# KARAKTERISASI pH α-AMILASE *Aspergillus versicolor* 3a1 YANG DIPRODUKSI PADA MEDIA LIMBAH CAIR TAPIOKA

**Fitratul Aini**
***Dosen Program Studi Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah IAIN Raden Fatah Palembang***

**Abstract :** *The research about pH Characterization of Aspergillus versicolor 3a1 a-Amylase Produced on Cassava Liquid Waste Media was conducted from February 2004 – March 2005. The pH characterization of a-amylase Aspergillus versicolor 3a1 was done at Laboratory of Microbiology, Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Science, Bogor Agricultural University. The aims of this experiments were to produce and to characterize pH of Aspergillus versicolor 3a1 a-amylase from cassava liquid waste media. Cassava liquid waste media contains 1% cassava starch, 1% yeast extract, 0.13% $KH_2PO_4$, and 0.05% $MgSO_4$ diluted in cassava liquid waste.*

*The process pH characterization of Aspergillus versicolor 3a1 a-amylase was done : isolat regeneration, crude extract production of Aspergillus versicolor 3a1 a-amylase, pH characterization of crude extract in ranges 4 – 9 with optimum temperature and incubation times for 10 minutes.*

*The result proved that a-amylase crude extract from Aspergillus versicolor 3a1 from cassava liquid waste showed its highest specific activity at pH 5; 26.13 U/mg.*

**Key Words :** ***characterization, α-amylase, Aspergillus versicolor 3a1, cassava liquid waste***

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara penghasil bahan-bahan berpati, seperti ubi kayu, yang pengolahannya menjadi pati banyak dilakukan oleh industri rumah tangga atau industri kecil. Proses pengolahan ubi kayu menjadi tepung tapioka terdiri atas tiga tahap yaitu pengolahan pendahuluan, ekstraksi pati, dan pengolahan akhir. Pada tahap ekstraksi pati banyak dihasilkan sisa bahan yang tidak dipakai lagi dan dibuang. Menurut Wenten dan Widiasa (2004) Indonesia yang memproduksi singkong 11 juta ton lebih per tahun, masih harus mengimpor berbagai produk turunan tapioka (manitol, maltitol, sorbitol, glukosa, fruktosa, dan maltosa) senilai US$ 2.7 juta sedangkan gula untuk kebutuhan farmasi mencapai 112 ribu ton senilai US$ 27 juta. Indonesia sebenarnya mempunyai potensi yang besar untuk mengembangkan industri turunan tapioka baik dari segi pasar maupun ketersediaan bahan baku. Selain untuk pemenuhan kebutuhan dalam negeri, potensi ekspor juga masih sangat terbuka.

Industri tapioka menghasilkan limbah cair dalam jumlah besar yaitu setiap ton singkong memerlukan 800 liter air untuk pengolahannya. Limbah cair ini berasal dari pencucian ubi kayu dan proses pengendapan/pemisahan pati (Djubaedah *et al.* 1994). Limbah tersebut masih mengandung pati 50% dan kandungan pati yang cukup tinggi dapat digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan cendawan (Handayani *et al.* 2002). Bahan-bahan tersebut sangat berpotensi apabila dimanfaatkan sebagai substrat pertumbuhan mikrob penghasil enzim terutama amilase. Enzim amilase merupakan kelompok enzim yang dihasilkan mikrob seperti bakteri dan cendawan (Nahas dan Waldemarin 2002).

α-Amilase tersebar luas pada jaringan mamalia, tanaman, dan mikrob (Mc Tigue *et al.* 1995). Penelitian tentang pemanfaatan mikrob untuk memproduksi enzim α-amilase sudah banyak dilakukan. *Aspergillus* spp. merupakan salah satu jenis kapang yang mempunyai kemampuan tinggi dalam menghasilkan berbagai macam enzim seperti amilase, selulase (Fogarty 1983). Secara umum α-amilase stabil pada pH 5.5 – 8.0. Aktivitas optimum α-amilase secara normal berada pada pH 4.8 – 6.5, tetapi bentuk kurva aktivitas pH berbeda untuk enzim yang dihasilkan dari sumber yang berbeda. Aktivitas α-amilase menurun secara cepat pada suhu diatas 50 °C, tetapi dengan adanya ion $Ca^{2+}$ penurunan aktivitas dapat diperlambat (Suhartono, 1989).

Dari uraian diatas bahwa limbah cair tapioka masih mengandung cukup banyak pati yang dapat digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan mikrob terutama kapang penghasil enzim pendegradasi pati, seperti amilase. Enzim yang dihasilkan oleh kapang yang ditumbuhkan pada media limbah cair tapioka dapat diproduksi dan diukur aktivitas enzimnya serta dikarakterisasi pH nya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengarakterisasi pH ekstrak kasar enzim α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 yang diproduksi pada media limbah cair tapioka.

## METODOLOGI PENELITIAN

### 1. Bahan dan Alat

a. Bahan yang digunakan adalah *Aspergillus versicolor* 3a1, Potato Dekstrosa Agar (PDA), alhokol 70%, ekstrak khamir, reagen asam dinitrosalisilat (DNS), maltosa, reagen Bradford, Bovine Serum Albumin (BSA).

b. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer, autoklaf, timbangan analitik, lampu bunsen, oven, labu erlenmeyer, beker glass, inkubator, cawan petri, erlenmeyer, jarum ose, tabung reaksi, mikropipet, pipet tetes, magnetik stirrer, penangas air, jarum ose, pH meter.

### 2. Cara Kerja

**a. Peremajaan Isolat**

Isolat *Aspergillus versicolor* 3a1 ditumbuhkan pada media agar-agar Potato Dekstrosa Agar (PDA) yang mengandung pati tapioka 1% (w/v).

**b. Pengukuran Pertumbuhan Kapang**

Empat keping isolat *Aspergillus versicolor* 3a1 (diameter 0.5 cm) yang berumur 7 hari diinokulasikan pada media limbah cair tapioka dengan komposisi pati tapioka 1%, ekstrak khamir 1%, $KH_2PO_4$ 0.13% dan $MgSO_4{:}7H_2O$ 0.05% (w/v) yang dilarutkan dalam 25 ml limbah cair pengolahan tapioka yang diambil dari Cimahpar Bogor. pH media diatur 7.0 dengan menambahkan NaOH 1 M atau HCl 0.2 M. Kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu ruang (25 °C) dengan goyangan 140 rpm (putaran per menit) selama 8 hari. Mulai hari ke-2 sampai hari ke-8 biakan yang tumbuh pada media limbah cair tapioka disentrifugasi pada kecepatan 5600 x g pada suhu 4 °C selama 20 menit. Endapan atau massa kapang dikeringkan dalam oven pada suhu 90 °C selama ± 3 hari sampai berat konstan. Kurva pertumbuhan kapang dibuat berdasarkan bobot kering massa kapang selama masa inkubasi 8 hari. Dari kurva pertumbuhan akan didapatkan aktivitas α-amilase optimum.

**c. Pengukuran Aktivitas α-Amilase dan Kadar Protein**

Supernatan yang diperoleh dari setiap masa inkubasi pertumbuhan kapang mengandung ekstrak kasar enzim α-amilase. Aktivitas enzim α-amilasenya diukur dengan menggunakan reagen asam dinitrosalisilat (DNS) (Bernfeld, 1955). Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim α-amilase dan 1 ml pati terlarut 1% (w/v) (pati di dalam bufer Tris-HCl 0.05 M pH 7.0) dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30 °C, kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS, dikocok kuat dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah campuran menjadi dingin, absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm dengan menggunakan alat Spectronic 20. Kontrol mendapatkan perlakuan yang sama, hanya saja ekstrak kasar enzim α-amilase ditambahkan setelah pemberian DNS. Sebagai standar digunakan maltosa pada konsentrasi 0-500 ppm dengan selang konsentrasi 100 ppm. Sebanyak 1 ml maltosa dari setiap konsentrasi ditambahkan kedalam 1 ml pati terlarut 1% (w/v) (pati di dalam bufer Tris-HCl 0.05 M pH 7.0) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30 °C, kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS, dikocok kuat dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah campuran menjadi dingin, absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Blanko menggunakan akuades sebagai pengganti enzim. Satu unit aktivitas α-amilase didefenisikan sebagai jumlah enzim yang reaksinya menghasilkan produk setara 1 μmol maltosa per menit pada kondisi pengukuran.

Kadar protein sampel diukur dengan metode Bradford (1976). Bovine Serum Albumin (BSA) digunakan sebagai standar dengan kadar 0-1.0 mg/ml dari stok BSA 1 mg/ml dengan selang 0.2 mg/ml. Sebanyak 0.1 ml BSA pada masing-masing konsentrasi ditambah 5 ml reagen Bradford, dikocok kuat, kemudian diinkubasi selama 10 menit. Blanko menggunakan akuades sebagai pengganti BSA. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Pengukuran protein dengan Bradford mikro assai memakai standar dengan kadar 0-0.1 mg/ml (selang 0.02 mg/ml). Sebanyak 0.4 ml BSA pada masing-masing konsentrasi ditambah 4 ml reagen Bradford, dikocok kuat, kemudian diinkubasi 10 menit, setelah itu absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Aktivitas spesifik (U/mg) didapatkan dari hasil perbandingan aktivitas (U/ml) dengan kadar protein (mg/ml).

**d. Produksi Ekstrak Kasar α-Amilase**

Delapan keping isolat *Aspergillus versicolor* 3a1 (diameter 0.5 cm) yang berumur 7 hari diinokulasikan pada 200 ml media limbah cair tapioka dalam Erlenmeyer 500 ml, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan goyangan 140 rpm sampai mencapai aktivitas α-amilase optimum yang didapat dari kurva pertumbuhan dan produksi yang dilakukan sebelumnya. Selanjutnya suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 5600 x g selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh mengandung ekstrak kasar enzim α-amilase. Ekstrak kasar diukur aktivitas spesifik enzimnya.

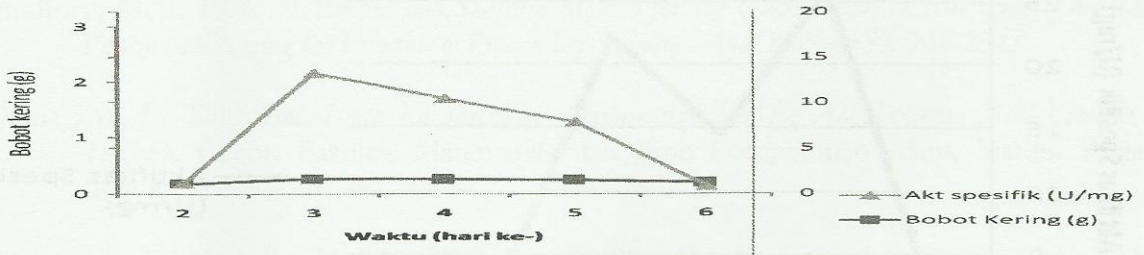
**e. Karakterisasi pH Enzim α-Amilase**

Enzim yang akan dikarakterisasi diproduksi kembali dengan komposisi media dan kondisi yang sama seperti pada tahap produksi sebelumnya, dengan menggunakan 500 ml media dalam Erlenmeyer 1000 ml. Karakterisasi pH enzim dilakukan pada ekstrak kasar pada kisaran pH 4-9 (selang 1 unit) dengan suhu optimum dan waktu inkubasi selama 10 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### a. Pengukuran Pertumbuhan Kapang dan Produksi α-Amilase

**Gambar 1. Kurva Bobot Kering dan Aktivitas Spesifik α-Amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 yang Diproduksi Pada Media Limbah Cair Tapioka**




Bobot kering *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka meningkat dari hari ke-2 hingga hari ke-3 inkubasi yang sekaligus merupakan bobot kering tertinggi yaitu 0.27 g dan menurun pada hari ke-4 inkubasi (Gambar 1).

Produksi α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka langsung terdeteksi pada hari ke-2 dan langsung meningkat dan mencapai maksimum pada hari ke-3 yaitu 13.30 U/mg pada akhir fase eksponensial pertumbuhan kapang dan aktivitas spesifik menurun pada hari ke-4 inkubasi (Gambar 1).

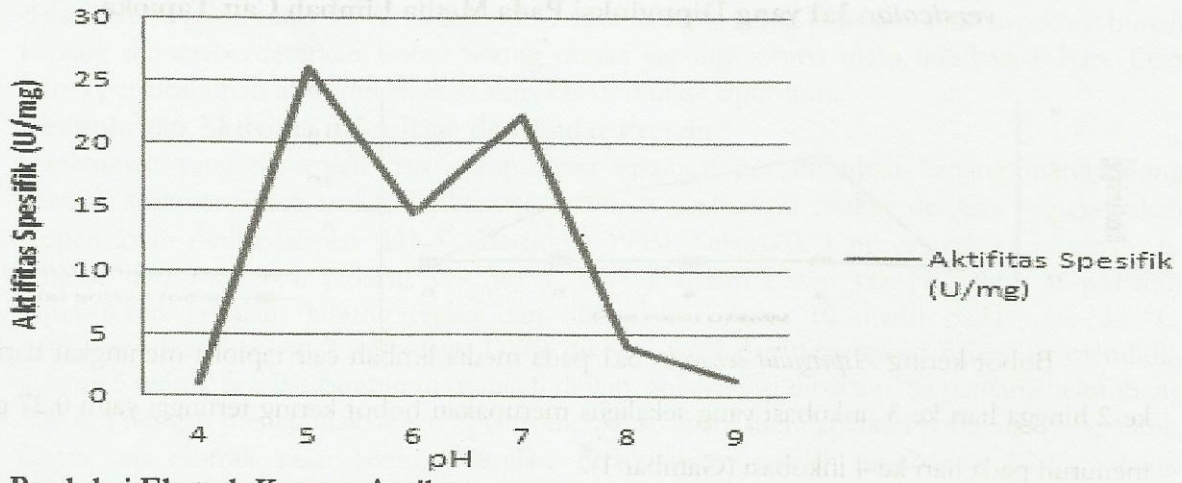
Bobot kering miselium *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka mengalami penurunan setelah akhir fase eksponensial, begitu juga dengan produksi α-amilasenya.

Peningkatan aktivitas spesifik α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 seiring dengan peningkatan bobot kering miselium. Isolat *Aspergillus versicolor* 3a1 yang diproduksi pada media limbah cair tapioka mempunyai fase lag yang pendek, hal ini dapat disebabkan karena isolat tidak membutuhkan waktu adaptasi yang lama untuk pertumbuhannya karena sesuai dengan habitat asalnya yaitu dari limbah cair tapioka (Damayanti 2000 ; Handayani 2000).

Aktivitas spesifik tertinggi *Aspergillus* versicolor 3a1 yang diproduksi pada media limbah cair tapioka dicapai pada akhir fase eksponensial pertumbuhan kapang. Menurut Madigan *et al.* (2000) salah satu karakteristik pertumbuhan pada fase eksponensial ialah terjadi peningkatan jumlah sel dan pada fase ini sering digunakan untuk mempelajari enzim-enzim atau komponen sel lainnya. Fase eksponensial ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan antara lain, suhu dan komposisi medium kultur.

Setelah mencapai fase eksponensial, selanjutnya terjadi penurunan bobot kering dalam hal ini kapang memasuki fase stasioner yang dilanjutkan fase kematian. Hal ini juga diikuti dengan penurunan aktivitas enzim, penurunan aktivitas spesifik α-amilase yang terjadi diduga karena *Aspergillus* sp. juga mengeluarkan protease dan glikosidase (Triwiyono, 1996). Menurut Madigan *et al.* (2000) pada beberapa kasus, pada saat sel mengalami lisis, enzim seperti protease dihasilkan dan dapat menguraikan protein enzim α-amilase yang menyebabkan turunnya aktivitas enzim.

**Gambar 2. Aktivitas Spesifik α-Amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 yang Diproduksi Pada Media Limbah Cair Tapioka Pada Berbagai pH. Aktivitas diukur pada suhu optimum.**




**b. Produksi Ekstrak Kasar α-Amilase**

Dari hasil produksi ekstrak kasar α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka yang telah dilakukan diperoleh aktivitas spesifik sebesar 7.57 U/mg. Selanjutnya ekstrak kasar tersebut dikarakterisasi suhunya. Nurhasanah (2005) mengatakan bahwa aktivitas spesifik suatu enzim (U/mg) berbanding lurus dengan aktivitas enzim dan berbanding terbalik dengan

kadar protein, semakin rendah kadar protein suatu enzim atau semakin tinggi aktivitas spesifiknya maka enzim tersebut semakin murni

**c. Karakterisasi pH α-Amilase**

Aktivitas spesifik tertinggi ekstrak kasar α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka dicapai pada suhu pH 5, sebesar 26.13 U/mg. Aktivitas mengalami penurunan pada pH 6 (Gambar 2). Penurunan aktivitas ini dapat disebabkan oleh denaturasi protein (Lehninger, 1982). Apabila suatu enzim bekerja pada pH yang optimum maka gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim akan berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan (Lehninger 1982). Fogarty (1983) menjelaskan bahwa aktivitas α-amilase secara umum berada pada kisaran pH 4.8 – 6.5, namun pH optimum ini dapat berlainan bergantung pada sumber penghasil enzimnya.

## KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Bobot kering dan aktivitas spesifik α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka didapatkan optimum pada hari ke-3.
2. Ekstrak kasar enzim α-amilase *Aspergillus versicolor* 3a1 pada media limbah cair tapioka optimum pada pH 5.

## DAFTAR PUSTAKA


Bernfeld, P. 1955. *Amylases a and β: Methods in Enzymology I.* New York: Academic Press, Inc.

Bradford, M.M. 1976. *A Radpid and Sensitive Method for the Quantitation on Microgram Quantities of Protein in Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Anal Biochem* 72: 248-254.

Damayanti, E. 2000. *Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Kapang Alkalotoleran Asal Limbah Cair Tapioka.* Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Djubaedah, E., Noerdin, M. Dan Harijanto, S. 1994. *Penanggulangan Limbah Cair Tapioka Secara Kimia. J. Agric. Indust.* 11: 28-33.

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

Handayani, D., Mubarik, N.R. dan Listiyowati, S. 2002. *Komunikasi Singkat. Isolasi dan Karakterisasi a-Amilase Ekstraseluler dari Kapang Asal Limbah Cair Tapioka. J. Mikrobiol. Indones.* 7: 51-54.

Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia.* Thenawidjaja, M. Penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari Principles of Biochemistry.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms.* 9th Ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Mc Tigue, M.A., Kelly, C.T., Doyle, E.M. and Fogarty, W.M. 1995. *The Alkaline Amylase of the Alkalophilic Bacillus* sp. *IMD 370. Enzyme Microb. Technol.* 17: 570-573.

Nahas, E. and Waldemarin, M.M. 2002. *Control of Amylase Production and Growth Characteristics of Aspergillus ochraceus. Rev. Latin. Microbiol.* 44: 5-10.

Nurhasanah. 2005. *Karakterisasi Gen Penyandi α-Amilase dan β-Xilosidase dari Bacillus thermoleovorans IT-08 di Escherichia coli.* Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi.* Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktoral Jenderal Pendidikan Tinggi. Antar Universitas Bioteknologi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Triwiyono, B. 1996. *Produksi Enzim Amilolitik Penghidrolisis Pati Mentah oleh Aspergillus* sp. *B-04.* Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Wenten IG, Widiasa IN. 2004. *Pengembangan Proses Konversi Enzimatik dalam Industri Berbasis Tapioka.* Bandung: Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, Institut Teknologi Bandung.