

PRODUKSI GLUKOAMILASE DARI *RHIZOPUS ORYZAE* SKALA FERMENTASI 2 LITER DAN 4 LITER

Linar Z. Udin, Ngadiman dan A.T. Karossi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI
Jalan Cisitua-Sangkuriang Bandung 40135

INTISARI

Produksi glukoamilase oleh *Rhizopus oryzae* telah dilakukan dalam skala erlenmeyer dengan menggunakan tepung sago sebagai sumber karbon dan tepung bungkil kedele sebagai sumber nitrogen. Diketahui bahwa tepung sago 2 % dan tepung bungkil kedele 0,5% dalam medium fermentasi dapat memberikan glukoamilase optimum. Pada penelitian ini dicoba mencari kondisi yang paling baik untuk menghasilkan glukoamilase dalam jumlah yang maksimal dan beraktifitas tinggi oleh *R. oryzae* dalam medium tepung sago pada skala 2 liter dan 4 liter. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa untuk percobaan fermentasi dengan skala 600-1500 ml waktu inkubasi yang diperlukan untuk produksi glukoamilase adalah 8 (delapan) hari. Pada kondisi ini aktifitas spesifik enzim dapat mencapai 0,85 U/mg protein - 1,50 U/mg protein. Pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 rpm, aktifitas spesifik enzim maksimum sebesar 2,58 U/mg protein diperoleh pada hari ke-8, sedangkan untuk kecepatan agitasi 500 rpm dan 700 rpm, aktifitas spesifik enzim maksimum masing-masing sebesar 3,47 U/mg protein dan 4,71 U/mg protein didapatkan pada hari ke-6 dan ke-5 fermentasi. Pada kondisi maksimum ini penggunaan pati sago dalam medium mencapai 94-98%. Biomasa yang dihasilkan pada akhir proses fermentasi berkisar antara 4,80 - 7,90 g kering/L medium.

ABSTRACT

Production of glucoamylase by *R. oryzae* has been conducted in erlenmeyer flasks using medium containing sago starch as carbon source and soybean meal as nitrogen source. It was known that 2 % of sago starch and 0.5 % of soybean meal in the medium is the best composition for the production of glucoamylase. At the present study, the optimal condition for maximal production of glucoamylase fermentation from *R. oryzae* was investigated using sago starch medium in the 2L and 4L scale. The results showed that the maximum production of glucoamylase at 600-1500 ml fermentation scale was reached at day-8 of incubation time. At this condition, the enzyme specific activity was 0.85 U/mg protein - 1.50 U/mg protein. For glucoamylase production within 4000 ml fermentation scale, the maximum enzyme specific activity, 2.58 U/mg protein, was obtained at day-8 of fermentation with 300 rpm agitation, while the maximum activity of 3.47 U/mg protein and 4.71 U/mg protein were achieved at day-6 and day-5 of fermentation process with 500 rpm and 700 rpm agitation, respectively. At this maximum condition, the use of sago starch reached 94 - 98 %, and biomass production at the end of fermentation process was 4.80 - 7.90 g (dry weight)/L medium.

PENDAHULUAN

Enzim glukoamilase banyak digunakan dalam industri makanan, terutama pada pembuatan sirup. Glukoamilase adalah enzim yang menghidrolisa molekul pati menjadi glukosa dengan cara memutuskan ikatan glikosida -1,4 dari ujung rantai non-pereduksi polimer pati. Glukoamilase yang digunakan dalam bidang industri ini dihasilkan oleh mikroorganisme dari golongan bakteri, ragi atau kapang. Jenis kapang yang secara komersial digunakan untuk produksi glukoamilase umumnya dari genera *Aspergillus* dan *Rhizopus* (2). Beberapa peneliti melaporkan bahwa spesies *Rhizopus* dan *Aspergillus* ini dapat menghasilkan beberapa jenis glukoamilase (3, 4). Underkofler (5) dan Davies (6), melaporkan bahwa enzim dari kapang *Rhizopus oryzae* merupakan salah satu enzim kapang yang sangat baik untuk proses sakarifikasi. Produksi glukoamilase dari kapang sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti komposisi medium, suhu, pH medium, tingkat aerasi dan waktu inkubasi. Untuk produksi enzim ini diperlukan medium yang mengandung sumber karbon, nitrogen dan mineral (6). Riyanto (1), melaporkan bahwa tepung sago atau campuran tepung sago dengan "soluble starch" dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk produksi glukoamilase oleh *R. oryzae*. Selain itu juga dilaporkan mengenai penggunaan tepung bungkil kedele sebesar 0,5 % (kandungan nitrogen dalam medium 0,05 %) menghasilkan glukoamilase terbaik (1). Pengaruh pH awal medium terhadap produksi glukoamilase *R. oryzae* telah dilaporkan oleh Prahastoeti (7). Diketahui bahwa produksi glukoamilase optimum diperoleh pada pH awal medium 4,5.

Penelitian yang dilaporkan disini bertujuan mencari kondisi agitasi yang paling baik untuk mendapatkan glukoamilase dalam jumlah yang maksimal dan beraktifitas tinggi dengan menggunakan *R. oryzae* di dalam medium fermentasi yang mengandung tepung sago pada skala fermentor 2 liter dan 4 liter.

BAHAN DAN METODA

Rhizopus oryzae L16 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi ITB. Pati sago dari jenis metroxylon dan bungkil kedele, keduanya, diperoleh dipasaran dilokasi Bandung.

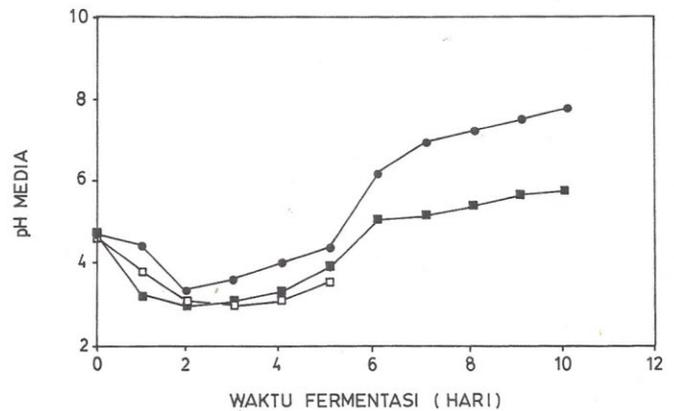
Media fermentasi yang digunakan untuk produksi glukamilase mengandung (g/l) tepung sagu 20; tepung bungkil kedele 7,07; malt ekstrak 3% 30 (ml); KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; KCl 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01. pH medium diatur sehingga mencapai 4,5. Media setelah disterilisasi, diinokulasi dengan 2% (v/v) larutan suspensi spora biakan murni *R. oryzae* yang berumur 7 (tujuh) hari (mengandung 10^6 spora/ml). Fermentasi dilakukan pada suhu 30 ± 1 °C, aerasi 4,5 - 6 L/menit (1 vvm). Agitasi dilakukan dengan menggunakan Corning Hot Plate Stirrer skala-6 (± 300 rpm). Volume fermentasi yang digunakan yaitu: 600 ml, 800 ml dan 1500 ml. Fermentor yang digunakan berkapasitas 2L, dengan diameter 15 cm. Percobaan pada skala fermentor 4L dilakukan pada kondisi yang sama dengan percobaan pada skala 2L, hanya dilakukan variasi agitasi 300 - 700 rpm, dan volume kerja fermentasi 4000 ml. Fermentor yang digunakan (LKB) mempunyai diameter 16 cm, dengan lebar pengaduk 1,5 cm. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan pH medium selama fermentasi berlangsung, aktifitas glukamilase yang dihasilkan, pati tersisa dalam medium fermentasi dan biomasa pada akhir fermentasi.

Aktifitas glukamilase ditentukan dengan menggunakan metoda Ueda (3) yang telah dimodifikasi. Unit aktifitas ditentukan setelah membandingkan dengan glukamilase standar (SIGMA). Unit aktifitas dinyatakan dalam unit/ml supernatan, yaitu banyaknya enzim yang dapat melepaskan 1 mg glukosa dari substrat pati-larut dalam waktu 10 menit pada pH 4,5 dan suhu 55°C. Kandungan protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry (8). Pati tersisa dalam medium ditentukan berdasarkan metoda Nelson-Somogyi setelah dihidrolisa dengan asam (9). Pengukuran biomasa dilakukan secara gravimetri setelah pencucian dengan air dan pengeringan pada 70°C (10).

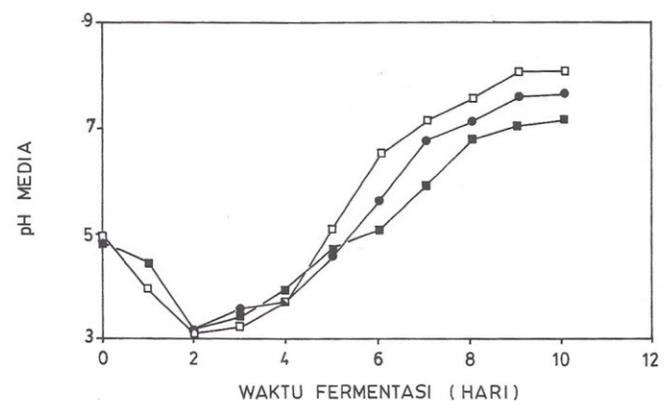
HASIL DAN DISKUSI

Dari hasil pengamatan perubahan pH medium selama proses fermentasi berlangsung, seperti yang diperlihatkan Gambar 1 dan Gambar 2, dapat dilihat bahwa pH medium meningkat terus, dimulai hari ke-3 fermentasi. Dari skala fermentasi 600 ml, terlihat bahwa pH medium naik mencapai pH 3,49 setelah hari ke-5 fermentasi. Hal yang sama juga didapatkan untuk skala fermentasi 800 ml dan 1500 ml yang diamati selama 10 hari. Pada keadaan ini dapat dilihat bahwa untuk skala fermentasi 800 ml, pH medium naik mencapai pH 5,67 setelah sepuluh hari, bahkan untuk skala fermentasi 1500 ml pH medium dapat mencapai 7,70. Pola yang sama terhadap perubahan pH medium juga teramati untuk skala 4000 ml, terutama proses fermentasi yang dilakukan dengan kecepatan agitasi 300 rpm dan 500 rpm (Gambar 2). Untuk proses fermentasi dengan kecepatan agitasi 700 rpm, pH medium sekitar 7,0 sudah dicapai pada hari ke-8. Perubahan pH medium ini tergantung pada aktifitas metabolisme kapang. pH medium memperlihatkan penurunan pada hari pertama inkubasi,

kemudian menunjukkan peningkatan terus mulai hari ke-3. Hal ini disebabkan karena hasil utama metabolisme kapang tahap awal pertumbuhannya adalah senyawa-senyawa asam (7). Akumulasi asam-asam ini dalam medium menyebabkan pH medium turun. Selanjutnya asam-asam ini digunakan oleh kapang untuk keperluan pertumbuhannya sehingga pH medium meningkat kembali. Dengan semakin tinggi agitasi, pertumbuhan kapang akan semakin cepat. Hal ini akan mengakibatkan peningkatan pH medium semakin cepat dicapai.

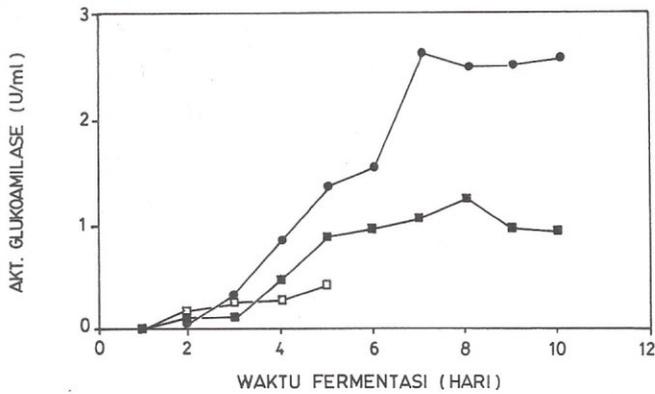


Gambar 1. Perubahan pH medium selama proses fermentasi oleh *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 600 ml (□) 800 ml (■), 1500 ml (●).

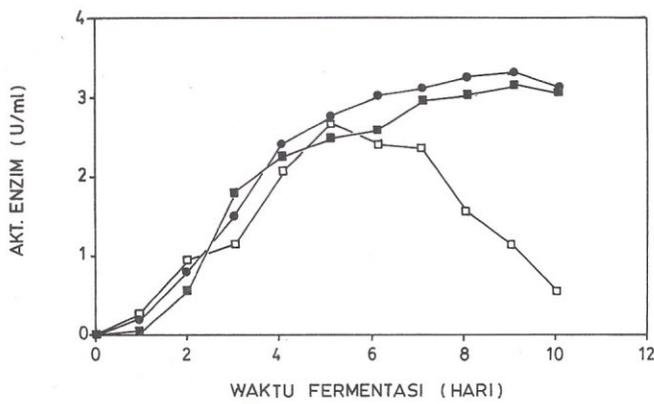


Gambar 2. Perubahan pH medium selama proses fermentasi oleh *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 rpm (■), 500 rpm (●), 700 rpm (□).

Aktifitas glukamilase yang dihasilkan dapat dilihat dalam Gambar 3 sampai Gambar 6. Terlihat bahwa aktifitas glukamilase meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi. Untuk skala fermentasi 600 ml, aktifitas glukamilase pada hari ke-5 baru mencapai 0,4102 U/ml (0,5583 U/mg protein). Tetapi untuk skala 800 ml dan 1500 ml, aktifitas enzim masih terus meningkat, dan mencapai maksimum setelah hari ke-8, yaitu masing-masing sebesar 1,1945 U/ml atau 0,8460 U/mg protein dan 2,3927 U/ml atau 1,5014 U/mg protein (Gambar 3 dan Gambar 5).



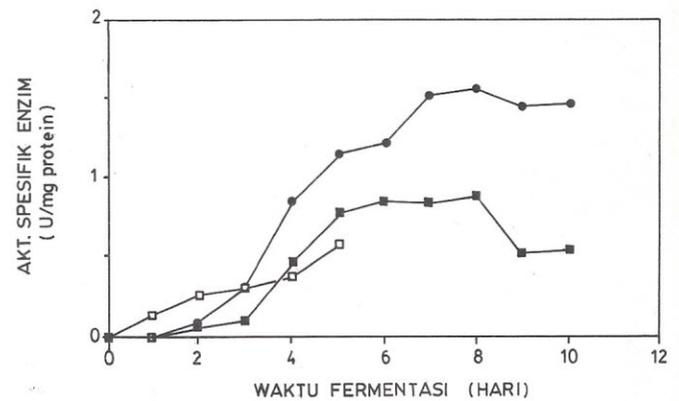
Gambar 3. Aktifitas glukoamilase hasil fermentasi *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 600 ml (□), 800 ml (■), 1500 ml (●).



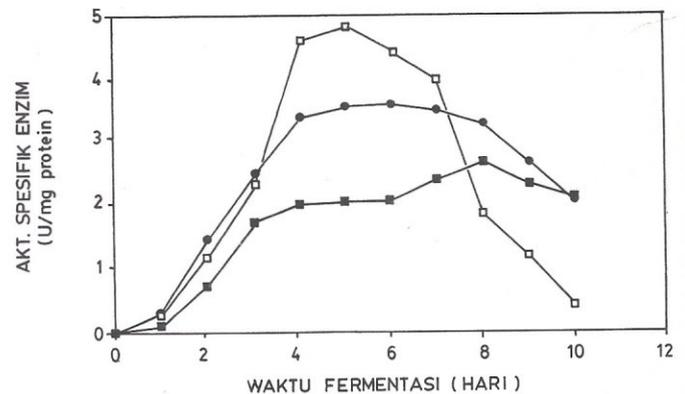
Gambar 4. Aktifitas glukoamilase hasil fermentasi *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 rpm (■), 500 rpm (●), 700 rpm (□).

Aktifitas spesifik enzim maksimum hasil fermentasi 4000 ml, yaitu 2,58 U/ mg protein, dicapai setelah hari ke-8 inkubasi dengan kecepatan agitasi 300 rpm (Gambar 4 dan Gambar 6). Dengan menaikkan kecepatan agitasi terlihat bahwa aktifitas spesifik enzim yang dihasilkan meningkat, dan waktu fermentasi untuk mendapatkan aktifitas maksimum semakin cepat dicapai. Proses fermentasi yang dilakukan dengan kecepatan agitasi 500 rpm dan 700 rpm, memberikan aktifitas spesifik glukoamilase masing-masing sebesar 3, 47 dan 4,70 U/mg protein yang diperoleh pada 6 dan 5 hari inkubasi. Hal ini disebabkan karena kontak antara mikroorganisme dengan nutrisi dalam medium semakin baik dengan adanya agitasi yang tinggi. Umumnya mikroorganisme memerlukan aerasi yang baik untuk kecepatan pertumbuhannya. Agitasi yang besar yang dapat memberikan aerasi yang baik akan mempercepat pertumbuhan kapang, yang berarti dapat mempercepat proses metabolisme kapang tersebut, sehingga waktu fermentasi untuk mendapatkan hasil maksimum akan semakin cepat dicapai. Aktifitas glukoamilase maksimum yang dihasilkan dari percobaan ini ada disekitar pH 5,0. Berarti bahwa

enzim yang dihasilkan secara maksimum, berkisar pada nilai pH medium yang sama seperti pH untuk aktifitas maksimum enzim tersebut.



Gambar 5. Aktifitas spesifik glukoamilase *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 600 ml (□), 800 ml (■), 1500 ml (●).



Gambar 6. Aktifitas spesifik glukoamilase *R. oryzae* L16 pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 rpm (■), 500 rpm (●), 700 rpm (□).

Semakin tinggi kecepatan agitasi, semakin banyak biomasa kapang yang terjadi. Hal ini dapat terlihat dari jumlah biomasa yang dihasilkan (Tabel 1 dan 2). Untuk proses fermentasi dengan kecepatan agitasi tertinggi (700 rpm) memberikan jumlah biomasa yang paling banyak (7,88g kering/L medium), sedangkan proses fermentasi dengan kecepatan agitasi 300 rpm dan 500 rpm, masing-masing menghasilkan biomasa sebesar 4,85g kering/L medium dan 4,52g kering/L medium. Tetapi agitasi yang terlalu tinggi juga dapat menyebabkan lisisnya sel-sel kapang tersebut. Keadaan ini dapat dilihat dari aktifitas glikoamilase hasil fermentasi dengan kecepatan agitasi 700 rpm (Gambar 6), yang sudah mulai menurun di hari ke-8, bahkan diakhir fermentasi aktifitas enzim tersebut hampir tidak ada.

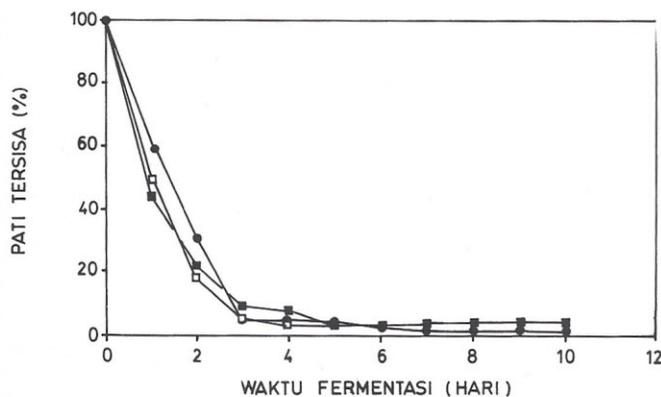
Tabel 1. Produksi biomasa oleh *R. oryzae* pada skala fermentasi 600 - 1500 ml.

Volume fermentasi (ml)	Biomasa (g kering/L medium)
600	3,40
800	3,46
1500	3,51

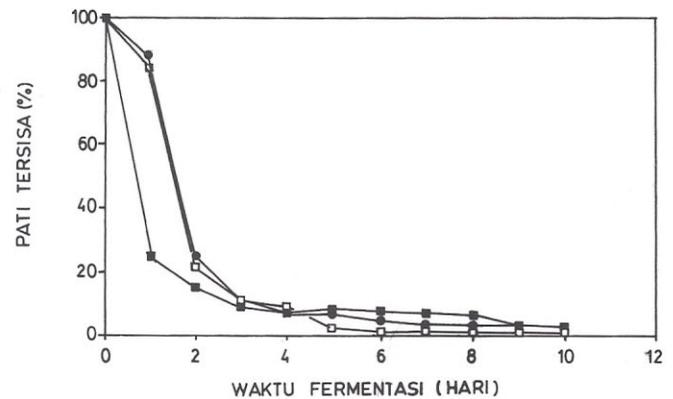
Tabel 2. Produksi biomasa oleh *R. oryzae* pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 - 700 rpm.

Kecepatan agitasi (rpm)	Biomasa (g kering/L medium)
300	4,52
500	4,85
700	7,88

Gambar 7 dan Gambar 8 memperlihatkan kandungan pati sisa dalam medium. Kandungan pati sisa ini untuk semua taraf perlakuan fermentasi terlihat semakin menurun dengan semakin lamanya waktu inkubasi. Dari Gambar 7 terlihat bahwa penurunan kandungan pati sisa dalam medium fermentasi skala 600 - 1500 ml berfluktuasi setelah hari ke-6 fermentasi. Hal ini disebabkan karena pada percobaan digunakan magnetic stirrer (sebagai agitator) yang putarannya tidak terlalu kencang sehingga kecepatan putaran tidak merata keseluruhan isi fermentor dan gumpalan yang terjadi tidak dapat hancur. Keadaan ini memungkinkan sampel yang diambil kurang mewakili keseluruhan isi. Dari Gambar 7 dan 8, juga teramati bahwa dalam keadaan maksimum pati sagu yang terpakai untuk pertumbuhan kapang mencapai 94 - 98 %.



Gambar 7. Kandungan pati sisa dalam medium selama proses fermentasi berlangsung oleh *R. oryzae* L16, pada skala fermentasi 600 ml (□), 800 ml (■), 1500 ml (●).



Gambar 8. Kandungan pati sisa dalam medium selama proses fermentasi berlangsung oleh *R. oryzae* L16, pada skala fermentasi 4000 ml dengan kecepatan agitasi 300 rpm (●), 500 rpm (■), 700 rpm (□).

KESIMPULAN

Dari percobaan ini diperoleh hasil sebagai berikut: waktu inkubasi (fermentasi) yang diperlukan untuk mendapatkan glucoamilase yang maksimum dengan skala 600 - 1500 ml adalah 8 hari. Aktifitas spesifik enzim yang dihasilkan berkisar antara 0,85 U/mg protein - 1,50 U/mg protein. Fermentasi dengan skala 4000 ml, memperlihatkan bahwa dengan meningkatnya kecepatan agitasi, aktifitas spesifik enzim meningkat dan waktu fermentasi untuk mendapatkan aktifitas enzim maksimum semakin cepat dicapai. Aktifitas spesifik glucoamilase sebesar 2,58; 3,74 dan 4,71 U/mg protein, masing-masing diperoleh setelah inkubasi selama 8, 6, 5 hari dengan kecepatan agitasi 300, 500 dan 700 rpm. Dengan meningkatnya kecepatan agitasi, selain dapat meningkatkan aktifitas enzim, juga dapat meningkatkan produksi biomasa. Biomasa yang dihasilkan diakhir fermentasi adalah 4,52 - 7,88 g kering/L medium dengan kecepatan agitasi 300 - 700 rpm. Penggunaan pati sagu dalam medium mencapai 94 - 98 %.

PUSTAKA

1. S. Riyanto. Skripsi S1. Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung (1986).
2. Linar Z. Udin dan A.T. Karossi. Penggunaan Enzim Pemecah Pati di Indonesia. *Buletin Limbah Pangan*, Vol. V, April : 484-497 (1990).
3. S. Ueda, Fukuoda, T. Mitsue and B.C. Saha. Glucoamylase Produced by Submerged Culture of *A. oryzae*. *Starke*. 31(9) : 307-314 (1979).
4. W.M. Fogarty. *Microbial Enzyme and Biotechnology*. W.M. Fogarty (Ed). Applied Science Publ., London (1983).

5. L.A. Underkofler. *Microbial Enzyme. Industrial Microbiology*. Brinton, M and W. Litsky (Ed). Mc.Graw Hill Book Co. New York (1976).
6. R. Davies. *Microbial Extracellular Enzymes. Their Role and Some Factors Affecting Their Formation*. Biochemistry of Industrial Microorganisms. Rainbow, C. and A.H. Rose (Ed). University of London Press Ltd. London (1963).
7. R.D. Prahastoeti. Skripsi S1. Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung (1989).
8. S.P. Colowick and H.O. Kaplan. *Methods in Enzymology*. Vol. 3. Acad Press Inc. New York (1957).
9. N. Nelson. A Photometric Adaption of the Somogyi Method for Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153 : 375-380 (1944).
10. A.T. Karossi, C. Tjahjadi, R. Dyah and Linar Z. Udin. *Food Science and Technology in Industrial Development*. Proceedings Food Conference'88. Bangkok, Thailand, 24-26 October 1988 : 396-398.

**Proceedings dan majalah berikut ini dapat dipesan pada
Rosidin d/a HKI, Puslitbang Kimia Terapan-LIPI**

DAFTAR HARGA PROCEEDINGS/MAJALAH DI UNION SHOP HKI

NO.	NAMA	HARGA JUAL
1.	Proceedings of the ASEAN-EC workshop on the scale up, cost evaluation and technology transfer of biotechnological processes.....	Rp 12.500,-
2.	Proceedings on the first ASEAN workshop on biochemical engineering.....	Rp 12.500,-
3.	Proceedings lokakarya pertama evaluasi biologi kimia dan fisika limbah lignosellulosa.....	Rp 7.500,-
4.	Proceedings of the first ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 7.500,-
5.	Invited papers presented at the first ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 7.500,-
6.	Proceedings of the second ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 12.500,-
7.	ASEAN bibliography on fermentation technology.....	Rp 7.500,-
8.	Biogasification of various organic residues in the ASEAN region.....	Rp 5.000,-
9.	Proceedings of the first ASEAN seminar workshop on biogas technology (+ supplementary information).....	Rp 12.500,-
10.	Buletin Limbah Pangan.....	Rp 1.500,-
11.	Proceedings of the First ASEAN workshop on solid substrate fermentation.....	Rp 7.500,-
12.	Proceedings of the second ASEAN workshop on food analytical techniques.....	Rp 7.500,-
13.	Jurnal Kimia Terapan 1991-1992.....	Rp 3.500,-
14.	Warta Kimia Analitik.....	Rp 2.000,-