

RADIASI SINAR ULTRA VIOLET STRAIN *ASPERGILLUS ORYZAE* UNTUK MENINGKATKAN PRODUKSI ALFA AMILASE

Yetti M.Iskandar, Linar Z. Udin dan A.T. Karossi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI
Jl. Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Telah dilakukan mutasi dengan radiasi ultra violet pada panjang gelombang 254 nm, terhadap *Aspergillus oryzae*. Mutan yang diperoleh dengan waktu penyinaran 0,10,20,30,40 dan 50 menit, diseleksi melalui uji amilolitik dan produksi alfa amilase. Proses fermentasi dilakukan secara aerob dengan menggunakan media pati sagu (*Metroxylon sp*) dalam skala labu kocok. Waktu inkubasi berlangsung selama 5 hari pada suhu 30°C, dengan putaran 120 kali/menit. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi ultra violet selama 10 menit mempunyai aktifitas spesifik alfa amilase tertinggi pada hari ke 4 yaitu sebesar 1675 Unit/g protein dimana aktivitas enzim ditentukan pada 40° C dan inkubasi selama 30 menit. Penggunaan pati untuk pertumbuhan kapang mencapai 87% sedang produksi biomasanya adalah 3,84 g kering/L media. Strain parental yang tanpa perlakuan radiasi mempunyai aktivitas spesifik alfa amilase sebesar 1069 Unit/g protein. Penggunaan pati mencapai 80 % dan produksi biomasa adalah 3,62 g kering/L media. Radiasi ultra violet selama 10 menit terhadap kapang dapat meningkatkan aktivitas spesifik alfa amilase sebesar 56 %.

ABSTRACT

*Mutation of Aspergillus oryzae was carried out by ultra violet irradiation at 254 nm. The mutants obtained with 0, 10, 20, 30, 40 and 50 minutes irradiation were screened for their amylolytic activity and alpha amylase production. The latter was carried out by aerobic fermentation using sago (*Metroxylon sp*) starch in shake flasks for five days at 30°C with orbital shake at 120 rpm. The observation indicated that the mutant resulted from 10 minute irradiation demonstrated a maximum alpha amylase activity of 1675 Unit/g protein at day-4. The amylase activity was assayed at 40°C for 30 minute incubation. The starch utilization was 87% and 3.84 g dry weight of biomass per L medium was produced. The specific activity of alpha amylase obtained from untreated parental strain was 1069 Unit/g protein. Starch consumption and biomass production was 80% and 3.62 g dry weight/ L medium, respectively. The increase of alpha amylase specific activity at 10 minute irradiation time was 56%.*

PENDAHULUAN

Radiasi dengan penyinaran ultra violet sering digunakan dalam studi mutagenesis. Pemakaian panjang gelombang pendek antara 200-300 nm merupakan salah satu cara mutagenik yang sangat efektif. Panjang gelombang yang optimum untuk mutasi adalah 254 nm, karena didaerah ini terjadi absorpsi maksimum oleh DNA. Hal yang sangat penting dari kerja sinar ultra violet adalah terbentuknya dimer antara basa-basa pirimidin yang berdekatan sehingga radiasi ultra violet terutama menginduksi transisi dari pasangan guanin sitosin dengan adenin timin. Radiasi dengan ultra violet gelombang panjang antara 300-400 nm, bersifat kurang lethal dan tidak mutagenik (1). Perbaikan strain mikro-organisme yang digunakan dalam fermentasi sangat penting artinya bagi proses pengembangan industri. Modifikasi genetik dapat diperoleh dengan memilih varian natural, induksi mutan dan memilih rekombinan (2).

Aspergillus oryzae merupakan mikroorganisme yang dapat memproduksi alfa amilase secara ekstraselular. Enzim ini banyak digunakan dalam berbagai industri misalnya industri farmasi, tekstil, kertas, detergen dan lain-lain. Alfa amilase merupakan endoenzim yang dapat memotong substrat pada bagian dalam yaitu hanya pada ikatan a-1,4 dari molekul substrat (3). Reaksi hidrolisanya tidak dihambat oleh ikatan a-1,6-glikosida, walaupun ikatan seperti ini tidak terputus (4).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari mutan baru dari *A.oryzae*, setelah diradiasi dengan sinar ultra violet, sehingga mutan yang diperoleh diharapkan mempunyai aktivitas spesifik enzim alfa amilase yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan strain parentalnya.

BAHAN DAN METODA

Mikroorganisma

Biakan *Aspergillus oryzae*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi ITB yang dipelihara dalam media agar kentang (Potato Dextrose Agar).

Radiasi sinar ultra violet

Biakan *A.oryzae* dipelihara dalam agar miring selama 7 hari. Sporanya disuspensi dalam larutan buffer fosfat, pH 7 dengan cara pengenceran sehingga diperoleh 10^6 spora/ml. Kemudian 2 ml suspensi spora dipipet secara aseptis kedalam cawan petri kecil dengan diameter 6 cm yang berada dalam cawan petri steril. Selanjutnya cawan yang berisi suspensi spora diradiasi sinar ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm, dengan jarak penyinaran 20 cm, waktu sinar 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 menit. Pada percobaan ini digunakan lampu UV Germicidal dengan kekuatan 15 Watt. Radiasi dilakukan dalam laminar flow.

Seleksi mutan

Setelah dilakukan penyinaran dengan sinar ultra violet, sejumlah suspensi dari setiap cawan tersebut dipindahkan secara aseptis dengan menggunakan mikropipet dan dituang kedalam cawan petri steril. Selanjutnya media Potato Starch Agar (PSA) dalam keadaan hangat kuku dituangkan kedalam cawan petri, agar-agar media digoyang sehingga merata. Cawan petri yang berisi media agar yang telah membeku diinkubasikan pada suhu 30°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh pada setiap cawan petri dihitung jumlahnya dan dilihat kenampakannya secara visual.

Uji amilolitik

Cawan petri yang berisi biakan hasil mutasi, selanjutnya ditetesi larutan iodin. Jika disekeliling koloni terlihat zona bening ini menunjukkan koloni mempunyai sifat amilolitik. Pengukuran zona bening dilakukan dengan menggunakan jangka sorong (5).

Isolasi mutan

Koloni yang mempunyai zona bening dipilih dan diinokulasi kedalam cawan petri berisi media agar dengan cara menempelkan ujung jarum ose pada satu titik dibagian tengah, sehingga diperoleh biakan dari kapang yang sama. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2-4 hari (5). Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap diameter koloni dan diameter zona beningnya. Selanjutnya biakan ini digoreskan lagi pada agar miring dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 7 hari untuk difermentasikan dalam medium pati sagu.

Fermentasi

Mutan yang diperoleh diuji terhadap produksi alfa amilase. Media fermentasi mengandung (g/L) sagu 20; bungkil kedele 7,04; K₂HPO₄ 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,5; KCl 0,5; FeSO₄·7H₂O 0,01 dan ekstrak malt 30 ml dari 3%. pH awal media diatur sehingga mencapai pH 7. Sejumlah labu erlenmeyer berukuran 250 ml yang berisi 50 ml media fermentasi, disterilisasi pada 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Setelah didinginkan kemudian diinokulasi dengan suspensi *A.oryzae* 2% dari mutan hasil radiasi ultra violet selama 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 menit. Proses

fermentasi berlangsung pada suhu 30°C dengan kondisi aerob, goncangan orbital 120 kali/menit dan inkubasi selama 5 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari.

Analisis

Proses fermentasi diamati dari hari ke 0 sampai hari ke 5. Sejumlah media fermentasi disentrifuga pada 5000 rpm selama 30 menit, filtratnya merupakan enzim kasar yang diuji. Aktifitas alfa amilase diuji menurut metoda Folin Wu (6). Unit aktifitas ditentukan setelah membandingkan dengan alfa amilase standar dari SIGMA pada 40°C dengan waktu inkubasi 30 menit. Kandungan protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry (7) untuk memperoleh aktivitas spesifik enzim. Pati tersisa dalam media fermentasi ditentukan setiap hari berdasarkan metoda Nelson Somogyi (8) setelah dilakukan hidrolisis asam.

HASIL DAN DISKUSI

Pengamatan terhadap mutan yang mempunyai sifat amilolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni kapang setelah ditetesi dengan larutan iodin. Hasil penghitungan jumlah koloni (*total plate count*) setelah diradiasi, menunjukkan ketahanan hidup dari kapang. Mutasi dengan radiasi ultra violet, didapatkan survival - rate 1% pada waktu penyinaran antara 40-50 menit dengan waktu inkubasi 48 jam, jarak 20 cm. Morfologi kapang diamati secara visual disajikan pada Tabel 1.

Rangsangan sinar ultra violet yang berkepanjangan mengandung risiko mutasi sel kearah kelainan perubahan susunan DNA. Hal yang sangat penting dari kerja ultra violet yaitu terbentuknya dimer dimer antara basa-basa pirimidin yang berdekatan. Disamping itu rangsangan yang berlebihan dapat memberikan kesempatan bagi munculnya fenotipe abnormal. Ini terlihat dari mutan hasil radiasi 40 dan 50 menit, mycelium dari kapang berubah warna menjadi kuning muda, jika dibandingkan dengan strain parental yang berwarna hijau muda. Perubahan morfologi dan sifat sel sering dikaitkan dengan perubahan molekul molekul pada permukaan sel. Karena sel berkembang biak menurut proses pembelahan, sehingga fungsi suatu sel yang normal memerlukan penggunaan informasi genetik yang dikandung oleh DNA untuk mengarahkan biosintesis dari protein enzim (2).

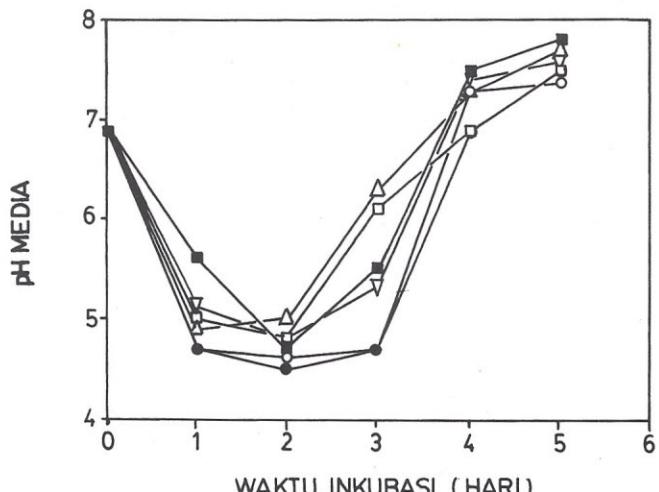
Mutan yang mempunyai sifat amilolitik diamati pada 48, 72 dan 96 jam inkubasi. Lamanya waktu penyinaran ultra violet berpengaruh terhadap diameter zona bening yang dihasilkan (Tabel 2), sehingga ratio sakarifikasi yang dihasilkan oleh radiasi 40 dan 50 menit lebih kecil jika dibandingkan dengan strain parental. Isolat murni hasil penyinaran ultra violet, selanjutnya diuji kemampuannya menghasilkan enzim alfa amilase pada proses fermentasi dengan menggunakan skala labu kocok.

Tabel 1: Daya tahan (*Survival rate*) *A.oryzae* yang disinari ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm, jarak 20 cm.

Waktu radiasi UV (menit)	Perbandingan diameter zona bening dan diameter koloni (mm)	Survival rate %	Morfologi koloni
0	8,8/4,8	100	Mycelium berwarna hijau muda, spora hijau muda.
10	6,2/3,2	32,1	idem
20	6,5/3,4	25,0	idem
30	4,4/3,6	9,8	idem
40	3,1/2,6	2,6	Mycelium berwarna kuning muda, spora kuning muda.
50	2,8/2,6	0,8	idem

Tabel 2: Seleksi mutan *Aspergillus oryzae* dalam media agar kentang pati (Potato Starch Agar).

Waktu sinar (menit)	Dia.koloni (mm)	Zona bening (mm)	Ratio sakarifikasi
Umur 48 jam			
0	5,1 4,8	10,5 10,1	2,05 2,10
10	2,7 2,0	6,5 5,0	2,40 2,50
20	3,0 2,8	6,5 6,4	2,16 2,28
30	2,5 3,0	7,0 8,9	2,80 2,90
40	2,5 2,7	4,3 4,7	1,72 1,74
50	3,1 2,7	3,4 3,8	1,12 1,40
Umur 72 jam			
0	10,4 10,6	21,7 22,8	2,08 2,15
10	10,7 11,4	23,7 23,2	2,21 2,03
20	14,0 14,8	23,1 24,4	1,65 1,64
30	14,0 13,0	24,2 23,5	1,72 1,80
40	14,9 13,6	22,8 23,8	1,53 1,75
50	13,8 12,6	22,7 22,6	1,64 1,79
Umur 96 jam			
0	24,4 27,9	40,0 43,2	1,63 1,54
10	25,0 24,0	40,8 38,6	1,63 1,60
20	27,2 25,4	41,3 39,4	1,51 1,55
30	22,2 23,4	34,4 38,4	1,54 1,64
40	16,7 17,6	23,5 25,1	1,40 1,42
50	17,8 17,1	22,7 23,2	1,27 1,35

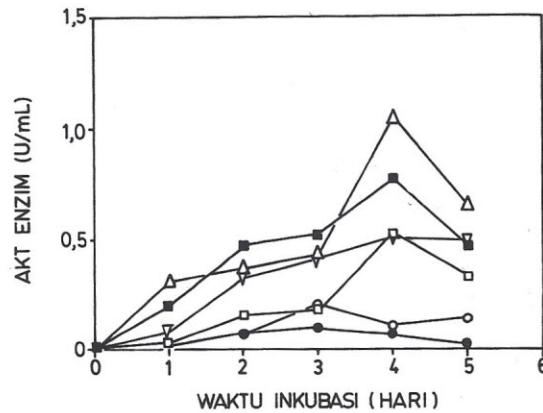


Gambar 1. Perubahan pH media selama proses fermentasi oleh mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi 0 - 50 menit.

(■) 0 menit (□) 30 menit
(△) 10 menit (○) 40 menit
(▽) 20 menit (●) 50 menit

Pada proses fermentasi pengamatan dilakukan sampai hari ke 5. Perubahan pH pada media fermentasi diamati seperti yang disajikan pada Gambar 1. Terlihat bahwa terjadi penurunan pH media fermentasi pada hari pertama sehubungan dengan terjadinya akumulasi dari asam organik hasil dari metabolisme kapang. Senyawa senyawa tersebut meliputi antara lain CO_2 dan asam asam organik seperti asam piruvat, asam sitrat dan asam suksinat. Akumulasi asam asam ini dalam media menyebabkan pH media turun, tetapi selanjutnya asam asam ini digunakan oleh kapang untuk keperluan pertumbuhannya sehingga pH media meningkat kembali (9).

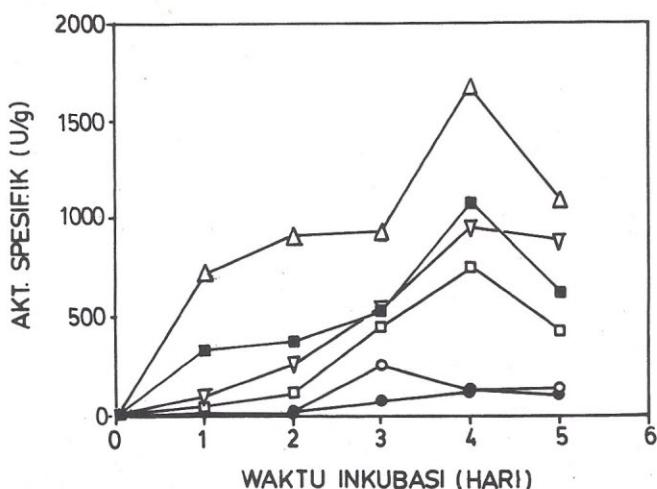
Aktivitas alfa amilase yang diperoleh selama proses fermentasi disajikan pada Gambar 2. Fermentasi dengan variasi mutan menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada radiasi UV selama 10 menit yang diperoleh pada hari ke 4 fermentasi yaitu sebesar 1,044 Unit/ml media sedangkan strain parentalnya sebesar 0,770 Unit/ml media. Aktivitas enzim alfa amilase dengan variasi mutan yang lain berkisar antara 0,061-0,524 Unit/ml media .



Gambar 2. Aktivitas alfa amilase hasil fermentasi oleh mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi 0 - 50 menit.

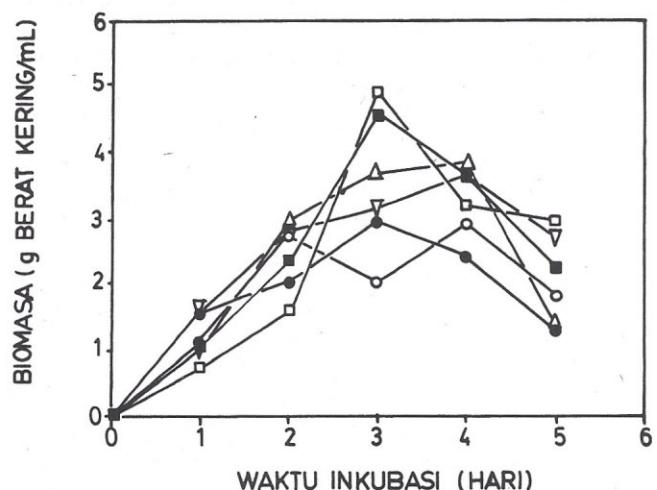
(■) 0 menit (□) 30 menit
(△) 10 menit (○) 40 menit
(▽) 20 menit (●) 50 menit

Aktivitas spesifik enzim alfa amilase yang disajikan pada Gambar 3 memperlihatkan nilai tertinggi diperoleh pada hari ke 4 proses fermentasi yaitu sebesar 1675 Unit/g protein (radiasi selama 10 menit), sedang untuk strain parentalnya mempunyai aktifitas spesifik enzim sebesar 1069 Unit/g protein. Pada variasi mutan yang lainnya berkisar antara 4-1071 Unit/g protein.

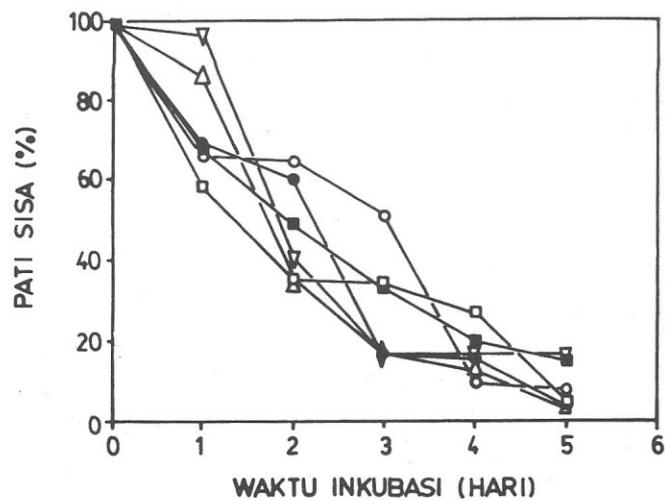


Gambar 3. Aktivitas spesifik alfa amilase hasil fermentasi oleh mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi 0 - 50 menit.
 (■) 0 menit (□) 30 menit
 (△) 10 menit (○) 40 menit
 (▽) 20 menit (●) 50 menit

Biomasa yang dihasilkan oleh kapang *A.oryzae* selama proses fermentasi berlangsung tertera pada Gambar 4. Hasil pengamatan menunjukkan adanya kenaikan biomasa yang disebabkan oleh pertumbuhan dari mycelia yang dimulai dari hari pertama proses fermentasi sampai hari ke 4, selanjutnya terjadi penurunan jumlah masa sel pada hari ke 5.



Gambar 4. Produksi biomassa dari hasil fermentasi oleh mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi 0 - 50 menit.
 (■) 0 menit (□) 30 menit
 (△) 10 menit (○) 40 menit
 (▽) 20 menit (●) 50 menit



Gambar 5. Pati tersisa dalam media hasil fermentasi oleh mutan *Aspergillus oryzae* hasil radiasi 0 - 50 menit.
 (■) 0 menit (□) 30 menit
 (△) 10 menit (○) 40 menit
 (▽) 20 menit (●) 50 menit

Pengamatan terhadap pati yang digunakan oleh *A.oryzae* selama proses berlangsung, tertera pada Gambar 5. Adanya pemakaian pati mengakibatkan terjadinya penurunan sejumlah pati, yang dimulai pada hari pertama proses fermentasi sampai hari ke 5 dimana pati hanya tersisa sebesar 3%. Penggunaan pati pada saat aktivitas spesifik enzim alfa amilase tertinggi yaitu sebesar 87%.

KESIMPULAN

Penggunaan radiasi sinar ultra violet dalam mutasi berpengaruh terhadap kemampuan mutan *A.oryzae* untuk menghasilkan enzim alfa amilase. Bertambahnya waktu penyinaran berakibat semakin kecil diameter koloni dan diameter zona beningnya. Begitu pula jumlah koloni yang diperoleh dari hasil total-plate-count semakin sedikit. Isolat dari hasil mutasi menunjukkan bahwa radiasi sinar ultra violet selama 10 menit dapat memperbaiki strain parental karena hasil aktivitas spesifik alfa amilase meningkat 56 % atau 1675 Unit/g protein pada hari ke 4 fermentasi. Pati yang digunakan pada saat itu sebesar 87% dan biomasa yang terbentuk sebesar 3,84 g kering/L media, jika dibandingkan dengan strain parental yang mempunyai aktivitas spesifik sebesar 1069 Unit/g protein, dengan pemakaian pati 80% dan produksi biomasanya mencapai 3,62 g kering/L media. Waktu radiasi sinar ultra violet lebih dari 50 menit dapat mematikan biakan *A.oryzae*. Ketahanan biakan yang hidup 1% (*survival rate 1%*) diperoleh pada waktu penyinaran antara 40 menit sampai 50 menit.

Bersambung ke halaman 45.