

Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Universitas Airlangga

**STUDI KOMPARASI AKTIFITAS ENZIM GLUKOAMILASE
PRODUK *Rhizopus oryzae* DAN *Aspergillus niger*
PADA BIAKAN CAMPURAN, BIAKAN TERPISAH, DAN
GABUNGAN ENZIM DARI BIAKAN TERPISAH**

Ketua Peneliti :

Dra. DWI WINARNI

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIP/OPF Unair 1992/1993

SK. Rektor Nomor : 5186/PT.03.H/N/1992

Nomor Urut : 132

Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Universitas Airlangga

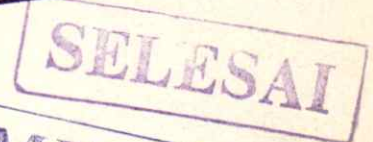
RA S
KK
576.072 Y
Shu

**STUDI KOMPARASI AKTIFITAS ENZIM GLUKOAMILASE
PRODUK *Rhizopus oryzae* DAN *Aspergillus niger*
PADA BIAKAN CAMPURAN, BIAKAN TERPISAH, DAN
GABUNGAN ENZIM DARI BIAKAN TERPISAH**

Ketua Peneliti :

Dra. DWI WINARNI

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam



16 AUG 1996



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIP/OPF Unair 1992/1993

SK. Rektor Nomor : 5186/PT.03.H/N/1992

Nomor Urut ; 132



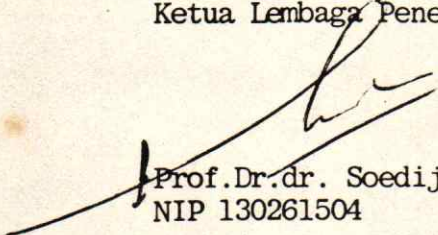
LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Darmawangsa Dalam 2 Telp. (031) 42322 Surabaya 60286

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Studi Komparasi Aktifitas Enzim Glukoamilase Produk *Rhizopus oryzae* Dan *Aspergillus niger* Pada Biakan Campuran, Biakan Terpisah, Dan Gabungan Enzim Dari Biakan Terpisah.
- b. Macam Penelitian : () Fundamental, () Terapan, (V) Pengembangan
2. Kepala Proyek Penelitian :
 - a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Dra. Dwi Winarni
 - b. Jenis Kelamin : Wanita
 - c. Pangkat/Golongan dan NIP : Asisten Ahli Madya - Gol.III/a - 131836619
 - d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar FMIPA Unair
 - e. Fakultas / Jurusan : MIPA / Biologi
 - f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Mikrobiologi, Biokimia
3. Jumlah Tim Peneliti : 5 (lima) orang
4. Lokasi Penelitian : Fakultas MIPA Universitas Airlangga
5. Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan, sebutkan :
 - a. Nama Instansi : -
 - b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 1.500.000,00
8. Hasil Penilaian : (V) Baik Sekali, () Baik, () Sedang, () Kurang

Mengetahui / Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,


Prof. Dr. dr. Soedijono
NIP 130261504

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

STUDI KOMPARASI AKTIFITAS ENZIM GLUKOAMILASE
PRODUK *Rhizopus oryzae* DAN *Aspergillus niger*
PADA BIAKAN CAMPURAN, BIAKAN TERPISAH, DAN
GABUNGAN ENZIM DARI BIAKAN TERPISAH

Peneliti :

Dra. Dwi Winarni

Dra. Y. Sri Wulan Manuhara

Dra. Ni Nyoman Tri Puspaningsih

Dra. Alfinda Novi Kristanti

Drs. Hery Suwito

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai : DIP Operasional Perawatan dan Fasilitas Tahun 1992/1993

SK Rektor Nomor : 5186/PTO3.H/N/1992

Tanggal : 6 Juli 1992

R I N G K A S A N P E N E L I T I A N

Judul Penelitian : STUDI KOMPARASI AKTIFITAS ENZIM
 GLUKOAMILASE PRODUK *Rhizopus*
oryzae DAN *Aspergillus niger* PADA
 BIAKAN CAMPURAN, BIAKAN TERPISAH,
 dan GABUNGAN ENZIM DARI BIAKAN
 TERPISAH

Ketua Peneliti : Dwi Winarni
 Anggota Peneliti : Y. Sri Wulan Manuhara,
 Ni Nyoman Tri Puspaningsih
 Alfinda Novi Kristanti
 Hery Suwito

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan
 Alam Universitas Airlangga

Sumber Biaya : DIP Operasional Perawatan dan
 Fasilitas Universitas Airlangga
 tahun 1992/1993.
 SK Rektor Nomor:5186/PT03.H/N/1992
 Tanggal : 6 Juli 1992

Glukoamilase adalah enzim yang dapat memecah pati menjadi glukosa. Glukoamilase dapat diproduksi oleh beberapa jenis jamur, bakteri dan ragi. Glukoamilase yang diperdagangkan umumnya merupakan produk *Aspergillus niger* atau *Rhizopus sp.*, digunakan dalam industri antara lain untuk memproduksi sirup glukosa dan HFS (*High Fructose Syrup*) yang banyak digunakan sebagai bahan dalam industri makanan dan farmasi.

Kemampuan glukoamilase mengubah pati menjadi gula tergantung pada besarnya aktifitas enzim, semakin tinggi aktifitas enzim, semakin banyak gula yang dihasilkan. Pada penelitian yang dilakukan di Lab. Mikrobiologi FMIPA Unair pada bulan Agustus-Desember ini dilakukan penelitian terhadap aktifitas enzim yang diproduksi oleh *R. oryzae* dan *A. niger* pada biakan campuran (perbandingan jumlah spora yang diinokulasi = 1:1) biakan terpisah dan gabungan enzim dari biakan terpisah dengan substrat dedak padi yang diatur kelembabannya sekitar 60% dengan tujuan perlakuan yang memproduksi enzim dengan aktifitas tertinggi-jika berbeda dengan perlakuan yang umum dikerjakan-dapat dijadikan alternatif pengganti proses produksi.

Uji aktifitas enzim (terhadap ekstrak enzim dengan pengeksrak buffer asetat pH=5) dilakukan dengan uji Somogyi-Nelson. Dari penentuan aktifitas enzim tersebut, didapatkan bahwa biakan *R. oryzae* -dibanding perlakuan yang

lain-mampu memproduksi enzim dengan aktifitas tertinggi (5,950 unit) dengan glukosa tereduksi hasil hidrolisis terhadap *soluble starch* sebesar 6120,04 $\mu\text{g/g}$ biakan/menit pada umur biakan yang paling singkat dibanding perlakuan lain (58 jam). Juga didapatkan hasil bahwa pada perbandingan volume ekstrak enzim 1:1 tidak didapati adanya efek sinergistik antara enzim produk *A. niger* dan *R. oryzae*.

Sebaiknya jika dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek sinergistik antara enzim glukoamilase produk *Rhizopus oryzae* dengan produk *A. niger* dengan tidak hanya menguji gabungan ekstrak enzim pada perbandingan 1:1, tetapi dalam berbagai perbandingan volume ekstrak enzim, dan jika dilakukan penelitian lanjutan tentang produksi enzim glukoamilase dari biakan campuran *R. oryzae* dengan *A. niger* sebaiknya mempertimbangkan faktor-faktor : distribusi rata-rata masing-masing jenis jamur dalam biakan, waktu mulai tumbuh masing-masing jamur dalam biakan, dan faktor-faktor yang mampu menghambat aktifitas enzim misalnya keberadaan protease atau bahan lain di dalam biakan.

K A T A P E N G A N T A R

Tim peneliti mengucapkan puji syukur kepada Tuhan Yang Mahaesa, karena telah berhasil menyelesaikan penelitian ini.

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian yang membiayai penelitian ini, Ketua Jurusan Biologi dan Pimpinan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas hingga penelitian ini dapat terlaksana.

Tentunya masih banyak kekurangan di dalam laporan penelitian ini. Untuk itu kritik dan saran yang membangun kami terima dengan senang hati.

Harapan kami, semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi mereka yang memerlukannya.

Surabaya, pertengahan Januari 1993

Tim Peneliti

D A F T A R I S I

	Halaman
RINGKASAN PENELITIAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Tentang <i>Aspergillus niger</i>	4
2.2 Tinjauan Tentang <i>Rhizopus oryzae</i>	5
2.3. Tinjauan Tentang Enzim Glukoamilase	6
BAB III METODA PENELITIAN	9
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	9
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	9
3.3. Tahapan Penelitian	10
3.3.1. Tahap persiapan	10
3.3.2. Tahap produksi enzim glukoamilase	10
3.3.3. Pengambilan Sampel	11
3.3.4. Penentuan Aktifitas Enzim	11
3.4. Penentuan Kadar Glukosa Tertinggi	14

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	15
	4.1. Hasil Penelitian	15
	4.1.1. Aktifitas enzim	15
	4.1.2. Kadar glukosa tertinggi	16
	4.2. Pembahasan	17
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	20
	5.1. Kesimpulan	20
	5.2. Saran	20
	DAFTAR PUSTAKA	22
	LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Nilai aktifitas enzim dan kadar glukosa hasil hidrolisis glucoamilase terhadap substrat pati terlarut (<i>soluble starch</i>)	16

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Gambaran aktifitas enzim produk biakan *A. niger*, *R. oryzae*, campuran *A. niger* dan *R. oryzae* (perbandingan jumlah spora yang dibiakkan = 1:1), dan gabungan enzim produk *A. niger* dan *R. oryzae* yang dibiakkan terpisah.

15

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil penentuan aktifitas enzim berdasar uji Somogyi-Nelson

Lampiran 2. Hasil pengukuran serapan cahaya terhadap larutan glukosa dengan konsentrasi glukosa yang telah ditentukan

BAB I

P E N D A H U L U A N

1.1. Latar Belakang Masalah

Enzim glukoamilase adalah enzim yang dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa (Panji, 1988). Penggunaan glukoamilase mulai meluas sejak tahun 1970 (Crueger, 1970) dan menurut Atlas (1982) penggunaannya dalam industri terus meningkat dari tahun ke tahun. Proses produksi yang memerlukan enzim ini antara lain adalah proses produksi sirup glukosa kadar tinggi (mengandung 90-97% D-glukosa) dan sirup fruktosa kadar tinggi (*High Fructose Syrup/HFS*)-yang mempunyai derajat kemanisan lebih tinggi dibanding sirup glukosa tetapi tidak menyebabkan peningkatan kadar gula darah jika dikonsumsi (Crueger, 1982, Panji, 1988). Produk-produk tersebut di atas selain dapat dikonsumsi secara langsung, digunakan pula sebagai bahan baku di dalam industri pangan dan farmasi (Sardjoko, 1991).

Enzim glukoamilase yang diperdagangkan umumnya merupakan produk jamur dari genus *Aspergillus*-terutama jenis *Aspergillus niger*-dan *Rhizopus* (Panji, 1988; Sardjoko, 1991). Kinoshita (1988) melalui penelitian yang dilakukan menyatakan bahwa aktifitas enzim yang diketahui dari perolehan (*yield*) hasil hidrolisis menunjukkan bahwa perolehan hasil hidrolisis gabungan enzim glukoamilase yang dihasilkan *A. oryzae* dan *Rhizopus sp* dari biakan terpisah lebih besar dibanding perolehan hasil hidrolisis enzim

glukoamilase produk kedua jamur tersebut secara individual (glukosa tereduksi hasil hidrolisis enzim glukoamilase gabungan terhadap substrat tapioka mentah sebesar 3,6 $\mu\text{g/ml/menit}$, lebih besar jika dibanding glukosa tereduksi hasil hidrolisis glukoamilase produk *Rhizopus sp* pada substrat yang sama yaitu sebesar 3,47 $\mu\text{g/ml/menit}$ dan produk *A. oryzae* sebesar 2,6 $\mu\text{g/ml/menit}$).

Mengingat bahwa penggunaan enzim ini akan terus meningkat di masa yang akan datang dan perlunya penelitian yang berkesinambungan terutama yang berkaitan dengan pengembangannya di bidang industri di masa yang akan datang, peneliti mencoba membandingkan aktifitas enzim glukoamilase yang dihasilkan oleh *Rhizopus* spesies tertentu - *Rhizopus oryzae* - dan *Aspergillus niger* secara individual, gabungan dan aktifitas enzim yang dihasilkan biakan campuran *R. oryzae* dengan *A. niger*. Dengan harapan perlakuan yang memproduksi enzim dengan aktifitas tertinggi -jika berbeda dengan perlakuan yang umum dikerjakan di industri-dapat dijadikan sebagai alternatif pengganti proses produksi.

1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut di atas, dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut.

Manakah di antara enzim glukoamilase yang dihasilkan *A. niger* dan *R. oryzae* secara individual, digabungkan dan yang dibiakkan bersama-sama yang mempunyai aktifitas enzim tertinggi ?.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan :

- (a) aktifitas enzim tertinggi di antara perlakuan yang diteliti,
- (b) kadar glukosa tertinggi hasil hidrolisis enzim produk masing-masing perlakuan terhadap substrat pati terlarut.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini, jika perlakuan yang memproduksi enzim dengan aktifitas tertinggi berbeda dengan yang biasa dikerjakan di industri, diharapkan dapat dijadikan alternatif pengganti proses produksi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang *Aspergillus niger*

Aspergillus niger menurut Gembong Tjitrosoepomo (1989), menempati kedudukan taksonomi,

Divisi	: Thallophyta
Kelas	: Euascomycetes
Bangsa	: Plectascales
Suku	: Aspergillaceae
Marga	: Aspergillus
Jenis	: <i>Aspergillus niger</i>

A. niger adalah jamur yang umum dikenal sebagai kontaminan makanan, berbiak secara aseksual dengan konidia - alat biak yang diproduksi dari sebuah sel khusus (*phialides*). *Phialides* berukuran $7,0-9,5 \times 3-4 \mu\text{m}$, dihasilkan oleh *metulae* yang tersusun radier pada ujung konidiofor yang membentuk vesikel. Konidia yang dihasilkan berwarna hitam membentuk susunan seperti rantai teratur dengan diameter masing-masing konidia-yang berbentuk kurang lebih bulat dengan permukaan bergerigi- adalah sekitar $3,5-5 \mu\text{m}$. *Conidial head* adalah istilah yang digunakan untuk menyebut vesikel dengan *metulae*, *phialides*, dan konidia. Biakan pada Czapek agar, suhu 25°C , selama 7 hari menampakkan koloni *A. niger* dengan diameter masing-masing koloni 4-5 cm dengan warna hitam dari *conidial head* yang menonjol (Samson, 1981).

2.2. Tinjauan Tentang *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae, menurut Gembong Tjitrosoepomo menempati kedudukan taksonomi

Divisi	: Thallophyta
Kelas	: Phycomycetes
Bangsa	: Zygomycetales
Suku	: Mucoraceae
Marga	: <i>Rhizopus</i>
Jenis	: <i>Rhizopus oryzae</i>

R. oryzae merupakan jamur yang terdistribusi luas terutama di daerah tropis dan subtropis. Dapat mudah diisolasi dari tanah, biji-bijian, air yang terpolusi, sayuran dan buah-buahan yang mulai membusuk.

R. oryzae dapat berbiak secara seksual maupun aseksual. Pembiasaan secara aseksual dengan sporangia yang berwarna coklat, bentuk spora bulat atau membulat berdiameter sekitar 30-120 μm menempel pada kolumela yang bersambungan dengan sporangiofor. Sporangiofor- yang merupakan "lanjutan" stolon (bagian hifa yang menjalar pada substrat) dengan panjang 150-2000 μm dan diameter 50-200 μm - dapat soliter atau berkelompok sampai 5 buah per kelompok. Di "bawahnya" dapat ditemukan *rhizoid* (hifa yang menembus substrat)-yang berwarna kecoklatan-atau tidak.

Koloni yang tumbuh pada media agar (*Potato Dextrosa Agar*) tumbuh cepat dengan warna koloni putih yang berangsur menjadi coklat keabuan jika biakan semakin tua. Suhu tumbuh optimum *R. oryzae* pada media MEA (*Malt Extract Agar*) diketahui sekitar 30-35°C (Samson, 1981).

2.3. Tinjauan Tentang Enzim Glukoamilase

Enzim glukoamilase-yang dikenal pula sebagai amiloglukosidase dan α -1,4-D-glukan glukohidrolase adalah salah satu jenis enzim amilase - yaitu enzim yang mampu memecah pati atau oligosakarida - yang mampu menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung non pereduksi secara berurutan dan ikatan cabang α -1,6 sehingga dihasilkan produk akhir glukosa dengan prosentase yang cukup tinggi (Syukur, 1983; Atlas, 1984; Panji, 1988).

Glukoamilase dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroorganisme, di antaranya adalah *Aspergillus awamori*, *A. soitoi*, *A. niger*, *Rhizopus sp*, ragi (yeast) dan berbagai jenis bakteri (Dharmsthiti, et.al, 1986).

Glukoamilase adalah enzim ekstraselular yaitu enzim yang setelah disintesis di dalam sel, dikeluarkan ke lingkungan di sekitar sel dan akan menghidrolisis pati di luar sel. Selain itu glukoamilase termasuk enzim adaptif, karena hanya diproduksi jika di lingkungan sel terdapat pati sedangkan dalam keadaan tak ada pati, diproduksi dalam jumlah minimal yang sangat sedikit (Syukur, 1983). Fowler, et.al. (1990) menyatakan bahwa gen pengatur sekresi glukoamilase pada *A. niger* akan terekspresi hanya jika di lingkungannya terdapat pati. Karakter glukoamilase yang disekresi bisa dikatakan spesies spesifik, karena karakternya akan berbeda jika jenis mikroorganisme penghasilnya berbeda (Takahashi, et.al, 1985; Dharmsthiti, et.al, 1986).

Dari mikroorganisme yang mampu menghasilkan glukoamilase tersebut sebagian besar produk enzimnya hanya mampu

menghidrolisis pati terlarut (*soluble starch*) menjadi glukosa dan tidak mampu mendegradasi pati tak terlarut (*raw starch*) menjadi glukosa. Beberapa jenis mikroorganisme yang produk glukamilasanya mampu mendegradasi pati tak terlarut adalah *Rhizopus sp*, *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *Amylomyces sp* dan *Endomycopsis fibuligera* (Darmsthiti, et.al, 1986; Pornsilapatip, et.al, 1986).

Dharmsthiti, et.al. (1986) - dari hasil penelitiannya menyatakan bahwa glukamilase produk *A. niger* sebenarnya terdiri dari 3 jenis glukamilase, yaitu GAN I, GAN II dan GAN III - yang menurut Wasten, et.al.(1991), dapat diproduksi hanya pada saat hidupnya masih mampu tumbuh. Ketiga jenis enzim tersebut mempunyai kemampuan yang hampir sama dalam menghidrolisis pati (dari penelitian Dharmsthiti yang menggunakan substrat dedak gandum, diketahui bahwa aktifitas enzim GAN I adalah 11.100 unit/ml, GAN II 13.300 unit/ml dan GAN III 12.200 unit/ml). Sedangkan temperatur dan pH optimum untuk masing-masing jenis adalah :GAN I 55°C dan 4,0, GAN II 50°C dan 5,0 dan untuk GAN III 65°C dan 5,0. Inkubasi pada 70°C selama 10 menit akan menghentikan aktifitasnya. Jika menginginkan memproduksi glukamilase dari *A niger*, kondisi yang disarankan Dharmsthiti-jika memilih cara fermentasi dengan substrat padat (medium dedak gandum)-sebaiknya dilakukan pada suhu 30°C dan kelembaban media 60%.

Dari hasil penelitian Takahashi, et.al.(1985) menggunakan *raw starch* diketahui bahwa *Rhizopus sp* mampu memproduksi 3 jenis glukamilase yaitu Gluc1, Gluc2 dan Gluc3. pH optimum ketiga jenis enzim tersebut hampir sama

(Gluc1 4,5; Gluc2 dan Gluc3 5,0). Juga, sama-sama mampu menghidrolisis *raw starch*, tetapi untuk kemampuan ini aktifitas Gluc1 25 kali lipat lebih besar dari Gluc2 dan Gluc3. Kisaran pH yang dapat mengefektifkan kerja Gluc1 adalah 4,5-5,5, perubahan pH mampu mempengaruhi kerja Gluc1 tetapi perubahan suhu tidak begitu berpengaruh.

Menurut Crueger (1984), selain menghasilkan glukamilase, kedua jamur tersebut di atas juga mampu memproduksi protease yang juga digolongkan enzim ekstraselular.

Pazur, et.al.(1990) membandingkan glukamilase produk *A. niger* dan *Rhizopus sp.* Dari hasil perbandingan tersebut didapatkan bahwa keduanya sama-sama mempunyai bobot molekul sekitar 95.500-97.500 dan struktur glikoprotein. Sedangkan perbedaannya terletak pada mobilitas elektroforetik, komposisi asam amino, jenis unit karbohidrat penyusun, dan jenis ikatan glikosidiknya.

BAB III

M E T O D A P E N E L I T I A N

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan bulan Nopember 1992 di Lab. Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Airlangga.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah: Biakan murni *Rhizopus oryzae* dan *Aspergillus niger* (dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga), media *Potato Dextrose Agar*, dedak padi, *yeast extract*, larutan fisiologis NaCl 0.85%, larutan buffer asetat (pH=5), pereaksi Somogyi A, pereaksi Somogyi B, pereaksi Nelson, akuademineral, akuades.

Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Tabung reaksi, rak tabung reaksi, *magnetic stirer* dengan batangan-batangan magnet, pembakar spiritus, *spatula*, inkubator, mikropipet, makropipet, papan hitung (Neubauer), mikroskop cahaya, *counter*, kain sutera, erlenmeyer 50 ml, erlenmeyer 250 ml, erlenmeyer 1000 ml, gelas beker 50 ml, gelas beker 1000 ml, penangas air, *sentrifuge*, spektrofotometer Hitachi 150-20.

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Tahap persiapan

Tahap persiapan penelitian ini meliputi tahapan sebagai berikut.

(a). Perbanyakkan

Perbanyakkan kultur murni dilakukan dengan memindahkan spora pada beberapa tabung reaksi berisi media PDA (*Potato Dextrose Agar*).

(b) Penyiapan suspensi spora

Suspensi spora dibuat dengan memindahkan spora *A.niger* dan *R.oryzae* ke dalam larutan fisiologis NaCl 0.85%. Penghitungan spora pada papan hitung Neubauer dilakukan agar dapat memenuhi jumlah 10^8 spora per gram media produksi.

(c) Penyiapan media produksi

Media yang digunakan untuk produksi enzim glukoamilase adalah media dedak padi yang ditambah dengan *yeast extract* 0,5% berat dan kelembaban media diatur sampai 60%. Media dimasukkan dalam 3 buah erlenmeyer 1000 ml, masing-masing diisi 250 g.

3.3.2. Tahap produksi enzim glukoamilase

Produksi enzim glukoamilase dilakukan pada suhu 30°C dan kelembaban media 60%. Mula-mula suspensi spora yang sudah dipersiapkan diisikan ke dalam media produksi pada:

(a) media produksi I : diisi dengan suspensi spora *A. niger*

(b) media produksi II : diisi dengan suspensi spora
R. oryzae

(c) media produksi III : diisi dengan suspensi spora *A. niger*
dan *R oryzae* dengan perbandingan

jumlah 1:1

3.3.3. Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari masing-masing erlenmeyer sebanyak 1 g biakan. Biakan ini diisikan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 10 ml larutan bufer asetat, kemudian dihomogenkan dengan *stirer*. Campuran disaring dan disentrifugasi untuk memisahkan ekstrak enzim dengan spora, kemudian dilakukan penentuan aktifitas enzim terhadap ekstrak enzim yang diperoleh. Waktu pengambilan sampel rata-rata 12 jam sekali sampai hasil penentuan aktifitas enzim menunjukkan penurunan.

3.3.4. Penentuan Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim ditentukan dengan uji gula tereduksi metoda Somogyi Nelson terhadap ekstrak enzim masing-masing sampel dan terhadap campuran ekstrak enzim *A.niger* dan *R.oryzae* dengan perbandingan volume 1:1

3.3.4.1. Uji gula tereduksi metoda Somogy-Nelson

Uji gula tereduksi metoda Somogyi-Nelson dilakukan duplo, meliputi urutan langkah kerja sebagai berikut.

- (a) 1 ml larutan pati terlarut diisikan ke dalam tabung reaksi sejumlah dua kali jumlah sampel. Tabung-tabung tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 42°C selama 5 menit.
- (b) Ke dalam masing-masing tabung diisikan 0,1 ml enzim/campuran enzim. Reaksi dalam suhu 42°C dibiarkan selama 10 menit.
- (c) Reaksi dihentikan dengan jalan memindahkan tabung-tabung

tersebut ke dalam penangas air 100°C selama 10 menit. (d) diisikan ke masing-masing tabung 1,6 ml reagen Somogyi I, kemudian 0,4 reagen Somogyi II. campuran dikocok, mulut tabung ditutup kelereng dan dipanaskan dalam penangas air 100°C selama 10 menit, kemudian tabung-tabung dimasukkan dalam es yang sedang mencair selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan ke dalam tabung reagen Nelson 2 ml dan 4,9 ml akuademineral dan dikocok kuat sambil menutup mulut tabung dengan ibujari hingga seluruh gas yang terjadi keluar. Larutan diukur serapan cahayanya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm (jika terjadi endapan, sebaiknya larutan disentrifugasi terlebih dahulu sebelum diukur serapan cahayanya).

(Catatan: Untuk mengeliminir pengaruh glukosa yang terbentuk dari hidrolisis dedak sepanjang waktu produksi terhadap hasil uji, dilakukan juga uji Somogyi Nelson terhadap ekstrak enzim masing-masing perlakuan yang sudah dinaktifkan terlebih dahulu dalam penangas suhu 100°C selama 10 menit).

3.3.4.2. Pembuatan kurva standar hubungan serapan cahaya dengan kadar glukosa

Kurva standar hubungan serapan cahaya dengan kadar glukosa diperlukan untuk menghitung besarnya aktifitas enzim dan menentukan kadar glukosa hasil hidrolisis. Adapun urutan kerjanya adalah sebagai berikut.

- (a) 200 mg D-glukosa pro analisis dilarutkan dalam akuades sampai volume 1000 ml.
- (b) Larutan (a) dipindahkan ke dalam 11 tabung reaksi dengan volume yang ditentukan sebagai berikut,

No tabung	Larutan glukosa (ml)	Akuades (ml)	Konsentrasi glukosa yang diperoleh ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	2,0	0
2	0,2	1,8	20
3	0,4	1,6	40
4	0,6	1,4	60
5	0,8	1,2	80
6	1,0	1,0	100
7	1,2	0,8	120
8	1,4	0,6	140
9	1,6	0,4	160
10	1,8	0,2	180
11	2,0	0	200

(c) Dilakukan uji Somogyi-Nelson seperti pada 3.4.1.

(d) Dibuat grafik serapan cahaya (sumbu x) dengan kadar glukosa yang telah ditentukan sehingga didapat persamaan garis lurus hubungan antara serapan cahaya dengan kadar glukosa.

3.3.4.3. Penentuan Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim masing-masing sampel ditentukan

berdasar rumus :

$$A.E. = \frac{f_s \times A \times K \times f_0}{t} \cdot 10^3$$

dengan $A.E.$ = aktifitas enzim dalam unit

f_s = faktor pengenceran contoh/sampel

A = serapan cahaya terukur

K = konsentrasi glukosa pada serapan
cahaya = 1

f_0 = faktor pengenceran ekstrak enzim

10^3 = perubahan harga konsentrasi glukosa

terukur

t = waktu pengujian

3.4. Penentuan Kadar Glukosa Tertinggi

Kadar glukosa tertinggi ditentukan berdasar serapan cahaya tertinggi masing-masing perlakuan (saat uji Somogy-Nelson) yang dikonversikan pada persamaan kurva standar hubungan antara serapan cahaya dengan kadar glukosa (3.3.4.2).

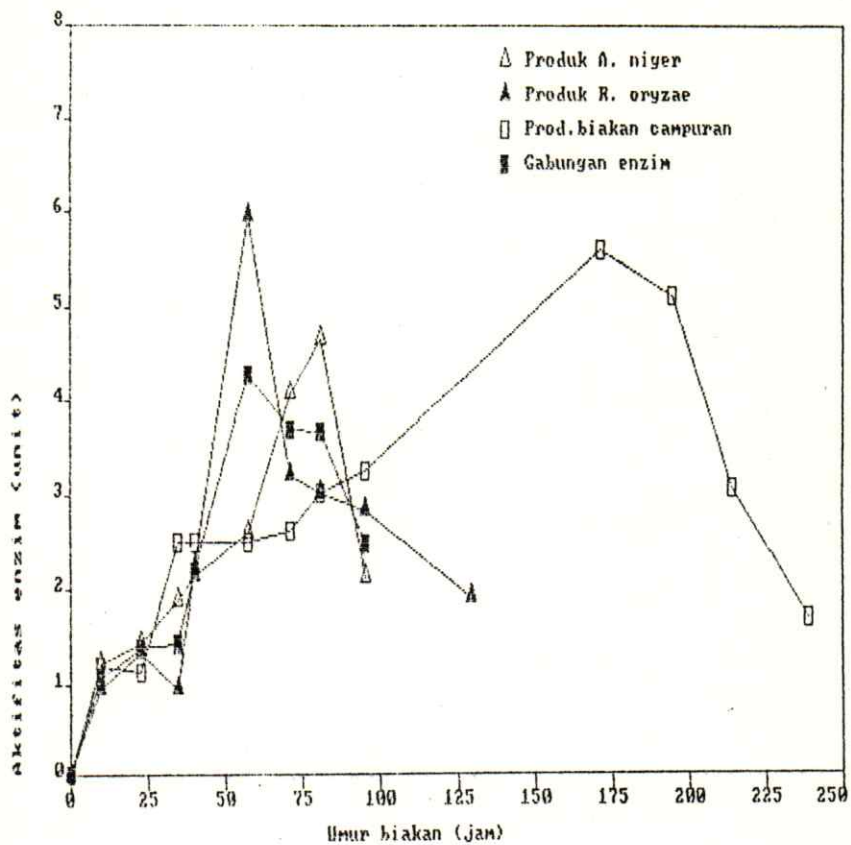
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Aktifitas enzim

Aktifitas enzim yang ditentukan berdasar hasil pengukuran gula tereduksi dengan metoda Somogyi Nelson sepanjang waktu pengamatan dapat diamati pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran aktifitas enzim produk biakan *A. niger*, *R. oryzae*, campuran *A. niger* dan *R. oryzae* (perbandingan jumlah spora yang dibiakkan= 1:1), dan gabungan enzim produk *A. niger* dan *R. oryzae* yang dibiakkan terpisah (perbandingan volume yang digabung= 1:1)

Nampak pada Gambar 1 bahwa aktifitas enzim tertinggi dicapai oleh glukoamilase yang diproduksi oleh *R. oryzae* yaitu 5,950 unit pada umur biakan 58 jam, kemudian produk biakan campuran *A. niger* dan *R. oryzae* (5.606 unit pada umur biakan 172 jam), produk *A. niger* (4,656) pada umur biakan 81 jam, dan aktifitas terkecil adalah aktifitas gabungan enzim produk *R. oryzae* dan *A. niger* (yang merupakan gabungan ekstrak enzim dengan perbandingan volume 1:1) yaitu 4,273 unit pada umur biakan 58 jam.

4.1.2. Kadar glukosa tertinggi

Kadar glukosa tertinggi ditentukan berdasar kadar glukosa hasil hidrolisis enzim terhadap substrat pati terlarut. Kadar glukosa hasil ditentukan dengan uji Somogyi Nelson, nilai serapan cahaya terukur dikonversikan ke persamaan kurva baku hubungan serapan cahaya dengan kadar glukosa (lampiran 2).

Tabel 1. Nilai aktifitas enzim dan kadar glukosa hasil hidrolisis glukoamilase terhadap substrat pati terlarut (*soluble starch*)

Jenis glukoamilase	Aktifitas enzim (unit)	Kadar glukosa hasil ($\mu\text{g/g}$ biakan/ menit)
Produk <i>A. niger</i>	4.656	4.874,91
Produk <i>R. oryzae</i>	5,950	6.120,01
Produk biakan campuran	5,606	5.365,47
Gabungan enzim produk <i>A. niger</i> dan <i>R. oryzae</i>	4,273	4.082,45

4.2. Pembahasan

Glukoamilase dapat diproduksi jamur saat hifanya masih aktif tumbuh, produksi akan kembali pada produksi basal jika hifanya tak mampu bertumbuh lagi (Wasten, 1991). Sebenarnya glukoamilase yang dihasilkan oleh *R. oryzae* dan *A.niger* sama-sama mampu menghidrolisis *raw starch* dan sama-sama mempunyai bobot molekul sekitar 95.500-97.500 tetapi agak berbeda dalam hal mobilitas elektroforetik, komposisi asam amino, jenis unit karbohidrat penyusun dan jenis ikatan glikosidiknya.

Pengukuran aktifitas glukoamilase pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak enzim (dalam buffer asetat pH=5) dari 1 g biakan, dengan demikian hasil pengukuran tidak mempertimbangkan berapa banyak glukoamilase yang dihasilkan oleh masing-masing jenis jamur per gram biakan.

Dari hasil penentuan aktifitas glukoamilase produk masing-masing perlakuan terhadap substrat *soluble starch* (pati terlarut), glukoamilase produk *R. oryzae* ternyata menempati urutan teratas (5,950 unit), selain aktifitas enzimnya tertinggi, waktu pemanenanpun lebih singkat dibanding perlakuan yang lain (dapat dipanen setelah biakan berumur 58 jam, sedangkan pemanenan biakan *A. niger* pada umur biakan 81 jam dan biakan campuran pada umur biakan 172 jam).

Kinoshita (1988) menyatakan bahwa ada efek sinergistik antara glukoamilase produk *A. oryzae* dan produk *Rhizopus sp*, yang terbukti dengan adanya peningkatan aktifitas enzim saat glukoamilase produk kedua jamur tersebut dicampur. Tetapi pada penelitian yang menggunakan *A. niger* dan

R. oryzae sebagai jamur penghasil glukoamilase ini tidak nampak adanya efek sinergistik pada produk enzimnya (terutama jika ekstrak enzimnya dicampur dalam perbandingan volume ekstrak 1:1). Hal ini dapat dilihat dari tidak adanya peningkatan aktifitas enzim pada gabungan ekstrak enzim produk *A niger* dan *R. oryzae* (Gambar 1). Selain dapat diamati tak adanya efek sinergistik, hasil penentuan aktifitas gabungan enzim dari waktu ke waktu - yang ternyata aktifitas enzimnya di antara aktifitas enzim produk *R. oryzae* dan *A. niger*- lebih menunjukkan ke fenomena "pengenceran - pemekatan" , jika diasumsikan jumlah glukoamilase produk *R.oryzae* lebih banyak dalam ekstrak dibanding dengan jumlah glukoamilase produk *A. niger* , jadi terjadi pengenceran konsentrasi ekstrak enzim produk *R.oryzae* (yang aktifitasnya lebih tinggi) dengan dicampurnya ekstrak enzim produk *A. niger* demikian sebaliknya, sehingga aktifitas gabungan ini cenderung terletak di antara aktifitas enzim produk *R. oryzae*. dan aktifitas enzim produk *A. niger*.

Waktu panen biakan campuran (perbandingan spora *A. niger* dan *R. oryzae* yang diinokulasikan = 1:1) ternyata jauh lebih lama dari waktu panen biakan kedua jamur tersebut secara individual, hal ini menunjukkan waktu penyesuaian bagi dua jamur tersebut untuk mampu hidup bersama dan melakukan fungsingan secara optimal. Jadi kalau ditinjau dari efisiensi waktu produksi, biakan campuran ini tidak begitu menguntungkan.

Akan tetapi glukoamilase produk biakan campuran ini ternyata mempunyai aktifitas enzim yang lebih tinggi dari aktifitas enzim produk *A niger* meski masih lebih rendah dari

aktifitas enzim produk *R.oryzae*. Dalam penelitian ini tidak diamati secara pasti distribusi tumbuh *A. niger* dan *R.oryzae* per gram biakannya, tetapi dari pengamatan yang hanya sekilas, tiap sampel yang diambil selalu mengandung dua jenis jamur tersebut. Kalau diasumsikan per g biakan terdapat hifa dua jamur tersebut dalam perbandingan yang hampir sama, dan dengan mempertimbangkan perkiraan hasil dari alinea 2 halaman 18, aktifitas enzim maksimum biakan campuran ini tidak akan melebihi aktifitas enzim maksimum dari glukoamilase produk *R.oryzae*. Mekanisme lain yang hanya bisa diperkirakan tapi juga tidak dibuktikan dalam penelitian ini adalah kemungkinan dihasilkannya protease dari salah satu atau kedua jamur tersebut karena terangsang oleh adanya glukoamilase yang dihasilkan jenis lain. Adanya protease mampu menurunkan aktifitas enzim glukoamilase, sehingga aktifitas maksimum tak mampu melebihi aktifitas maksimum enzim produk *R. oryzae* secara individual.

BAB V

K E S I M P U L A N D A N S A R A N

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini didapatkan kesimpulan sebagai berikut.

- (1). Aktifitas enzim glukamilase hasil uji Somogy Nelson, tertinggi dicapai oleh produk *R. oryzae* sebesar 5,950 unit pada umur biakan 58 jam.
- (2). Kadar glukosa tereduksi hasil hidrolisis pati terlarut oleh glukamilase produk *R. oryzae* mencapai 6120,01 $\mu\text{g/g.biakan/menit}$.
- (3). Tidak terjadi efek sinergistik antara glukamilase produk *R. oryzae* dengan produk *A. niger*, jika ekstrak enzim digabung dengan perbandingan volume 1 : 1.

5.2. Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan :

- (a) sebaiknya jika dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek sinergistik antara enzim glukamilase produk *Rhizopus oryzae* dengan produk *A. niger* dengan tidak hanya menguji gabungan ekstrak enzim pada perbandingan 1:1, tetapi dalam berbagai perbandingan volume ekstrak enzim,
- (b) jika dilakukan penelitian lanjutan tentang produksi enzim glukamilase dari biakan campuran *R. oryzae* dengan *A. niger* sebaiknya mengamati dan mempertimbangkan faktor-faktor : distribusi rata-rata masing-masing jenis jamur dalam biakan, waktu mulai tumbuh masing-masing

jamur dalam biakan, dan faktor-faktor yang mampu menghambat aktifitas enzim misalnya keberadaan protease atau bahan lain di dalam biakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, Ronald M. 1984. *Microbiology, Fundamentals and Applications*. 2nd edition. New York:Mc. Millan Publishing Company.
- Crueger, Wulf and Anneliese. 1984. *Biotechnology, A Textbook of Industrial Microbiology*. Sunderland: Sinauer Associates
- Dharmsthiti, S.C, et.al. 1986. *Production of Glucoamylase from Aspergillus niger*. Microbial Utilization of Renewable Resources. vol 4. Japan. p.107-113
- Fowler, T, et.al. 1990. *Regulation of glaA Gene of Aspergillus niger*. Curr-Genet. Dec ed.18(6).
- Kinoshita, Shinichi, et.al. 1983. *Hydrolysis of Starch by Immobilized Cells and by Enzymes of Aspergillus oryzae and Rhizopus sp.* Annual Reports of ICME vol.6. Japan.
- Panji, C. 1988. *Penuntun Praktikum Bioindustri*. Bogor: PAU-IPB-Lembaga Sumberdaya Informasi IPB
- Pazur, JH. et.al. 1990. *Comparison of The Properties of Glucoamilase from Rizopus aureus and Aspergillus niger*. Biotechnol-Appl-Biochem. 1990 Feb. 112(1). p. 63-78.
- Pornsilapatip, J, et.al. 1986. *Characteristic of Partially Purified Raw Starch Digesting Glucoamylase from Amylomyces sp.* Microbial Utilization of Renewable Resources vol.4. Japan.

Samson, R.A, et.al. 1981. *Introduction to Food Borne Fungi*. Baarn: Central Bureau voor Schimmelcultures-Academy of Arts and Sciences, Institute of The Royal Netherlands.

Sardjoko. 1991. *Bioteknologi, Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Syukur, S. 1993. *Studi Pendahuluan Biokonversi Pati Menjadi Glukosa Secara Sel Amobil*. Tesis. Bandung: Fak. Pasca Sarjana.

Takahashi, T, et.al. 1985. *Different Behavior Towards Raw Starch of Three Forms of Glucoamylase from Rhizopus sp.* Journal of Biochemistry. Sep.ed. Japan.

Tjitrosoepomo, G. 1989. *Taksonomi Tumbuhan, Schizophyta, Thallophyta, Bryophyta, Pteridophyta*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Wasten, H.A. et.al. 1991. *Localization of Growth and Secretion of Proteins in Aspergillus niger*. J-Gen-Microbiol. Aug.ed.



L A M P I R A N

Lampiran 1

Penentuan Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim ditentukan berdasar rumus.

$$A.E. = \frac{f_s \cdot A \cdot K \cdot f_o}{t} \cdot 10^3$$

• di mana : $f_s = 100$

A = nilai hasil pengukuran serapan cahaya

K = 91,2856

$f_o = 1$

t = waktu pengujian = 10 menit

Hasil penentuan aktifitas enzim dapat diamati pada daftar berikut.

Umur biakan (jam)	Aktifitas enzim (unit)			
	produk <i>A. niger</i>	produk <i>R. oryzae</i>	produk biakan campuran	produk gabungan enzim
0	0	0	0	0
9,67	1,226	0,932	1,206	1,054
23	1,442	1,344	1,128	1,379
34,58	1,873	0,952	2,500	1,445
40	2,147	2,226	2,500	2,183
57,5	2,598	5,950	2,500	4,273
71	4,060	3,206	2,618	3,692
81	4,656	3,010	3,010	3,667
95	2,108	2,814	3,245	2,479
129,5	-	1,912	-	-
171,5	-	-	5,606	-
194,5	-	-	5,096	-
214	-	-	3,069	-
239	-	-	1,687	-

Lampiran 2

Hasil pengukuran serapan cahaya terhadap larutan glukosa dengan konsentrasi glukosa yang telah ditentukan (Uji Somogyi-Nelson)

No	Kadar glukosa dalam larutan ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan cahaya terukur pada $\lambda = 520 \text{ nm}$
1	0	0
2	20	0,3
3	40	0,4
4	60	0,75
5	80	0,91
6	100	1,12
7	120	1,28
8	140	1,51
9	160	1,58
10	180	1,8
11	200	2,31
12	220	2,42

Persamaan kurva baku hubungan antara serapan cahaya terukur dengan kadar glukosa merupakan regresi linier dari data tersebut di atas. Persamaan regresi yang diperoleh, yang merupakan persamaan kurva baku adalah.

$$y = 0,0106 x + 0,0326$$

dengan y adalah serapan cahaya terukur dan x adalah kadar glukosa.

Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Universitas Airlangga

PAMERAN

SELESAI

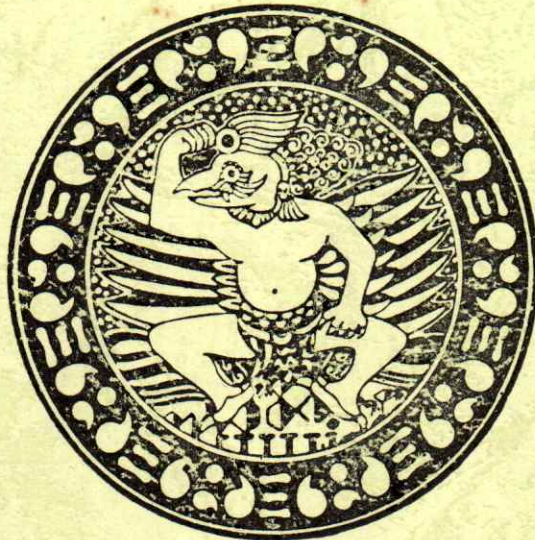
16 NOV 1995

**RADIASI SINAR GAMMA TERHADAP EFEK SEKSUAL
AEDES AEGYPTI GENERASI BERIKUTNYA**

Ketua Peneliti :

Ir. SUHARININGSIH

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIP OPF Unair 1993/1994
SK. Rektor Nomor : 3533/PT.03.H/N/1993

Nomor Urut : 176