

Produksi Enzim Lakase oleh Jamur *Trichoderma asperelloides* LBKURCC2 Menggunakan Substrat Jerami Padi Secara Fermentasi Kultur Padat dengan Variasi Waktu Fermentasi dan Laju Aerasi 1,5 L/M

¹Bangkit Swadi Iwara, ²Sri Helianty, ³Andi Dahliaty

¹Mahasiswa Program Studi Teknik Kimia, ²Dosen Jurusan Teknik Kimia

³Dosen Jurusan FMIPA Kimia

Laboratorium Teknologi Bioproses FT

Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler FMIPA
Program Studi Teknik Kimia S1, Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Binawidya Jl. HR. Subrantas Km 12,5 Pekanbaru 28293

bangkit.swadiiwara@student.unri.ac.id

ABSTRACT

Laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) is classified as blue copper oxidase enzyme. Laccase generally found in plant, insect, bacteria and filamentous fungus. One of filamentous fungus that able to degradates lignin is Trichoderma. Lignin is available in biomass such as rice straw, that contains around 18% lignin. The technique of producing laccase enzymes in this study is solid state fermentation. Solid state fermentation allows microorganisms to grow in conditions close to or similar to their natural habitat, with relatively better product than submerged state fermentation. In this study, the effect of giving force aeration on variations in fermentation time was studied in order to obtain optimum conditions for the production of laccase enzyme by solid state fermentation using the fungus Trichoderma asperelloides LBKURCC2 with rice straw substrate on a tray bioreactor. The fermentation is carried out with variation of the fermentation time 6, 8, and 10 days with incubation temperature of 30 ± 2 °C, acetate buffer solution pH 5.5 (0.05 M), substrate size 1 cm, addition of 0.5 g / l $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ inducer, bed height 3 cm, and aeration rate 1.5 l / m. The highest laccase enzyme activity was obtained during the production time of 8 days, with an average 7.78×10^{-6} U / L. The 8th day is considered to be the best growth time where the enzyme activity has reached its peak and is in a stagnant condition after the increase that occurred on the 6th and 7th days. Meanwhile, on the 9th and 10th days there was a significant decrease in the activity of the laccase enzyme due to the greater repression of catabolites.

Keywords: Laccase, Solid State Fermentation, Tray Bioreactor, Force Aeration, Fermentation Time

1. Pendahuluan

Lakase (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) termasuk kelompok enzim protein tembaga biru (*blue copper proteins*) atau *blue copper oxidase*. Lakase biasa terdapat pada tanaman tingkat tinggi, serangga, bakteri dan jamur berfilamen. Enzim lakase memiliki potensi besar di bidang

bioteknologi, karena kemampuannya mengoksidasi senyawa lignin fenolik dan non-fenolik serta mengoksidasi polutan lingkungan. Saat ini pengaplikasian enzim lakase cukup luas seperti pada delignifikasi pulp, penyisihan warna limbah, detoksifikasi air limbah, detoksifikasi senyawa xenobiotik dan

transformasi antibiotik dan steroid (Octavio dkk., 2006).

Salah satu jamur berfilamen adalah *Trichoderma* yang mampu mendegradasi lignin untuk pelapukan, dengan melibatkan enzim lignolitik seperti Lignin Peroksidase (LiP), Manganese Peroksidase (MnP) dan Lakase. Jamur *Trichoderma* mudah ditemui di lahan pertanian dan perkebunan. Kelebihan *Trichoderma* antara lain, mudah diisolasi, daya adaptasinya luas dan spektrum substrat beragam (Gusnawaty, 2014).

Jerami padi adalah biomassa yang cocok sebagai substrat untuk produksi lakase karena memiliki kandungan ligninnya sekitar 18%. Kandungan lignin yang tinggi ini dapat menjadi sumber nutrisi yang baik. Selain itu kandungan lignin jerami padi terdegradasi lebih cepat dibanding biomassa lainnya (Sulardjo, 2013). Karena itu, jerami padi baik untuk media produksi lakase.

Teknik memproduksi enzim lakase pada penelitian ini adalah fermentasi kultur padat. Fermentasi kultur padat sesuai untuk produksi enzim oleh jamur berfilamen karena memiliki *water activity* yang rendah (0,5 – 0,6 aw), sehingga lebih menjaga keawetan jamur (Thomas dkk., 2013). Fermentasi kultur padat memungkinkan mikroorganisme tumbuh pada kondisi mendekati atau serupa dengan habitat alaminya, dengan perolehan produk yang relatif lebih baik dari fermentasi kultur terendam.

Beberapa parameter yang mempengaruhi hasil produksi fermentasi kultur padat antara lain waktu fermentasi dan aerasi. Waktu fermentasi berhubungan dengan fasa hidup mikroorganisme sehingga mampu memproduksi enzim dengan optimal. Kelangsungan hidup dan pertumbuhan mikroorganisme dibantu dengan aerasi paksa untuk

mempertahankan kondisi aerobik untuk desorpsi CO₂, dan pengaturan kadar air.

Penelitian ini ditujukan untuk mendapatkan pengaruh laju aerasi paksa terhadap variasi waktu fermentasi kultur padat dengan menggunakan jamur *Trichoderma asperelloides* LBKURCC2 dengan substrat jerami padi pada bioreaktor *tray*.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan yang Digunakan

Bahan-bahan penelitian ini yaitu kultur jamur LBKURCC2 *Trichoderma asperelloides* koleksi Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau, jerami padi yang didapat dari Kabupaten Siak, Provinsi Riau, Komposisi untuk medium Kirk termodifikasi yakni glukosa, CuSO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KH₂PO₄ aqua DM, dan Larutan penyangga asetat pH 5,5.

2.2 Alat yang Digunakan

Alat-alat penelitian ini unit *bioreaktor tray*, neraca analitik, *autoclave*, *shaker*, pengaduk magnetic, cawan petridis, erlenmeyer, oven, *waterbath*, jarum ose, sentrifus, *stopwatch*, mikro pipet berbagai ukuran, pH meter, *double hygrometer*, gelas ukur, gelas kimia, dan lampu spiritus serta instrumen analisis kuantitatif spektrofotometer Genesys 10S UV/Vis dengan kuvet kuarsa.

2.3 Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian terdiri dari variabel tetap dan variabel bebas. Variabel tetap pada penelitian ini yaitu temperatur inkubasi 30±2 °C, larutan buffer asetat pH 5,5 (0,05 M), ukuran substrat 1 cm (Gustina, 2018), penambahan *inducer* CuSO₄.7H₂O 0,5 g/l (Gustina, 2018), tinggi unggun 3 cm (Fajri, 2018), dan laju aerasi 1,5 l/m. Variabel bebas penelitian

ini adalah waktu fermentasi, yakni 6, 8, dan 10 hari.

2.4 Prosedur Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini adalah:

2.4.1 Preparasi Substrat

Substrat berupa jerami padi diperoleh dari pertanian padi di Siak Provinsi Riau, dipotong berukuran 1 cm.

2.4.2 Peremajaan Isolat Jamur

Isolat jamur diremajakan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang dibuat dengan mengupas kentang dan dibersihkan lalu ditimbang sebanyak 20 gram. Kentang tersebut dipotong dadu, kemudian direbus dengan *aqua* DM sebanyak 50 mL hingga mendidih. Kentang difiltrasi dan diambil filtratnya. Agar batang 1,7 gram dan *dextrose* 2 gram ditambahkan ke dalam filtrat. Kemudian *aqua* DM ditambahkan hingga volume 50 mL. Media PDA dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 mL, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121 °C. Media PDA didinginkan dan diinkubasi selama 1 jam di dalam *waterbath* (60°C). Penambahan asam sitrat 10% sebanyak 50 μ L ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan. PDA yang telah membeku didiamkan pada suhu kamar selama 2-3 hari. Bila tidak ada kontaminasi, media PDA ini dapat digunakan.

Miselia jamur diambil dari biakan murni dengan menggunakan jarum ose secara aseptis. Miselia dari jamur yang terdapat diujung jarum ose diinokulasi ke atas media agar miring PDA.

2.4.3 Pembuatan Media Starter Inokulum Jamur

PDA (*Potato Dextrose Agar*) adalah media yang umum untuk pertumbuhan jamur di laboratorium karena memiliki pH yang rendah (pH 4,5 sampai 5,6). Media

PDA dibuat dengan cara yaitu, kentang dikupas dan dibersihkan lalu ditimbang sebanyak 50 gram. Kentang tersebut dipotong dadu dan direbus dengan *aqua* DM sebanyak 100 mL hingga mendidih, kemudian difiltrasi dan diambil filtratnya. Selanjutnya 5 gram *dextrose* dan agar batang 4,30 gram ditambahkan ke dalam filtrat. *Aqua* DM ditambahkan hingga volume 250 mL. Sterilisasi PDA dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121 °C. Setelah diautoklaf, media PDA steril didinginkan dan diinkubasi selama 1 jam di dalam *waterbath* (60 °C) dan ditambahkan asam sitrat 10% sebanyak 1250 μ L. Selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri sebanyak \pm 15 mL, lalu media dibiarkan selama 2-3 hari pada suhu ruang. Bila tidak ada kontaminasi, media dapat digunakan.

Miselia jamur ditambahkan *aqua* DM sebanyak 6 mL dan diserut menggunakan jarum ose. Kemudian sebanyak 0,25 mL diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam media cawan petri. Lalu disebar dengan batang L yang telah steril. Media yang sudah ditanami tersebut, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari.

2.4.4 Pembuatan Media PD

Media *Potato Dextrose* (PD) dibuat dengan kentang dikupas dan dibersihkan lalu ditimbang sebanyak 6 gram. Kentang tersebut dipotong dadu dan direbus dengan menambahkan *aqua* DM sebanyak 15 mL hingga mendidih. Kemudian kentang disaring dan diambil filtratnya, 15 mL filtrat dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi *dextrose* 0,6 gram. Larutan dihomogenkan lalu ditambahkan larutan *buffer* asetat pH 5,5 sebanyak 15 mL, lalu disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Setelah diautoklaf,

media PD diinkubasi selama satu malam. Bila tidak ada kontaminasi, media dapat digunakan.

Media PD yang tidak terkontaminasi dimasukkan plug jamur sebanyak 2 buah. Jamur yang telah tumbuh di media cawan petri di plug dengan plug borer ukuran diameter 1 cm. Larutan yang berisi media PD di *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 3 hari. Bila tidak ada kontaminasi media dapat digunakan.

2.4.5 Produksi Lakase

Substrat yang digunakan berupa jerami Bioreaktor disinfeksi dengan menggunakan etanol 70 %. Kemudian *tray* dan media dasar untuk produksi (yang tertera pada tabel 3.1) disterilkan pada temperatur 121 °C selama 20 menit. Jamur *Trichoderma asperelloides* LBKURCC2 yang berada pada media PD dimasukkan ke dalam *tray* yang telah berisi 40 g substrat. Media dasar untuk produksi ditambahkan sebanyak 30 mL ke masing-masing *tray* dimana pada bioreaktor terdapat 3 *tray*. Setelah dingin *tray* dan media dimasukan ke dalam bioreaktor. Bioreaktor di operasikan dengan variasi laju aerasi yaitu 1,5 L/m. Fermentasi dilakukan sesuai variasi yakni 6, 8 dan 10 hari. Berikut tabel 2.1 yang menunjukkan media fermentasi yang digunakan.

Tabel 2.1 Media Fermentasi (volume 30 mL untuk 40 gram substrat)

| Media | Berat atau volume |
|---|--------------------|
| Substrat | 40 g (Fajri, 2018) |
| Gliserol 1% | 0,3447 mL |
| Tepung kedelai | 0.6921 g |
| Tween 20 | 0,03 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,03 g |
| CuSO ₄ | 0,001308 g |
| MgSO ₄ | 0,061 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,018 g |
| Aqua DM | 30 ml |

2.4.6 Ekstraksi Lakase

Enzim lakase diekstrak dengan cara kultivasi dari media fermentasi, dicuci dengan menggunakan 400 mL larutan bufer asetat pH 5,5 (0,05 M), lalu disaring menggunakan glass woll, selanjutnya disaring dengan kertas saring GFC sehingga diperoleh filtrat. Filtrat diambil sebanyak 10 mL, kemudian disentrifugasi dilakukan selama 20 menit dengan kecepatan 9500 rpm pada suhu 4 °C. Supernatant dipisahkan dan disterilisasi menggunakan *corning sterile syringe filter* 0,45 µm sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim ditambahkan 0,02% NaN₃ untuk mengawetkan enzim selama penyimpanan, kemudian 1 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* untuk mempermudah analisa aktivitas enzim lakase dan disimpan di dalam *freezer*.

2.4.7 Uji Aktivitas Lakase

Lakase akan diukur dengan mencampurkan 1 ml filtrat enzim lakase, 1 ml larutan 0,45 mM ABTS (2,2-azino-di-[3-ethyl-benzo-thiazolin- 6-sulphonic acid]) dalam 2 ml larutan penyangga asetat dengan pH 5,5. Absorbansi diamati pada panjang gelombang 420 nm dengan waktu inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang menggunakan spektrofotometer Genesys 10S UV-Visible. Aktivitas enzim diukur dengan metode Desai dkk (2011) yaitu aktivitas enzim (U/mL) = absorbansi spektrofotometer x volume total larutan / (volume enzim x waktu inkubasi x koefisien enzim ABTS (36.000 M⁻¹ cm⁻¹)).

3. Hasil dan Pembahasan

Media produksi dengan berkomposisi glukosa, tepung kedelai, tween 20, (NH₄)₂SO₄, CuSO₄.5H₂O, MgSO₄.7H₂O dan KH₂PO₄. Setiap komponen media untuk menghasilkan lakase. Fungsi glukosa adalah sebagai

sumber energi dan karbon utama dan juga berperan dalam menunjang pertumbuhan jamur pada awal proses produksi lakase. Tepung kedelai meningkatkan daya ikat air untuk ketersediaan air yang diperlukan mikroorganisme. Faktor penunjang pertumbuhannya seperti mineral Cu^{2+} berperan menginduksi produksi lakase. MgSO_4 berfungsi sebagai sumber Mg^{2+} yang berfungsi sebagai kofaktor enzim. KH_2PO_4 menyumbangkan unsur K^+ yang juga berfungsi sebagai kofaktor enzim.

Produksi dilakukan pada suhu ruang (28-30°C). Hal ini berdasarkan hasil penelitian Risdianto *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa produksi lakase sesuai dengan suhu pertumbuhan jamur, yaitu pada suhu ruang ($\pm 28^\circ\text{C}$). Hasil penelitiannya juga menyatakan bahwa suhu optimum untuk produksi lakase adalah 30-31°C. Proses produksi juga dilakukan dengan adanya cahaya. Kunamneni *et al.* (2007) memaparkan bahwa produksi lakase optimal pada suhu 25°C dengan keberadaan cahaya.

Penelitian menggunakan jerami padi ukuran 1 cm berdasarkan penelitian Gustina (2018). Ukuran yang lebih kecil akan menyebabkan hasil yang lebih rendah karena porositas yang kecil menaikkan temperatur sehingga menyulitkan jamur dalam berespirasi. Sementara ukuran yang terlalu besar akan meminimalisir bidang kontak antara jamur dan substrat sehingga enzim yang dihasilkan tidak maksimal. Variabel utama dari penelitian ini adalah variasi waktu fermentasi yakni, 6, 8 dan 10 hari, selain itu diberikan laju aerasi sebesar 1,5 l/m.

Peningkatan laju aerasi paksa meningkatkan aktivitas enzim. Risdianto (2012) mengatakan bahwa pada laju aerasi 1,5 l/m, oksigen dari udara mencapai jumlah minimum oksigen terlarut yang dibutuhkan, aktivitas enzim yang lebih tinggi didapatkan dibanding dengan variasi

lain yang dilakukannya yakni dengan laju aerasi sebesar 0.5 l/m. Sementara untuk laju aerasi yang lebih besar dari 1,5 l/m, dapat menurunkan aktivitas enzim dikarenakan menurunnya kadar air pada unggun yang mengakibatkan efek negatif bagi pertumbuhan. Aktivitas lakase tertinggi didapat pada waktu produksi selama 8 hari seperti yang tertera pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Aktivitas Ekstrak Enzim Lakase *T. Asperelloides* LBKURCC2 dengan Penambahan Laju Aerasi (1,5 l/m).

| Waktu Fermentasi (Hari) | Aktivitas enzim lakase (U/L) |
|-------------------------|---|
| 6 | $4,78 \times 10^{-6}$ |
| 8 | $7,78 \times 10^{-6}$ |
| 10 | $6,55 \times 10^{-6}$ |

Jamur menyesuaikan keadaan seperti suhu, pH serta kelembaban selama 5 hari awal, selain itu nutrisi masih tersedia di dalam media produksi, sehingga jamur tumbuh dengan nutrisi tersebut. Setelah semua glukosa pada media habis, jamur akan mengkonsumsi lignin pada substrat dan mensintesis enzim lakase. Aktivitas enzim lakase terus meningkat pada hari ke-6 dan ke-7 karena lignin didegradasi oleh jamur dan dikonversi menjadi enzim lakase. Hari ke-8 disinyalir sebagai waktu pertumbuhan terbaik dimana aktivitas enzim telah mencapai puncaknya dan berada pada kondisi stagnan setelah peningkatan yang terjadi pada hari ke-6 dan ke-7. Sementara hari ke-9 dan ke-10 aktivitas enzim lakase menurun secara signifikan disebabkan kenaikan represi katabolit dan menurunnya kelembaban.

4. Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat pada penelitian ini adalah:

Hari ke-8 disinyalir sebagai waktu pertumbuhan terbaik dimana aktivitas

enzim tertinggi didapat sebesar $7,78 \times 10^{-6}$ U/L. Penambahan laju aerasi 1,5 L/m mampu meningkatkan aktivitas enzim karena menyediakan oksigen yang diperlukan dalam proses pada bioreaktor *tray*.

5. Saran

Perlu dilakukan pengukuran lebih banyak terhadap berbagai parameter yang mempengaruhi peningkatan aktivitas enzim terutama pada strategi kontrol pada bioreaktor *tray*. Dengan begitu diharapkan akan semakin menjawab tantangan terhadap optimalisasi proses fermentasi kultur padat.

Daftar pustaka

- Desai, SS., Nityanand, C. Microbial Lakase and their Applications: A review. Asian Journal of Biotechnology. 2011; 3 (2): 98 – 124.
- Fajri, M., Helianty, S., Dahliaty, A. 2018 Produksi Enzim Lakase Oleh Jamur *Trichoderma Asperellum* LBKURCC1 Secara Fermentasi Padat Pada Bioreaktor *Tray*. Jom FTEKNIK 5(2):1-2
- Gusnawaty, H.S., Muhammad T., Leni T., dan Asniah. 2014. Karakterisasi morfologis *Trichoderma sp.* indigenus Sulawesi Tenggara. Jurnal Agroteknos 4(2).
- Gustina, Helianty, S., Dahliaty, A. 2018 Produksi Enzim Lakase Oleh Jamur *Trichoderma Asperellum* LBKURCC1 Dalam Bioreaktor *Tray* Menggunakan Variasi Ukuran Substrat Jerami Padi dan Induser CuSO_4 Pada Fermentasi Kultur Padat. Jom FTEKNIK 5(2):1-2

Octavio, L. C., Ma, P. P. Ricardo, C. I. B. R. J., dan Francisco, V. O. 2006. Lakase. Agricultural and Food Biotechnology, 661(2), 323-340

Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., dan Setiadi, T. (2012). Optimization Of Lakase Production using White Rot Fungi and Agricultural Wastes In Solid-State Fermentation. Journal of Engineering Science ITB 44(2), 93-106.

Sulardjo, (2013). Pemanfaatan limbah padi untuk industri. bahan ajar prodi teknologi hasil pertanian. [Tesis] Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Widya Dharma Klaten, Semarang