



## Pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh fungi *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi

NUR WAHYU INDIRA PANGESTI, ARTINI PANGASTUTI\*, ESTU RETNANINGTYAS N

---

♥ **Alamat korespondensi:**

Jurusan Biologi FMIPA  
Universitas Sebelas Maret  
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126  
Tel. & Fax.: +62-271-664178.  
email: pangastuti\_tutut@yahoo.co.id

Manuskrip diterima: 11 Oktober 2012.  
Revisi disetujui: 2 November 2012.

*Pangesti NWI, Pangastuti A, Retnaningtyas NE. 2012. Effect of additional molasses to xylanase enzyme production by fungi Aspergillus niger with rice straw substrate. Bioteknologi 9: 41-48.* To find alternative materials that cheap and easily available for xylanase production then conducted research on xylanase enzyme production from rice straw and molasses. Rice straw could be used as a xylan substituting substrate which was expensive, while molasses as sources of carbon, nitrogen, minerals and nutrients were needed for microbial growth and enzyme production. The aim of this research was to determine the effect of addition molasses on the production of xylanase enzymes by fungi *Aspergillus niger* with rice straw substrate. The research was divided into three phases, namely preparation, enzyme production and experimental phase. Preparation phase included breeding strains, inoculums preparation, and preparation of fermentation medium. At the enzyme production phase, *A. niger* was grown in a liquid medium with rice straw substrate which made of powder. At this fermentation medium, molasses was added in variant 0%, 1%, 3%, and 5%. Fermentation process was done in a shaker incubator at 37° C, 200 rpm agitation and pH 6. At the experimental phase, reduction of sugar content using DNS method to obtain an enzyme activity that had been produced. The addition of molasses on the rice straw media could increase the growth of fungi *A. niger* but could not significantly increase the activity of xylanase enzyme and gave the longer effect on incubation time. The most optimal concentration of molasses for the production of xylanase enzyme was 1%, the highest enzyme activity amount 0.055 U/mL, with incubation time-56 hours.

**Keywords:** xylanase, *A.niger*, rice straw, molasses

*Pangesti NWI, Pangastuti A, Retnaningtyas NE. 2012. Pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh fungi Aspergillus niger dengan substrat jerami padi.. Bioteknologi 9: 41-48.* Dalam rangka mendapatkan bahan alternatif yang berharga murah dan mudah diperoleh untuk menghasilkan xilanase, maka dilakukan penelitian produksi enzim xilanase dari jerami padi dan molase. Jerami padi dapat digunakan sebagai pengganti substrat xilan yang mahal, sementara molase diperlukan sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral dan nutrisi bagi pertumbuhan mikroba sehingga dapat menghasilkan enzim. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh jamur *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi. Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap persiapan, produksi enzim dan pengujian. Tahap persiapan meliputi pengembangbiakan strain jamur, persiapan inokulum, dan persiapan media fermentasi. Pada tahap produksi enzim, *A. niger* ditumbuhkan dalam medium cair dengan substrat jerami padi yang diserbuk. Pada medium fermentasi, ditambahkan molase dengan variasi 0%, 1%, 3%, dan 5%. Proses fermentasi dilakukan dalam inkubator shaker pada suhu 37°C, agitasi 200 rpm dan pH 6. Terakhir, pengujian reduksi kadar gula menggunakan metode DNS untuk mendapatkan aktivitas enzim yang telah diproduksi. Dari hasil penelitian diketahui bahwa penambahan molase pada media jerami padi dapat meningkatkan pertumbuhan jamur *A. niger*, tetapi tidak dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase secara signifikan dan membutuhkan waktu inkubasi lebih lama. Konsentrasi yang paling optimal dari molase untuk produksi enzim xilanase adalah 1% dengan aktivitas enzim tertinggi sebesar 0,055 U/mL dan dengan waktu inkubasi 56 jam.

**Kata kunci:** xilanase, *A. niger*, jerami padi, molase

## PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat dimanfaatkan untuk pemutihan kertas, campuran pakan ternak, penjernihan sirup, pembuatan gula xilosa, dan lain-lain. Penggunaan xilanase untuk mengurangi pemakaian khlorin dalam pemutihan kertas, telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi dan sekarang telah digunakan pada beberapa pabrik kertas (Bourbonnais et al. 1997; Ruiz-Arribas et al. 1995). Xilanase merupakan produk bioteknologi yang memiliki kegunaan cukup beragam, tetapi produksinya masih menghadapi kendala, antara lain masih kurangnya ketersediaan biakan mikroba unggul dan rendahnya pengetahuan tentang teknologi produksi enzim. Banyak pakar negara maju mengakui bahwa negara yang kaya akan keanekaragaman hayati, merupakan sumber mikroba yang potensial untuk bioproses (Richana et al. 2000).

Penggunaan mikroba sebagai penghasil enzim memiliki beberapa keuntungan, diantaranya biaya produksi relatif murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, mempunyai kecepatan tumbuh yang tinggi serta mudah dikontrol (Fogarty dan Weshoff 1983). Salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim xilanase adalah fungi *Aspergillus niger*. Untuk mengoptimalkan produksi enzim perlu adanya pengoptimalan faktor-faktor yang berperan dalam produksi enzim tersebut, antara lain: media fermentasi, suhu, aerasi, agitasi, pH, serta strain yang digunakan. Media fermentasi memegang peranan penting. Untuk skala besar diperlukan media fermentasi yang murah dan mudah diperoleh serta dapat menghasilkan enzim yang diharapkan (Trismilah et al. 2003).

Xilanase mampu menghidrolisis xilan menjadi gula xilosa. Untuk menghasilkan xilanase, maka substrat yang digunakan harus mengandung xilan. Penggunaan xilan murni dalam produksi xilanase skala besar tidak ekonomis karena mahal. Xilan banyak terdapat pada limbah pertanian dan industri makanan (Rani dan Nand 1996; Beg et al. 2001). Salah satu limbah pertanian di Indonesia yang belum dimanfaatkan adalah jerami padi. Jerami merupakan limbah pertanian terbesar serta belum sepenuhnya dimanfaatkan. Kandungan xilan jerami padi cukup tinggi yaitu sebesar 20% (Roberto et al. 2003). Jerami padi juga

mengandung sekitar 34,2% selulosa, 24,5% hemiselulosa dan 23,4% lignin (Wyman et al. 1996).

Untuk mengoptimalkan produksi xilanase, diperlukan penambahan sumber karbon pada media fermentasi untuk membantu inisiasi pertumbuhan fungi. Setelah pertumbuhan fungi meningkat, diharapkan produksi xilanase juga meningkat. Beberapa sumber karbon yang sering digunakan adalah molase, sereal, pati, glukosa, sukrosa, dan laktosa (Richana et al. 2000). Molase merupakan hasil samping industri gula dan alkohol. Molase bersifat sangat korosif di alam dan meningkatkan kadar BOD (*Biological Oxygen Demand*) dan COD (*chemical oxygen demand*). Di sisi lain molase dapat menjadi salah satu media fermentasi yang baik, karena masih mengandung kadar gula 62% (Dellweg 1983).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan meliputi: *Aspergillus niger*, substrat jerami padi, PDA, media prekultur, media produksi, molase, dan reagen DNS (*Dinitrosalisilic Acid*). Alat utama yang digunakan adalah spektrofotometer UV-VIS.

### Cara kerja

**Sterilisasi alat dan bahan.** Alat dan media yang akan digunakan untuk percobaan disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

**Pembuatan substrat jerami padi.** Jerami basah disortasi, lalu dicuci dan dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Setelah setengah kering, kemudian dioven dengan suhu 50°C. Setelah kering dan dapat dipatahkan, kemudian diblender. Didapatkan serbuk jerami yang akan digunakan sebagai substrat.

**Pemeliharaan biakan.** *A. niger* dipelihara di media miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 hari. Setelah tumbuh sebagian biakan disimpan dalam lemari pendingin (4°C) sebagai biakan stok (*stock culture*) dan sebagian lagi digunakan sebagai kultur kerja I.

**Penentuan kepadatan spora.** *A. niger* dari kultur kerja I diinokulasikan secara merata pada media PDA miring. Penentuan kepadatan spora dilakukan dengan menambahkan 5 mL akuades steril dalam inokulum, kemudian dikerik. Hasilnya ditampung dalam tabung reaksi, digojog sampai homogen. Kepadatan spora

diukur menggunakan hemasitometer berdasarkan cara Hadioetomo (1993) yang dilakukan setiap 24 jam selama 144 jam (6 hari). Spora yang paling padat digunakan sebagai kultur kerja II.

**Penyiapan inokulum.** Penyiapan inokulum dilakukan dengan memindahkan biakan dari kultur kerja II ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 50 mL media prekult. Media prekult kemudian diinkubasi pada *incubator shacker* dengan kecepatan 200 rpm dan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diinokulasikan pada media fermentasi sebanyak 130 spora/mL.

**Pembuatan media produksi.** Bubuk jerami padi 2% (b/v) ditambah dengan 0,6 g ekstrak khamir, 5 mL urea 1%, 0,005 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , molase dengan variasi konsentrasi 0%, 1%, 3%, 5% dan *buffer* pH 6 hingga volumenya 50 mL. Inokulum yang telah disiapkan diambil 1 mL untuk dibiakkan dalam medium produksi, kemudian dikocok dengan *incubator shacker* pada 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 88 jam.

**Pengukuran aktivitas xilanolitik.** Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan mengukur gula pereduksi yaitu kadar xilosanya. Banyaknya xilosa yang terbentuk diukur dengan metode DNS (Miller 1959). Pengukuran aktivitas xilanase dilakukan dengan menambahkan 1 mL *Oat Spelts Xylan* 1% dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL ekstrak kasar enzim dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit. Sebanyak 3 ml larutan DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah didinginkan diukur nilai asorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama dengan sampel, hanya penambahan ekstrak kasar enzimnya setelah campuran ditambahkan pereaksi DNS.

**Pengukuran pertumbuhan *A. Niger*.** Pengukuran pertumbuhan kapang *A. niger* dilakukan dengan mengukur berat kering sel. Miselia yang diperoleh diletakkan pada kertas saring dan dikeringkan dengan suhu 100°C, kemudian ditimbang sehingga diperoleh berat kering sel. Hubungan antara berat kering sel dengan waktu pertumbuhan digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan. Penambahan berat kering diplotkan pada sumbu Y, sedangkan waktu inkubasi diplotkan pada sumbu X.

#### Analisis data

Hasil pengukuran aktivitas enzim xilanase oleh *A. niger* berupa unit aktivitas/mL sampel (U/mL) pada masing-masing perlakuan

dibandingkan dengan aktivitas enzim xilanase pada kontrol. Analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji scheffe dengan signifikansi 0,05.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penyiapan bahan

Jerami padi yang digunakan sebagai substrat diambil dari sawah yang baru saja dipanen. Potongan jerami disortasi, kemudian dicuci dan dikeringkan dibawah sinar matahari terlebih dahulu untuk mengurangi kadar air dengan ditutup kain hitam yang berfungsi untuk menghindari penguapan yang terlalu cepat dan menghindari kontak langsung dengan pancaran gelombang ultra violet yang dapat merusak bahan. Setelah kadar air berkurang, pengeringan dilanjutkan di dalam oven bersuhu 50°C sampai dapat dipatahkan. Kemudian bahan diblender hingga menjadi serbuk jerami. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas bidang permukaan sehingga kemungkinan kontak antara substrat dan enzim semakin tinggi, yang mengakibatkan hidrolisis semakin cepat.

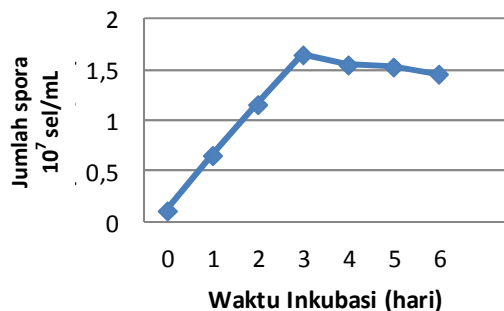
### Pertumbuhan *A. niger* pada media PDA

Pertumbuhan fungi sangat berkaitan dengan perkembangbiakan yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah atau volume sel. Perkembangbiakan fungi secara aseksual secara umum adalah melalui pembentukan spora, sehingga untuk mengetahui pertumbuhannya dapat dilakukan perhitungan kepadatan spora (Suriawiria 1999). Kepadatan spora diukur menggunakan hemasitometer berdasarkan cara Hadioetomo (1993) yang dilakukan setiap hari berturut-turut hingga didapat spora yang paling padat untuk dijadikan kultur kerja.

Hubungan antara jumlah spora *A. niger* dengan waktu perhitungan spora ditunjukkan pada Gambar 1, tampak peningkatan jumlah spora *A. niger* sampai hari keenam.

Berdasarkan Gambar 1., jumlah spora *A. niger* mengalami peningkatan mulai hari pertama, yaitu sebesar  $1,12 \times 10^7$  sel/mL sampai hari kedua memasuki fase eksponensial yang merupakan fase perbanyakan sel. Dan mencapai puncak stasioner pada hari ketiga, dengan jumlah spora dari *A. niger* tertinggi yaitu  $1,65 \times 10^8$  sel/mL, dan selanjutnya digunakan sebagai sumber inokulum untuk produksi enzim. Setelah hari keempat jumlah spora *A. niger* mulai berkurang tetapi relatif masih stabil sampai hari keenam dengan jumlah spora  $1,46 \times 10^8$  sel/mL.

Pada hari keempat inilah mulai terjadi fase kematian.



**Gambar 1.** Hubungan antara jumlah spora *A. niger* dengan waktu inkubasi (hari)

### Produksi enzim xilanase

Xilanase merupakan enzim yang bersifat inducible, sehingga akan diproduksi oleh mikroorganisme sebagai respon terhadap ketersediaan xilan dalam medium. Xilanase tersebut digunakan oleh mikroorganisme untuk merombak xilan dalam medium menjadi gula yang lebih sederhana sehingga dapat digunakan untuk pertumbuhan. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri dan fungi. Pada penelitian ini, mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi enzim xilanase adalah fungi *A. niger*. Meskipun pada umumnya enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada suhu yang lebih tinggi dibanding jamur, namun aktivitas xilanase dari golongan jamur jauh lebih tinggi dari bakteri. Selain itu, level produksi yang tinggi dan kemudahan dalam kultivasi membuat jamur lebih banyak digunakan dalam produksi enzim skala industri (Bergquist et al. 2002).

Xilanase dapat dihasilkan dengan fermentasi cair ataupun padat (Haltrich et al. 1996). Pada penelitian ini, digunakan fermentasi pada medium cair untuk memudahkan pengambilan ekstrak kasar enzim yang akan diukur menggunakan spektrofotometer. Keuntungan fermentasi pada medium cair adalah komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah. Selain itu, oksigen, pH dan nutrisi dapat tersebar secara merata karena adanya proses agitasi (Rachman 1989; Suhartono 1989). Fermentasi dilakukan pada *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi sebesar 200 rpm. Fungsi shaker adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium sehingga kontak antara media dan inokulum semakin banyak dan

homogen. Hal ini penting dilakukan untuk menjaga kondisi biakan tetap aerobik. Jika difusi oksigen dalam medium lancar, kadar DO (oksigen terlarut) dalam medium akan cukup mendukung pertumbuhan sel secara aerobik. Berdasarkan penelitian Richana (2006) menggunakan bakteri alkalo-termofilik, agitasi untuk menghasilkan xilanase optimum berkisar 150-200 rpm.

Tahap awal sebelum inokulum masuk pada media produksi, terlebih dahulu dilakukan tahap penyiapan inokulum. Yang digunakan sebagai inokulum adalah biakan fungi pada agar miring. Fungi dari agar miring dipindahkan pada medium cair yang komposisinya hampir sama dengan medium produksi. Tujuan tahap ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga mempersingkat *lag phase* (fase adaptasi) dan pertumbuhan fungi pada medium produksi akan maksimum dalam waktu yang relatif singkat.

Medium untuk produksi xilanase selain mengandung karbon dan nitrogen, biasanya mengandung beberapa mineral (seperti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{NO}_3^-$ ) dan ion logam (seperti  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Haltrich et al. 1996). Penambahan ekstrak khamir pada medium produksi berfungsi sebagai penyedia asam-asam amino tunggal, *growth factor* dan berbagai vitamin yang dibutuhkan sel. George et al. (2001) melakukan optimasi sumber nitrogen untuk produksi xilanase pada *Thermomonospora sp.* Penelitian tersebut membandingkan aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh tripton, pepton, amonium klorida, sodium nitrat, dan ekstrak khamir. Berdasarkan penelitian tersebut, sumber nitrogen yang menghasilkan produksi xilanase tertinggi adalah ekstrak khamir.

Penambahan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pada media jerami padi berfungsi sebagai sumber Ca untuk stabilisasi dinding sel. Dalam media juga ditambahkan urea. Penambahan urea 1% bertujuan untuk memenuhi kebutuhan sumber nitrogen sehingga pertumbuhan sel fungi dapat berlangsung dengan cepat dan produksi xilanase dalam media akan lebih cepat pula. Namun, penggunaan urea dapat menyebabkan pH media meningkat karena urea sebagai nitrogen organik akan mengalami hidrolisis sehingga melepaskan ammonia dan karbondioksida (Roberto et al. 1996). Perubahan pH pada saat fermentasi dapat menyebabkan metabolisme mikroorganisme terhenti karena enzim terdenaturasi sehingga tidak dapat mengubah substrat (Hawcroft 1987; Bauman 2004). Oleh karena itu diperlukan

penstabilan pH, yang dapat dilakukan dengan penambahan buffer.

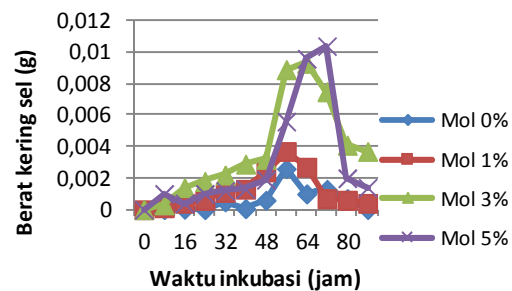
Konsentrasi substrat jerami yang dimasukkan dalam media produksi adalah sama baik pada kontrol, molase 1%, molase 3%, maupun molase 5%. Hal ini dilakukan karena dalam penelitian ini hanya untuk mengetahui pengaruh molase sebagai sumber karbon tambahan dalam media jerami padi terhadap produksi xilanase. Menurut Haltrich et al. (1996), faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi fermentasi cair pada produksi xilanase adalah jenis substrat, medium fermentasi dan kondisi fermentasi seperti suhu, pH, agitasi, waktu inkubasi dan zat tambahan sebagai sumber karbon. Pada produksi enzim xilanase, penambahan molase pada media sebagai sumber karbon dimungkinkan dapat mempengaruhi pertumbuhan fungi, aktivitas enzim dan lamanya waktu inkubasi.

#### **Pengaruh penambahan molase terhadap pertumbuhan *A. niger* pada media produksi**

Dalam pertumbuhannya, *A. niger* membutuhkan berbagai nutrisi yang harus terkandung dalam medianya. Penambahan molase pada media jerami padi dapat mempengaruhi pertumbuhannya. Menurut Prescott dan Dunn (1987), molase yang merupakan hasil samping dari proses pembuatan gula, masih mengandung gula 62%, air 20%, non-gula 10%, dan garam-garam anorganik (abu) 8%. Kandungan gula yang tinggi pada molase merupakan sumber karbon bagi *A. niger* untuk metabolisme dan pertumbuhan, sehingga dapat ditambahkan dalam media jerami padi sebagai pemicu pertumbuhan *A. niger*.

Pertumbuhan dan perkembangbiakan *A. niger* ditandai dengan bertambahnya berat dan jumlah sel. Pertumbuhan dapat diukur berdasarkan berat kering sel karena fungi yang dipakai pada penelitian ini dapat dihitung hanya dengan perhitungan berat kering sel. Penambahan berat kering sel selama proses fermentasi menunjukkan pertumbuhan fungi, sehingga dapat dibuat profil pertumbuhan fungi. Penambahan berat kering sel diplotkan pada sumbu Y, sedangkan waktu inkubasi diplotkan pada sumbu X (Gambar 2).

Selain untuk melihat pengaruh penambahan molase terhadap pertumbuhan *A. niger*, kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui hubungan antara pertumbuhan fungi dengan aktivitas xilanase yang dihasilkan.



**Gambar 2.** Hubungan antara berat kering sel *A. niger* (gram) terhadap waktu inkubasi (jam) pada penambahan berbagai variabel konsentrasi molase

*Aspergillus niger* mengalami pertumbuhan dan perkembangbiakan sel hingga mencapai puncaknya pada suatu waktu tertentu dan setelah itu pertumbuhannya akan mengalami penurunan. Dari kurva pertumbuhan dapat dilihat bahwa antara jam ke-0 sampai jam ke-24 terjadi fase lag (adaptasi). Pada fase ini peningkatan berat kering sel belum signifikan karena fungi dalam proses adaptasi sehingga nutrisi yang ada di dalam medium jerami belum digunakan untuk proses pertumbuhan. Lalu, antara jam ke-24 sampai jam ke-48 terjadi peningkatan berat kering sel yang signifikan. Pada saat ini terjadi fase eksponensial. Antara jam ke-48 sampai jam ke-80, rata-rata sampel mengalami puncak pertumbuhan. Rata-rata pertumbuhan mulai menurun setelah jam ke-80. Pada fase inilah terjadi fase kematian. Nutrisi dalam medium jerami padi berkurang sehingga banyak miselia mengalami kematian.

Rata-rata berat kering sel kontrol (molase 0%) lebih rendah dibandingkan berat kering sel perlakuan (molase 1%, 3%, dan 5%). Pada kontrol, puncak pertumbuhan dicapai dengan berat kering sel sebesar 0,0026 g, sedangkan pada media jerami padi yang ditambahkan perlakuan (molase 1%, 3%, dan 5%) puncak pertumbuhan masing-masing dicapai dengan berat kering sel 0,0037 g; 0,0075 g; dan 0,0104 g. Puncak berat kering sel tertinggi didapatkan pada perlakuan dengan penambahan molase 5%.

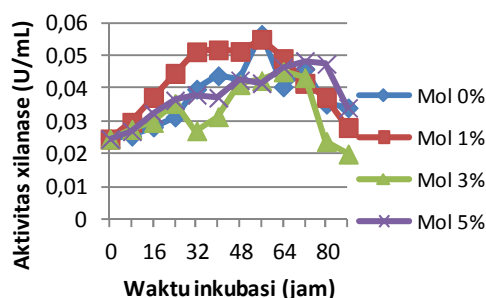
Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa semakin besar penambahan molase semakin besar pula berat kering sel yang didapat. Penambahan molase menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Berarti, sebagai sumber karbon bagi *A. niger*, penambahan molase pada media jerami dapat meningkatkan berat kering miselia. Didukung

oleh hasil penelitian Pamungkas (2000) bahwa penambahan molase juga dapat meningkatkan berat segar jamur tiram putih. Selain itu menurut Garraway and Evans (1984), memerlukan bahan-bahan organik dan anorganik untuk keperluan hidupnya khamir. Khamir mendapatkan energi dari ikatan karbon untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan yang berasal dari molekul sederhana seperti gula, asam organik atau alkohol. Karena molase mengandung senyawa gula, maka molase dapat menyediakan energi yang dibutuhkan untuk metabolisme di dalam sel sehingga pertumbuhan fungi dapat optimal.

#### *Pengaruh penambahan berbagai variasi konsentrasi molase terhadap aktivitas enzim xilanase*

Adanya pengaruh penambahan molase pada media jerami padi terhadap produksi xilanase dapat dideteksi dengan mengukur aktivitas enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler selama pertumbuhan sel. Perubahan yang terjadi akibat hidrolisis pada substrat limbah pertanian akan terlihat dari degradasi bahan berlignoselulosa menjadi gula pereduksi (Dewi 2002).

Aktivitas enzim xilanase menyatakan seberapa besar kemampuan enzim xilanase dalam menguraikan atau mengkonversi xilan menjadi produknya yaitu xilosa. Aktivitas ini dihitung dalam satuan *International Unit* (IU), berdasarkan jumlah mikromol xilosa yang dibebaskan permenit pada kondisi pengujian. Metode yang digunakan adalah metode DNS (Miller 1959).



**Gambar 3.** Hubungan waktu inkubasi (jam) terhadap aktivitas enzim xilanase (U/mL) pada penambahan berbagai variabel konsentrasi molase

Pengujian aktivitas xilanase dilakukan pada masing-masing enzim yang dihasilkan pada penambahan berbagai konsentrasi molase. nilai aktivitas xilanase yang didapat merupakan hasil

dari pengukuran aktivitas enzim kasar. Supernatan yang digunakan untuk pengukuran aktivitas xilanase merupakan enzim kasar yang belum dimurnikan. Dari uji ini dapat diketahui pengaruh penambahan molase terhadap aktifitas xilanase (Gambar 3).

Gambar 2 dan 3 menunjukkan bahwa hasil aktivitas enzim ini berhubungan dengan hasil analisa berat kering sel *A. niger*. Dari kurva diketahui bahwa produksi enzim xilanase dari *A. niger* mengikuti pola *growth-associated product formation*. Pada kondisi lingkungan pertumbuhan tinggi maka aktivitas xilanase yang dihasilkan juga tinggi dan sebaliknya pada kondisi pertumbuhan menurun maka terjadi penurunan enzim yang dihasilkan, karena produksi enzim berfungsi mendukung pertumbuhan sel. Enzim mulai dihasilkan pada awal pertumbuhan sel. Penurunan pertumbuhan *A. niger* ditandai dengan turunnya berat kering sel yang diikuti dengan penurunan aktivitas enzim xilanase.

Berdasarkan Gambar 3, aktivitas xilanase telah terukur pada jam ke-0, karena inokulum telah menghasilkan xilanase pada *starter*. *Starter* diinokulasikan ke dalam medium fermentasi pada jam ke-24 dan kemungkinan pada saat itu *starter* mencapai fase log. Berdasarkan Brock et al. (1994), enzim telah dihasilkan pada fase log dan akan terakumulasi pada fase stasioner.

Untuk lebih detailnya, aktivitas enzim dianalisa menggunakan Anova satu arah dengan signifikansi 0,05. Hasil analisis data menunjukkan bahwa dengan penambahan molase yang merupakan sumber karbon tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase dari fungi *A. niger* dengan substrat jerami padi. Hasil rata-rata aktivitas enzim antara masing-masing perlakuan menunjukkan tidak berbeda nyata; dimana nilai  $F_{hitung}$  sebesar 2,070 dengan nilai probabilitas sebesar  $0,118 > 0,05$ .

Penambahan molase pada media jerami mengakibatkan peningkatan pertumbuhan *A. niger* tetapi tidak meningkatkan aktivitas xilanase. Rata-rata aktivitas xilanase yang dihasilkan antara kontrol dan perlakuan tidak berbeda signifikan. Pada dasarnya, penambahan molase dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk *A. niger* karena kandungan gulanya yang masih tinggi. Karbon merupakan nutrisi penting yang dapat digunakan *A. niger* untuk pertumbuhannya. Tetapi, dalam konsentrasi tinggi molase dapat menyebabkan aktivitas xilanase menurun. Hal ini kemungkinan dikarenakan pemecahan molase sebagai sumber

karbon menghasilkan panas sehingga semakin banyaknya molase dalam media menyebabkan suhu dalam media semakin meningkat. Menurut Supriyati et al. (1998) bahwa dalam aktivitasnya kapang menggunakan karbohidrat sebagai sumber karbon. Pemecahan karbohidrat akan diikuti pembebasan energi, karbondioksida dan air. Panas yang dibebaskan menyebabkan suhu substrat meningkat.

Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim salah satunya adalah suhu. Pada suatu reaksi enzimatik, suhu mempengaruhi kestabilan enzim. Kenaikan suhu sedikit di atas suhu optimum dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim, sedangkan pada suhu jauh di atas suhu optimum enzim akan mengalami denaturasi hingga kehilangan aktivitas katalitiknya (Shuler dan Kargi 2002).

Selain itu, penambahan molase pada konsentrasi yang berlebih dapat mengakibatkan terjadinya represi enzim. Menurut Haltrich et al. (1996) xilosa dan xilooligosakarida dapat mengakibatkan represi katabolit, namun juga dapat berfungsi sebagai inducer xilanase pada konsentrasi yang rendah. Represi enzim terjadi bila pada suatu medium terdapat dua atau lebih substrat (sumber karbon), sehingga substrat yang lebih sederhana akan terlebih dahulu digunakan untuk metabolisme sedang substrat yang lebih kompleks akan ditekan sintesisnya (Jawetz et al. 1976; Kulkarni et al. 1999; Bauman, 2004).

### **Pengaruh penambahan molase terhadap waktu inkubasi**

Waktu inkubasi pada setiap mikroorganisme berbeda-beda. Berdasarkan Gambar 3, penambahan molase menyebabkan waktu inkubasi untuk menghasilkan enzim xilanase tertinggi lebih lama daripada tanpa penambahan molase (kontrol). Pada kontrol dibutuhkan waktu selama 56 jam untuk menghasilkan xilanase tertinggi. Sedang pada sampel molase 1%, 3%, dan 5% untuk menghasilkan xilanase tertinggi dibutuhkan waktu masing-masing selama 56 jam; 64 jam; dan 72 jam. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan molase memberikan waktu inkubasi yang lebih lama daripada tanpa penambahan molase.

Penambahan molase 5% membutuhkan waktu inkubasi yang paling lama. Banyak sedikitnya molase mempengaruhi waktu inkubasi untuk memproduksi xilanase. Molase merupakan sumber karbon yang lebih sederhana dibandingkan xilan jerami padi, sehingga fungsi menghidrolisis molase terlebih dahulu

dibandingkan xilan jerami padi. Dengan demikian, Xilanase akan dikeluarkan oleh *A. niger* setelah ketersediaan molase semakin menipis. Bauman (2004) menyatakan, jika di dalam suatu medium terdapat dua atau lebih substrat (sumber karbon) maka substrat yang lebih sederhana akan terlebih dahulu digunakan daripada substrat yang lebih kompleks, sehingga enzim penghidrolisis substrat yang lebih kompleks akan ditekan.

### **KESIMPULAN**

Penambahan molase dengan konsentrasi 1%, 3%, dan 5% pada media jerami padi dapat meningkatkan pertumbuhan fungi *A. niger* tetapi tidak dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase secara signifikan dan memberikan efek waktu inkubasi yang lebih lama. Konsentrasi molase yang paling optimal untuk produksi enzim xilanase adalah konsentrasi 1% dengan aktivitas enzim tertinggi yang dihasilkan sebesar 0.055 U/mL dan diperoleh pada waktu inkubasi jam ke-56.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Bauman RW. 2004. Microbiology. Benjamin Cummings, Toronto.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbia xylanase and their industrial application; a review. J Appl Microbiol Biotechnol 56: 326-338.
- Bourbonnais R, Paice M.G, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. 1997. Reactives of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. Appl Environ Microbiol 63: 4632.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1994. Biology of microorganism. 7<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Dewi KH. 2002. Hidrolisis limbah hasil pertanian secara enzimatik. Akta Agrosia 5 (2): 67-70.
- Fogarty WC, Weshoff DC. 1983. Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Pub., London.
- Garraway MO, Evans RC. 1984. Fungal nutrition and physiology. John Wiley and Sons, New York.
- George SP, Ahmad A, Rao MB. 2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. Bios Technol 78: 221-224.
- Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Zupancic S. 1996. Production of fungal xylanases. Bios Technol 58: 137-161.
- Hawcroft D. 1987. Diagnostic enzymology: analytical chemistry by open learning. John Wiley & Sons, London.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagen for determination of reducing sugar. Anal Chem 31: 426-429
- Pamungkas. 2000. Studi penambahan molase dan tepung jagung dalam media tanam terhadap pertumbuhan dan hasil jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). [Skripsi]. Universitas Widyagama, Malang.
- Rachman A. 1989. Pengantar tekologi fermentasi. Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Rani S, Nand K. 1996. Development of cellulose-free xylanase

- producing anaerobic consortia or the use lignocellulosic wastes. *Enzyme Microb Technol* 18:23-28.
- Richana N, Lestari P, Thontowi A, Rosmimik. 2000. Seleksi isolat bakteri lokal penghasil xilanase. *J Mikrobiologi Indonesia* 5 (2): 54-56.
- Richana N, Lestina P. 2006. Produksi xilanase untuk biokonversi limbah biji kedelai. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. 388-396.
- Roberto IC, Mussatto SI, Rodrigues R. 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind Crops Prod* 17:171-176
- Ruiz-Arribas A, Fernandez-Abalos JM, Sanches P, Gardu AL, Santamaria RI. 1995. Over production, purification and biochemical characterization of xylanase I (xys 1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol* 61 (6): 2414-2419.
- Shuler ML, Kargi F. 2002. Bioprocess engineering. In: Sukandar U, Syamsuriputra AA, Lindawati, Trusmiyadi Y. (ed) *Kinerja amilase *Aspergillus niger* ITBCC L74 dalam sakarifikasi pati ubi kayu menjadi bioetanol*. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia – SNTKI 2009*.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Trismilah, Deden, Sumaryanto. 2003. Produksi xilanase. *J Sains dan Teknologi* (2): 66-69.
- Wyman CE. 1996. Ethanol production from lignocellulosic biomass: Overview. In: Wyman CE. (ed). *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC.