

PEMURNIAN GLUKOAMILASE DARI HASIL FERMENTASI KAPANG *RHIZOPUS ORYZAE*

Linar Z. Udin *, Rini Noviyanti **, A. Sidik **
dan A.T. Karossi *

* Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jalan Cisitu, Bandung 40135

** FMIPA, Jurusan Kimia, Universitas Padjadjaran, Bandung

INTISARI

Pemurnian glucoamilase dari *R. oryzae* dilakukan dengan cara presipitasi dengan penambahan garam amonium sulfat 80 % jenuh pada 4°C. Presipitat enzim yang dihasilkan dipisahkan dengan sentrifuga pada 9000 rpm. Pemekatan enzim dilakukan dengan proses dialisa dalam larutan buffer dan kemudian dipekatkan dengan metoda cara pengeringan beku. Hasil pemurnian menunjukkan adanya satu macam glucoamilase dengan berat molekul sekitar 36000 secara elektroforesis gel. Aktifitas spesifik enzim hasil pemurnian dapat meningkat hampir 3 (tiga) kali lebih besar dari aktifitas enzim kasar (1,73 U/mg protein) dan tingkat kemurniannya hampir 12 (dua belas) kali lebih murni dari enzim kasar. pH optimum enzim yang ditentukan dengan menggunakan patilarut sebagai substrat berada pada pH 4-5, dan suhu optimum pada 55°C terhadap substrat yang sama. Harga Km yang diperoleh 0,027 %

ABSTRACT

Purification of the glucoamylase *R. oryzae* was carried out by addition of ammonium sulfate 80% saturation, on the fermentation broth at 4°C. The precipitate formed by centrifugation at 9000 rpm was then dialyzed in buffer solution and then concentrated using freeze dryer. It was found that the specific activity of the enzyme was around three-fold higher the crude enzyme from fermentation broth and the purity of the enzyme was almost twelve-fold purer than the crude enzyme. The molecular weight of the glucoamylase was found to be 36,000 as determined by SDS gel electrophoresis. The optimum pH with soluble starch as substrate was at pH 4.5 and the optimum temperature was 55°C while the Km Value was 0.027%.

PENDAHULUAN

Glucoamilase, 1,4- α -D-glucan glucohydrolase EC 3.2.1.3, adalah enzim yang sangat berperan dalam pembuatan glukosa dari pati. Enzim ini mempunyai kemampuan dalam menghidrolisa pati menjadi glukosa yang hampir sempurna(1). Pemurnian enzim umumnya dilakukan dengan cara presipitasi dengan garam amonium sulfat dan pemisahan melalui kromatografi filtrasi gel. Beberapa peneliti telah melaporkan pemurnian glucoamilase dari kapang (2,3). Semua glucoamilase ini

merupakan enzim ekstraseluler yang diperoleh dari filtrat medium. Morita (4) melaporkan empat macam glucoamilase hasil pemurnian *A. oryzae* yang difermentasi dalam medium nasi, sementara Miah and Ueda (5) mendapatkan tiga macam glucoamilase *A. oryzae* yang difermentasi dalam medium gandum. Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Miah and Ueda ini diketahui bahwa kemurnian dari masing-masing glucoamilase setelah melalui dua kali filtrasi dengan gel-Sephadex G-200, dapat meningkat sampai 10 kali untuk glucoamilase I, 30 kali untuk glucoamilase II, 32 kali untuk glucoamilase III. Diketahui pula bahwa berat molekul glucoamilase I, II, III, masing-masing adalah 76000, 38000, dan 38000 dalton. Mitsue (1) telah melakukan pemurnian glucoamilase *A. oryzae* hasil fermentasi dalam medium nasi dengan penambahan garam amonium sulfat 80 % jenuh, dan didapatkan tiga macam glucoamilase (I,II,III). Kemurnian yang dihasilkan untuk masing-masing glucoamilase I, II, III adalah 6 kali, 7 kali dan 5 kali lebih murni dari enzim kasar, hasil perolehan-kembali yang diperoleh 0,7 %; 1,5 % dan 0,4 % dan berat molekul untuk masing-masing enzim tersebut 96000, 67000, 54000. Karakterisasi glucoamilase hasil pemurnian ini telah pula dilakukan baik oleh Miah (5) maupun oleh Mitsue (1). Diketahui bahwa pH optimum glucoamilase *A. oryzae* I, II, III berada pada pH 4,5 dan suhu optimum 60°C untuk glucoamilase I, serta 50°C untuk glucoamilase II dan III.

Penelitian mengenai isolasi dan pemurnian glucoamilase dari kapang *R. oryzae* belum banyak dilaporkan. Pada tulisan ini dilaporkan pemurnian dan karakterisasi glucoamilase *R. oryzae* hasil fermentasi dalam medium pati sagu.

BAHAN DAN METODA

Rhizopus oryzae L16 berasal dari koleksi mikro-organisme yang ada di Puslitbang Kimia Terapan-LIPI, pati sagu dari jenis metroxyton dan amonium sulfat teknis dengan kemurnian sekitar 95 %.

Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan fermentor kapasitas 4 Liter dalam medium yang me-

ngandung pati sagu 2 %, bungkil kedele 0,7 % (kandungan nitrogen dalam medium 0,05 %) dan mineral ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1%; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%), yang diinokulasi dengan larutan suspensi biakan murni *R. oryzae* yang berumur 7 hari (mengandung 10^6 spora/ml). Proses fermentasi dilakukan pada suhu $30^\circ C \pm 1^\circ C$ dengan aerasi 8-9 L/menit dan agitasi 300 rpm (6). Cairan hasil fermentasi disentrifuga pada 9000 rpm ($4^\circ C$) selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai crude enzim (1).

Pengerjaan pemurnian enzim ini dilakukan pada $4^\circ C$. Kedalam enzim kasar ditambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk konstan sampai mencapai 80 % jenuh, dan didiamkan semalam. Endapan yang terbentuk disentrifuga pada 9000 rpm dan dilarutkan dalam bufer asetat 0,05 M pH 6,0. Larutan endapan ini kemudian didialisa dalam kantung selofan, pertama-tama dengan menggunakan air dan kemudian dengan bufer asetat 0,05 M pH 6,0 masing-masing selama 48 jam (1). Setelah didialisa, larutan enzim kemudian dipekatkan dengan metoda pengeringan beku.

Aktifitas enzim ditentukan dengan menggunakan metoda yang telah dilaporkan oleh Karossi *et al.* (6). Unit aktifitas ditentukan setelah membandingkan dengan glukamilase standar (SIGMA).

Kadar protein enzim ditentukan berdasarkan metoda Lowry (7) menggunakan Serum Bovine Albumin sebagai standar protein.

Berat molekul glukamilase hasil pemurnian ditentukan dengan menggunakan SDS gel elektroforesis (8, 9). Ribonuklease A (berat molekul 13700), Kimotripsinogen A (25000), Ovalbumin (43000) dan Bovin Serum Albumin (67000) digunakan sebagai standar.

Buffer asetat 0,1 M (pH 3,0-6,0) dan buffer fosfat 0,1 M (pH 7,0) digunakan dalam penentuan pH optimum enzim terhadap substrat pati larut. Pengerjaan yang dilakukan sama seperti pada penentuan aktifitas enzim, hanya pH buffer yang digunakan bervariasi (1).

Pengerjaan untuk penentuan suhu optimum yang dilakukan sama seperti pada penentuan aktifitas enzim, hanya suhu reaksi enzimatik yang digunakan bervariasi dari $40^\circ C - 60^\circ C$ (1).

Penentuan substrat spesifik dilakukan dengan menggunakan tepung aren, tepung tapioka, tepung jagung, tepung sagu dan pati-larut sebagai substrat (10, 1). Proses hidrolisa dilakukan pada pH 4,5; $55^\circ C$ dan selama 10 menit.

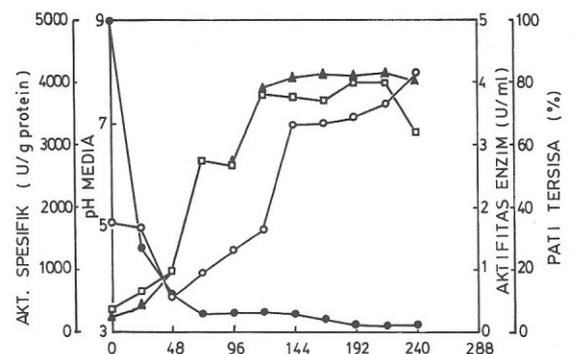
Penentuan harga K_m dilakukan sama seperti pada penentuan aktifitas enzim. Pada penentuan ini konsentrasi pati-larut bervariasi. Harga K_m diperoleh dari kurva Lineweaver-Burk (10).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi glukamilase

Fermentasi dilakukan dalam fermentor dengan volume percobaan 4 Liter. Hasil percobaan dapat dilihat pada

Gambar 1. pH medium terlihat menurun sampai 48 jam inkubasi mencapai pH 3,6 dan kemudian terjadi peningkatan pH medium yang dimulai pada 72 jam inkubasi. Hal ini disebabkan karena hasil utama metabolisme kapang pada tahap awal pertumbuhannya adalah senyawa-senyawa asam. Akumulasi asam-asam ini dalam medium menyebabkan pH medium turun. Selanjutnya asam-asam ini digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya sehingga pH medium meningkat kembali. Produksi glukamilase maksimum terjadi setelah 192 jam inkubasi. Pada kondisi ini aktifitas enzim yang dihasilkan adalah 4.09 U/ml atau aktifitas spesifik 4000 U/g protein. Pada 240 jam inkubasi atau akhir fermentasi, glukamilase yang dihasilkan masih memberikan aktifitas enzim 4.02 U/ml (aktifitas spesifik 3220 U/g protein), sedang pH medium hampir mencapai 8,0. Biomass yang dihasilkan 5,8 g/L (berat kering) dan pati yang digunakan untuk pertumbuhan sel 97 %.



Gambar 1. pH medium (o), aktifitas glukamilase (\blacktriangle), aktifitas spesifik glukamilase (\square) dan pati tersisa (\bullet) dalam medium setelah fermentasi oleh *R. oryzae*.

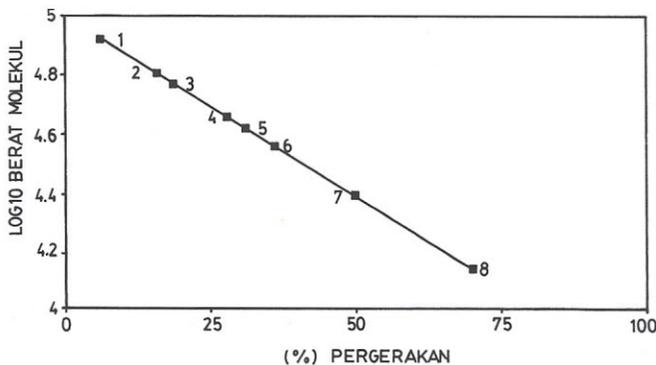
Pemurnian glukamilase

Aktifitas enzim dan kandungan protein enzim pada setiap tahap pemurnian diamati. Hasil pemurnian enzim, seperti yang terlihat dalam Tabel 1, menunjukkan bahwa aktifitas spesifik enzim tiga kali lebih besar dari pada aktifitas spesifik enzim kasar dan kemurniannya sekitar dua belas kali lebih murni dari enzim kasar hasil fermentasi. Adanya peningkatan aktivitas enzim menunjukkan tidak terjadi migrasi protein enzim keluar dari membran selofan selama proses dialisa, sehingga terjadi pemekatan konsentrasi protein enzim ekstraseluler.

Table 1. Pemurnian glukamilase dari *R. oryzae* hasil fermentasi skala 4 Liter, dengan fraksinasi amonium sulfat (80 % jenuh).

Fraksi	Volume (ml)	Aktifitas enzim (U/ml)	Aktifitas enzim total (Unit)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktifitas Spesifik enzim (U/mg protein)	Kemurnian (kali)	Hasil (%)
Cairan hasil fermentasi	2563	4,40	11268,4	2,54	1,73	1,0	100
Fraksinasi amonium sulfat * Residue, setelah dialisa	80	13,55	1083,8	4,18	3,24	1,6	9,6
Setelah pengeringan beku	18	147,11	2648,0	29,80	4,94	11,8	52,2

Perolehan kembali aktifitas glukoamilase hanya mencapai 52 % yang menunjukkan adanya fraksi glukoamilase yang tidak terendapkan. Suatu fenomena yang sama diamati oleh Feniksova (2) pada isolasi dan pemisahan enzim amilase dari *rice koji*. Pada percobaan penentuan berat molekul menggunakan SDS gel elektroforesa, selain dilakukan pengukuran berat molekul glukoamilase hasil pemurnian, juga dilakukan pengukuran berat molekul glukoamilase standar (SIGMA) sebagai pembanding. Dari hasil elektroforesa, terlihat bahwa untuk glukoamilase standar memberikan 3 pita protein dengan berat molekul masing-masing 83000; 59000 dan 41000, sedang untuk glukoamilase hasil pemurnian hanya memberikan 1 pita protein dengan berat molekul 36000 (Gambar 2). Dilihat dari berat molekul enzim yang diperoleh, glukoamilase *R. oryzae* hasil pemurnian ini mempunyai berat molekul mendekati berat molekul glukoamilase standar fraksi III, dengan berat molekul 41000, atau hampir sama dengan berat molekul glukoamilase *A. oryzae* bentuk II atau III hasil isolasi oleh Miah yang mempunyai berat molekul 38000. Tidak terpisahnya fraksi-fraksi protein glukoamilase *R.oryzae* dan rendahnya berat molekul yang didapat, mungkin karena proses pemurnian yang dilakukan masih kurang sempurna; misalnya belum dilakukannya pemisahan fraksi-fraksi baik melalui kolom DEAE-Sephadex maupun gel filtrasi.



Gambar 2. SDS gel elektroforesa dari glukoamilase *R.oryzae* hasil pemurnian. (1) Glukoamilase standar fraksi I, (2) Bovin Serum Albumin, (3) Glukoamilase standar fraksi II, (4) Ovalbumin, (5) Glukoamilase standar fraksi III, (6) Glukoamilase hasil pemurnian, (7) Kimotripsinogen A, (8) Ribonuclease.

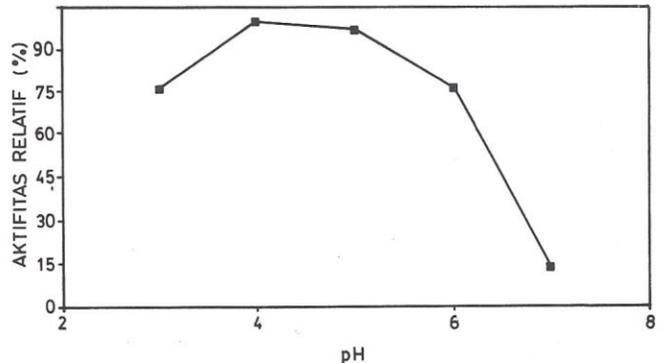
Karakterisasi glukoamilase pH optimum

Pengamatan pengaruh pH reaksi enzimatis terhadap aktifitas glukoamilase hasil pemurnian terlihat pada Gambar 3. Terlihat bahwa pH antara 4-5 merupakan optimum untuk reaksi enzimatis glukoamilase terhadap substrat pati-larut.

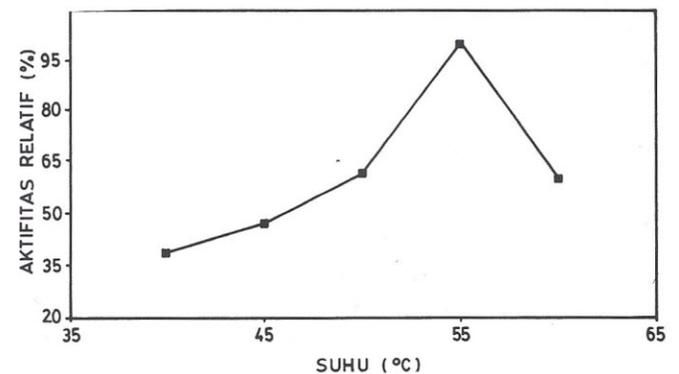
Suhu optimum

Dari hasil pengamatan suhu optimum seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4, terlihat bahwa aktifitas enzim meningkat dengan naiknya suhu reaksi sampai dengan suhu

55°C. Pada suhu yang lebih tinggi, aktifitas enzim menurun. Keadaan ini disebabkan karena setelah mencapai keadaan optimum, kenaikan suhu reaksi menyebabkan protein enzim mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak aktif lagi, dengan demikian akan diperoleh aktifitas enzim yang lebih kecil.



Gambar 3. Pengaruh pH reaksi enzimatis terhadap aktifitas glukoamilase *R. oryzae* hasil pemurnian pada 55°C selama 10 menit dengan pati larut sebagai substrat.



Gambar 4. Pengaruh suhu reaksi enzimatis terhadap aktifitas glukoamilase *R. oryzae* hasil pemurnian pada pH 4,5 selama 10 menit dengan pati larut sebagai substrat.

Substrat spesifik

Kecepatan reaksi awal hidrolisa dari berbagai substrat oleh glukoamilase hasil pemurnian dapat dilihat pada Tabel 2. Pati-larut merupakan substrat yang paling baik pada hidrolisa oleh glukoamilase dibandingkan dengan keempat substrat yang lainnya, dan kecepatan hidrolisa paling rendah diperoleh bila tapioka digunakan sebagai substrat. Pati-larut mempunyai struktur amilodekstrin sehingga lebih mudah dihidrolisis. Kandungan amilosa pada tepung sagu dan tepung jagung yaitu 27 dan 26%, sehingga kecepatan hidrolisis kedua substrat ini oleh glukoamilase tidak berbeda jauh, sedangkan kandungan amilosa pada tepung tapioka 17%, sehingga kecepatan hidrolisisnya paling rendah. Glukoamilase tidak menghidrolisis secara acak tetapi menghidrolisis pada ujung non pereduksi molekul pati, dan kecepatan hidrolisis untuk ikatan percabangan lebih lambat daripada kecepatan untuk ikatan glikosida lurus.

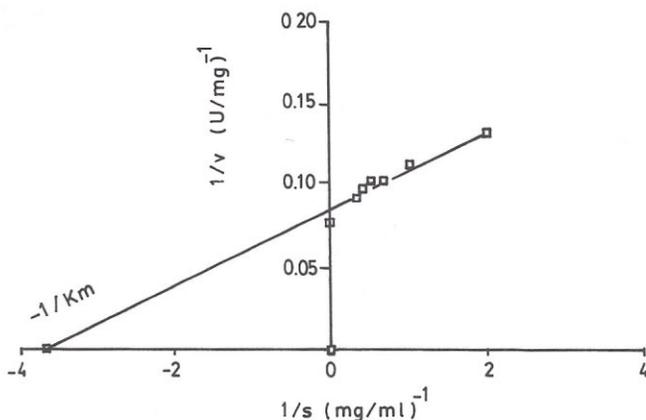
Tabel 2. Kecepatan reaksi awal glukoamilase pada berbagai substrat.

Substrat	Kecepatan reaksi awal * (U/mg protein)
Pati larut	6,94
Tepung aren	1,63
Tepung jagung	1,73
Tepung sagu	1,83
Tepung tapioka	1,26

* Kecepatan reaksi awal dinyatakan dalam aktifitas spesifik.

Konstanta Michaelis (Km)

Harga Km glukoamilase hasil pemurnian ditentukan pada pH 4,5 dengan menggunakan pati-larut sebagai substrat, menunjukkan nilai 0,027 %, seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan hidrolisa pati larut oleh glukoamilase *R. oryzae* hasil pemurnian. Hasil digambarkan dalam plot Lineweaver-Burk antara kecepatan terhadap konsentrasi substrat. Kecepatan hidrolisa dinyatakan dalam aktifitas spesifik enzim.

KESIMPULAN

Pemurnian glukoamilase *R. oryzae* dapat dilakukan dengan penambahan garam amonium sulfat 80 % jenuh, dan endapan yang dihasilkan dipisahkan dengan sentrifuga pada 9000 rpm, 4°C. Pemekatan larutan enzim dilakukan dengan dialisa dalam bufer asetat dan terakhir dipekatkan

dengan menggunakan pengering beku. Aktifitas enzim hasil pemurnian ini dapat meningkat hampir tiga kali lipat dari pada aktifitas enzim kasar, kemurniannya dapat mencapai hampir 12 kali lebih murni dengan perolehan kembali mencapai 52 %. Dari penentuan karakteristik enzim dengan menggunakan pati larut sebagai substrat diperoleh pH optimum enzim antara 4-5, suhu optimum 55°C dan harga K_m 0,027 %.

PUSTAKA

1. T. Mitsue, B.C. Saha and S. Ueda. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* Cultured on Steamed Rice. *Journal of Applied Biochemistry*, 1 : 410-422 (1979).
2. R. V. Feniksova, and V.G. Ryzhakova. Isolation and Purification of Preparations of Glucoamylase from *Aspergillus Awamori*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 4, (3) : 203-208 (1968).
3. Z. U. Linar, dan A.T. Karossi. Penelitian dan Pengembangan pada Penggunaan Enzim Pemecah Pati di Indonesia. *Buletin Limbah Pangan* Vol. V : 484-497, (1990).
4. Y. Morita, K. Shimizu, M. Ohga and T. Korenaga. *Agr. Biol. Chem.*, 30 : 114-119 (1966).
5. M.N.N. Miah, and S. Ueda. Multiplicity of Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part I. Separation and Purification of Three Forms of Glucoamylases. *Die Starke*, 29 : 191-196 (1977).
6. A.T. Karossi, C. Tjahyadi, R. Diah and L. Z. Udin. *Food Science and Technology in Industrial Development*. Proceedings Food Conference'88. Bangkok, Thailand, 24-26 October 1988 : 396-398.
7. Colowick S.P., and N.O. Kaplan. *Methods in Enzymology* Vol. III. Acad Press, Inc. New York (1957).
8. M. Olympia, Y. Nakata, T. Date and M. Takano. Purification of Amylase from Amylolytic Lactic Acid Bacteria Isolated from "Bulong-Bangus". *Microbial Utilization of Renewable Resources*, Vol. 5, NRCT, NUS, NSTA-JSPS, Joint Seminar on Biotechnology, 20-22 November 1986 : 129-136.
9. Anonim. *Electran*. Molecular Weight Markers Calibration Kits for SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresa, RNA Electrophoresa, Gel Filtration. BDH Chemicals Ltd. Poole, England (1989).
10. M.N.N. Miah, and S. Ueda. Multiplicity of Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part II, Enzymatic and Physicochemical Properties of Three Forms of Glucoamylase. *Die Starke*, 29 : 235-239 (1977).