

PRODUKSI ENZIM AMILOGLUKOSIDASE DARI *Aspergillus niger*

Fatmawati Nur*

*Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar
email: fatenurkhalik@yahoo.com.

Abstrak: Semua mikroorganisme memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi, dan faktor esensial pertumbuhan. Molekul-molekul sederhana seperti gula dan komponen lain yang larut di sekitarnya dapat langsung digunakan, tetapi molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel. Untuk memecahkan molekul besar menjadi molekul sederhana, mikroba mengeluarkan enzim tertentu ke lingkungannya yang lazim disebut enzim ekstraselluler misalnya amiloglukosidase. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi pH dan waktu fermentasi optimum *Aspergillus niger* dengan memanfaatkan selaput biji markisa sebagai substrat untuk menghasilkan enzim amiloglukosidase. Perlakuan pH yang diberikan adalah 4.0, 4.5, 5.0, dan 5.5, serta waktu fermentasi 3, 4, 5, dan 6 x 24 jam. Hasil yang diperoleh memperlihatkan kemampuan *Aspergillus niger* menghasilkan enzim amiloglukosidase melalui uji aktivitas metode Somogyi-Nelson adalah pada pH 4.5 senilai 433.675 unit, waktu fermentasi 5 x 24 jam senilai 529.513 unit.

Keywords: *Aspergillus niger*, Enzim, Amiloglukosidase, pH, Waktu Fermentasi

PENDAHULUAN

Aspergillus terdapat di mana-mana, baik di daerah kutub maupun daerah tropik, dan hampir pada semua substrat (Fraizer, 1978). Disamping adanya species yang patogen, ada pula species yang dimanfaatkan oleh manusia dalam perindustrian. Aspergillus banyak digunakan dalam studi tentang enzimologi, biokimia, pembuatan asam sitrat, asam glukonat, dan beberapa asam organik lainnya dengan mempergunakan *Aspergillus niger* (Lay, 1984).

Seperti halnya mikroorganisme yang lain, pertumbuhan *Aspergillus niger* dipengaruhi oleh berbagai keadaan fisik dan kimiawi. Karena enzimlah yang

mengkatalisis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan proses kehidupan, maka keadaan-keadaan lingkungan yang mempengaruhi enzim dan karenanya juga mempengaruhi pertumbuhannya (Pelczar, 1985).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikroorganisme adalah konsentrasi ion H^+ (pH), suhu, kadar air dan aktivitas air (a_w), potensial oksidasi reduksi, komposisi makanan, dan adanya komponen inhibitor (Sa'id, 1987).

Setiap mikroorganisme memiliki suhu optimum untuk pertumbuhannya, misalnya *Aspergillus niger* pada suhu 37.8 °C, dan masa inkubasinya seperti kapang pada umumnya berkisar pada 3 x 24 jam sampai 7 x 24 jam. Sedangkan pH yang optimum berlaku pada semua kapang yaitu sekitar 4.5 – 5.5 yang berarti bahwa pH aktivitas enzim yang mempengaruhi pertumbuhannya berada pada kisaran tersebut, karena pada dasarnya pertumbuhan mikroorganisme itu adalah akibat adanya kerja enzim.

Molekul-molekul sederhana seperti gula dan komponen lain yang larut di sekelilingnya dapat langsung digunakan. Molekul-molekul lain yang lebih kompleks seperti selulosa, pati, dan protein harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel (Hardjo, 1989). Untuk memecahkan molekul besar menjadi molekul sederhana, mikroba mengeluarkan enzim tertentu ke lingkungannya sesuai dengan jenis zat yang akan diuraikan. Produksi enzim ini merupakan kebutuhan utama untuk pertumbuhan normal mikroba (Rahman, 1992).

Enzim yang dikeluarkan oleh mikroorganisme ke lingkungan, lazim disebut enzim ekstraselluler. Jenis enzim inilah yang mula-mula diusahakan secara komersial, misalnya amiloglukosidase yang sangat penting digunakan dalam bidang produksi alkohol, roti, juice, dan pati. Mikroorganisme yang berkemampuan baik untuk menghasilkan enzim ini adalah jenis *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, dan *Endomycopsis bispora* (Rahman, 1992).

Buah markisa atau siuh (*Passiflora edulis*) adalah salah satu jenis buah-buahan yang tumbuh subur di Indonesia, khususnya di Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan. Umumnya buah ini diolah dalam industri dengan dibuat sirup, soda, jelly, dan selai. Bagian buah yang dimanfaatkan untuk keperluan industri adalah sari buah berupa air yang dibungkus selaput (Smith, 1993). Bahan buangan berupa kulit, biji, dan selaput yang masih mengandung air, protein, lemak, serat, karbohidrat, serta mineral, telah

diusahakan pengolahannya (Pelczar,1985), misalnya kulit dan biji yang diolah menjadi makanan ternak, sedangkan endocarp yang mengandung pektin dapat dijadikan bahan untuk jelly (Smith, 1993).

Melihat kandungan zat-zat yang terdapat pada limbah industri markisa di atas, maka sangat besar kemungkinannya dapat digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba.

Kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan mensintesis produk pada suatu lingkungan tertentu ditentukan oleh perilaku genetika mikroorganisme tersebut. Pengembangan proses fermentasi yang berhasil sangat tergantung pada strain yang baik, serta pengetahuan mengenai efek parameter lingkungan terhadap pertumbuhan sel dan pembentukan produknya (Winarno, 1995).

TUJUAN PENELITIAN

1. Untuk mengetahui kondisi pH yang optimum untuk fermentasi *Aspergillus niger* pada substrat selaput biji markisa.
2. Untuk mengetahui waktu fermentasi optimum untuk fermentasi *Aspergillus niger* pada substrat selaput biji markisa.

METODELOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yang tujuannya mengarah kepada kondisi optimum fermentasi *Aspergillus niger* pada substrat selaput biji markisa dengan cara mendeteksi aktivitas enzim amiloglukosidase pada tiap pH dan masa fermentasi yang diperlakukan pada medium fermentasinya. Urutan tahapan penelitian sebagai berikut :

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dari gelas disterilkan dengan oven pada suhu 180 °C selama 2 jam. Sedangkan alat dari logam seperti ose dan jarum spoit disterilkan dengan api. Untuk sterilisasi bahan dan medium dilakukan pada otoklaf suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium PDA (Potato Dextrose Agar)

Medium PDA ditimbang sesuai kebutuhan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan air suling sampai volume yang dibutuhkan. Selanjutnya dipanaskan sambil diaduk, kemudian disterilkan. Ditambahkan 16% Asam tartrat 10% sebelum dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 5 ml tiap tabung, ditutup dengan kapas, dan dimiringkan dalam keadaan masih panas sampai agar dalam tabung reaksi membeku.

Pengolahan Selaput Biji Markisa

Selaput biji markisa dipisahkan dari kulitnya, kemudian dikeringkan pada sinar matahari. Bahan kering dihaluskan, dan ditimbang sesuai keperluan untuk medium fermentasi.

Pembuatan Inokulum

Aspergillus niger yang ditumbuhkan pada medium PDA umur 4 x 24 jam, suhu kamar ditambahkan cairan yang terdiri dari 0.1% Tween 80 dan 0.9% NaCl fisiologis, kemudian dikeruk dan dikocok hingga semua spora mikroorganismenya lepas. Suspensi ini digunakan sebagai inokulum yang akan dimasukkan ke dalam medium fermentasi.

Medium Fermentasi

Medium fermentasi terdiri dari : tepung selaput biji markisa (8%), NaH_2PO_4 (4.7%), CaCl_2 (0.1%), KCl (0.02%), dan $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02%) diatur pHnya menjadi 4.0, 4.5, 5.0, dan 5.5, kemudian ditambahkan buffer sitrat. Medium disterilkan pada otoklaf suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit, diinokulasikan dengan *Aspergillus niger* dari inokulum sebanyak 1 ml pada volume 100 ml, difermentasikan pada shaker, suhu kamar dengan dua kali ulangan. Pengambilan sampel enzim dilakukan pada waktu fermentasi 3, 4, 5, dan 6 x 24 jam yang diekstraksi dengan sentrifuge 3000 rpm selama 10 menit, kemudian ditentukan aktivitas enzim amiloglukosidase secara Saccharifying.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semua mikroorganisme memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi, dan faktor esensial pertumbuhan. Unsur-unsur nutrisi dasar tersebut disamping menyediakan energi juga digunakan untuk pembentukan konstituen seluler (Britz, 1985).

Penggunaan *Aspergillus* sebagai organisme pengujian berbagai zat sering dilakukan, karena jamur ini peka sekali terhadap unsur-unsur kimia tertentu, misalnya *Aspergillus niger* yang aslinya berwarna hitam menjadi berwarna abu-abu jika tembaga yang tersedia dalam tempat tumbuhnya kurang dari 2.5 mg. Warna hitam berubah menjadi warna kuning jika jamur tersebut tidak diberi tembaga sama sekali (Dwijoseputro, 1978).

Ciri khas yang dimiliki jamur ini ialah cara bagaimana konidia terbentuk, sedang untuk membedakan spesies yang satu dengan yang lain digunakan terutama kriteria warna (Dwijoseputro, 1978).

Kenampakan konidiphora berupa panjang pendek, besar kecil, serta halus kasarnya, menjadi kriteria dalam perbedaan spesies (Dwijoseputro, 1978). Begitu pula halnya keragaman konidia terutama dalam hal warna dan ukuran. Konidia berbentuk bulat dapat ditemukan pada *Aspergillus niger*, hemisperikel pada *Aspergillus tricola*, clips pada *Aspergillus elevatus*, dan bentuk kolumnar pada *Aspergillus flavus* (Prescott, 1959).

Dwijoseputro (1978) mengelompokkan *Aspergillus niger* ke dalam suatu sistematik sebagai berikut : regnum Plantarum, divisio Mycota, sub divisio Eumycotina, classis Ascomycetes, sub classis Euascomycetidae, ordo Eurotiales, familia Euroticeae, genus *Aspergillus*, dan spesies *Aspergillus niger*.

Penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan limbah selaput biji markisa sebagai substrat/media fermentasi untuk *Aspergillus niger*, sehingga mikroorganisme tersebut dapat mengeluarkan metabolit sekundernya berupa enzim amiloglukosidase yang dapat mendegradasi pati pada substrat menjadi glukosa sebagai sumber karbonnya, sehingga dapat diserap masuk ke dalam selnya.

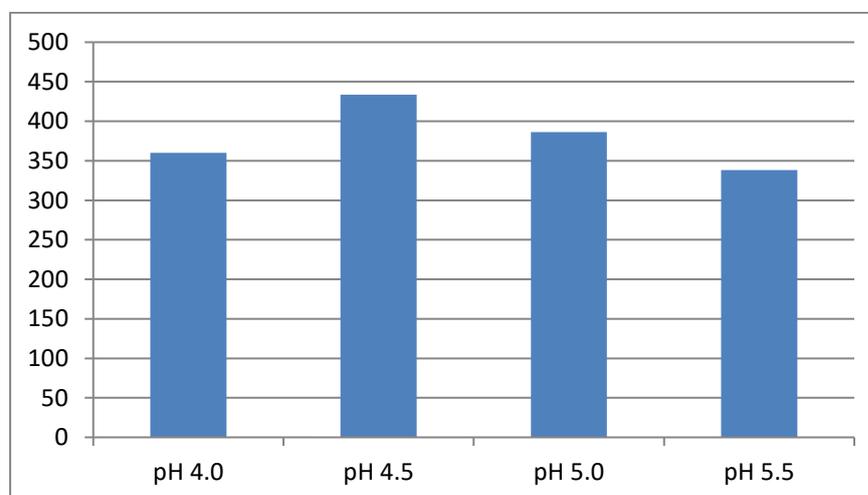
Kondisi pH sangat menentukan pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder sebuah mikroorganisme karena pH berpengaruh pada fungsi membran dan enzim. Perubahan pH medium dapat mempengaruhi sifat permeabel sel (Hardjo, 1989).

Pengujian aktivitas enzim untuk mengukur kondisi optimum pH memperlihatkan hasil terbaik pada pH 4.5 senilai 433.675 unit aktivitas enzim yang berbeda nyata dengan perlakuan pH yang lain (tabel 1).

Tabel 1. Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi pH pada Substrat Selaput Biji Markisa

pH	4.0	4.5	5.0	5.5
Unit	359.975 c	433.675 a	386.238 b	338.250 d

Hal ini disebabkan karena pada pH tersebut kondisi yang tepat untuk gugus pemberi atau penerima proton pada sisi katalitik enzim yang dihasilkan berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan.

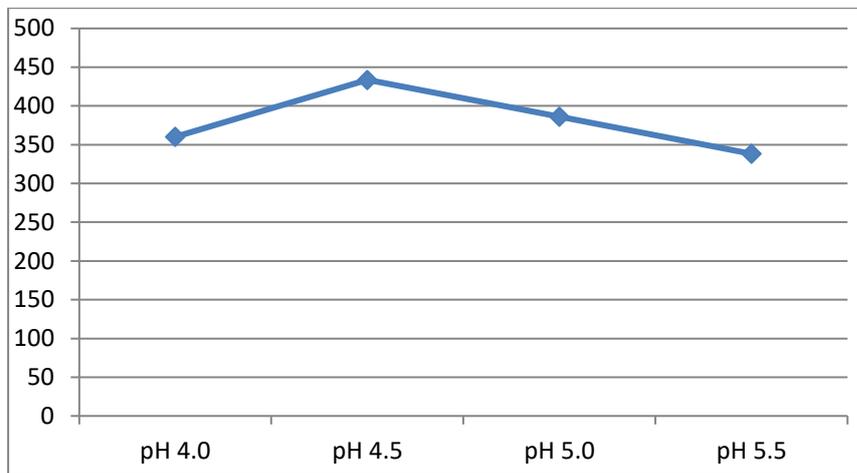


Gambar 1. Diagram Batang Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi pH pada Substrat Selaput Biji Markisa

Perlakuan pH sebelum dan setelah 4.5 menunjukkan nilai yang lebih rendah dapat pula dilihat pada diagram batang aktivitas enzim amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* pada gambar 1 dan gambar 2. Berkurangnya aktivitas terjadi karena laju reaksi disebabkan karena pH tinggi atau rendah mempengaruhi permeabilitas sel.

Sewaktu pertumbuhan mikroorganisme, konsentrasi ion H^+ (pH) dalam medium mempengaruhi protein (enzim dan sistem transport) yang terdapat pada membran sel. Struktur protein berubah bila pH dalam medium berubah. Mikroorganisme

memiliki enzim yang berfungsi pada pH tertentu (Lay,1984). Rentang pH optimum berbagai mikroorganisme adalah sebagai berikut: (1) Bakteri memiliki pH optimum 6.5 – 7.5, pH minimum 3 - 5, dan pH maksimum 8 - 10. (2) Khamir memiliki pH optimum 4.5 – 5.5, pH minimum 1 - 2, dan pH maksimum 7 - 8. (3) Kapang memiliki pH optimum 4.5 – 5.5, pH minimum 1 - 2, dan pH maksimum 7 - 8. (Moat, 1979).



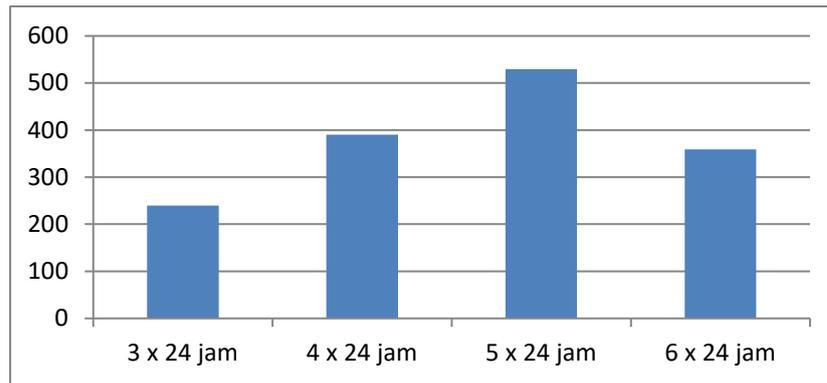
Gambar 2. Grafik Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi pH pada Substrat Selaput Biji Markisa

Meninjau waktu fermentasi, enzim amiloglugosidase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* memperlihatkan aktivitas tertinggi pada waktu fermentasi 5 x 24 jam senilai 529.513 unit yang berbeda nyata dengan perlakuan waktu fermentasi yang lain tabel 2).

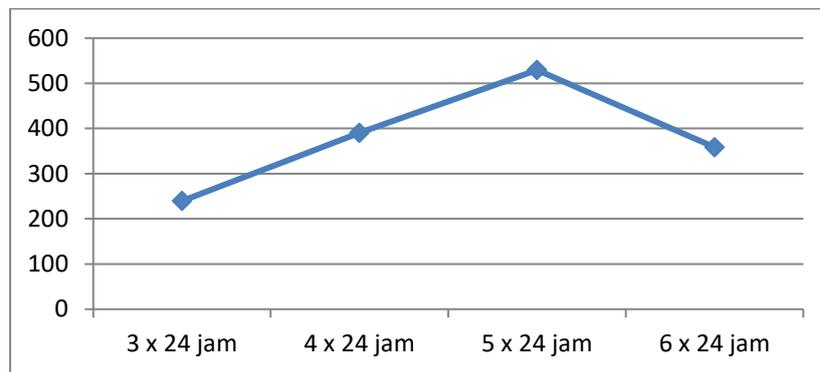
Tabel 2. Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi Waktu fermentasi pada Substrat Selaput Biji Markisa

Waktu	3 x 24 jam	4 x 24 jam	5 x 24 jam	6 x 24 jam
Unit	239.525 d	390.363 b	529.513 a	358.738 c

Setelah melewati fase eksponensial yang merupakan proses fisiologis tertinggi, nutrien mulai berkurang sehingga *Aspergillus niger* membutuhkan nutrien alternatif yang memerlukan enzim untuk mengubahnya menjadi nutrien sederhana sehingga dapat diserap masuk ke dalam selnya.



Gambar 3. Diagram Batang Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi Waktu Fermentasi pada Substrat Selaput Biji Markisa



Gambar 4. Grafik Aktivitas Enzim Amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* dengan Variasi Waktu Fermentasi pada Substrat Selaput Biji Markisa

Seperti halnya mikroorganismenya yang lain, *Aspergillus niger* memiliki kurva pertumbuhan dengan tiga fase yang berbeda, yakni masing-masing fase awal (lag phase), fase eksponensial (log phase), dan fase stasioner. Fase awal adalah sejak inokulasi sel pada medium dan merupakan periode adaptasi. Selama fase ini massa sel dapat berubah tanpa adanya suatu perubahan jumlah sel. Fase Logaritmik/fase eksponensial dicirikan oleh suatu garis lurus antar Ln X melawan waktu. Periode ini adalah keadaan pertumbuhan yang seimbang atau mantap, dengan laju pertumbuhan spesifik, konstan. Fase stasioner terjadi bila seluruh sel berhenti membagi diri atau bilamana sel-sel hidup telah mencapai keseimbangan dengan sel-sel mati, yakni dengan kecepatan kematian. Meskipun pertumbuhan telah terhenti, metabolisme dan akumulasi produk masih terjadi. Massa sel total dapat tetap konstan, tetapi jumlah

sel hidup cenderung menurun. Pada saat ketahanan hidupnya menurun, lisis mungkin terjadi dan massa sel akan menurun (Sa'id, 1987).

Untuk keperluan tersebut, *Aspergillus niger* mengeluarkan enzim amiloglukosidase beserta enzim amylase lain untuk mengubah pati pada substrat menjadi glukosa. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Smith (1993) bahwa enzim sebagian besar diproduksi selama fase pertumbuhan pasca eksponensial.

Seperti halnya mikroorganisme yang lain, *Aspergillus niger* memiliki kurva pertumbuhan dengan tiga fase yang berbeda, yakni masing-masing fase awal (lag phase), fase eksponensial (log phase), dan fase stasioner. Fase awal adalah sejak inokulasi sel pada medium dan merupakan periode adaptasi. Selama fase ini massa sel dapat berubah tanpa adanya suatu perubahan jumlah sel. Fase Logaritmik/fase eksponensial dicirikan oleh suatu garis lurus antar $\ln X$ melawan waktu. Periode ini adalah keadaan pertumbuhan yang seimbang atau mantap, dengan laju pertumbuhan spesifik, konstan. Fase stasioner terjadi bila seluruh sel berhenti membagi diri atau bilamana sel-sel hidup telah mencapai keseimbangan dengan sel-sel mati, yakni dengan kecepatan kematian. Meskipun pertumbuhan telah terhenti, metabolisme dan akumulasi produk masih terjadi. Massa sel total dapat tetap konstan, tetapi jumlah sel hidup cenderung menurun. Pada saat ketahanan hidupnya menurun, lisis mungkin terjadi dan massa sel akan menurun (Sa'id, 1987).

Pada waktu fermentasi 6 x 24 jam, enzim yang dihasilkan memperlihatkan penurunan aktivitas (gambar 3 dan gambar 4). Hal ini disebabkan oleh adanya produk akhir amiloglukosidase berupa monomer glukosa dan kemudian menghambat sintesis enzim selanjutnya. Hal ini diperkuat oleh Sa'id (1987) yang mengatakan bahwa kebanyakan enzim yang diproduksi selama pertumbuhan sel, menjadi tertekan bilamana produk akhir terbentuk.

Setiap mikroba memiliki suhu optimum untuk pertumbuhannya, misalnya *Aspergillus niger* pada suhu 37,8 °C. Tetapi hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi pada suhu kamar (25 °C - 28°C) dapat menghasilkan enzim amiloglukosidase lebih baik pada keadaan suhu lebih rendah dari suhu optimum untuk pertumbuhan. Pada suhu di atas 30 °C, sintesis enzim akan menurun karena energi dari respirasi lebih banyak digunakan untuk pembentukan spora daripada untuk pembentukan miselium (Hardjo, 1989).

Produksi enzim amiloglukosidase oleh *Aspergillus niger* ini dilakukan pada fermentasi medium cair, karena menurut Smith (1993) suatu keuntungan dari fermentasi medium cair itu ialah tidak terlalu banyak menghasilkan enzim lain yang tidak diharapkan. Selain itu medium cair mempunyai beberapa kelebihan antara lain jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur, dan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan dapat dikontrol.

Dalam penelitian ini fermentasi medium cair difermentasi pada penangas goyang (shaker). Shaker menyebabkan agitasi dalam medium sehingga dapat mempercepat transfer nutrisi ke dalam sel dan mencampur cairan fermentasi sehingga membentuk suspensi yang seragam (Hardjo, 1989).

KESIMPULAN

1. Kondisi pH yang optimum untuk fermentasi *Aspergillus niger* pada substrat selaput biji markisa adalah pada pH 4.5 senilai 433.675 unit.
2. Waktu fermentasi optimum untuk fermentasi *Aspergillus niger* pada substrat selaput biji markisa adalah pada 5 x 24 jam senilai 529.513 unit.

DAFTAR PUSTAKA

- Britz, M.L. dan Demain, A.L., 1985, "*Regulation of Metabolite Synthesis*" dalam "*Comprehensive Biotechnology*", (Moo-Young, M.ed), Pergamon Press, New York.
- Dixon, E.G. dan Webb, M.A., 1979, "*Enzymes*", Longman, Australia.
- Dwidjoseputro, D., 1978, "*Pengantar Mikologi*", Alumni, Bandung.
- Fraizer, W.C. dan Westhoff, D.C., 1978, "*Food Microbiology*", Tata Mc Graw Hill Publishing Company Ltd, New Delhi.
- Hardjo, S., Indrasti, N.S. dan Bantacut, T., 1989, "*Biokonversi : Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian*", PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Lay, B. W., 1994, "*Analisis Mikroorganisme di Laboratorium*", Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Page, D.S., 1985, "*Prinsip-prinsip Biokimia*", Terjemahan oleh R. Soendoro, Erlangga, Jakarta.

Pelczar, M.J. dan Chan., 1985, "*Dasar-dasar Mikrobiologi 1*", Terjemahan oleh R.S. Hadioetomo, T.

Imas, S.S. Tjitrosoepomo, S.L. Angka, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Prescott, S.C., 1959, "*Industrial Microbiology*", Mc Graw Hill Publishing Company Ltd, New York.

Rahman, A., 1992, "*Teknologi Fermentasi*", Arcan, Jakarta.

Sa'id, E.G., 1987, "*Bioindustri: Penerapan Teknologi Fermentasi*", Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.

Smith, I.E., 1993, "*Prinsip Bioteknologi*", Terjemahan oleh V.F. Sumo, B.Sumantri, dan Subono, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Winarno, F.G., 1995, "*Enzim Pangan*", Gramedium Pustaka Utama, Jakarta.