

## Karakterisasi Glukoamilase Hasil Produksi *Aspergillus niger* BCS dengan Penyangga Fermentasi Sekam dan Dedak

MAHYUDIN A. RAHMAN<sup>1\*</sup>, KOESNANDAR<sup>1</sup>, GANY H<sup>2</sup>,  
AHMAD MARASABESSY<sup>2</sup>, ALI ROHMAN<sup>3</sup>, USMAN SUMO FT<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pusat Pengkajian & Penerapan Teknologi Bioindustri, Departemen TAB, BPPT  
Jl. M.H. Thamrin 8 Jakarta Pusat

<sup>2</sup>Balai Pusat Bioteknologi, BPPT, Jl. M.H. Thamrin 8 Jakarta Pusat

<sup>3</sup>Program Studi Magister MIPA,  
Kampus Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat

Diterima 5 Mei 2004, Disetujui 11 Juli 2004

**Abstract:** Glucoamylase, the enzyme which converts starch to dextrins and glucose, is used in the starch-processing industry, especially for the production of glucose crystal and high fructose syrup. The aim of this work was to produce glucoamylase by *Aspergillus niger* BCS using rice husk as solid substrate support. For this purpose, rice husk added to the mixture was optimized on a fixed weight ratio of cassava starch and rice bran. After that, using optimum rice husk concentration, optimization of the weight ratio of cassava starch and rice bran was carried out. Glucoamylase *A. niger* produced in this work was characterized by determining its optimum pH and temperature, its stability under various pH and temperature, its kinetic parameters, its hydrolysis products using soluble starch as substrate, and its molecular weights. The optimum conditions for glucoamylase production by *A. niger* obtained when the weight ratio of cassava starch: rice bran was 1:1 (dry basis, db) and the rice husk concentration in the fermentation medium was 20% by weight (db). Under these optimized conditions, enzyme units as high as 1774 U/g dry fermented substrate was obtained when fermentation was carried out for 5 days at 30°C. Optimum pH of glucoamylase *A. niger* was 4.5 and its optimum temperature activity was 65°C. This enzyme was stable at pH 3.0 – 7.0 and at a temperature up to 50°C.

**Key words:** Glucoamylase, *Aspergillus niger*, solid substrate, support, rice husk

### PENDAHULUAN

Glukoamilase, enzim yang dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa, merupakan enzim yang sangat penting diindustri pengolahan pati, terutama produksi kristal glukosa dan *high fructose syrup* (HFS). Glukoamilase adalah enzim ekstraseluler komersial yang diperoleh dari beberapa kapang *Aspergillus* atau *Rhizopus*<sup>(1)</sup>. Walaupun menunjukkan aktivitas transglukosidase, glukoamilase yang berasal dari *Aspergillus* bersifat lebih termostabil daripada glukoamilase yang berasal dari *Rhizopus*<sup>(2)</sup>. Hal ini menyebabkan glukoamilase yang berasal dari *Aspergillus* dapat bekerja pada suhu yang cukup tinggi sehingga reaksi hidrolisis dapat berjalan dengan cepat. Menurut Creighton, dengan perbaikan galur

secara tradisional dan optimasi proses fermentasi, *Aspergillus niger* dapat memproduksi glukoamilase dalam jumlah yang cukup tinggi (lebih dari 20 g glukoamilase/l)<sup>(3)</sup>.

Kualitas dan kuantitas glukoamilase yang dihasilkan oleh kapang dipengaruhi oleh metode pembiakan. Dorta *et al.* melaporkan bahwa aktivitas produksi glukoamilase oleh *A. niger* dengan metode fermentasi padat (*solid state fermentation*-SSF) tiga kali lebih tinggi dibanding fermentasi terbenam (*submerged fermentation*-SmF)<sup>(4)</sup>.

Jenis substrat padat yang digunakan pada SSF adalah bahan alam seperti makromolekul lignoselulosa, lignin, selulosa, pektin, pati, atau campurannya. Bahan-bahan ini merupakan produk pertanian atau limbah agroindustri sehingga harganya relatif murah<sup>(5)</sup>. Di samping itu, pati lebih mudah diuraikan dan dikonsumsi oleh bermacam-macam mikroorganisme. Pati yang paling sering dipakai pada SSF

\* Penulis korespondensi, telp. 6221-3169530,  
e-mail: yudinr@hotmail.com

adalah pati singkong (pati tapioka), beras, dan dedak gandum<sup>(6)</sup>.

Substrat padat yang telah dipakai untuk membiakkan *A. niger* pada produksi glukoamilase, di antaranya adalah dedak gandum<sup>(7)</sup>, campuran dedak gandum dan tepung jagung<sup>(8)</sup> serta dedak padi<sup>(1)</sup>. Ramadas *et al.* membiakkan *A. niger* pada pati tapioka dengan menambahkan nitrogen anorganik untuk meningkatkan kandungan protein dalam pati tersebut<sup>(5)</sup>. Kandungan nitrogen yang rendah mengakibatkan penggunaan tapioka sebagai substrat SSF memerlukan penambahan sumber nitrogen untuk menyeimbangkan kandungan karbon dan nitrogen pada media produksi glukoamilase oleh *A. niger*<sup>(6)</sup>. Dedak padi dapat digunakan sebagai sumber nitrogen karena kaya akan karbohidrat, lemak, protein sebagai sumber N, vitamin (B1, B2, B3, E, biotin, pantetonat, dan folat) dan sumber mineral (Ca, F, dan Fe)<sup>(9)</sup>.

Kelemahan penggunaan pati dan dedak pada proses fermentasi adalah sumber karbon merupakan bagian penyusun struktur bahan itu sendiri. Selama pertumbuhan mikroorganisme, bahan tersebut akan terdegradasi sehingga bentuk geometri dan sifat fisik akan berubah<sup>(10)</sup>. Sebelum digunakan pada SSF perlu proses gelatinisasi karena sebagian besar mikroorganisme lebih mudah tumbuh pada pati tergelatinisasi dari pada pati mentah<sup>(8,5)</sup>. Gelatinisasi pati dapat menimbulkan masalah, yaitu tekstur pati menjadi rusak dan terbentuk massa yang lengket serta menggumpal sehingga porositas bahan tersebut rendah dan kemampuannya untuk transfer massa maupun panas berkurang<sup>(10)</sup>.

Untuk menghindari proses gelatinisasi dilakukan fermentasi pada substrat pati tapioka dengan isolat kapang yang mampu menguraikan pati mentah<sup>(11)</sup>. Di lain pihak, untuk mengatasi terbentuknya massa pati yang lengket dan menggumpal selama proses gelatinisasi, dapat dilakukan penambahan minyak tanaman sebelum proses gelatinisasi<sup>(6)</sup>.

Untuk mempertahankan bentuk geometri dan sifat fisik media pada SSF sehingga transfer bahan dan panas lebih terkendali, digunakan bahan padat *inert* untuk menyangga substrat cair<sup>(10)</sup>. Penggunaan bahan padat *inert* sebagai penyangga untuk meningkatkan porositas media dan memperbaiki keseimbangan aktivitas air ( $a_w$ ) selama fermentasi menggunakan substrat padat<sup>(11)</sup>.

Bahan penyangga *inert* dapat berupa bahan buatan (seperti polistirena, *foam* poliuretana, vermikulit, dan amberlit) atau bahan alami (seperti lempung, *bagasse*, dan sekam)<sup>(10)</sup>. Bahan-bahan yang telah dipakai sebagai penyangga pada SSF, di antaranya adalah tebu<sup>(3)</sup>, amberlit<sup>(12)</sup>, *bagasse*<sup>(13)</sup>,

sekam padi<sup>(11)</sup>, dan lain-lain.

Sekam padi adalah limbah dari penggilingan padi. Karena kandungan silika yang cukup tinggi dan hampir semua karbohidrat penyusun adalah selulosa dan hemiselulosa<sup>(9)</sup> maka sekam bersifat sangat keras, *inert*, harganya murah dan mudah diperoleh di Indonesia.

Penelitian bertujuan melakukan produksi glukoamilase oleh *A. niger* BCS menggunakan sekam sebagai penyangga substrat padat campuran pati tapioka dan dedak padi. Untuk itu, dilakukan optimasi penggunaan sekam padi sebagai penyangga substrat padat campuran pati tapioka dan dedak padi untuk produksi glukoamilase oleh *A. niger* BCS. Selanjutnya, dilakukan optimasi substrat campuran pati tapioka dan dedak padi pada fermentasi menggunakan penyangga sekam yang optimum. Dilakukan juga karakterisasi terhadap glukoamilase yang diproduksi dengan menentukan pH dan suhu optimum, stabilitas terhadap pH dan suhu.

## BAHAN DAN METODE

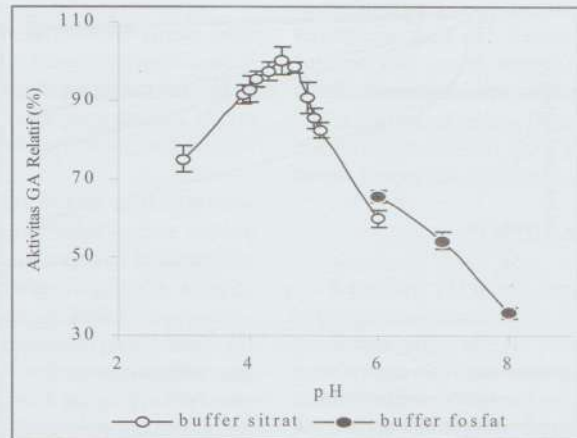
**BAHAN.** Mikroorganisme: *Aspergillus niger* BCS, koleksi BP2 Bioteknologi BPPT), bahan kimia: *potato dextrose agar*, sekam padi, dedak padi,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , Tween 80,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaOH, *soluble starch*, Na-asetat,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , HCl, asam sitrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , glukosa,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , anilin, maltosa, etanol, metanol, propanol, larutan somgyi, HMW Marker kit, difenil amin.

**METODE.** Pada penelitian ini dilakukan analisis aktivitas glukoamilase pada berbagai rentang pH dan suhu<sup>(15)</sup>, analisis gula pereduksi<sup>(16)</sup>, dan kadar air (gravimetri).

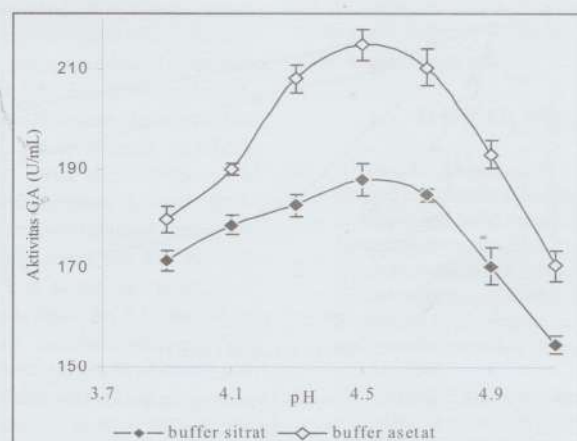
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Penentuan pH dan suhu optimum glukoamilase.** pH tidak hanya mempengaruhi substrat, tetapi juga menentukan sifat-sifat enzim yang dihasilkan. Suatu enzim dapat bekerja pada berbagai kondisi pH, tetapi aktivitasnya optimum pada kisaran pH yang sempit saja<sup>(17)</sup>. Seperti protein lainnya, enzim mempunyai beberapa gugus yang dapat terionisasi. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan pada gugus-gugus tersebut. Hal ini mengakibatkan perubahan struktur, konformasi, dan sisi aktif enzim<sup>(18)</sup>. Di samping itu, perubahan ekstrim dari pH mengalami denaturasi pada enzim. Grafik nilai pH terhadap aktivitas glukoamilase disajikan pada Gambar 1.

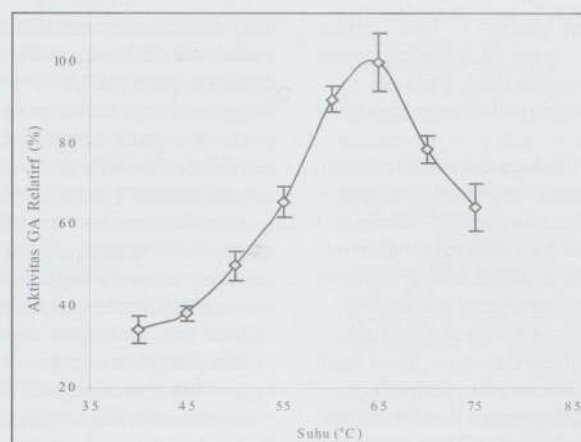
Glukoamilase umumnya aktif pada pH asam,



Gambar 1. Pengaruh perubahan pH terhadap aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS

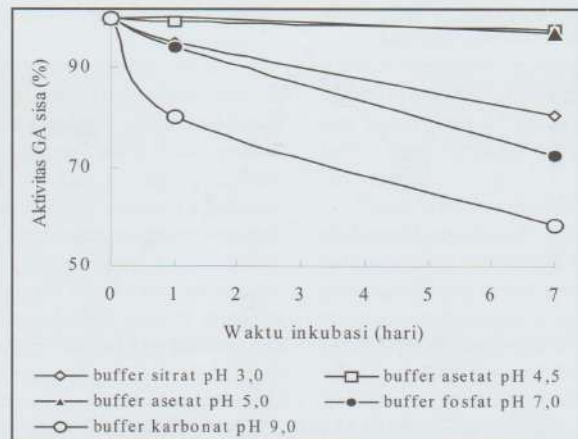


Gambar 2. Perbandingan aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS pada dapar sitrat dan asetat diberbagai nilai pH.

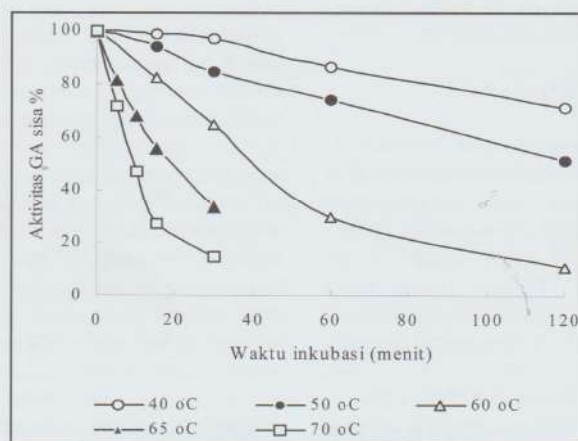


Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS.





Gambar 4. Pengaruh pH terhadap stabilitas glukoamilase *A. niger* BCS.



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap stabilitas glukoamilase *A. niger* BCS.

dengan nilai pH optimum sekitar 4,5 – 5,0<sup>(8)</sup>. Terlihat bahwa glukoamilase *A. niger* BCS optimum pada pH 4,5 dengan aktivitas 188 U/ml. Pada pH 3,9 – 4,9 enzim ini bekerja dengan aktivitasnya lebih besar dari 90%.

Kenaikan pH lebih berpengaruh terhadap aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS daripada penurunan nilai pH. Kenaikan pH 1,5 satuan dari pH optimum menyebabkan penurunan aktivitas enzim 40%, sedang penurunan pH sebesar itu hanya menyebabkan aktivitas enzim turun sekitar 25%.

Jenis dapar pun mempengaruhi aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS. Dari Gambar 1, sitrat lebih mendeaktivasi enzim glukoamilase daripada dapar fosfat, misalnya pH 6,0, dapar sitrat dan dapar fosfat aktivitas enzim masing-masing 112 dan 123 U/ml. Pengaruh jenis dapar terhadap aktivitas glukoamilase

diuji dengan cara membandingkan dapar sitrat dan asetat pada penentuan aktivitasnya. Pengujian dilakukan pada pH 3,9 – 5,1 (Gambar 2). Pada pH yang sama, dapar sitrat memberikan aktivitas lebih rendah dari pada dapar asetat, tetapi pada kedua jenis dapar tersebut glukoamilase *A. niger* BCS menunjukkan pH optimum sama yakni pH 4,5.

Secara umum dengan kenaikan suhu mempercepat reaksi enzimatik<sup>(17)</sup> Hal ini disebabkan kenaikan suhu yang dapat meningkatkan energi zat-zat yang bereaksi hingga mampu melampaui energi aktivasi. Walaupun demikian, enzim adalah protein yang akan mengalami denaturasi pada suhu tinggi. Oleh karena itu, pada batas suhu tertentu, laju reaksi enzimatik akan meningkat jika suhu dinaikkan. Reaksi berjalan paling cepat pada suhu optimum, namun pada suhu yang lebih tinggi laju reaksi

menurun.

Selain ditentukan oleh sifat dasar enzim, suhu optimum suatu enzim juga tergantung pada kondisi lingkungannya. Lama waktu pengujian juga akan mempengaruhi suhu optimum yang diamati. Makin lama waktu pengujian, suhu optimum yang diamati akan semakin rendah<sup>(17)</sup>.

**Penentuan stabilitas enzim glukoamilase pada pH dan suhu.** Stabilitas enzim adalah kemampuan enzim untuk menjaga struktur dan konformasinya pada kondisi lingkungan tertentu sehingga aktivitas tetap tinggi. Pada industri, suatu reaksi enzimatik sering dilakukan pada kondisi pH dan suhu yang cukup ekstrim dalam waktu yang cukup lama. Oleh karena itu, di samping pH dan suhu optimum, faktor penting yang menentukan kualitas enzim industri adalah stabilitas enzim terhadap pH dan suhu<sup>(17)</sup>.

Hasil uji pengaruh inkubasi glukoamilase *A. niger* BCS pada berbagai pH pada suhu 4°C terhadap stabilitasnya disajikan pada Gambar 4. Setelah inkubasi selama 1 hari pH 3,0–7,0, glukoamilase *A. niger* BCS mampu mempertahankan aktivitas lebih besar dari 90%. Hal ini sesuai dengan stabilitas glukoamilase *A. niger* yang diproduksi oleh Selvakumar *et al.*<sup>(19)</sup>. Glukoamilase *A. niger* BCS sangat stabil pada pH optimum. Inkubasi enzim ini selama 7 hari dalam dapar asetat pH 4,5 dan 5,0 tidak banyak menurunkan aktivitas. Walaupun demikian, glukoamilase *A. niger* BCS tidak cukup stabil pada suasana basa. Inkubasi pada pH 9,0 selama 1 dan 7 hari akan menurunkan aktivitasnya masing-masing sekitar 20 dan 42%. Data pengujian pengaruh inkubasi glukoamilase *A. niger* BCS dalam pH 4,5 pada berbagai suhu terhadap stabilitasnya disajikan Gambar 5.

Setelah inkubasi selama 120 menit, glukoamilase *A. niger* BCS relatif stabil sampai suhu 50°C. Aktivitas enzim ini tidak berkurang setelah inkubasi selama 10 menit pada suhu 40°C dan masih tersisa 71% setelah 2 jam. Pengamatan ini sesuai dengan laporan Somogyi<sup>(20)</sup>. Menurut Imanaka *et al.* Stabilitas termal enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme berkaitan dengan adanya faktor pelindung yang didapatkan dari sel-sel penghasil enzim dan banyaknya gugus hidrofob yang terdapat pada enzim tersebut<sup>(21)</sup>. Meskipun demikian, pada suhu yang lebih tinggi glukoamilase *A. niger* BCS akan mengalami inaktivasi dengan tajam. Pada suhu 70°C, waktu paruh enzim hanya sekitar 10 menit. Inkubasi pada suhu optimum (65°C), juga menyebabkan aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS turun dengan cepat. Menurut Ooijkaas<sup>(11)</sup> suhu optimum dan kestabilan enzim terhadap suhu adalah dua sifat yang

berbeda. Stabilitas enzim terhadap suhu sangat tergantung pada pH, kekuatan ion, konsentrasi substrat, dan jumlah protein yang terdapat dalam larutan. Semakin murni suatu enzim, enzim tersebut makin labil terhadap suhu. Dengan demikian, inkubasi enzim tanpa substrat akan menyebabkan enzim tersebut mengalami inaktivasi dengan cepat.

## SIMPULAN

Kenaikan pH lebih berpengaruh terhadap aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS daripada penurunan pH. Pada pH yang sama, dapar sitrat memberikan aktivitas lebih rendah daripada dapar asetat meskipun *A. niger* memiliki pH optimum yang sama pada kedua jenis dapar tersebut. Kenaikan suhu akan meningkatkan aktivitas glukoamilase *A. niger* BCS. Glukoamilase *A. niger* sangat stabil pada pH optimum, yaitu pada pH 4,5 dan masih stabil pada rentang pH 3,0–7,0. Glukoamilase *A. niger* relatif stabil sampai pada suhu 50°C.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Alazard D, Raimbault M. Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1981;12:113-117.
2. Balasubramaniam AK, Nagarajan KV, Paramasamy G. Optimization of media for fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry.* 2001; 36:1241-1247.
3. Creighton TE. *Proteins: structures and molecular principles.* New York : WH Freeman and Co; 1984. p. 405-408.
4. Dorta B, Bosch A, Arcas J, Ertola R. Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. *Enzyme Microb Technol.* 1994;16:562-565.
5. Gelmi C, Pérez-Correa R, González M, Agosin E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry.* 2000; 35:1227-1233.
6. Houston DF, Rice Bran, Polish. In : Houston DF, editor. *Rice chemistry and technology.* Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc.; 1972. p. 275-283, 306-313.
7. Imanaka T, Shibasaki M, Takagi MA. New way of enhancing the stability of proteases. *Nature.* 1986; 324:695-697.
8. Lonsane BK & Ghildyal N P. Exoenzymes. In: Doelle HW, Mitchell DA and Rolz CE, editors. *Solid substrate cultivation.* London: Elsevier Applied Science; 1992. p. 201.
9. Mitchell DA. 1992. Microbial basis of processes. In: Doelle HW, Mitchell DA and Rolz CE, editors. *Solid substrate cultivation.* London: Elsevier

- Applied Science; 1992. p. 17-21.
10. Montencourt BS, Carroll JO and Lanzilotta RP. Assay of industrial microbial enzymes. In : Moo-15.
  11. Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J & Rinzema A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. Trends in Biotechnol. 2000, 18:356-360.
  12. Pandey A. Glucoamylase research: an overview. Starch/Starke. 1995; 47:439-445.
  13. Pandey A, Ashakumary L, Selvakumar P, Vijayalakshmi. Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. World J Microbiol Technol. 1994; 10:485-486.
  14. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem. 2000; 31:135-152.
  15. Pandey A, Selvakumar P, Ashakumary L. Performance of column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. Process Biochemistry. 1996; 31:43-36.
  16. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D A. New developments in solid state fermentation: i- bioprocesses and products. Process Biochemistry. 2000; 35:1153-1169.
  17. Raimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic J Biotechnol. 1998; 1 (3):1-15.
  18. Ramadas M, Holst O, Mattiason B. Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. World J Microbiol Biotechnol. 1996; 12:267-271.
  19. Selvakumar P, Ashakumary L, Helen A, Pandey A. Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Lett Appl Microbiol. 1996; 23:403-406.
  20. Somogyi M. Notes on sugar determination. J Biol Chem. 1952; 195:19-23.
  21. Weber F J, Tramper J, Rinzema A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production in a packed-bed reactor. Biotechnol Bioeng. 1999; 65:447-458.