

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Perlakuan Substrat

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa aktivitas sakarifikasi enzim hasil optimasi dengan perlakuan substrat berbeda nyata ($p < 0.05$) antar perlakuan (lampiran 4). *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (ETo) menghasilkan aktivitas sakarifikasi enzim paling tinggi yaitu 247.43 $\mu\text{mol/ml}$. *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan sawit perlakuan (PTn) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan sawit tanpa perlakuan (PTo) menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Adapun polard NaOH (PPn) menghasilkan enzim dengan aktivitas terendah yaitu sekitar 120.9 $\mu\text{mol/ml}$. Begitu juga halnya dengan aktivitas spesifik, PTo dan PTn menghasilkan aktivitas yang tidak berbeda nyata satu sama lain ($p > 0.05$) namun aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Aktivitas spesifik yang dihasilkan oleh PTo adalah 2519 $\mu\text{mol/ml}$ dan PTn sekitar 2452 $\mu\text{mol/ml}$. Tabel 2 memperlihatkan aktivitas sakarifikasi dan aktivitas spesifik enzim selulase yang dihasilkan oleh semua perlakuan.

E. javanicum BS4 merupakan kapang yang berhasil diisolasi dari inti buah sawit (Purwadaria *et al.* 1994). Komposisi tandan dan inti buah sawit tidak jauh berbeda sehingga kemiripan lingkungan yang ada dengan habitat aslinya mampu membuat *E. javanicum* BS4 bekerja lebih optimal dibandingkan lainnya. Aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh enzim ini lebih besar dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan oleh enzim yang dihasilkan pada substrat

tandan tanpa perlakuan. Hasil penelitian ini berlawanan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Rakhmani *et al.* (2005). Beliau melaporkan bahwa aktivitas FPase yang dihasilkan oleh kapang ini yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan lebih rendah dibandingkan yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH. Hasil uji tahap pertama ini juga memperlihatkan bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 lebih tinggi dibandingkan yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240. Hal ini sejalan dengan penelitian Purwadaria *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa *E. javanicum* BS4 menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi yang lebih besar dibandingkan *Aspergillus niger* NRRL 337 pada substrat bungkil sawit dan lumpur sawit.

Aktivitas spesifik menggambarkan aktivitas enzim untuk setiap mg enzim. Tingginya aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 pada tandan tanpa perlakuan diakibatkan rendahnya protein yang dihasilkan. Protein terukur yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 pada substrat tandan sawit sebesar 72 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 2). Akan tetapi besarnya aktivitas spesifik enzim ini yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan tidak berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan oleh kapang ini yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH. Begitu pula dengan aktivitas sakarifikasi dan protein yang dihasilkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Enzim yang dihasilkan oleh kapang *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard menghasilkan enzim dengan

Tabel 2 Aktivitas sakarifikasi selulase dari kapang *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 pada substrat tandan dan polard

Sampel	Kandungan protein ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas sakarifikasi ($\mu\text{mol/ml}$)*	Aktivitas spesifik sakarifikasi ($\mu\text{mol/mg}$)*
ETn	128	150.6 ^c	1221 ^b
ETo	257	247.4 ^a	978 ^{b,c}
PTn	83	201.8 ^b	2452 ^a
PTo	72	180.7 ^{b,c}	2519 ^a
PPn	178	120.9 ^d	692 ^c

Keterangan :

ETn = *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH

ETo = *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan NaOH

PTn = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH

PTo = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan NaOH

PPn = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard perlakuan NaOH

* Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

aktivitas paling rendah. Rendahnya aktivitas ini mungkin berhubungan dengan lebih rendahnya kandungan selulosa dalam polard dan derajat kristalinitas. Selulase merupakan enzim yang produksinya diinduksi oleh suatu induser yang salah satunya adalah selulosa. Polard yang dicuci dengan NaOH mengandung selulosa sebesar 26.9% (Purwadaria *et al.* 2004) sedangkan tandan tanpa pencucian mengandung selulosa sebesar 32.6% (Darwis 1988). Selain itu polard juga mengandung gula pereduksi yang tinggi sehingga merepresi pembentukan enzim selulase. Adapun lebih tingginya protein yang dihasilkan pada perlakuan ini dibandingkan perlakuan lain dengan kapang yang sama berhubungan dengan tingginya kandungan protein dalam polard itu sendiri.

Lebih tingginya kandungan protein dan aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan menjadikan dasar pemilihan perlakuan ini untuk digunakan pada tahap penelitian selanjutnya. Aktivitas sakarifikasi dan protein yang dihasilkan kapang dengan perlakuan ini berbeda nyata dengan yang dihasilkan pada tandan dengan perlakuan. Adapun *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan tanpa perlakuan dipilih untuk penelitian selanjutnya disebabkan aktivitas spesifiknya tertinggi. Enzim memiliki aktivitas sakarifikasi yang rendah tetapi dengan aktivitas spesifik yang tinggi, peningkatan protein akan meningkatkan produksi enzim. Walaupun protein dan aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan dengan perlakuan NaOH lebih tinggi akan tetapi perbedaannya tidak berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan tanpa perlakuan.

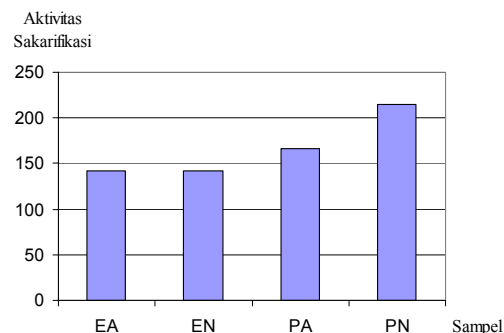
Optimasi Produksi Enzim dengan Variasi Sumber Nitrogen dalam Medium

Hasil uji RAL dua faktorial menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara kapang dengan sumber nitrogen ($p > 0.05$) terhadap aktivitas enzim (Lampiran 4). Perbedaan sumber nitrogen juga tidak menghasilkan aktivitas sakarifikasi dan spesifik yang berbeda nyata ($p > 0.05$). Nitrat menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 178.9 $\mu\text{mol/ml}$ sedangkan amonium menghasilkan aktivitas rata-rata sebesar 154.4 $\mu\text{mol/ml}$. Perbedaan nyata ($p < 0.05$) terjadi antar kapang yang digunakan. *P. nalgiovense* SS240 menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar

191.0 $\mu\text{mol/ml}$ sedangkan *E. javanicum* BS4 menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar 142.3 $\mu\text{mol/ml}$.

Berdasarkan Gambar 2 sampel PN menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi tertinggi yaitu sebesar 215.3 $\mu\text{mol/ml}$ dengan kandungan protein 135 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini memperkuat penelitian Rajoka (2004) yang melaporkan bahwa penggunaan natrium nitrat sebagai sumber nitrogen menghasilkan aktivitas FPase paling tinggi dibanding sumber nitrogen lainnya pada bakteri *Cellulomonas flavigena*. Natrium nitrat, kalium nitrat dan amonium nitrat merupakan sumber nitrogen terbaik karena *C. flavigena* memiliki kandungan nitrat reduktase dengan aktivitas yang tinggi yang diinduksi oleh ion NO_3 dan direpresi oleh ion amonium bebas dalam medium tumbuh. Selain itu senyawa ini mampu meningkatkan pertumbuhan massa sel dan produksi FPase.

Natrium nitrat mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan amonium sulfat pada kedua kapang yang digunakan. Secara rata-rata, natrium nitrat menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar 178.9 $\mu\text{mol/ml}$ sedangkan amonium menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 154.4 $\mu\text{mol/ml}$. Krishna (1999) melaporkan bahwa penggunaan amonium sulfat ataupun natrium nitrat memberikan efek yang sama terhadap aktivitas enzim. Laju produksi selulase meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi amonium sulfat dan natrium nitrat dalam medium sampai 1% (w/w). Pada penelitian ini kadar protein rata-rata yang dihasilkan oleh sumber nitrogen yang berasal dari nitrat lebih besar dibandingkan yang dihasilkan dari sumber nitrogen amonium sulfat dan urea. Penelitian yang dilakukan



Gambar 2 Aktivitas sakarifikasi *E. javanicum* BS4 (E) dan *P. nalgiovense* SS240 (P) dengan sumber nitrogen amonium sulfat + urea (A) dan natrium nitrat (N)

oleh Kashem *et al.* (2004) menunjukkan bahwa penggunaan KNO_3 mampu menginduksi produksi secara maksimal protein ekstraseluler, gula pereduksi dan persentase sakarifikasi.

Hasil uji ini dijadikan acuan bagi penelitian selanjutnya. Kapang *P. nalgiovense* SS240 dengan sumber nitrogen natrium nitrat (PN) digunakan sebagai sampel yang digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya. Kapang ini menghasilkan aktivitas sakarifikasi tertinggi dibandingkan yang lain dan produksi enzim yang besar. Walaupun aktivitas spesifiknya lebih kecil dibandingkan perlakuan PA namun perbedaan ini tidak nyata ($p>0.05$). Aktivitas spesifik untuk perlakuan PA adalah sebesar 2072 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ sedangkan untuk perlakuan PN adalah 1682 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Apabila dibandingkan aktivitas sakarifikasi dari kedua kapang yang digunakan *P. nalgiovense* SS240 menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 191.0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ sedangkan *E. javanicum* BS4 hanya menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 142.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$.

Optimasi Produksi Enzim dengan Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen dalam Medium

Optimasi produksi selulase pada *P. nalgiovense* SS240 pada tahap ini dilakukan dengan merubah konsentrasi sumber nitrogen yang terdapat dalam medium cair Mandels. Aktivitas sakarifikasi hasil optimasi produksi selulase pada tandan sawit dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen disajikan pada Tabel 3. Konsentrasi nitrogen sebanyak 0.017% (w/v) menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi tertinggi dibandingkan perlakuan lain yaitu 172.4 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ namun aktivitas spesifiknya paling rendah yaitu 958 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dikarenakan besarnya kadar protein yang dihasilkan, sedangkan aktivitas spesifik tertinggi dicapai oleh perlakuan dengan

konsentrasi 0.068% (w/v) yaitu sebesar 1284 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dengan aktivitas sakarifikasi sebesar 170.0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. Produksi selulase sensitif terhadap sumber nitrogen dan konsentrasi nitrogen dalam medium (Desai *et al.* 1982 di dalam Fadel 2000). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa penggunaan nitrogen organik atau anorganik seperti ekstrak khamir, tepung kedelai mempengaruhi produksi selulase. Aktivitas CMCase dan β -glukosidase disajikan pada Gambar 3a. Berdasarkan analisis ragam diketahui bahwa variasi konsentrasi nitrogen tidak memberikan perbedaan yang nyata antar perlakuan (Lampiran 4) tetapi medium dengan konsentrasi nitrogen 0.017% (w/v) menghasilkan aktivitas CMCase dan β -glukosidase paling tinggi yaitu sebesar 0.027 U/ml dan 0.046 U/ml. Medium dengan konsentrasi 0.034% dan 0.068% menghasilkan aktivitas CMCase sebesar 0.015 U/ml dan 0.017 U/ml serta aktivitas β -glukosidase sebesar 0.034 U/ml dan 0.046 U/ml. Adapun aktivitas spesifik kedua enzim ini disajikan pada Gambar 3b. Pada gambar tersebut terlihat bahwa aktivitas spesifik CMCase dari enzim yang dihasilkan oleh kapang *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentarsi sumber nitrogen 0.017% (w/v) lebih tinggi dibandingkan perlakuan lain yaitu sebesar 0.147 U/mg protein. Sedangkan aktivitas spesifik β - glukosidase paling tinggi dihasilkan oleh enzim yang berasal dari kapang dengan konsentrasi 0.068% (w/v) yaitu sebesar 0.279 U/mg protein.

Protein yang dihasilkan makin rendah ketika konsentrasi nitrogen dinaikkan. Rendahnya protein yang diproduksi mungkin diakibatkan efek represi katabolit oleh nitrogen namun protein yang terepresi bukan protein enzim. Hal ini terlihat dari aktivitas enzim yang tinggi pada konsentrasi nitrogen yang tinggi. CIS2, gen yang mengkodekan γ -glutamyl-transpeptidase yang berperan dalam katabolisme glutation diinduksi oleh L-

Tabel 3 Aktivitas selulase *P. nalgiovense* SS240 pada berbagai konsentrasi sumber nitrogen

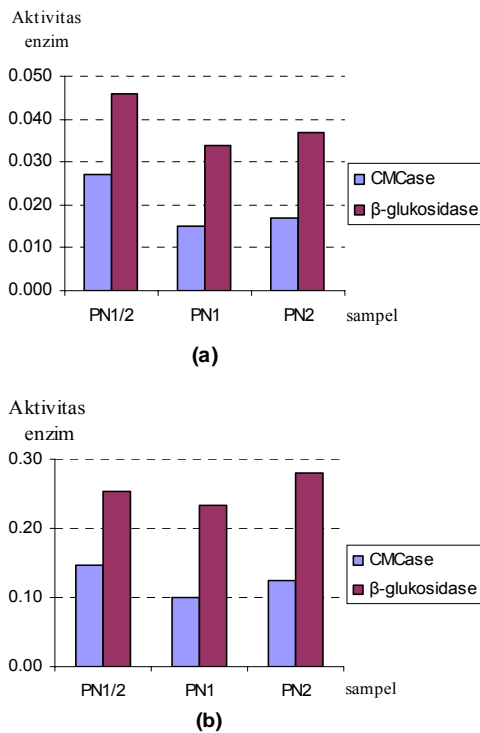
Sampel	Kandungan protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Aktivitas sakarifikasi ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	Aktivitas spesifik sakarifikasi ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
PN $\frac{1}{2}$	180	172.4	958
PN1	148	160.3	1086
PN2	136	170.0	1284

Keterangan :

- PN $\frac{1}{2}$ = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.017% (w/v)
- PN1 = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.034% (w/v)
- PN2 = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.068% (w/v)

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 3 Aktivitas CMCCase dan β-glukosidase (a) dan spesifik CMCCase dan β-glukosidase (b) *P. nalgiovensis* SS240 dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen

glutamat dan L-prolin namun direpresi oleh NH₄⁺ atau L-glutamin (Springael dan Penninckx 2003). Karboksimetil selulase (CMCase) merupakan bagian dari endoglukanase yang memutus selulosa dengan mekanisme endo. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Fadel (2000) pada CMCase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger*, glukosa dan maltosa mampu menginduksi produksi enzim ini. Hasil penelitian lain menunjukkan glukosa dalam konsentrasi rendah tidak merepresi sintesis CMCase namun ketika glukosa yang ditambahkan dalam konsentrasi tinggi (10%) sintesis CMCase dihambat (Sanyal *et al.* 1988 di dalam Fadel 2000).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses perlakuan secara kimiawi terhadap tandan sawit tidak mampu meningkatkan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovensis* SS240. Tandan sawit menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan polard pada kapang *P. nalgiovensis* SS240.

Sumber nitrogen yang paling baik bagi produksi enzim selulase adalah natrium nitrat pada kapang *P. nalgiovensis* SS240 dengan aktivitas sakarifikasi sebesar 215.3 μmol/ml. Amonium sulfat 0.14% + urea 0.03% dan natrium nitrat 0.20% tidak memberikan pengaruh yang nyata (p>0.05) terhadap aktivitas enzim. Pada tahap ketiga aktivitas CMCase, β-glukosidase dan sakarifikasi tertinggi dihasilkan oleh perlakuan dengan konsentrasi nitrogen sebesar 0.017% yaitu dengan aktivitas sebesar 0.027 U/ml, 0.046 U/ml dan 172.4 μmol/ml. Namun perbedaan konsentrasi nitrogen juga tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas enzim (p>0.05).

Saran

Kapang *P. nalgiovensis* SS240 mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi pada substrat tandan sawit. Salah satu kelemahan organisme mutan adalah kembalinya sifat yang dimiliki seperti tipe liarnya sehingga diperlukan penyimpanan yang baik agar tidak kembali seperti tipe liarnya. Selain itu, aplikasi langsung enzim terhadap pakan ternak perlu dilakukan untuk mengetahui keefektifan dan efisiensi enzim sebagai suplemen pakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Campbell L, Bedford MR. 1992. Enzyme application for monogastric feeds: a review. *Can. J. Anim. Sc.* **72**:449-466.
- Darwis AA, Bunasor T, Hartato L, Alisyahbana M. 1988. Studi Limbah Lignoselulolitik di Indonesia. Di dalam: Irawadi TT. 1991. Produksi enzim ekstraseluler (selulase dan xilanase) dari *Neurospora sitophila* pada substrat limbah padat kelapa sawit [disertasi]. Bogor. Fakultas Pascasarjana. IPB.
- Desai JD, Desai AJ, Patel NP. 1982. Production of cellulases and β-glucosidase by shake culture of *Scytalidium lignicola*. Di dalam: Fadel M. 2000. Production physiology of cellulases and β-glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *J Biol Sci* **1**: 401-411.