PRODUKSI ALFA-AMILASE OLEH ASPERGILLUS ORYZAE DALAM MEDIA PATI SAGU (*Metroxylon sp.*)

S. Pudjiraharti, L.Z. Udin dan A.T. Karossi

Puslitbang Kimia Terapan-LIPI, Jl. Sangkuriang,Bandung 40135

INTISARI

Produksi α-amilase dalam media pati sagu menggunakan kapang Aspergillus oryzae telah dilakukan dalam fermentor Biostat-B dengan volume kerja 2 liter. Kondisi fermentasi diadaptasi dari kondisi fermentasi menggunakan fermentor Biotech volume kerja 4 L pada suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm dan agitasi 300 rpm. Konsentrasi inokulum yang digunakan 2,5 - 3% v/v. Aktifitas spesifik enzim maksimum antara 300-460 U/g protein diperoleh pada fermentasi dengan konsentrasi inokulum 2,5%, sedangkan aktifitas enzim spesifik maksimum 850 U/g protein diperoleh pada fermentasi dengan konsentrasi inokulum 3%. Aktifitas enzim tertinggi dicapai pada sekitar hari ke 5 atau ke 6 fermentasi.

Fermentasi menggunakan berbagai konsentrasi inokulum pada skala labu erlenmeyer dilakukan untuk mencari konsentrasi inokulum yang dapat menghasilkan aktifitas enzim maksimal. Konsentrasi-konsentrasi inokulum yang digunakan 5,0; 7,5; 10 dan 12,5% v/v. Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C dan pengocokan 120 rpm. Aktifitas spesifik enzim tertinggi 12.640 U/g protein dihasilkan pada fermentasi menggunakan inokulum 12,5% v/v yang dicapai pada hari ke-5.

Aplikasi ke dalam fermentor 2 liter dengan kondisi fermentasi suhu 30°C, aerasi 1,5 vvm dan agitasi 500 rpm menunjukkan produksi enzim yang lebih singkat (satu hari fermentasi) untuk mencapai aktifitas tertinggi antara 1.000-1.300 U/g protein.

ABSTRACT

The production of alpha-amylase in sago starch media by A. oryzae have been performed in Biostat-B stirred tank fermentor with working volume of 2 L. The condition was adapted from the fermentation using Biotech fermentor: working volume 4 Liters, temperature 27°C, aeration 0,75 vvm and agitation of 300 rpm. The concentrations of inoculum added into the medium were 2,5 - 3% v/v. The maximum enzyme spesific activites around 300-460 U/g protein was obtained at fermentation using inoculum concentration of 2,5%, while the maximum enzyme specific activity of 850 U/g protein was also obtained at fermentation using inoculum concentration of 3%. The maximum enzyme specific activity was achieved at day 5 or 6 of fermentation.

Fermentation using various concentrations of inoculum in erlenmeyer flask scale was carried out to investigate the inoculum concentration which resulting maximal enzyme activity. The concentrations used were 5.0%; 7.5%; 10%; and 12.5% v/v. Fermentation was done at 30°C and agitation of 120 rpm. The highest enzyme activity of 12,640 U/g protein was resulted at fermentation with inoculum concentration of 12.5% v/v at day-5.

Application into fermentator two liters at temperature 30°C, aeration 1.5 vvm and agitation of 500 rpm showed enzyme production in earlier time (one day fermentation) to achieved enzyme activity of around 1000-1300 U/g protein.

PENDAHULUAN

α-amilase (1,4-a-glucan-glucano hydrolase) adalah enzim ekstraseluler yang menghidrolisis pemecahan ikatan α-1,4-glikosidik secara acak pada bagian dalam molekul pati[1]. α-amilase dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri dan kapang. Jenis kapang yang menghasilkan α-amilase adalah genera Aspergillus, Penicillium, Cephalosporium, Mucor, Candida, Neurospora dan Rhizopus. α-amilase yang dihasilkan oleh Aspergillus mempunyai kegunaan penting pada industri makanan dan minuman. Beberapa penelitian mengenai α-amylase dari *A.oryzae* telah dilaporkan. Menurut Iskandar[2] pH awal medium yang optimum untuk produksi α-amilase pada media sago adalah 7. Karossi, dkk[3] telah pula melakukan pemurnian dan karakterisasi α-amilase. Enzim α-amilase yang diperoleh tersebut mempunyai pH optimum 6,8 dan suhu optimum 40°C. Aktifitas enzim dinhibisi oleh ion Hg^{2+} dan Ca^{2+}.

Untuk mendapatkan produksi enzim yang maksimum, jumlah inokulum yang ditambahkan ke dalam medium perlu diteliti. Pada makalah ini dilaporkan hasil-hasil fermentasi α-amilase skala labu untuk mencari konsentrasi inokulum kapang optimal yang masih memungkinkan dan aplikasi hasil skala labu ke dalam fermentor Biostat skala 2 liter.

BAHAN DAN METODA

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah kapang *A. oryzae* yang dipelihara dalam media Potato Dextrose Agar (PDA) pada suhu 30°C selama 7 hari.

Media

Pati sagu *(Metroxylon sp.)* dan tepung kedele masing-masing digunakan sebagai sumber karbohidrat dan sumber

nitrogen, diperoleh dari sebuah pasar di kota Bandung. Bahan-bahan kimia dari E. Merck dan malt extract dari Diffco. Medium produksi mempunyai komposisi (g/l): tepung sagu 20; tepung kedele 7,04; KH_2PO_4 1,0; $MgSO_4$ $7H_20$ 0,5; KCl 0,5; $FeSO_4$ $7H_2O$ 0,01 dan malt extract 0,9. pH medium diatur 7 sebelum sterilisasi. Selanjutnya medium disterilisasi pada 121°C selama 15 menit.

Penyiapan Inokulum

Spora hasil biakan kapang *A. oryzae* yang berumur 7 hari disuspensikan ke dalam larutan tween-80 0,010% secara aseptis. Konsentrasi inokulum yang digunakan pada fermentasi menggunakan fermentor biostat adalah 2,5-3% v/v. Variasi konsentrasi inokulum yang digunakan pada fermentasi skala labu kocok adalah 5%; 7,5%; 10% dan 12,5% v/v. Selanjutnya konsentrasi inokulum 12,5% digunakan pada fermentasi berikutnya menggunakan fermentor biostat.

Produksi α-amilase

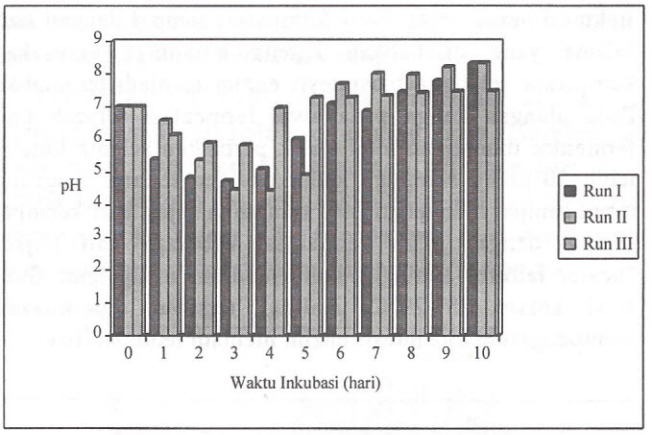
Produksi α-amilase mula-mula dilakukan dalam fermentor Biostat dengan volume kerja 2 liter. Kondisi fermentasi diadaptasi dari kondisi fermentasi menggunakan fermentor Biotech skala 4 Liter, suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm, dan agitasi 300 rpm (4). Selanjutnya untuk mencari konsentrasi inokulum yang optimal, fermentasi dilakukan dalam labu kocok 500 mL dengan volume media 100 mL, putaran 120 rpm, suhu 30°C selama 10 hari. Hasil percobaan skala labu selanjutnya diaplikasikan ke dalam fermentor dengan kondisi suhu 30°C, agitasi 500 rpm (agitasi optimum pada fermentasi dengan fermentor Biotech) dan aerasi 1,5 vvm.

Analisis

Untuk keperluan analisis, contoh hasil fermentasi diambil setiap 24 jam. Cairan hasil fermentasi terlebih dahulu dipisahkan dari biomasa dan zat-zat yang tidak larut dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan jernih yang diperoleh digunakan sebagai enzim ekstrak kasar. Aktifitas α-amilase ditentukan berdasarkan metoda Folin Wu[5] dan dibandingkan terhadap α-amilase standar (Wako Pure Chemicals Industri, No. Co. 015-03731). Kadar protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry.[6]

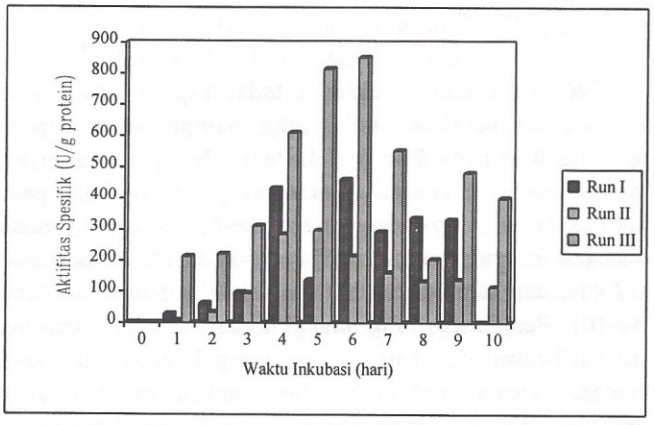
HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi α-amilase menggunakan fermentor Biostat pada suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm dan agitasi 300 rpm dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Hasil yang diperoleh disajikan pada Gambar 1, 2 dan 3. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa perubahan pH media pada ketiga ulangan percobaan mempunyai pola yang sama. Pada tahap awal terjadi penurunan pH mencapai nilai minimal antara 4,40-5,84 sampai dengan hari ke-4 fermentasi, setelah itu terjadi kenaikan sampai dengan akhir fermentasi (hari ke-10) mencapai nilai maksimal antara 7,47-8,32.



Gambar 1. Perubahan pH media pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat-B (2 L) dengan kondisi suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm, agitasi 300 rpm dan konsentrasi inokulum: 2.5-3.0% v/v.

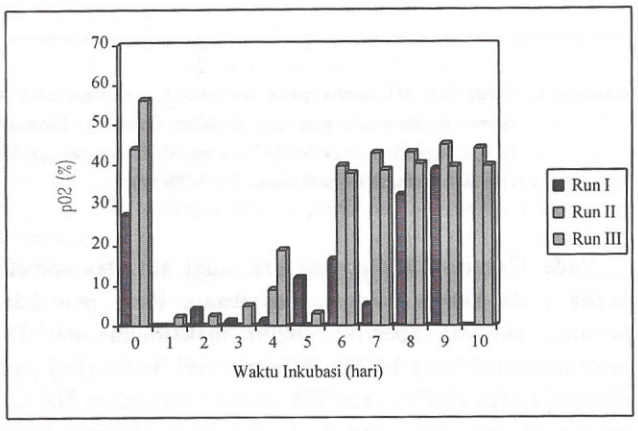
Pada Gambar 2 diperlihatkan nilai aktifitas spesifik enzim pada ketiga ulangan percobaan. Pada percobaan pertama aktifitas spesifik enzim maksimum 460 U/g protein dicapai pada hari ke-6 fermentasi, sedangkan pada ulangan kedua aktifitas spesifik enzim maksimum 300 U/g protein dicapai pada hari ke-5 dan pada ulangan ketiga aktifitas spesifik enzim maksimum meningkat menjadi 850 U/g protein pada hari ke-6.



Gambar 2. Aktifitas spesifik enzim pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat-B (2 L) dengan kondisi suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm, agitasi 300 rpm dan konsentrasi inokulum: 2.5-3.0% v/v.

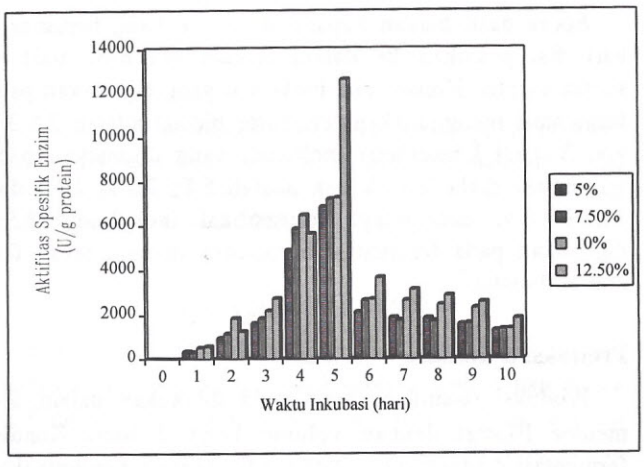
Aktifitas spesifik yang lebih tinggi pada ulangan ketiga diperkirakan karena konsentrasi inokulum yang digunakan lebih tinggi yaitu 3% v/v, sedangkan pada percobaan

pertama dan kedua konsentrasi inokulum yang digunakan 2,5% v/v. Pada ulangan kedua aktifitas spesifik enzim maksimum dicapai pada hari ke-5, sedangkan pada ulangan pertama dan ketiga baru dicapai pada hari ke-6. Hal ini mungkin disebabkan karena pada percobaan pertama terjadi fluktuasi aerasi sejak awal fermentasi sampai dengan hari kelima yang disebabkan karena terjadinya kerusakan kompresor sehingga biosintesis enzim menjadi terhambat. Pada ulangan ketiga pada awal fermentasi seluruh unit fermentor dihentikan total untuk perbaikan selama kurang lebih 10 menit sehingga kadar oksigen terlarut langsung turun sampai mendekati 0%, kemudian sejak hari keempat sampai dengan akhir fermentasi beberapa kali terjadi "heater failure" sehingga suhu medium mengalami fluktuasi antara 25°-29°C. Hal-hal tersebut diperkirakan mempengaruhi biosintesis enzim menjadi lebih lambat.



Gambar 3. Oksigen terlarut media (pO_2) pada fermentasi α-amilase oleh *A.. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat (2 L) dengan kondisi suhu 27°C, aerasi 0,75 vvm, agitasi 300 rpm dan konsentrasi inokulum: 2.5% v/v (run I&II); 3% v/v (run III).

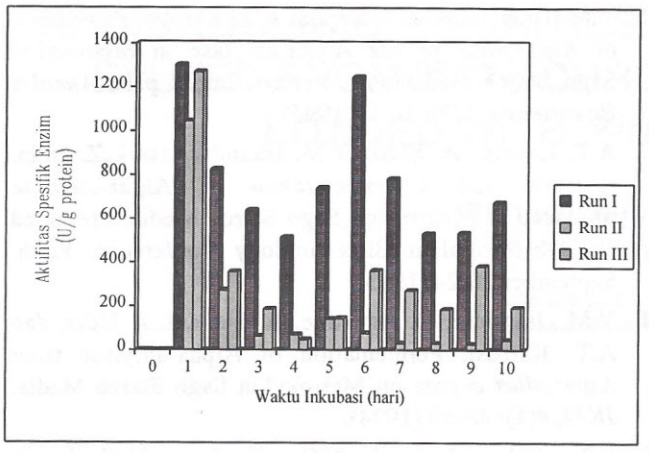
Perubahan jumlah oksigen terlarut pada ketiga percobaan menunjukkan pola yang hampir sama seperti diperlihatkan pada **Gambar 3.** Pada tahap pertama terjadi penurunan yang sangat cepat mencapai nilai 0-3% pada hari pertama sampai dengan hari ke-5, kemudian jumlah oksigen terlarut meningkat tajam pada hari ke-6 mencapai 37-40% dan hampir konstant sampai akhir fermentasi (hari ke-10). Penjelasan yang mungkin dari keadaan tersebut adalah bahwa pada hari pertama sampai dengan hari ke-5 kapang secara maksimal menggunakan oksigen yang tersedia dalam medium untuk pertumbuhan dan proses-proses metabolisme. Ini dapat dilihat secara visual dari pembentukan biomasa yang terus meningkat dan cairan media yang makin lama menjadi semakin jernih. Hal ini sesuai dengan terjadinya penurunan pH sampai dengan hari ke-5 akibat adanya metabolisme karbohidrat menjadi metabolit-metabolit yang bersifat asam. Kenaikan oksigen terlarut pada hari ke-6 menunjukkan bahwa mikroorganisme sudah tidak lagi menggunakan oksigen untuk aktifitas metabolisme. Hal ini disebabkan karena mikroorganisme sudah cukup tua dan faktor gesekan akibat pengadukan yang terus menerus menyebabkan mikroorganisme mengalami lisis. Hal ini dapat dilihat pula secara visual, cairan media semakin lama semakin keruh dan pH media semakin meningkat akibat protein-protein intra sel terdedahkan ke dalam medium dan mengalami penguraian enzimatis.



Gambar 4. Aktifitas spesifik enzim pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu skala labu kocok (100 mL) menggunakan berbagai konsentrasi inokulum (% v/v). Kondisi fermentasi suhu 30°C danpengocokan 120 rpm.

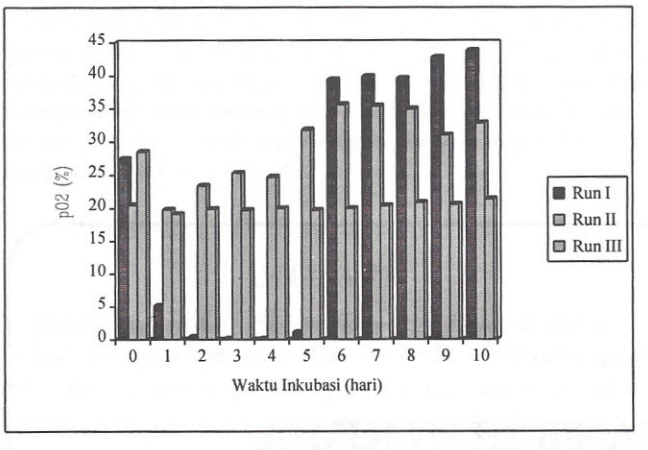
Percobaan untuk mempelajari pengaruh konsentrasi inokulum terhadap produksi enzim dilakukan pada skala labu dengan volume medium 100 ml. Hasil yang diperoleh disajikan pada **Gambar 4.** Aktifitas spesifik enzim maksimum sebesar 12.640 U/g protein diperoleh pada fermentasi menggunakan inokulum dengan konsentrasi 12,5% v.v yang dicapai pada hari ke-5 fermentasi. Hasil yang diperoleh dari skala labu tersebut kemudian diaplikasikan ke dalam fermentor Biostat 2 L dengan kondisi fermentasi: pH awal 7,0; suhu 30°C, aerasi 1,5 vvm dan kecepatan pengadukan 500 rpm. Fermentasi dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dan hasil yang diperoleh disajikan pada Gambar 5,6 dan 7.

Pada percobaan pertama aktifitas spesifik enzim maksimum mencapai 1300 U/g protein, pada percobaan kedua 1.045 U/g protein sedangkan pada percobaan ketiga 1.269 U/g protein. Aktifitas spesifik enzim kemudian mengalami penurunan mulai hari kedua sampai dengan hari ke-5. Pada percobaan pertama dan ketiga masing-masing menjadi 741 U/g protein dan 144 U/g protein, sedangkan pada percobaan kedua penurunan aktifitas spesifik enzim terjadi mulai hari kedua sampai hari keempat menjadi 69 U/g protein (**Gambar 5**). Pada hari ke-6, aktifitas spesifik enzim pada percobaan pertama dan ketiga meningkat kembali masing-masing menjadi 1.247 U/g protein dan 363 U/g protein, sedangkan pada percobaan kedua menjadi 141 U/g protein (hari ke-5).



Gambar 5. Aktifitas spesifik enzim pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat (2 L) dengan kondisi suhu 30°C, aerasi 1,5 vvm, agitasi 500 rpm dan konentrasi inokulum: 12,5% v/v.

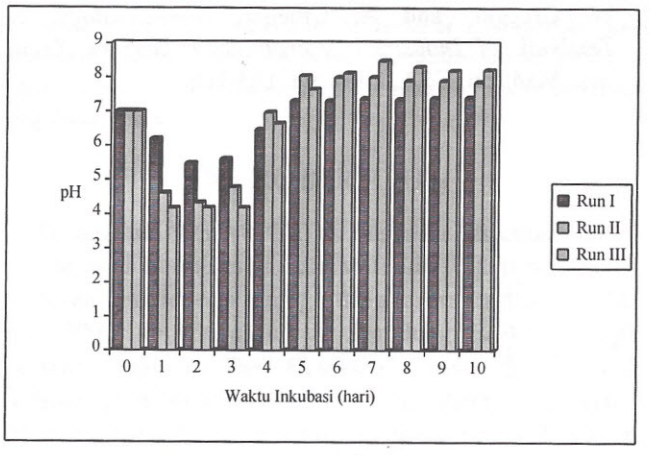
Rendahnya aktifitas spesifik enzim yang dihasilkan pada percobaan kedua kemungkinan disebabkan karena pasokan oksigen pada awal fermentasi tidak konstan sehingga menghambat pertumbuhan dan aktifitas metabolisme *A. oryzae*. Dibandingkan fermentasi sebelumnya dengan kondisi konsentrasi inokulum 3%, suhu 27°C dan laju aerasi 0,75 vvm, aktifitas spesifik enzim yang diperoleh relatif lebih tinggi (Gambar 2). Hal ini dapat disebabkan selain konsentrasi inokulum yang digunakan lebih tinggi sehingga pertumbuhan sel dapat lebih baik.



Gambar 6. Oksigen terlarut dalam medium (pO_2) pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat (2 L) dengan kondisi suhu 30°C, aerasi 1,5 vvm, agitasi 500 rpm dan konsentrasi inokulum: 12,5% v/v.

Konsumsi oksigen yang tidak efisien pada percobaan kedua dan ketiga (Gambar 6) menghasilkan aktifitas spesifik enzim yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan percobaan pertama. Walaupun pola penggunaan oksigen terlarut pada ketiga ulangan sangat berbeda nampaknya hal tersebut tidak mempengaruhi sintesis enzim pada hari pertama, karena mungkin yang terpenting adalah penggunaan oksigen pada awal fermentasi (hari pertama). Konsumsi oksigen yang maksimal setelah hari pertama pada percobaan pertama (Gambar 6) ternyata menyebabkan kenaikan aktifitas spesifik yang lebih besar dibandingkan pada percobaan kedua dan ketiga.

Perubahan pH media selama fermentasi dari ketiga ulangan mempunyai pola yang hampir sama (Gambar 7). Pada tahap awal terjadi penurunan pH mencapai nilai antara 4,2-5,6 pada hari ketiga, kemudian pH naik terus dan mencapai nilai antara 7,3-8,0 pada hari ke-6 dan hampir konstant sampai dengan akhir fermentasi (hari ke-8).



Gambar 7. Perubahan pH media pada fermentasi α-amilase oleh *A. oryzae* dalam media pati sagu di dalam fermentor Biostat (2 L) dengan kondisi suhu 30°C, aerasi 1,5 vvm, agitasi 500 rpm dan konsentrasi inokulum: 12,5% v/v.

Rendahnya aktifitas enzim yang diperoleh pada fermentasi menggunakan fermentor Biostat dibandingkan labu kocok menunjukkan bahwa kondisis optimum proses fermentasi dalam fermentor belum tercapai. Sistem pengadukan yang dimiliki oleh fermentor Biostat-M (turbine blade) dan tingginya kecepatan putaran yang digunakan (500 rpm) kemungkinan memberikan efek gesekan yang besar terhadap mikrorganisme yang digunakan sehingga pada hari pertama sebagian besar sel telah mengalami lisis, hal tersebut mengakibatkan produksi enzim rendah. Untuk mendapatkan hasil yang maksimal perlu kiranya dilakukan kajian dan penelitian lebih lanjut mengenai sistem pengadukan dan laju kecepatan pengadukan yang dapat memberikan efek gesekan seminimal mungkin, serta laju aerasi yang optimal.

KESIMPULAN

Dari hasil analisis dan pembahasan terlihat bahwa konsentrasi inokulum, suhu dan aerasi berpengaruh terhadap produksi enzim. Dengan menggunakan konsentrasi

inokulum, suhu dan aerasi yang cukup tinggi (12,5% v/v, 30°C, 1,5 vvm) untuk mencapai produksi enzim dengan aktifitas relatif lebih tinggi (1000-1300 U/g protein) dibandingkan percobaan sebelumnya (konsentrasi inokulum 3% v/v, 27°C) diperlukan waktu yang relatif lebih singkat (satu hari fermentasi). Untuk mendapatkan produksi enzim yang maksimal skala fermentor laboratorium perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari kondisi/teknik fermentasi yang lebih sesuai untuk produksi α-amilase dari kapang *A. oryzae.*

DAFTAR PUSTAKA

1. W. Crueger, and A. Crueger, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology.* Science Tech. Inc., Madison, USA, 1984. pp. 163-168.
2. Y.M. Iskandar, L.Z. Udin and A.T. Karossi. Production of *Aspergillus oryzae* Alpha-amylase in Metroxylon Sago Starch media with Verious Initial pHs. *Annales Bogoriensis,* 2(2): 16-19(1993).
3. A.T. Karossi, A. Sidik, Y.M. Iskandar, dan L.Z. Udin. Isolation and Characterization of Alpha-amylase produced in Metroxylon Sago Starch Media. Presented at 11th Australian Biotechnology Conference, Perth, September 20-24, 1993.
4. Y.M., Iskandar, D. Agustine, A. Sidik, L.Z. Udin, dan A.T. Karossi. Fermentation of Alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* on Metroxylon Sago Starch Media. *JKTI,* 4(1): 48-50 (1994).
5. S.P. Colowick and N.O. Kaplan. *Methods in Enzymology. 1,* Academic Press, Inc., New York, 1954.
6. S.P. Colowick and N.O Kaplan. *Methods in Enzimology. 3,* Academic press, Inc., New York, 1957.

Untuk:

PERUSAHAAN PERALATAN/BAHAN KIMIA,

JKTI menawarkan kesempatan untuk mempromosikan produk yang anda tawarkan dalam bentuk kerjasama:

1. Penitipan brosur peralatan/bahan yang akan ditawarkan pada setiap majalah yang didistribusikan kepada semua pelanggan JKTI.
2. Membuat ulasan ilmiah mengenai produk yang akan anda promosikan untuk diterbitkan pada salah satu nomor penerbitan JKTI.