

Isolasi Enzim Amiloglukosidase Terimmobilisasi dari *Aspergillus Niger* Ampas Tepung Sagu

Hermin Kombong¹⁾*

1) Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Haluoleo, Kendari, 93232, Indonesia

Abstract

Amyloglucosidase enzyme was isolated using the media of sago waste flour by batch culture method during 4 (four) days at 32 °C. The supernatant of crude amyloglucosidase was obtained by purification with (NH₄)₂SO₄ 80 % (w/v) and then further purification by means of Sepadex G-200 column chromatography. The purified amyloglucosidase enzyme was characterized at the interval of temperature, pH, and concentration of starch substrate are 30-70 °C, 2.5-8.0, and 0.5-3.0%, respectively. The isolate of *Aspergillus niger* from sago waste flour give the clear zone at the starch agar media by iod reagen addition. The specific activity of enzyme is 0.071 U/mg of protein. The purified enzyme by (NH₄)₂SO₄ shows the specific activity of 0.210 U/mg of protein and increase more three time than the crude enzyme. The specific activity of the enzyme which purified by Sepadex G-200 column chromatography is 1.921 U/mg and more pure 27.1 times than crude enzyme. The optimum temperature, pH, and substrate concentration were obtained at 45 °C, 6.4 and 2.0%, respectively.

Keywords: *Aspergillus Niger*, amyloglucosidase, enzyme, sago waste starch

Received: 18 April 2011

Accepted: 29 June 2011

Abstrak

Enzim amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* telah diisolasi menggunakan media ampas tepung sagu melalui fermentasi sistem *bacth* (kultur curah) selama 4 hari pada suhu 32 °C. Supernatan amiloglukosidase kasar diperoleh melalui pemurnian hasil fermentasi dengan (NH₄)₂SO₄ 80 % (b/v) dan dilanjutkan dengan kolom kromatografi gel Sepadex G-200. Amiloglukosidase hasil pemurnian dikarakterisasi pada interval suhu 30-70 °C, pH interval 2,5-8,0, dan konsentrasi substrat pati pada interval 0,5-3,0%. Hasil karakterisasi isolat kapang *A.niger* ampas tepung sagu memberikan zona bening pada media agar pati dengan penambahan reagen iod. Aktivitas spesifik enzim adalah 0,071 U/mg protein. Pemurnian dengan (NH₄)₂SO₄ menunjukkan aktivitas spesifik 0,210 U/mg protein dengan tingkat kemurnian 3 kali dari enzim kasar. Pemurnian dengan kolom kromatografi meningkatkan kemurnian 27,1 kali dari enzim kasar dan aktivitas spesifiknya adalah 1,921 U/mg protein. Suhu, pH, konsentrasi substrat optimum dari amiloglukosidase diperoleh pada masing-masing 45 °C, 6,4 dan 2,0%.

Kata Kunci : *Aspergillus niger*, Amiloglukosidase, Ampas tepung sagu

Diterima: 18 April 2011

Disetujui untuk dipublikasikan: 29 Juni 2011

*Penulis Korespondensi/corresponding author: Telp. + 62 0401 3190877 Fax. +62 0401 3190496
E-mail: herminkombong@yahoo.com

1. Pendahuluan

Mikroba sebagai mesin hayati yang dapat mensintesis banyak enzim yang dapat berfungsi dalam pertumbuhan, metabolisme, dan autolisis. Penggunaan mikroba sebagai penghasil enzim memiliki beberapa keuntungan, yaitu di antaranya biaya produksi relatif murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat sesuai dengan permintaan, memiliki kecepatan tumbuh yang tinggi serta mudah dikontrol [1].

Kapang *A. niger* memiliki keunggulan dalam memproduksi enzim glukoamilase jika dibandingkan dengan jenis kapang lainnya. Oleh karena *A. niger* pada kondisi pH optimum 4,0-4,5 dengan suhu efektif 60 °C yang ditumbuhkan pada pati hanya menghasilkan enzim amiloglukosidase [1].

Enzim amiloglukosidase menghidrolisis pati pada ikatan glikosida α 1-4 dan menghasilkan glukosa, sehingga enzim ini dapat digunakan untuk pembuatan gula glukosa dari tepung sagu yang mengandung pati. Glukosa yang diperoleh dari hasil hidrolisis diukur dengan cara penentuan gula pereduksi dengan cara Smogy-Nelson dan DNS (asam 3,5 dinitro salisilat) [1, 2]

Sekarang ini pengadaan bahan baku sumber enzim cukup mahal. Untuk mengatasi masalah ini, maka digunakan tepung sagu sebagai bahan baku sumber enzim yang harganya lebih murah dan mudah diperoleh [3,4]. Selain itu tepung sagu jika ditinjau dari kandungan kimianya memiliki potensi untuk digunakan sebagai sumber enzim amiloglukosidase dengan memanfaatkan *A. niger* hasil isolasi dari ampas tepung sagu

Daya hidrolitik suatu enzim dapat bervariasi meskipun enzim tersebut berbeda, hal ini sangat dipengaruhi oleh mikroba sumber dan substrat yang digunakan. Stabilitas aktivitas dan kondisi optimumnya dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti pH, suhu, bahan aditif, dan jenis uji yang digunakan [2,3].

Dengan kemajuan teknologi fermentasi dan rekayasa genetik telah meningkatkan hasil produksi enzim glukoamilase dari kapang [4]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim amiloglukosidase mutan F-2035 diperoleh dari *A. awamori* var, dapat mencerna pati jagung mentah dua kali lebih cepat dari glukoamilase lanilla [3, 5].

Dalam penelitian ini telah diisolasi dan dikarakterisasi enzim amiloglukosidase menggunakan media ampas tepung sagu

melalui fermentasi sistem *bacth* (kultur curah).

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan dan Alat yang Digunakan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini, diantaranya: *Potato Dextro Agar* (PDA), pereaksi Somogy-Nelson, amilum murni (*starct*), glukosa murni (larutan standar), larutan nutrisi pertumbuhan yang terdiri atas: amonium sulfat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , dan $ZnSO_4$, dan pati sagu, larutan buffer fosfat, aquades steril, dan kultur murni *A. niger*.

Alat yang digunakan, diantaranya: autoklaf, inkubator, pH meter, timbangan analitik, spektrofotometer 20 D, sentrifus, penangas air, pengaduk magnet, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium kimia, seperti: pipet volumetrik, pipet ukur, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, elenmeyer, gelas ukur, botol semprot.

2.2. Isolasi Enzim Amiloglukosidase

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa langkah, isolasi kapang *A. niger* dari ampas tepung sagu, pengujian kemampuan *A. niger* pada media agar pati dengan reagen iod, peremajaan kultur *A. niger* dalam media padat PDA (*Potato*

dextro Agar), pembuatan substrat fermentasi ampas sagu pembuatan nutrisi, inokulasi *A. niger* pada media ampas tepung sagu untuk isolasi enzim amiloglukosidase, fermentasi dengan sistem *bacth* selama 4 hari pada suhu 32 °C, panen hasil fermentasi (isolasi) enzim, dengan sentrifus pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, karakterisasi enzim amiloglukosidase dengan pengujian aktivitas terhadap media uji pati murni (starch), Sedangkan untuk melihat kecepatan reaksinya digunakan variasi terhadap: pengaruh suhu dan pH, Enzim dimurnikan dengan fraksi $(NH_4)_2SO_4$ 80% (b/v) yang kemudian dilanjutkan kolom kromatografi gel Sepadex G-200. Hasil pemurnian dikarakterisasi untuk mengetahui suhu maksimum, pH, dan konsentrasi optimumnya. Glukosa hasil aktivitas enzim amiloglukosidase dari pati murni ditentukan dengan metode Smogy Nelson dan DNS menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm dan kadar protein terlarutnya ditentukan dengan metode Biuret pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas amiloglukosidase diukur, dengan mengambil 1 mL filtrat enzim kasar dan dimasukkan ke dalam 4 mL larutan pati 4% dalam larutan buffer asetat

pH 4,8. Aktivitas glukoamilase diukur dengan mengukur jumlah kadar glukosa yang terbentuk pada suhu 60 °C selama 1 jam. Pengukuran aktivitas amiloglukosidase dilakukan dengan 4 macam variasi konsentrasi pati sebagai media uji (2%, 4%, 6%, dan 8%) dengan suhu bervariasi, yaitu dari 30 °C sampai 70 °C. dan pH divariasi mulai dari 2,5- 8,0

Pengaruh suhu terhadap reaksi hidrolitik dan denaturasi enzim dapat ditunjukkan dengan persamaan Arrhenius:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (1)$$

Dengan k , E_a , A , R , T masing-masing adalah tetapan laju reaksi, E_a = energi aktivasi (11 kkal/g mol), tetapan Arrhenius, tetapan gas, dan suhu absolut.

Pengaruh pH terhadap reaksi hidrolitik enzim amiloglukosidase ditentukan dengan menggunakan kurva untuk melihat pH optimum dengan kadar glukosa tertinggi [4].

2.3. Penentuan Aktivitas Amiloglukosidase

Sepuluh mL larutan pati 1% dipipet ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL filtrat enzim, kemudian diletakkan dalam penangas air pada suhu 37-40 °C

selama 30 menit. Larutan tersebut di atas dipipet 5 mL ke dalam gelas kimia 50 mL dan ditambahkan 5 mL larutan pereaksi Somogy, kemudian diletakkan dalam air mendidih selama 15 menit. Larutan kemudian didinginkan, lalu ditambahkan 2 mL larutan Iod-asetat dan 3 mL larutan H₂SO₄ 2 N. Larutan dikocok perlahan-lahan hingga semua endapan larut.

Larutan dibiarkan dalam air dingin selama 5 menit, sambil dikocok beberapa kali. Larutan dititrasikan dengan larutan Na₂S₂O₃ 0,005 N yang sudah distandarisasi (b mL). Dibuat pula blanko dengan cara yang sama (a mL).

Aktivitas enzim amiloglukosidase dinyatakan dalam satuan Unit Aktivitas Amiloglukosidase (UAA) atau unit per mL filtrat enzim. Satu unit aktivitas setara dengan 1 mikromol glukosa (sebagai gula pereduksi) yang dihasilkan dari perlakuan enzim tersebut di atas. Perhitungan aktivitas amiloglukosidase dapat dihitung dengan rumus seperti berikut ini:

$$UAA = 0,1099(a - b) + \frac{0,048 \times 1000}{s \times 180} \quad (2)$$

dimana UAA adalah unit aktivitas enzim amiloglukosidase, a adalah jumlah mL titran $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk blanko, b adalah jumlah mL titran $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk sampel, c adalah faktor pengenceran, s merupakan bobot sampel (g).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi Kapang *Aspergillus Niger*

Isolasi kapang *A. niger* diawali dengan membiarkan ampas sagu mengalami pembusukan oleh mikroorganisme. Setelah tampak adanya pembusukan oleh mikroorganisme, limbah kemudian disuspensikan ke dalam larutan fisiologis NaCl 1% steril dan disebarkan di atas media PDA dan diinkubasi selama beberapa hari pada suhu 32°C . Proses isolasi ini dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh kultur kapang *A. niger* murni.

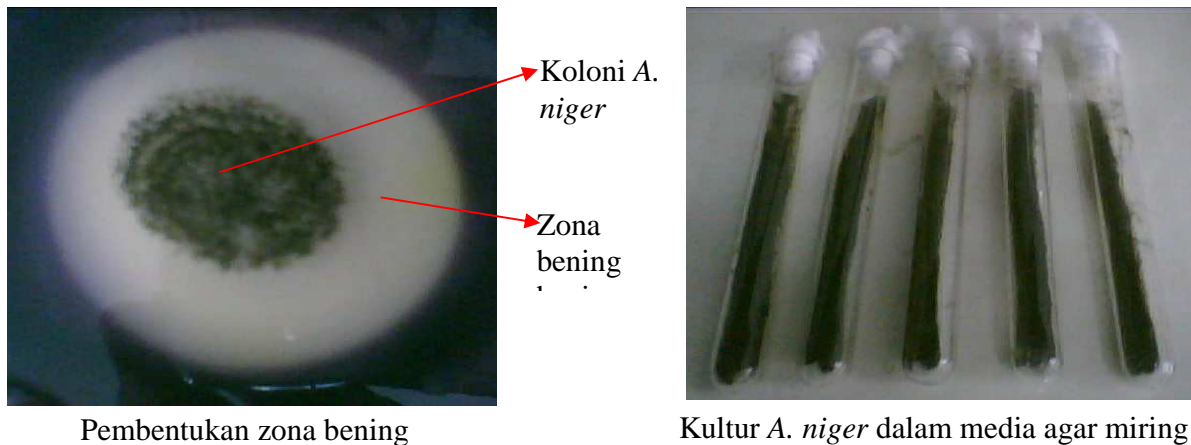
Kapang *A. niger* tampak sebagai koloni dengan hifa berwarna putih pada tahap awal pertumbuhan seperti terlihat pada Gambar 1. Setelah empat hari, konidianya mulai tumbuh di atas hifa yang tampak berwarna hitam kecokelatan. Kemampuan amilolitik isolat kapang yang diperoleh diuji dengan menumbuhkan pada media agar pati dan mengamati zona bening dengan menggunakan reagen Iod. Isolat *A. niger* yang memperlihatkan zona

bening kemudian diperbanyak/diremajakan dalam media agar miring untuk keperluan produksi enzim.

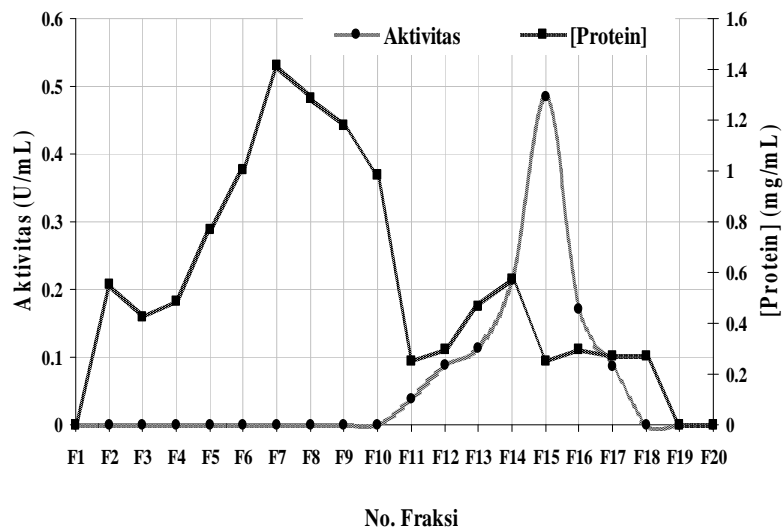
3.2. Produksi dan Pemurnian Amiloglukosidase

Produksi amiloglukosidase dari isolat kapang yang diperoleh dilakukan dengan fermentasi sistem *batch* (kultur curah). Fermentasi ini dilakukan dengan memanfaatkan ampas tepung sagu sebagai inducer amiloglukosidase yang merupakan enzim ekstraseluler dari *A. niger*. Fermentasi berlangsung pada suhu 32°C dengan shaker selama empat hari yang didasarkan pada hasil pengukuran *optical density* dari spora *A. niger*.

Hasil fermentasi dimurnikan melalui sentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan cairan enzim dari sel-sel kapang dan sisa media fermentasi. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar yang selanjutnya dimurnikan melalui fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% (b/v). Hasil fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% (b/v) mampu meningkatkan kemurnian enzim hingga 3 kali dari enzim kasarnya dengan aktivitas spesifik 0,210 U/mg protein. Enzim yang diperoleh dari fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% (b/v), kemudian diaplikasikan ke dalam kolom filtrasi gel



Gambar 1. Isolat kapang *A. niger*



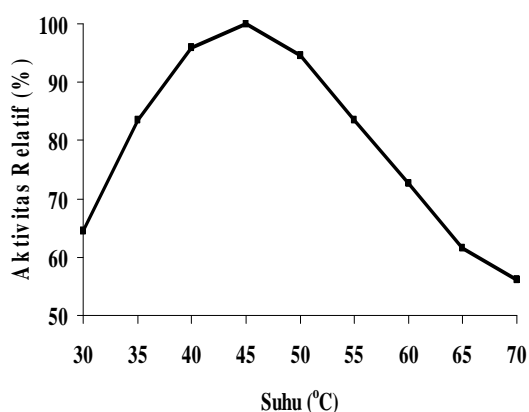
Gambar 2. Pola protein ($\lambda=540$ nm) dan aktivitas amiloglukosidase ($\lambda=560$ nm) hasil filtrasi gel Sephadex G-200 dengan ukuran 2,5 x 25 cm pada elusi buffer fosfat pH 6,4 dengan

menggunakan Sephadex G-200. Hasil pemisahan dengan Sephadex G-200 diperoleh pola protein dan aktivitas amiloglukosidase seperti pada Gambar 2.

Hasil pemisahan menunjukkan tiga puncak protein, tetapi yang memiliki aktivitas amiloglukosidase hanya pada puncak protein antara fraksi F11-F18 sedangkan fraksi yang lain tidak

menunjukkan adanya aktivitas. Fraksi enzim yang memiliki aktivitas tertinggi adalah F15 dengan aktivitas 0,484 U/mL.

Proses pemurnian menggunakan Sephadex G-200 telah meningkatkan aktivitas amiloglukosidase sebesar 1,921 U/mg protein. Dengan demikian tahap filtrasi gel telah meningkatkan kemurnian enzim 27 kali dari enzim kasarnya.

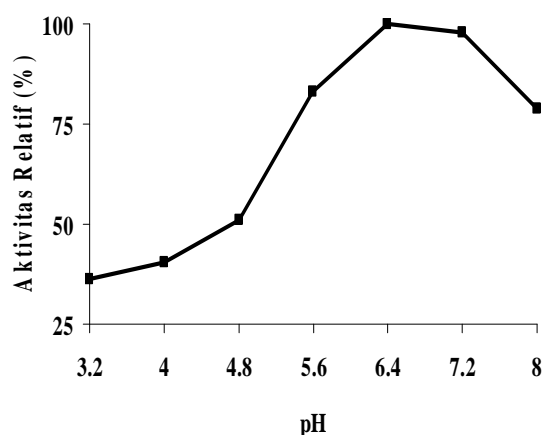


Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas glucoamilase

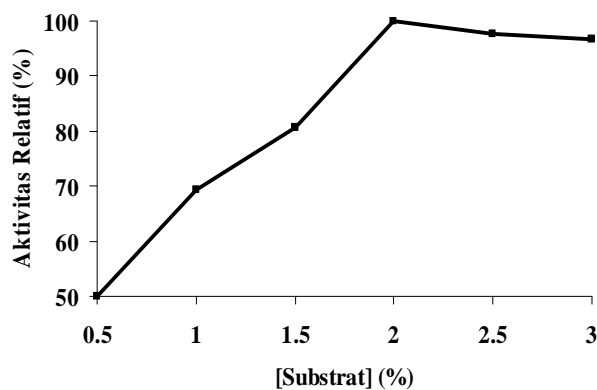
3.3. Karakterisasi Amiloglukosidase

Pengamatan pengaruh suhu terhadap aktivitas amiloglukosidase dilakukan pada interval suhu 30-70 °C yang diperlihatkan pada Gambar 3. Hasil pengamatan menunjukkan aktivitas amiloglukosidase terus meningkat diatas suhu 30°C dan mencapai maksimum pada suhu 45°C. Aktivitas enzim kemudian turun diatas suhu 45 °C yang disebabkan oleh

denaturasi enzim pada suhu tinggi. Sedangkan pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas amiloglukosidase menunjukkan pH optimum amiloglukosidase berada pada pH 6,4 (Gambar 4).



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas glucoamilase



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat pati terhadap aktivitas glucoamilase

Selain pengaruh suhu dan pH, pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas

enzim juga diamati. Gambar 5 memperlihatkan penambahan konsentrasi substrat pati dapat meningkatkan aktivitas glucoamilase hingga mencapai optimumnya pada konsentrasi pati 2% (b/v). Diatas konsentrasi pati 2% (b/v), aktivitas enzim tidak bertambah lagi dan menunjukkan pola yang konstan. Hal ini disebabkan enzim telah jenuh dengan substrat.

4. Kesimpulan

Enzim amiloglukosidase dari *Aspergillus niger* telah diisolasi menggunakan media ampas tepung sagu melalui fermentasi sistem *bacth* (kultur curah) dan dikarakterisasi pada interval suhu 30-70 °C, pH interval 2,5-8,0, dan konsentrasi substrat pati pada interval 0,5-3,0%. Suhu, pH, dan konsentrasi substrat optimum dari amiloglukosidase diperoleh pada masing-masing 45 °C, 6,4 dan 2,0%.

5. Pustaka

1. Ji, L.N., Zhao, X.R., dan Yang, H.Y. 1992. Effects of Trace Elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger* and treatment of cane molasses, *J. Industrial Microbiology*, 22 (2): 16-21.
2. Kulp, K. 1975. *Carbohydrates*. Academic Press. New York. p: 45.
3. Fukuda, Y., K. Teramoto, S. Hayashida, 1992, The hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate rich glucoamylase from a protease and glycosidase-negative mutant of *Aspergillus awomori* var. *kawachi* F-2035, *Journal of Biosci, Biotech. Biochem.* 56(1), 8-12.
4. Azis, S.A., D.C Ang, H.M. Yusof, M.I.A. Karim, A.B. Ariff, K.Uchiyama, S. Shioya, 2001, Effect of C/N ratio and starch concentration on ethanol production from sago starch using recombinant yeast, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 713-719.
5. Darwis, A.A. dan Sukara, E. 1990. *Isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim*. Penuntun Praktikum. Depdikbud. DIKTI. PAU-Biotek. IPB. Bogor.