AKTIVITAS EKSO-GLUKOAMILASE DARI MUTAN *Aspergillus niger* LYD85 DENGAN SUBSTRAT AMPAS TAPIOKA, AMPAS TAHU DAN SAGU

Marniati Salim, Abdi Dharma, Yopi Sartika
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Mutan *Aspergillus niger* LYD85, mutan radiasi sinar gamma yang diseleksi terhadap aktifitas ekso-glukoamilase dan produksi asam sitrat, digunakan untuk memfermentasi limbah tapioka, limbah tahu dan tepung sagu. Glukosa hasil hidrolisis pati pada medium fermentasi ditentukan dengan metoda Somogyi Nelson untuk menguji aktifitas enzim glukoamilase yang diekskresikan oleh *A. niger* LYD85, dan didapat kadar tertinggi pada limbah tapioka yaitu 42.703,2 µg/ml.

Mutan dapat memproduksi glukoamilase 1,2 – 1,3 kali lebih dari galur liar. Aktivitas glukoamilase ditemukan paling tinggi setelah fermentasi 144 jam, 120 jam dan 48 jam fermentasi berturut-turut untuk limbah tapioka, limbah tahu dan tepung sagu.

ABSTRACT

The mutant of *Aspergillus niger* LYD85, the gamma irradiated mutant that was selected for the activity of glucoamylase and higher production of acid, was applied to ferment the the waste of tapioca and tofu waste and sago flour. Glucose that was produced from hydrolisis of starch during fermentation was determined with Somogyi Nelson Method.

The mutant produced glucoamylase 1.2 – 1.3 times higher than wild type. The glucoamylase activity were the highest after 144 hour, 120 hour and 48 hour fermentation in cassava waste, tofu waste and sago flour respectivity.

PENDAHULUAN

Amilase adalah enzim yang mengkatalis hidrolisa pati menjadi karbohidrat yang lebih sederhana. Dikenal 3 jenis enzim amilase, yaitu α amilase, β amilase dan glukoamilase. Amilase merupakan suatu enzim penting secara ekonomi untuk berbagai proses industri. Enzim yang umum digunakan dalam industri adalah enzim ekstraselluler yang dihasilkan oleh mikroorganisme nontoksik seperti *A. niger*. Enzim ini telah banyak digunakan dalam industri sirup glukosa dengan proses sacharifikasi pati terlarut dan berbagai sumber seperti gandum, sagu dan lain-lain. Glukoamilase dapat diproduksi oleh *A. niger* dalam 2 bentuk yaitu glukoamilase 1 (G1) dan glukoamilase 2 (G2) molekul G1 lebih besar dari G2, yaitu 85.300 dan 7600. G1 menghidrolisis pati 3 kali lebih cepat dari G2[1].

Karakter enzim glukoamilase dari *A. niger* telah dilaporkan sebagai berikut; ekstraselular glukoamilase dari *A. niger* adalah suatu glikoprotein dengan perkiraan BM 90 kD dengan SDS PAGE, dan pI 3,4, temperatur aktifitas optimum 60° C, dan pH optimum 5,0.[2]. Enzim ini terikat dengan inhibitor 1-deoxynojirimycin dan dengan pseudo-tetrasaccharide acarbose berturut-turut dengan konstanta disosiasi 3 x 10^{-6} dan 9 x 10^{-11} M^{-1} pada suhu 27°C[3].

Frandsen (1994) telah mengganti Glu400 menjadi Gln dan Tyr48 menjadi Trip dari glukoamilase *A. niger* dengan "site directed mutagenesis". Hasil studi karakter enzim mutant ini menyarankan bahwa Glu400 berperan dalam proses katalisis, dan Tyr48 penting untuk mempertahankan geometri dari sisi aktif dan penting untuk stabilisasi dari suatu ion oxokarbonium substrat[4].

Glukoamilase dari Rhizopus dengan nama komersial gluczyme digunakan bersama dengan kefir bakterium

untuk fermentasi bahan minuman yang sangat disukai[4].

Berbagai sumber pati telah dijadikan sebagai substrat untuk menghasilkan enzim amilolitik, karena itu keberadaannya dalam medium selain sebagi sumber karbon juga diharapkan akan memacu peningkatan produksi enzim. Sumber pati telah dijadikan sebagai substrat seperti gandum, onggok, limbah tahu, susu kedelai[6], limbah kopra[7], pati beras[8].

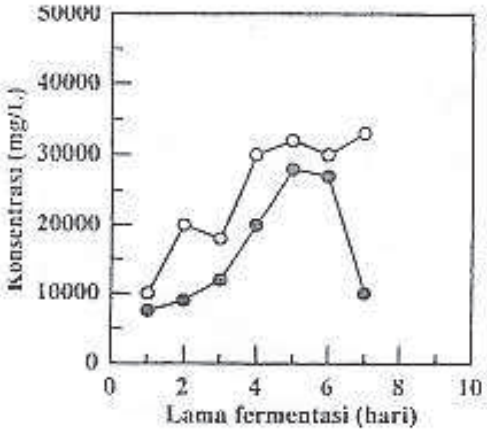
Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah-limbah yang ada, antara lain, limbah tapioka, limbah tahu dan sagu sebagai substrat, sehingga bahan yang terbuang dapat memberikan nilai komersial yang lebih tinggi daripada pati mentah, serta untuk menguji kemapuan muatan *A. niger* LYD85 untuk menghidrolisa pati serta menguji kemampuannya menghasilakan enzim glukoamilase dalam medium fermentasi yang mengandung limbah tapioka, limbah tahu dan tepung sagu..

BAHAN DAN METODA

Bahan

A. niger LYD85., mutan hasil radiasi dengan sinar gamma dan ditapis terhadap aktifitas exo-amilase dan produksi asam sitrat tinggi, limbah tapioka (onggok), limbah tahu, tepung sagu, medium PDA, medium fermentasi, larutan standar glukosa, reagen Nelson, reagen arsen molibdat dan lain-lain.

Metoda



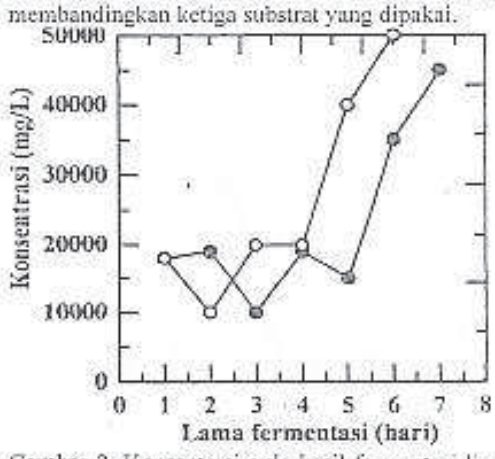
Gambar 1. Konsentrasi gula hasil fermentasi limbah tapioka oleh *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = glaur murni)

Metoda

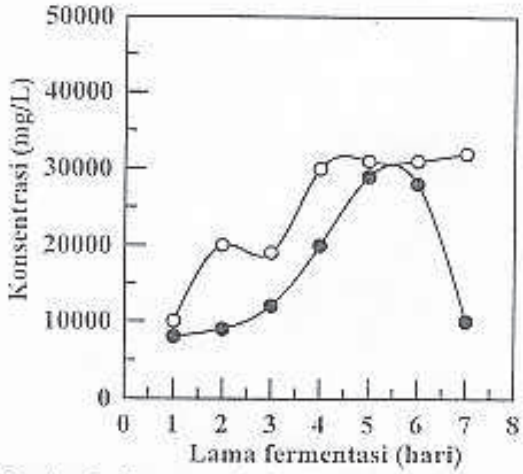
Mutan *A. niger* LYD85 digunakan untuk memfermentasi ampas tapioka, ampas tahu dan sagu. Didalam setiap 100 ml medium fermentasi terkandung urea 0,21 g, ekstrak ragi 0,30 g, KH_2PO_4 0,1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,03 g dan 2,5 g sumber karbon, yang dalam hal ini adalah ampas tapioka, ampas tahu dan tepung sagu. Setelah disterilisasi, kedalam medium fermentasi diinokulasikan 1 ml spora *A. niger* LYD85 dan parental dan fermentasi dibiarkan berlangsung selama 168 jam dengan kecepatan agotasi 250 rpm. Setelah fermentasi, campuran fermantasi disaring dengan kertas saring Whatman-41, dan filtrat diambil sebagai ekstrak kasar enzim amilase, kemudian ditentukan aktifitas enzim amilase dari filtrat. Sampel hasil fermentasi diambil setiap hari dan ditentukan kadar gula reduksi yang terbentuk dan aktifitas amilase. Aktifitas enzim amilase didalam filtratnya ditentukan dengan metoda Shymogy Nelson yaitu dengan menetukan kadar gula reduksi yang dihasilkan oleh aktifitas amilase terhadap substrat pati. Untuk itu disiapkan standar glukosa.

HASIL DAN DISKUSI

Hidrolisis pati oleh glukoamilase dilihat dari kadar glukosa yang dihasilkan pada proses fermentasi dengan metoda Somogyi Nelson. Kadar tertinggi didapat dari substrat tapioka, yaitu 42,7 mg/ml. Hal ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini dengan membandingkan ketiga substrat yang dipakai.



Gambar 2. Konsentrasi gula hasil fermentasi limbah tahu oleh *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = glaur murni)

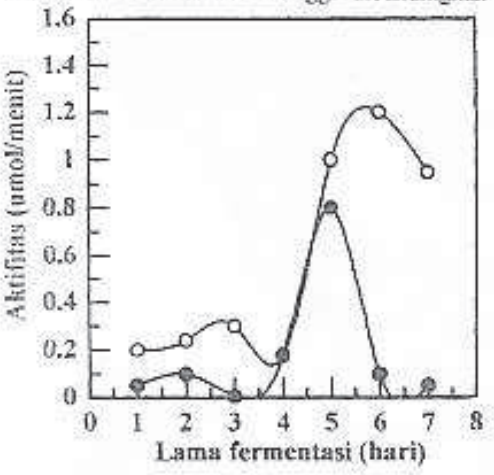


Gambar 3. Konsentrasi gula hasil fermentasi tepung sagu oleh *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = glaur murni)

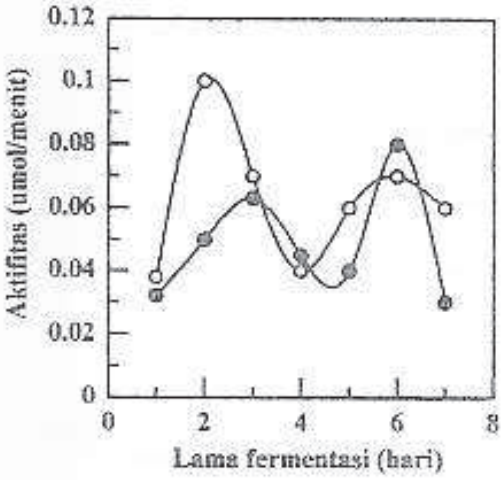
Dari gambar diatas terlihat bahwa profil produksi gula hasil fermentasi terhadap lama fermentasi hampir sama oleh *A. niger* LYD85 maupun oleh *A. niger* galur liar.

Konsentrasi gula hasil fermentasi didapatkan tertinggi pada hari keenam atau ketujuh. Hanya saja dihari ketujuh pada fermentasi tepung sagu oleh *A. niger* galur liar terlihat penuruan produksi gula dibandingkan dengan oleh mutan. Aktitas amilase dari mutan sedikit lebih tinggi dibandingkan pada galur liar, terlihat dari kadar glukosa yang dihasilkan sedikit lebih tinggi pada setiap fermentasi (Gambar 1,2 dan 3).

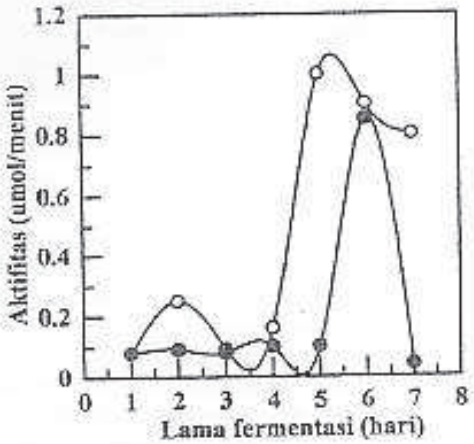
Konsentrasi gula tetinggi yang dihasilkan pada fermentasi oleh mutan *A. niger* LYD85 adalah berturut-turut 34,6, 42,3 , dan 6,0 mg/ml dengan substrat sagu, tapioka dan ampas tahu. Sedangkan konsentrasi gula hasil fermentasi oleh *A. niger* galur liar adalah berturut-turut 28,9, 40,4 dan 4,2 mg/ml dengan substrat sagu, tapioka dan ampas tahu. Konsentrasi gula hasil fermentasi tertinggi adalah pada fermentasi ampas tapioka, hal ini mungkin disebabkan karena limbah tapioka mengandung kadar pati yang lebih tinggi dari limbah tahu dan tepung sagu. Hasil uji aktifitas enzim glukoamilase dari ekstrak kasar enzim juga memperlihatkan bahwa *A. niger* LYD85 menghasilkan enzim yang lebih besar dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh galur liarnya. Hanya saja data hasil uji aktifitas enzim amilase pada limbah tahu agak sulit untuk diinterpretasi (Gambar 4, 5 dan 6). Aktifitas enzim amilase mulai terlihat meningkat pada hari ke lima atau hari keenam yaitu pada fasa stasioner dari pertumbuhan *A. niger* (data pertumbuhan tidak dimunculkan), Setelah itu aktifitas glukoamilase mulai terlihat menurun. Aktifitas enzim dinyatakan dengan jumlah µmol gula yang terbentuk dari hidrolisa pati oleh 0,1 ml preparat enzim per menit.



Gambar 4. Aktifitas enzimatik glukoamilase hasil fermentasi limbah tapioka dengan *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = glaur murni)



Gambar 5. . Aktifitas enzimatik glukoamilase hasil fermentasi limbah tahu dengan *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = glaur murni)



Gambar 6. Aktifitas enzimatik glukoamilase hasil fermentasi tepung sagu dengan *A. niger* LYD85 dan galur liar (O = mutan, ● = galur murni)

Dari uji aktifitas enzim glukoamilase yang terdapat didalam ekstrak kasar enzim terlihat bahwa aktivitas enzim amilase tertinggi didapatkan dalam ekstrak enzim pada medium fermentasi limbah tapioka yaitu 1,025 µmol/menit sedangkan dalam medium limbah tahu dan tepung sagu adalah 0,11 dan 0,97 µmol/menit.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa mutan *A. niger* LYD85 dapat menghasilkan enzim glukoamilase yang lebih tinggi dari galur liar dengan menggunakan, baik substrat limbah tapioka, limbah tahu dan tepung sagu. Sedangkan kadar glukosa, aktvitas glukoamilase tertinggi dengan substrat tapioka didapat berturut-turut 42,7 mg/ml dan 1,025 µmol/menit. Aktifitas glukoamilase dari *A. niger* LYD85 lebih tinggi sekitar 1,3 kali dibandingkan dengan aktifitas enzim pada galur liar.

DAFTAR PUSTAKA

1. J.W. Bennet, "Aspergillus Biology and Industrial Application" Butterwart Heinemann, USA, 106-114 (1992).
2. A.S. Vandersall, R.G. C.J. III. Cameron, G. Nairn, Yelenosky, R.J. Wodzinski, Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus ni'=ger* (syn. *A. fleuum*) NRRL 3135. Prep-biochem. 25, 29-55 (1995).
3. B.W. Sigurskjold, C.R. Berland, B. Svensson. Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from Aspergillus niger determined by displacement titration calorimetry. Biochemistryv. 33; 10191-10199 1994.
4. T.P. Frandsen, C. Dupont. J. Lehmbeck, B. Stoffer, M.R. Sierks, R.B. Honzatko, B. Svensson, Site-directed mutagenesis of the catalytic base glutamic acid 400 in glucoamylase from *Aspergillus niger* and of tyrosine 48 and glutamine 401, both hydrogen-bonded to the gamma-carboxylate group of glutamic acid 400. Biochemistry. 33; 13808-13816 (1994).
5. M. Tominaga, K. Sato. Lavctic acid fermentation of sacharified solution from rice flour. J. Food Sci. 61: 627-631 1996.
6. S.K. Khare " Citric Acid Production From Okara (Sary Residu) by Solid-state Fermentation, Elsevier Sci., Lim, Creat Britain, (1996).
7. A., Pandey, L. Ashakumary, P. Selvakumar, Copra waste-a novel substrate for solid-state fermentation. Bioresour-technol., 51; 217-220 (1995).
8. A. Pandey, P. Selvakumar, L. Ashakumary, Glucoamylase production by Aspergillus niger on rice bran is improved by adding nitrogen sources, World-j-microbiol-biotechnol 10; 348-349 (1994).