Biota Vol. VIII (1) : 1 - 8, Februari 2003
ISSN 0853-8670

Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Kapang Alkalotoleran Asal Limbah Cair Tapioka

Isolation and Characterization of Alcalotolerant Fungal Amylases from Cassava Starch Liquid Waste

Nisa Rachmania Mubarik, Evi Damayanti & Sri Listyowati

Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran , Bogor 16144
Tel./Fax. +62-251-345011, E-mail: riknisa@telkom.net

Abstract

A total of 6 fungi isolates of growing at pH 9 and 2 isolates on pH 10 with amylolytic indexes 0f 0.07-1.42 have been isolated from cassava starch liquid waste. Two isolates having the highest amylolytic index were identified as Aspergillus sydowii *K10 (1.42) and* Aspergillus versicolor *L30 (1.4). Both* A. sydowii *K10 and* A. versicolor *L30 were described as alcalotolerant for being able to grow with range pH 5-10. The optimal α-amylases production of* A. sydowii *K10 and* A. versicolor *L30 was obtained after 4 and 3 days of incubation at 30^{0}C. The optimum of α-amylase activity from* A. sydowii *K10 was at 40^{0}C and 70^{0}C, and pH 6; while those from* A. versicolor *L30 was at 50^{0}C and pH 6 respectively. Both* A. sydowii *K10 and* A. versicolor *L30 could produce glucoamylase. The optimum of glucoamylase activity from* A. sydowii *K10 was at 40^{0}C and pH 5, while those from* A. versicolor *L30 was at 50^{0}C and pH 5 respectively.*

Key words : characterization, *α-amylase, glucoamylase*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*.

Diterima: 6 Oktober 2002, disetujui: 15 Desember 2002

Pendahuluan

Sebagian besar ubi kayu yang dihasilkan oleh negara Indonesia dimanfaatkan sebagai bahan baku pati tapioka. Proses pembuatan tapioka menghasilkan sekitar 50% pati (Nishise *et al.*, 1988). Selain pati, limbah tapioka masih mengandung bahan organik yang lain seperti gula dan protein yang dapat digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan kapang.

Glukoamilase dan α-amilase merupakan enzim penghidrolisis pati yang banyak digunakan di dalam industri makanan, minuman (Robyt, 1984), detergen (Borchert *et al.*, 1995), tekstil, dan farmasi (Sarikaya *et al*., 2000). Alfa amilase (EC 3.2.1.1) mengkatalisis pemutusan ikatan glikosidik α-1,4 dari bagian dalam molekul pati, sedangkan glukoamilase atau amiloglukosidase (EC 3.2.1.3) menghidrolisis ikatan glikosidik α-1,4 dan α-1,6 dari bagian ujung gula nonpereduksi secara berurutan (Fogarty, 1983). Kapang penghasil α-amilase antara lain *Aspergillus oryzae,A. niger*, *Paecilomyces subglobosum*, *Mucor pusilus* (Fogarty, 1983, Nigam & Singh, 1995), dan *Thermomyces lanuginosus* (Arnesen *et al.*, 1998). Penghasil glukoamilase antara lain *A. niger, A. satoi, Penicillium oxalicum, Rhizopus* (Nishise *et al*., 1988, Nigam & Singh, 1995), dan *T. lanuginosus* (Chuan-li *et al.*, 1998).

Pada umumnya kapang memiliki pertumbuhan optimum pada kisaran pH asam, namun beberapa galur kapang dari genus *Fusarium, Penicillium, Absidia, Chaetomium, dan Monilia* mampu tumbuh sampai pH 10. Organisme alkalotoleran mampu tumbuh sampai pH di atas 9, namun mempunyai pertumbuhan optimum pada kisaran pH asam hingga netral (Kroll, 1990).

Dalam penelitian ini kapang yang diisolasi dari limbah cair tapioka ditumbuhkan pada kisaran pH 5.0 sampai pH 10.0. Isolat yang tumbuh dan berpotensi sebagai penghasil α-amilase ekstraseluler dipilih untuk dikarakterisasi aktivitas α-amilase dan glukoamilasenya.

Metode penelitian

Pengambilan Sampel.

Contoh limbah cair tapioka berasal dari daerah industri rakyat di Kedung Halang dan Cimahpar, Bogor. Sampel limbah cair tapioka (suhu 30 ^{0}C, pH 6.0) dimasukkan ke dalam botol steril dan langsung dibawa ke laboratorium.

Isolasi dan Penapisan Isolat.

Sebanyak 0.1 ml sampel limbah cair tapioka dituang ke dalam cawan yang berisi media agar-agar kentang yang mengandung pati tapioka pH 9.0-10.0 (agar-agar 2%, pati tapioka 1% - merek Pak Tani buatan Bogor, kentang 20%, dan antibiotik kanamisin 0.05%). Inkubasi dilakukan pada suhu kamar. Isolat yang tumbuh dimurnikan pada media dengan komposisi yang sama. Warna koloni, bentuk koloni, dan ciri-ciri morfologi kapang diamati untuk keperluan identifikasi. Masing-masing isolat kemudian ditetesi larutan Lugol Iodin di sekitar tepi koloni kapang. Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni menunjukkan kapang tersebut memiliki aktivitas amilase. Indeks amilolitik dihitung berdasarkan hasil bagi diameter zona bening terhadap diameter koloni. Dua kapang yang memiliki indeks amilolitik tertinggi dipilih untuk diidentifikasi (Gilman, 1957). Selanjutnya, ditumbuhkan pada media agar-agar kentang yang mengandung pati tapioka 1% pada kisaran pH 5-10, dan dikarakterisasi aktivitas amilasenya.

Produksi Amilase.

Pengujian aktivitas amilase dilakukan terhadap isolat kapang yang memiliki indeks amilolitik tertinggi. Empat keping biakan (diameter 0,5 cm) umur 7-10 hari diinokulasikan pada 100 ml media cair pH 10.0 (pati tapioka 1 %, ekstrak khamir 1%, KH_2PO_4 0.13%, dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%), diinkubasi pada suhu 30^{0}C dengan 150 goyangan per menit selama 3-4 hari. Setelah itu kultur disaring dan filtrat yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim α-amilase. Massa kapang dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 ^{0}C selama ± 2 hari (sampai bobot konstan).

Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas α-amilase.

Kurva pertumbuhan kapang dibuat berdasarkan berat kering massa miselium selama masa inkubasi 6 hari. Selama masa tersebut diukur pula aktivitas α-amilasenya.

Pengukuran Aktivitas Amilase.

Aktivitas α-amilase diukur dengan metode Bernfeld (1955). Satu unit aktivitas α-amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang reaksinya menghasilkan produk setara 1 μmol maltosa per menit pada kondisi pengukuran. Sebanyak 1 ml enzim dan 1 ml pati terlarut 1% (pati di dalam bufer glisin-NaOH 0.05 M) direaksikan di dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30^{0}C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml reagen asam dinitrosalisilat (DNS) dan setelah itu dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah campuran menjadi dingin, absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai standar digunakan maltosa pada konsentrasi 40-400 ppm dengan selang konsentrasi 40 ppm.

Aktivitas glukoamilase diukur dengan metode Nelson-Somogyi (Nelson, 1944). Sebanyak 0.5 ml larutan pati 0.5% , 0.4 ml bufer glisin-NaOH 0.05 M, dan 0.1 ml larutan enzim direaksikan di dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 40 ^{0}C. Pada akhir inkubasi ditambahkan 1 ml larutan A. Sebanyak 1 ml campuran tersebut diambil dan direaksikan dengan larutan D dalam tabung reaksi yang lain, dipanaskan di dalam air mendidih selama 20 menit. Campuran didinginkan pada air mengalir selama 5 menit, direaksikan dengan larutan C kemudian dikocok kuat sampai tidak ada gelembung. Campuran dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar, diencerkan dengan akuades hingga volume akhir 25 ml. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm. Satu unit aktivitas glukoamilase setara dengan 1 μmol glukosa yang dihasilkan per menit pada kondisi pengukuran. Sebagai standar digunakan glukosa pada konsentrasi 40-400 ppm dengan selang konsentrasi 40 ppm.

Karakterisasi Amilase.

Uji karakteristik α-amilase dan glukoamilase dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada kisaran pH 3.0-10.0 dengan selang satu unit pada suhu 30 ^{0}C untuk menentukan pH optimum aktivitas enzim, dan mengukur aktivitas enzim pada kisaran suhu 20^{0}C hingga 80^{0}C dengan selang 10^{0}C untuk menentukan suhu optimumnya. Bufer yang digunakan untuk penentuan pH optimum ialah bufer sitrat 0.05 M (pH 3.0-6.0), bufer Tris-HCl 0.05 M (pH 7.0-8.0), dan bufer Glisin-NaOH 0.05 M (pH 9.0-10.0).

Hasil Dan Pembahasan

Penapisan Isolat.

Sebanyak 8 isolat kapang penghasil enzim amilase berhasil diisolasi dari media agar-agar kentang yang mengandung pati 1% pH 9 atau 10 (Tabel 1). Dua isolat yang tumbuh pada pH 10 memiliki indeks amilolitik di atas 1, yaitu isolat K10 (1.42) dan L30 (1.4). Berdasarkan Gilman (1957), isolat K10 diidentifikasi sebagai *Aspergillus sydowii* dan isolat L30 sebagai *A. versicolor*.

Pertumbuhan Isolat pada Berbagai pH.

Isolat *A. sydowii* K10 dan *A. versicolor* L30 mampu tumbuh pada media agar-agar kentang yang mengadung pati 1% pada kisaran pH 5-10. Indeks amilolitik terbesar terdapat pada pH 8 (1.22) untuk *A. sydowii* K10 dan pH 10 untuk *A. versicolor* L30 (Tabel 2). Kedua isolat dapat digolongkan sebagai alkalotoleran karena mampu tumbuh pada kisaran pH asam hingga basa (pH 5-10).

Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas α-amilase.

Kedua kapang membentuk massa miselium menyerupai pelet pada media cair yang diagitasi. Aktivitas α-amilase *A. sydowii* K10 mulai terukur pada hari ke-2 kultivasi, aktivitas tertinggi tercapai pada hari ke-4 kultivasi (0.177 U/ml) dan setelah itu mengalami penurunan. Aktivitas α-amilase *A. versicolor* L30 tertinggi tercapai pada hari ke-3 kultivasi (0.117 U/ml) relatif konstan pada hari ke-4 (0.115 U/ml) kemudian mengalami penurunan hingga hari ke-6 (Gambar 1).

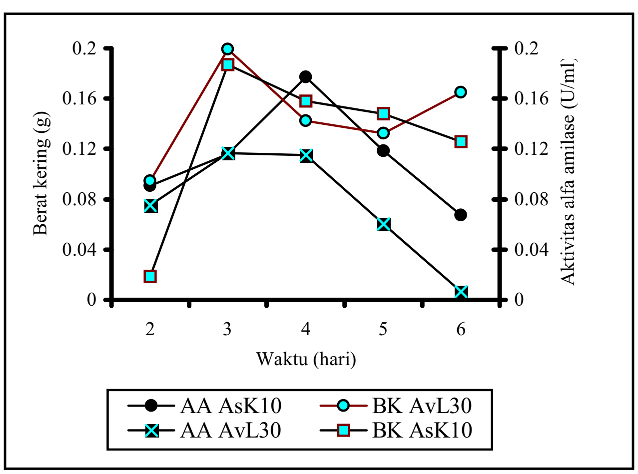
Keberadaan substrat berupa pati tapioka dalam media akan menginduksi sintesis enzim amilase. Hal ini karena substrat yang berberat molekul tinggi seperti pati akan sulit masuk ke dalam sel, sehingga perlu dipecah terlebih dahulu oleh enzim amilase ekstraseluler. Seiring dengan lama waktu kultivasi, setelah melewati hari ke-4 kultivasi, aktivitas α-amilase mengalami penurunan. Hal ini diduga karena terjadi penumpukan produk yang lebih sederhana, misalnya glukosa, yang dapat menekan pembentukan enzim α-amilase. Mekanisme ini dinamakan represi produk akhir (Priest, 1983). Dugaan tersebut dapat dibuktikan dengan adanya aktivitas glukoamilase yang menghasilkan produk akhir berupa glukosa pada supernatan di hari ke-4 kultivasi. Aktivitas glukoamilase yang terukur sebesar 0.328 U/ml pada *A. sydowii* K10 dan 0.332 U/ml pada *A. versicolor* L30. Siquera *et al.*(1997) telah melaporkan pula bahwa aktivitas α-amilase cendawan *Pycnoporus sanguineus* terhambat dengan adanya glukosa di dalam medium.

Tabel 1. Indeks amilolitik beberapa isolat kapang alkalotoleran

Kode isolat	pH pertumbuhan	Diameter koloni (mm)	Diameter zona bening (mm)	Indeks amilolitik
K10	10	2.60	6.30	1.42
M19	9	4.10	4.80	0.17
M21	9	6.80	7.30	0.07
L28	9	2.00	3.00	0.43
M18	9	3.90	5.30	0.36
L21	9	2.50	3.70	0.48
L30	10	2.00	4.80	1.40
K13	9	1.70	3.20	0.88

Tabel 2. Indeks amilolitik A. sydowii *K10 dan* A. versicolor *L30 pada berbagai pH media*

	pH					
	5	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
A. sydowii K10						
Diameter koloni (mm)	2.35	2.35	2.25	2.20	2.40	2.35
Diameter zona bening (mm)	4.30	4.05	4.50	4.90	4.30	4.60
Indeks amilolitik	0.83	0.72	1.00	1.22	0.95	0.95
A. versicolor L30						
Diameter koloni (mm)	2.30	2.10	2.00	2.25	1.80	1.35
Diameter zona bening (mm)	4.50	4.40	4.95	4.95	4.50	5.25
Indeks amilolitik	0.95	1.09	1.47	1.20	1.50	2.88



Gambar 1. Kurva berat kering (BK) dan aktivitas α-amilase (AA) Aspergillus sydowii *K10 (As K10) dan* Aspergillus versicolor *L30 pada pH 10 dan suhu 30 ^{0}C.*

Karakterisasi Aktivitas Amilase.

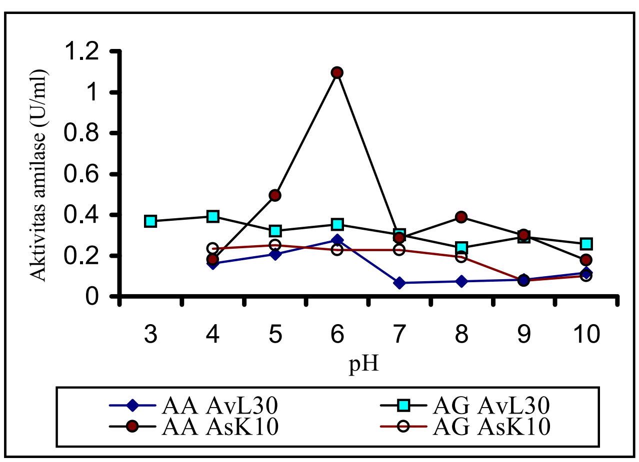
Pada suhu pengukuran 30^{0}C aktivitas α-amilase *A. sydowii* K10 dan *A. versicolor* L30 (Gambar 2) mempunyai pH optimum 6. Walaupun kedua isolat bersifat alkalotoleran, namun pH optimumnya ialah 6. Pada umumnya aktivitas α-amilase berada pada kisaran pH 4.8 hingga 6.5 tergantung sumber enzimnya (Fogarty & Kelly, 1980).

Sebagai contoh, aktivitas α-amilase *A. oryzae* sangat stabil pada pH 5-7 (Carlsen *et al.*, 1996), *A. niger* mempunyai pH optimum 5 dan 6 (Fogarty, 1983). Kapang yang mempunyai aktivitas α-amilase pada pH optimum asam (pH 3.5-4.0) misalnya *Mucor pusilus* (Fogarty 1983).

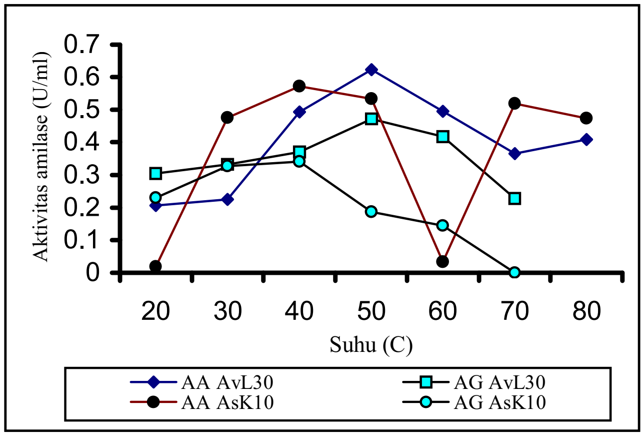
Suhu optimum aktivitas α-amilase *A. versicolor* L30 yaitu pada suhu 50^{0}C, sedangkan aktivitas α-amilase *A. sydowii* pada suhu 40^{0}C dan 70^{0}C (Gambar 3). Adanya 2 suhu optimum, kemungkinan menunjukkan dua molekul α-amilase yang berbeda tetapi mengkatalisis reaksi enzim yang sama (isoenzim). Contoh serupa terdapat pada glukoamilase yang berasal dari *A. awamori* NRRL 3112 murni yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 50^{0}C dan 60^{0}C (Meidiawati, 1995).

Pada pengukuran aktivitas glukoamilase, *A. sydowii* K10 mempunyai pH optimum 5 pada suhu 50^{0}C, sedangkan *A. versicolor* L30 mempunyai pH optimum 4 pada suhu 40^{0}C (Gambar 2). Suhu optimum aktivitas glukoamilase 40^{0}C untuk *A. sydowii* K10 dan 50^{0}C untuk *A. versicolor* L30 yang diukur pada pH optimum masing-masing (Gambar 3). Pada umumnya glukoamilase memiliki pH optimum 4.5-5.0 dan suhu optimum 40-60^{0}C (Fogarty, 1983).

Glukoamilase dan α-amilase yang berasal dari kapang dan memiliki suhu optimum 50-60^{0}C telah digunakan secara bersama-sama dalam industri, misalnya untuk produksi pemanis (Ng & Kenealy, 1986). Wagu *et al.* (2000) menyatakan bahwa *A. versicolor* dan *A. sydowii* yang diisolasi dari makanan fermentasi asal Cina memiliki aktivitas α-amilase, namun tidak dilaporkan aktivitas glukoamilasenya. Aktivitas α-amilase dari kedua isolat ini lebih rendah daripada aktivitas protease dan lipasenya.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas α-amilase (AA) dan glukoamilase (AG) A. sydowii *K10 (As K10) dan* A. versicolor *L30 (Av L30).*



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas α-amilase (AA) dan glukoamilase (AG) A. sydowii *K10 (As K10) dan* A. versicolor *L30 (Av L30).*

Kesimpulan

Berhasil diisolasi 8 isolat kapang alkalotoleran yang bersifat amilolitik. Dua isolat di antaranya yang diidentifikasi sebagai *A. sydowii* K10 dan *A. versicolor* L30 mempunyai indeks amilolitik tertinggi, dan memiliki aktivitas α-amilase serta glukoamilase.

Aktivitas α-amilase dan glukoamilase *A. versicolor* L30 yang optimum pada suhu 50^0C berpeluang dapat diaplikasikan sebagai biokatalis. Demikian pula aktivitas α-amilase *A. sydowii* K10 yang memiliki dua suhu optimum yaitu 40^0C dan 70^0C, menarik untuk dipelajari lebih lanjut.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Okky Setyawati Dharmaputra yang telah turut mengidentifikasi kedua isolat yang digunakan dalam penelitian ini. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai Project Grant QUE jurusan Biologi, FMIPA, IPB tahun 1999-2000 kepada Nisa Rachmania Mubarik.

Daftar Pustaka

Arnesen, S. S.H. Eriksen, J. Olsen & B. Jensen. 1998. Increased Production of α-amilase from Thermomyces Lanuginosus by the Addition of Tween 80. *Enzyme Microb*. 23: 249-252.

Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β. In: Colowick, S.P., N.O. Kaplan (Eds.). *Methods in Enzymology* I. pp. 149-150. Academic Press. New York.

Borchert, T.V., S.F. Lassen, A, Svendsen & H.B. Frantzen. 1995. Oxydation Stable Amylases for Detergents. In: Petersen, S.B., B. Svensson & S. Pedersen (Eds.). *Progress in Biotechnology 10. Carbohydrate Bioengineering*. pp. 175-179. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

Carlsen, M., J. Nielsen & J. Viladsen. 1996. Grwth and α-amylase Production by *Aspergillus oryzae* During Continous Cultivations. *J. Biotechnol*. 45:81-93.

Chuan-Li, D., Y. Jun-Yang, Y. Liang-Peng & C. Yao-Shen. 1998. Purification and Characterization of Extracellular Glucoamylase from Thermophilic Thermomyces lanuginosus. *Mycol. Res*. 102:568-572.

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Amylases. In: Fogarty, W.M. (Ed.). Microbial *Enzymes and Biotechnology*. pp. 1-92. Applied Science. London.

Fogarty, W.M. & C.T. Kelly. 1980. Amylases, Amyloglucosidases, and Related Glucanases. In: Rose, A.H. (Ed.). *Economic Microbiology. Vol. 5. Microbial Enzymes and Bioconvertion*. pp. 115-170. Academic Press. London.

Gilman, J.C. 1957. A Manual of Soil Fungi. 2nd Ed. The Iowa State College Press. Iowa.

Kroll, R.G. 1990. Alkalophiles. In: Edwards, C. (Ed.). *Microbiology of extreme Environtment*. pp. 55-95. McGraw Publishing Company. New York.

Meidiawati, D.P. 1995. Karakterisasi Enzim Amilase dari Kapang *Aspergillus awamori* NRRL 3112. In: Jamaran, I., Djuma'ali, Koesnandar, A.E. Tjahjono, Suprianto, D.P. Meidiawati (Eds.). pp. 46-50. *Prosiding Seminar Bioteknologi BPPT I*. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta.

Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol.Chem*. 153:375-380.

Ng, T.K. & E.F. Kenealy. 1986. Industrial Application of Thermostable Enzymes. In: Brick, T.D. (Ed.). *Thermophiles: General, Molecular, and Applied Microbiology.* pp. 197-215. John Wiley & Sons. New York.

Nigam, P. & D. Singh. 1995. Enzyme and Microbial System Involved in Starch Processing. *Enzyme Microb. Technol*. 17:770-778.

Nishise, H., A. Fuji, M. Ueno. V. Vongsuvanlert, Y. Tani. 1988. Production of Raw Cassava Starch-Digestive Glucoamylase by Rhizopus sp. in Liquid Culture. *J. Ferment. Technol*. 66:397-402.

Priest, FG. 1983. Enzyme Synthesis: Regulation and Process of Secretion by Microorganisms. In: Fogarty, W.M. (Ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. pp. 319-366. Applied Science. London.

Robyt, J.F. 1984. Enzymes in the Hydrolisis and Synthesis of Starch. In: Whistler, R.L., J.N. Bemiler & E.F. Paschall (Eds.). Starch: Chemistry and Technology. 2nd Ed. pp. 87-97. Academic Pr. New York.

Sarikaya, E., T. Higasa, M. Adachi & B. Mikami. 2000. Comparison of Degradation Abilities of α- and β-amylases on Raw Starch Granules. *Process Biochem*. 35:711-715.

Siquera, E.M.D.A., K. Mizuta & J.R. Giglio. 1997. Pycnoporus Sanguis: A Novel Source of α-amylase. *Mycol. Res*. 101:188-190.

Wagu, Y, T. Kakuta, H. Shindo & T. Koizumi. 2000. *Identification and Enzyme Activity of Molds Isolated from Chinese Fermented Food "Jinhua Huotui"*. http://www.bioc.co.jp/product/Identi.pdf [30 Oktober 2002].