan 1 berikut.

$$\text{Enzyme Activity (U/mL)} = \frac{C}{V \text{ (BM Produk)}(t)} \times \frac{1}{D_f} \quad (1)$$

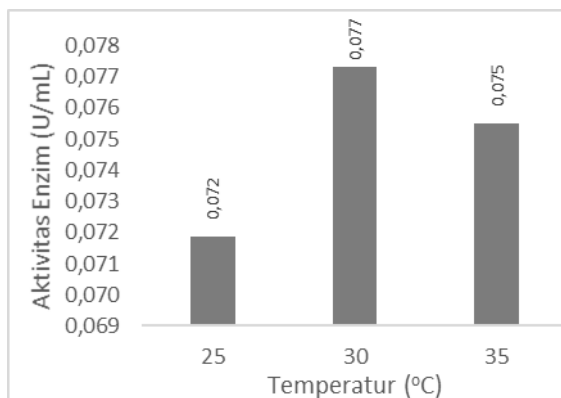
- C : Massa monomer gula yang terbentuk (mg)  
 V : Volume enzim yang ditambahkan (mL)  
 BM : Berat molekul gula (mg/ $\mu$ mol)  
 t : Waktu inkubasi (menit)  
 D<sub>f</sub> : Faktor Pengenceran

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dipelajari pengaruh temperatur produksi enzim terhadap aktivitas enzim selulase dan xilanase dari *Eupenicillium javanicum* dengan substrat kulit nanas menggunakan metode fermentasi *solid state* dan membandingkan hasil aktivitas enzim hasil produksi dengan metode fermentasi *solid state* dan *submerged*.



**Gambar 1.** Aktivitas Enzim Selulase pada Variasi Temperatur dan pH 4



**Gambar 2.** Aktivitas Enzim Xilanase pada Variasi Temperatur dan pH 4

### 3.1 Pengaruh Temperatur terhadap Produksi Enzim Selulase dan Xilanase

Hasil analisis aktivitas enzim pada temperatur 25, 30 dan 35 °C dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2. Pada gambar tersebut terlihat bahwa aktivitas enzim meningkat seiring dengan peningkatan temperatur dari 25 °C hingga 30 °C dan menurun pada temperatur 35 °C. Aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada temperatur 30 °C yaitu sebesar 0,054 U/mL. Sama halnya dengan enzim selulase, aktivitas tertinggi enzim xilanase terjadi pada temperatur 30 °C yaitu sebesar 0,077 U/mL.

Perbedaan aktivitas enzim akibat perbedaan temperatur produksi ini disebabkan oleh perbedaan laju reaksi enzimatik. Pada temperatur 25 °C laju pergerakan molekul enzim dan substrat lebih lambat sehingga reaksi enzimatik antara substrat dan enzim berlangsung lebih lambat. Dalam reaksi enzimatik peningkatan temperatur meningkatkan laju reaksi, akibat meningkatnya laju pergerakan molekul enzim dan substrat [Bettleheim *et al.*, 2015]. Hal ini berdampak pada terganggunya pemenuhan nutrisi mikroorganisme yang memproduksi enzim ekstraselular.

Namun jika temperatur optimum sudah tercapai maka peningkatan temperatur di atasnya menyebabkan struktur protein enzim akan berubah. Konformasi enzim sangat sensitif terhadap perubahan temperatur, peningkatan temperatur di atas temperatur optimum akan merubah sisi aktif yang berikatan dengan substrat, hal ini tentu akan menurunkan aktivitas enzim. Pada temperatur 30 °C kondisi optimum tersebut sudah tercapai, sehingga peningkatan temperatur produksi di atasnya akan menyebabkan denaturasi pada protein enzim, sebagai akibat putusannya ikatan hidrogen antar asam amino penyusun enzim, hal ini

dapat merubah struktur situs aktif enzim dan menyebabkan turunnya laju reaksi [Bettleheim *et al.*, 2015].

### 3.2 Perbandingan Aktivitas Enzim Optimum pada Fermentasi Solid State dan Submerged

Perbandingan aktivitas enzim selulase dan xilanase dengan metode produksi fermentasi *solid state* dan *submerged* dilakukan pada temperatur 30 °C dan pH 6. Aktivitas enzim selulase dan xilanase pada kondisi *solid state* secara berturut-turut adalah 0,155 U/mL dan 1,006 U/mL, sementara pada kondisi *submerged* adalah 0,029 U/mL dan 0,060 U/mL.

Kondisi fermentasi *solid state* menunjukkan aktivitas enzim selulase dan xilanase yang lebih tinggi secara signifikan. Kadar air yang rendah menjadikan mikroorganisme tumbuh seperti habitat aslinya, metode *solid state* meningkatkan *yield* enzim yang dihasilkan sehingga aktivitas enzim juga meningkat [Singhania *et al.*, 2010]. Pada kondisi *submerged* kadar air yang berlebih menyebabkan terhalangnya interaksi molekul yang lebih sedikit akibat keberadaan molekul yang lebih banyak, pada penelitian ini interaksi substrat dan mikroorganisme terhambat oleh keberadaan air yang berlebih sehingga menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Selain itu, keberadaan air juga mengurangi porositas substrat akibat terjadinya pembengkakan, hal ini menghambat perpindahan oksigen oleh karena itu perlu dilakukan pengadukan pada fermentasi *submerged* untuk mendapatkan oksigen terlarut sebagai suplai oksigen bagi mikroorganisme [Tao *et al.*, 2011]. Menurut Gonzales *et al.* [2003] jumlah air yang berlebih pada fermentasi *submerged* meningkatkan kelarutan produk dan meningkatkan potensi terjadinya proteolisis, yaitu pemecahan protein menjadi polipeptida atau asam amino yang lebih kecil, proteolisis terjadi akibat ikatan protein

yang terhidrolisis. Akibatnya dapat merubah struktur enzim akibat degradasi protein dan menurunkan aktivitas enzim, selain itu proteolisis dapat menurunkan yield enzim.

## 4. KESIMPULAN

Temperatur fermentasi produksi enzim memengaruhi laju degradasi substrat oleh enzim sehingga meningkatkan aktivitas enzim dan laju pertumbuhan mikroorganisme,

## 5. UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Satou Laboratories atas hibah D-Xilosa dan Ibu Fenti Fatmawati, MSi atas hibah xilan untuk penelitian ini pada tahun 2019.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, M. J., P. Biely, & K. Poutanen. (1992). Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257 – 270
- Bettleheim, F., William, B., Mary, C., & Shawn, F. (2015). *Introduction to General, Organic and Biochemistry*. California: Cengage Learning
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 59, 257 – 268
- Gonzales, G., Ernesto, T., Cristobal, A., Sergio, G., Gerardo, G., & Christopher, A. (2003). Advantages of Fungal Enzymes Production in Solid State over Liquid Fermentation. *Biochemical Engineering*, 13, 157 - 167
- Kemristekdikti. (2017). Kemandirian Produk Enzim Indonesia. *Siaran Pers Kemristekdikti*. <https://ristekdikti.go.id/kabar/kemandirian-produk-enzim-indonesia/>. Diakses pada 9 Maret 2019

- Pardo, M., Cassellis, Escobedo, R., & Garcia, E. (2014). Chemical Characterisation of Industrial Residues of Pineapple (*Ananas comusus*). *Scientific Research*, 3, 53-56
- Purwadaria, T., T. Haryati, & B. Tangendjaja. (2003). Optimisation of  $\beta$ -Mannanase Production on Submerged Culture of *Eupenicillium javanicum* as well as pH and Temperature Enzyme Characterizations. *Jurnal Ilmu Ternak & Veteriner*, 8, 46 – 54
- Putri, W. D. (2016). Transfer Teknologi Enzim, BNPPT Gandeng Bioindustri Cina. *Republika*. [https://www.republika.co.id/berita/trendtek/sainstrendtek /](https://www.republika.co.id/berita/trendtek/sainstrendtek/). Diakses pada 9 Maret 2019
- Ritter, C., M. Camassola, & D. Zampieri. (2013). Cellulase and Xylanase Production by *Penicillium echinulatum* in Submerged Media Containing Cellulose Amended with Sorbitol. *Enzyme Research*, 2013, 1-9
- Singh, R., M. Kuamar, A. Mittal, & P. K. Mehta. (2016), Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *Biotechnolgy*, 6, 174 – 186
- Tao, N., Wen-qing S., Yue-jin, L., & Shi-rong, H. (2011). Production of feed enzymes from citrus processing waste by solid-state fermentation with *Eupenicillium javanicum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1073–1079