



OPTIMALISASI MEDIA PRODUKSI AMILOGLUKOSIDASE MENGUNAKAN FERMENTASI MEDIA PADAT

Medium Optimization in Amyloglucosidase Production Using Solid Fermentation

Rofiq Sunaryanto^{1,*}, Ahmad Marasabessy²

¹Pusat Teknologi Bioindustri, BPPT, Gedung LAPTIB 611 Kawasan PUSPIPTEK,
Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

²Balai Bioteknologi BPPT, Gedung 630 Kawasan PUSPIPTEK
Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314

*E-mail: rofiq.sunaryanto@bppt.go.id

ABSTRACT

*Amyloglucosidase is one of the enzymes that are widely used in liquid sugar industry. In the process of fermentation, the composition of the fermentation medium affects the activity of amyloglucosidase. In this study, medium optimization for amyloglucosidase production using solid fermentation by *Aspergillus niger* had been conducted. Optimization of solid media was conducted by determining the ratio of rice bran:starch combined with various sources of nitrogen. This study used organic and inorganic nitrogen sources. The organic nitrogen sources used were Corn Step Liquor (CSL) and peptone, while the inorganic nitrogen sources were ammonium nitrate, ammonium sulphate, and ammonium phosphate. Fermentation was carried out for 120 hours at 30°C. The results showed that the 1:1 combination of rice bran and starch produced the highest amyloglucosidase of 724 units/mL. Ammonium sulphate as an inorganic nitrogen source gave the best productivity of 823 units/mL, whereas it was CSL, rather than peptone, that produced higher amyloglucosidase with the productivity of 884 units/mL.*

Keywords: *Aspergillus niger, amyloglucosidase, fermentation, carbon source, nitrogen source*

ABSTRAK

Amiloglukosidase adalah salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri gula cair. Dalam proses fermentasi, komposisi medium fermentasi sangat berpengaruh terhadap aktivitas amiloglukosidase. Pada penelitian ini telah dilakukan optimalisasi media padat pada proses produksi amiloglukosidase secara fermentasi padat dengan menggunakan isolat *Aspergillus niger*. Optimalisasi media padat dilakukan dengan menentukan rasio dedak:pati terbaik yang selanjutnya dikombinasikan dengan beberapa sumber nitrogen. Sumber nitrogen yang digunakan adalah sumber nitrogen organik dan anorganik. Sumber nitrogen organik yang digunakan antara lain adalah *Corn Step Liquor (CSL)* dan pepton, adapun sumber nitrogen anorganik yang digunakan adalah amonium nitrat, amonium sulfat, dan amonium fosfat. Fermentasi dilakukan selama 120 jam pada suhu 30°C. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kombinasi perbandingan media sumber karbon dedak:pati 1:1 menghasilkan produktivitas amiloglukosidase tertinggi, yaitu 724 unit/mL. Amonium sulfat merupakan sumber nitrogen anorganik terbaik dan mampu menghasilkan produktivitas amiloglukosidase sebesar 823 unit/mL, sedangkan CSL menghasilkan produktivitas amiloglukosidase lebih tinggi dibandingkan pepton, yakni sebesar 884 unit/mL.

Kata kunci: *Aspergillus niger, amiloglukosidase, fermentasi, sumber karbon, sumber nitrogen*

PENDAHULUAN

Bahan baku berpati dan limbah agroindustri seperti onggok, dedak, bekatul, jerami banyak terdapat di Indonesia. Bahan baku berpati dan produk samping agroindustri seperti ini juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk proses fermentasi (Melliawati 2013). Salah satu produk fermentasi yang banyak memanfaatkan limbah agroindustri dan bahan berpati adalah produksi amiloglukosidase. Dedak padi sebagai hasil samping dari pengolahan beras giling terbukti dapat dipakai sebagai substrat pada fermentasi dengan menggunakan media padat (Kapilan 2015). Pada penggilingan padi akan dihasilkan dedak kira-kira sebanyak 10% dari total bahan. Dedak padi sangat potensial untuk dikembangkan sebagai substrat pada fermentasi dengan menggunakan media padat. Dedak tersusun dari berbagai macam senyawa kimia. Selain kaya karbohidrat dan lemak, dedak juga banyak mengandung protein, vitamin, dan mineral. Vitamin yang terdapat dalam dedak adalah vitamin B dan vitamin E, sedangkan mineralnya berupa kalsium, kalium, fosfor, dan besi.

Walaupun potensi sumber alam Indonesia dan mikroorganisme sangat besar untuk industri enzim khususnya amilase, namun sampai saat ini di Indonesia belum ada industri yang memproduksi enzim khususnya amilase. Sebagai negara yang banyak menghasilkan bahan berpati (ubi kayu, sagu, dan lain-lain) dan kaya akan keanekaragaman mikroorganisme, Indonesia memiliki potensi untuk memproduksi amilase khususnya amiloglukosidase.

Amiloglukosidase dapat diproduksi dalam skala industri melalui fermentasi kultur cair maupun fermentasi padat. Fermentasi dengan media cair maupun media padat mempunyai keunggulan dan kelemahan masing-masing. Dalam menjaga kondisi proses fermentasi sesuai dengan apa yang diinginkan seperti pH, aerasi, kehomogenan media, fermentasi dengan media cair lebih menguntungkan, tetapi biaya operasional dan alat yang digunakan lebih mahal. Fermentasi dengan media padat mempunyai keunggulan lebih sederhana dalam pelaksanaannya, biaya operasional dan peralatan fermentasi lebih

murah, tetapi untuk menjaga kondisi fermentasi sesuai dengan apa yang diinginkan seperti kehomogenan media, aerasi sangat sulit untuk dilakukan (Ramachandran et al. 2013). Dalam aplikasinya fermentasi dengan media padat dapat memanfaatkan limbah pertanian seperti limbah teh (Kapilan 2015), limbah kopra (Castro dan Sato 2015; Mrudula dan Murugammal 2011), dan limbah dari proses pengolahan pati (Kiran et al. 2014; Sindhu et al. 2015). Beberapa parameter yang harus diperhatikan di dalam fermentasi media padat antara lain konsentrasi substrat, pH, kelembaban, suhu, dan produksi metabolit sekunder yang mungkin dapat menyebabkan kontaminasi (Tabassum et al. 2014). Fermentasi dengan media padat akan memberikan hasil yang lebih baik karena jumlah substrat yang tersedia lebih banyak (20-50%), sehingga peranan substrat menjadi lebih nyata karena jumlah substrat yang perlu dihidrolisis lebih tinggi. Jumlah substrat yang tinggi akan menginduksi sintesis enzim-enzim ekstraselular hidrolitik yang diperlukan untuk mendegradasi substrat itu sendiri (Kapilan 2015). Menurut Tani et al. (1986), Koyani dan Rajput (2015) bahwa pada kondisi yang tepat produksi amiloglukosidase dengan menggunakan media padat, tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi dengan media cair. Mikroorganisme yang sering dibiakkan pada proses fermentasi media padat adalah bakteri, khamir, dan kapang. Namun demikian kapang merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam proses ini.

Amiloglukosidase (EC 3.2.1.3) adalah enzim yang dapat mengkatalis reaksi hidrolisis amilum dan poli- atau oligosakarida lainnya menghasilkan glukosa (Ayola et al. 2013). Dengan kemampuan tersebut amiloglukosidase banyak digunakan dalam industri gula cair, dekstrosa dan glukosa cair. Selain itu enzim ini juga banyak digunakan dalam industri farmasi, pembuatan minuman ber-alkohol, dan produksi sel tunggal (Mittal et al. 2013).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kombinasi media campuran dedak:pati yang optimum dan menentukan sumber nitrogen yang paling cocok untuk produksi amiloglukosidase.

BAHAN DAN METODE

Isolat mikroba

Isolat mikroba yang digunakan untuk produksi enzim amiloglukosidase adalah *Aspergillus niger* yang merupakan kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi Balai Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.

Kombinasi campuran media

Komposisi media fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada Tani et al. (1986) yang dimodifikasi. Komposisinya adalah sebagai berikut: A g tapioka, B g dedak, 1,67 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,52 g $Ca(NO_3)_2$, dan 37 mL air. Besarnya nilai A dan B mengikuti perlakuan perbandingan dedak:tapioka yaitu sebesar (1:1), (1:2), (1:3), (2:1), dan (3:1) dengan berat total dedak dan tapioka sebesar 57,82 gram. Media fermentasi dimasukkan ke dalam toples dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Fermentasi dilakukan dalam toples yang bervolume satu liter selama 120 jam pada suhu 30°C.

Pengaruh sumber nitrogen

Campuran dedak:tapioka terbaik yang diperoleh dari hasil percobaan sebelumnya digunakan untuk penentuan sumber nitrogen terbaik. Sumber nitrogen yang digunakan adalah sumber nitrogen organik dan anorganik. Adapun sumber nitrogen anorganik yang digunakan adalah amonium sulfat, amonium nitrat dan amonium fosfat, sedangkan sumber nitrogen organik yang digunakan adalah *Corn Steep Liquor* dan pepton. Jumlah sumber nitrogen yang ditambahkan sebanyak 1% b/b untuk setiap media.

Metode analisis

Hasil fermentasi padat diekstraksi menggunakan bufer asetat pH 4,6 selama 1 jam. Selanjutnya disaring dengan kertas saring. Filtrat enzim yang diperoleh diukur produktivitas amilasena. Pengukuran produktivitas enzim adalah sebagai berikut: Filtrat enzim diencerkan menggunakan bufer asetat pH 4,6 dengan faktor pengenceran (fp) kali. Sebanyak 1,9 mL *soluble starch* sebagai substrat (V_{sb}) dicampur 0,1 mL larutan contoh (V_c), kemudian diinkubasi selama 20 menit (t) pada suhu 60°C. Setelah

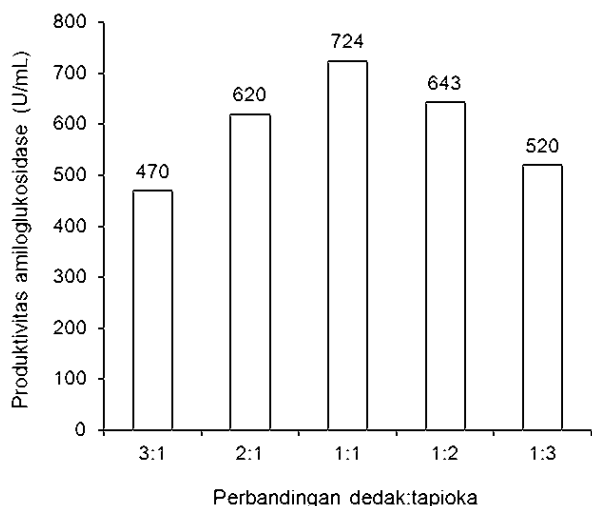
inkubasi selesai dilakukan pemanasan dengan air mendidih selama 5 menit untuk menghentikan kerja enzim. Hal yang sama dilakukan untuk larutan blanko, larutan sampel dipanaskan terlebih dahulu sebelum dicampur dengan substrat. Kemudian diukur gula reduksinya (Cgr) dengan metode Somogy, dimana berat molekul glukosa (BM) adalah 180. Perhitungan produktivitasnya di sajikan dalam persamaan 1. Satu unit enzim (A) didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis *soluble starch* akibat produktivitas enzim per menit pada kondisi percobaan.

$$A = \frac{Cgr \times (V_c + V_{sb}) \times fp}{BM \times t \times V_c} \dots\dots\dots (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kombinasi terbaik sumber karbon

Perbandingan campuran dedak:tapioka sebagai sumber karbon sangat menentukan produktivitas *Aspergillus niger* dalam menghasilkan amiloglukosidase. Rasio perbandingan dedak:tapioka yang digunakan adalah 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 dan 3:1. Hasil analisis ragam menunjukkan variasi komposisi dedak:tapioka berpengaruh nyata terhadap produktivitas amiloglukosidase. Hasil uji lanjut Duncan dengan taraf nyata α (0,05) menunjukkan media dedak:tapioka (1:1) menghasilkan produktivitas amiloglukosidase tertinggi, yaitu sebesar 724 U/mL, yang diikuti oleh media dedak:tapioka (1:2), (2:1), (1:3) dan (3:1). Gambar 1 menunjukkan media dedak:tapioka (1:1) menghasilkan produktivitas amiloglukosidase yang berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Menurut Tani et al. (1986) dan Souto et al. (2016), tapioka merupakan media yang cocok untuk produksi amiloglukosidase. Seperti diketahui tapioka memiliki ikatan glikosida $\alpha,1,4$ -D-Glikosidik yang dapat menginduksi *Aspergillus niger* untuk mensekresi amiloglukosidase. Namun pada komposisi media dengan rasio jumlah tapioka yang lebih besar ternyata menimbulkan permasalahan pada sifat fisik media. Media menjadi lebih kental dan lengket yang mengakibatkan aerasi udara dalam media menjadi berkurang.

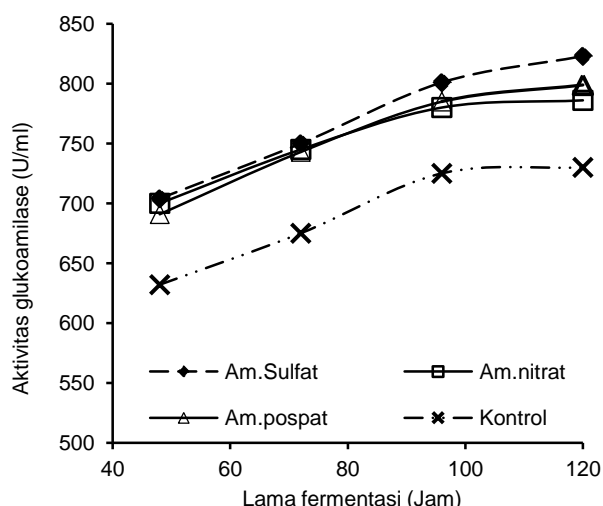


Gambar 1. Produktivitas amilglukosidase yang dihasilkan dengan variasi dedak dan tapioka.

Permasalahan ini dapat dikurangi dengan menambahkan dedak. Disamping memperbaiki sifat fisik media, dedak juga kaya akan protein. Hasil analisis proksimat menunjukkan dedak mengandung 13,65% (b/b) protein, dengan demikian kombinasi media dedak:tapioka akan menghasilkan komposisi media yang saling melengkapi.

Komposisi media dedak:tapioka (1:1) menunjukkan sifat fisik media yang cenderung berbentuk granula, sehingga proses difusi oksigen ke dalam media berjalan dengan baik. Pertumbuhan biomassa *Aspergillus niger* BCS pada media dedak:tapioka (1:1) terlihat lebih cepat dan sporulasi terjadi pada hari ke 4. Lain halnya dengan media dedak:tapioka (1:2) dan (2:1), sporulasi terlihat lebih awal, yaitu pada hari ke 2. Pembentukan spora mengisyaratkan bahwa sel-sel kapang berubah menjadi sel-sel resisten yang bersifat dorman. Pada fase ini proses metabolisme kapang akan menjadi minimal dan sekresi amilglukosidase terhenti. Sporulasi kapang juga berkaitan dengan respon terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan yang dapat disebabkan oleh kekurangan substrat, perubahan suhu, kelembaban atau perubahan pH (Alexopoulos et al. 1996).

Penurunan produktivitas amilglukosidase pada rasio tapioka terhadap dedak lebih dari satu yaitu dedak:pati (1:2) dan (1:3) diduga dipengaruhi oleh kondisi media yang kental dan lengket. Proses gelatinisasi pati akan mengakibatkan medium menjadi lengket dan



Gambar 2. Pengaruh sumber nitrogen anorganik (konsentrasi 1% b/b) terhadap produktivitas amilglukosidase.

viscous, sehingga porositasnya menjadi kecil dan menghambat proses difusi oksigen ke dalam media, akibatnya kapang akan sulit tumbuh akibat gelatinisasi pati.

Pengaruh sumber nitrogen

Kombinasi campuran dedak:pati (1:1) hasil dari percobaan sebelumnya digunakan sebagai media kontrol (tanpa perlakuan penambahan sumber nitrogen). Sumber nitrogen anorganik yang ditambahkan dalam media perlakuan meliputi amonium sulfat (Am. sulfat), amonium pospat (Am. pospat), dan amonium nitrat (Am. nitrat) (Gambar 2).

Gambar 2 menunjukkan bahwa sumber nitrogen anorganik secara keseluruhan memiliki pengaruh terhadap produktivitas amilglukosidase, terbukti dari ketiga macam sumber nitrogen anorganik, semuanya mampu menaikkan produktivitas amilglukosidase jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan sumber nitrogen). Dilihat dari kandungan sumber nitrogen media kontrol sebenarnya media tersebut sudah mengandung sumber nitrogen dari dedak, namun kandungan nitrogen dedak belum mencukupi untuk kebutuhan metabolisme dalam sel mikroba.

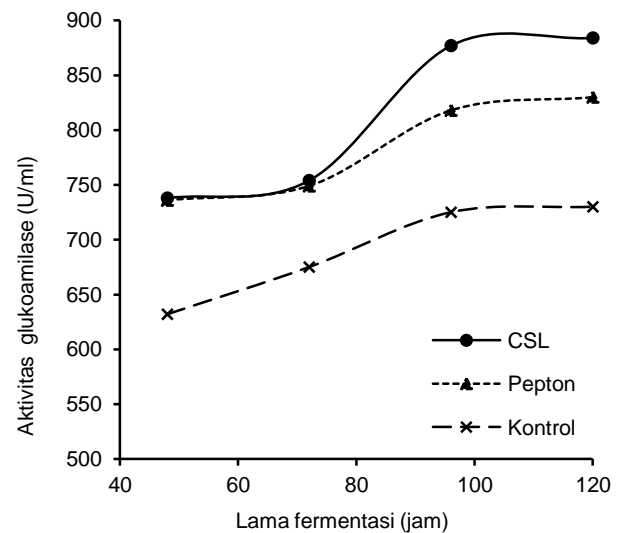
Tiga sumber nitrogen anorganik yang digunakan ternyata menghasilkan produktivitas amilglukosidase yang berbeda-beda. Hasil uji lanjut Duncan dengan taraf nyata α (0,05) perlakuan terhadap sumber nitrogen anorganik menghasilkan produktivitas amilglukosidase yang berbeda nyata.

Sumber nitrogen amonium sulfat menghasilkan produktivitas amiloglukosidase paling tinggi, yaitu 823 U/mL, selanjutnya diikuti amonium fosfat dan amonium nitrat berturut-turut sebesar 799 dan 786 U/mL. Sebagai standar pembandingan digunakan kontrol tanpa diberikan sumber nitrogen yang menghasilkan produktivitas amiloglukosidase sebesar 730 U/mL.

Sumber nitrogen lain yang digunakan dalam percobaan ini adalah sumber nitrogen organik. Pada percobaan ini digunakan *Corn Step Liquor* (CSL) dan pepton. Gambar 3 menunjukkan efek sumber nitrogen CSL dan pepton terhadap produktivitas amiloglukosidase. Dari kedua sumber nitrogen organik yang digunakan ternyata menghasilkan produktivitas amiloglukosidase yang lebih besar dibandingkan sumber nitrogen anorganik. Diduga hal ini disebabkan karena di dalam sumber nitrogen organik terdapat nutrisi lainnya selain sumber nitrogen itu sendiri yang dibutuhkan. Diketahui bahwa CSL maupun pepton merupakan campuran beberapa asam amino dan mineral lainnya. Sumber nitrogen CSL merupakan sumber nitrogen yang jauh lebih murah dibandingkan dengan sumber nitrogen anorganik maupun sumber nitrogen pepton. CSL merupakan produk samping dari proses fermentasi jagung. Gambar 3 menunjukkan produktivitas amiloglukosidase pada media dengan CSL ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan media pepton yaitu sebesar 884 U/mL dan campuran pepton menghasilkan 830 U/mL. Hasil uji lanjut Duncan dengan taraf nyata α (0,05) perlakuan penggunaan sumber nitrogen organik menghasilkan produktivitas amiloglukosidase yang berbeda nyata satu sama lainnya. Dengan demikian sumber nitrogen CSL merupakan sumber nitrogen yang direkomendasikan untuk produksi amiloglukosidase secara fermentasi padat.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa produktivitas amiloglukosidase dapat ditingkatkan dengan memperbaiki komposisi sumber karbon (dedak:tapioka) dan sumber nitrogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi variasi (dedak:tapioka) 1:1 menghasilkan produktivitas amiloglukosidase yang lebih tinggi dibandingkan



Gambar 3. Pengaruh sumber nitrogen organik (konsentrasi 1% b/b) terhadap produktivitas amiloglukosidase

empat jenis perlakuan lainnya. Secara keseluruhan sumber nitrogen yang digunakan di dalam penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi 15% (b/b) *Corn Step Liquor* menghasilkan produktivitas amiloglukosidase tertinggi yaitu sebesar 884 U/ml. Sumber nitrogen CSL direkomendasikan untuk digunakan dalam fermentasi untuk produksi amiloglukosidase.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexopolous JC, Mims CW, Blackwell M (1996) *Introductory of mycology*. J Wiley. New York
- Ayoola AA, Addeyo AO, Efeovbokhan CV, Olasimbo DA (2013) Optimum hydrolysis condition of cassava starch for glucose production. *Int J Adv Res IT Eng* 2:92–101
- Castro RJS, Sato HH (2015) Enzyme production by solid state fermentation: general aspect and analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro—industrial waste valorization. *Waste biomass valorization* 6:1085–1093
- Kapilan R (2015) Solid state fermentation for microbial products: A review. *Arch Appl Sci Res* 7:21–25
- Kiran EU, Trzcinski AP, Liu Y (2014) Glucoamylase production from food waste by solid state fermentation and its evaluation in the hydrolysis of domestic food waste. *Biofuel Res J* 1: 98–105

- Koyani R, Rajput KS (2015) Solid state fermentation: Comprehensive tool for utilization of lignocellulosic through biotechnology. *Bioprocess Biotech* 5:1–15
- Melliawati R (2013) Pemanfaatan limbah pertanian untuk penghasil enzim amilase oleh *Aspergillus awamori* KT-11 dan *Saccharomycopsis* sp. TJ-1. Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA-UNNES Hal:439–445
- Mittal A, Aggarwa NK, Gupta V, Singh G, Yadav A (2013) Purification and characterization of amyloglucosidase by *Aspergillus awamori* NA21 under Solid State Fermentation using tapioca powder. *Octa J Biosci* 1:122–131
- Mrudula S, Murugammal R (2011) Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Braz J Microbiol* 42:1119–1127
- Ramachandran V, Pujari N, Matey T, Kulkarni S (2013) Enzymatic hydrolysis for glucose - A Review. *Int J Sci Eng Technol Res* 2:1937–1942
- Sindhu R, Pandey A, Binod P (2015) Solid-state fermentation for production of poly(hydroxyalcanoates). *Chem Biochem Eng* 29:173–181 doi:10.15255/CABEQ.2014.2256
- Souto LRF, Caliaro M, Junior MSS, Fiorda FA, Garcia MC (2016) Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. *Food Sci Technol*. doi:10.1590/1678-457X.0023
- Tabassum R, Khaliq S, Rajoka MI, Agblevor F (2014) Solid state fermentation of a raw starch digesting alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* RT7PE1 and its characteristics. *Biotechnol Res Int* 2014:1–8. doi: 10.1155/2014/495384
- Tani Y, Vongsuvanlert V, Kumnuanta J (1986) Raw cassava starch-digestive glucoamylase of *Aspergillus* sp.n-2 isolated from cassava chips. *J Ferment Technol* 5:405–410