



Produksi β -Glukosidase *Aspergillus niger* Bio 2173 dengan Fermentasi Padat menggunakan Substrat Dedak

Sri Sugiwati ^{a,b}, Maggy Thenawidjaja Suhartono ^{a *}, Muhammad Hanafi ^b, Hanifah Nuryani Lioe ^a

^aDepartemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

^bPusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang, Indonesia

Diterima : 07 Maret 2018, Revisi akhir : 03 Mei 2018, Disetujui terbit : 07 Mei 2018

*Production of β -Glucosidase *Aspergillus niger* Bio 2173 on Solid State Fermentation using Rice Bran as Substrate*

Abstract

*β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) is a part of the cellulase enzyme complex which acts synergistically with exoglucanase and endoglucanase to hydrolyze cellulose into glucose. The purpose of this study was to obtain the maximum fermentation conditions for production of β -glucosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 with solid state fermentation using rice bran as fermentation substrate. The factors that affect the production of β -glucosidase which consist of initial pH of the fermentation medium, incubation period, ratio of water content to fermentation substrate, incubation temperature and addition of the Mandel's mineral salts solution were examined in the study. The results showed that maximum fermentation conditions for β -glucosidase production were at initial of fermentation pH of 2,0, incubation period of 7 days, ratio of water content to substrate of 1:1, and incubation temperature of 32°C. Addition of Mandel's mineral salts solution to the fermentation substrate at maximum fermentation conditions increased the activity and specific activity of β -glucosidase crude extract up to 5,24 \pm 0,57 U/mL and 2,46 \pm 0,04 U/mg respectively.*

*Keywords: β -glucosidase, *Aspergillus niger*, rice bran, solid state fermentation, crude extract*

Abstrak

β -Glukosidase (EC 3.2.1.21) merupakan bagian dari enzim multi kompleks selulase, yang bekerja secara sinergis dengan eksoglukanase dan endoglukanase menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan kondisi fermentasi maksimum untuk produksi β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 dengan fermentasi media padat menggunakan substrat dedak. Pengujian dilakukan terhadap faktor-faktor yang mempengaruhi produksi β -glukosidase, yaitu pH awal medium fermentasi, waktu inkubasi, perbandingan kandungan air terhadap substrat medium fermentasi, suhu inkubasi dan penambahan larutan garam mineral Mandels. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi fermentasi maksimum untuk produksi β -glukosidase adalah pada pH awal medium fermentasi 2,0, waktu inkubasi 7 hari, perbandingan kandungan air terhadap substrat medium fermentasi 1:1, dan suhu inkubasi 32°C. Penambahan larutan garam mineral Mandels ke dalam substrat fermentasi pada kondisi fermentasi maksimum menyebabkan peningkatan aktivitas dan aktivitas spesifik ekstrak kasar β -glukosidase masing-masing sebesar 5,24 \pm 0,57 U/mL dan 2,46 \pm 0,04 U/mg protein.

Kata kunci: β -glukosidase, *Aspergillus niger*, dedak padi, fermentasi padat, ekstrak kasar

Pendahuluan

β -Glukosidase (β -D-glukosida glukohidrolase, EC 3.2.1.21) merupakan bagian dari enzim multikompleks selulase. β -Glukosidase memiliki banyak manfaat potensial untuk digunakan pada berbagai proses bioteknologi seperti pelepasan rasa (*flavor*), aroma, aglikon isoflavon dan untuk sintesis oligosakarida dan alkil glikosida. Pada produksi bioetanol dari biomassa lignoselulosa, β -glukosidase berperan dalam menghidrolisis selobiosa yang merupakan senyawa intermediet dari hidrolisis selulosa menjadi monomer glukosa (Krisch *et al.*, 2010, Singhanian *et al.*, 2013) sedangkan pada industri pulp dan kertas, β -glukosidase bersama-sama dengan selulase dan hemiselulase digunakan untuk menghilangkan warna tinta pada proses daur ulang limbah kertas (Ahmed *et al.*, 2017).

Hidrolisis selulosa menjadi glukosa melibatkan enzim multi kompleks selulase yang terdiri dari tiga macam enzim, yaitu endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase. Ketiga macam enzim tersebut bekerja secara sinergis untuk hidrolisis lengkap selulosa menjadi glukosa melalui beberapa tahapan hidrolisis. Pada tahap pertama, serat selulosa dihidrolisis oleh endoglukanase melepaskan fragmen selulosa kecil dengan bagian ujung/terminal bebas dalam bentuk pereduksi dan non pereduksi, yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut oleh eksoglukanase melepaskan oligosakarida berukuran kecil dan selobiosa. Pada tahap akhir, β -glukosidase melengkapi hidrolisis selulosa dengan menghidrolisis selobiosa (produk intermediet hidrolisis selulosa) menjadi monomer glukosa (Krisch *et al.*, 2010, Singhanian *et al.*, 2013).

β -Glukosidase terdapat pada bakteri, kapang, tanaman dan hewan. Kapang merupakan sumber β -glukosidase yang telah banyak dilaporkan. Isolasi β -glukosidase dari kapang dilakukan baik dengan menggunakan metode fermentasi media padat maupun fermentasi media cair (Singhanian *et al.*, 2013). Berbagai jenis kapang telah dijadikan sebagai sumber β -glukosidase seperti *Aspergillus niger* (Raza *et al.*, 2011; Zahoor *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2012; Junior *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015 Julia *et al.*, 2016), *Aspergillus terreus* (Elshafei *et al.*, 2011), *Aspergillus fumigatus* (Liu *et al.*, 2012), *Fusarium proliferatum* (Gao *et al.*, 2012), *Penicillium pinophilum* (Joo *et al.*, 2010), *Penicillium italicum* (Park *et al.*, 2012), *Trichoderma viride* (Irshad *et al.*, 2013), dan *Trichoderma reesei* (Zheng *et al.*, 2017).

Aspergillus niger merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam industri fermentasi seperti produksi asam organik (Yang *et al.*, 2017), enzim hidrolitik lipase (Salihu *et al.*, 2016) dan amilase (Carrillo-Sancen *et al.*, 2016). *Aspergillus niger* juga merupakan sumber β -glukosidase yang potensial. Hal ini disebabkan karena kemudahannya untuk dikultivasi pada media produk agro dengan fermentasi media padat maupun fermentasi media cair. Selain itu, *Aspergillus niger* telah dinyatakan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat sebagai GRAS (*generally regarded as safe*) (Silva *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2012). Beberapa penelitian produksi β -glukosidase yang menggunakan *Aspergillus niger* sebagai sumber enzim, diantaranya adalah Junior *et al.* (2014) yang melakukan isolasi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* dengan fermentasi media padat menggunakan substrat kulit ari gandum (*wheat bran*) dan purifikasi parsial menggunakan *MANAE-agarose* menghasilkan larutan enzim dengan aktivitas spesifik 17,1 IU/mg dan Hu *et al.* (2011) yang melakukan isolasi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* dengan medium minimal *Aspergillus* dan 1% *wheat bran* menghasilkan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas $3,3 \pm 0,1$ nmol/min/mL dan kultur campuran *Aspergillus niger* dan *A. oryzae* dengan aktivitas $4,9 \pm 0,1$ nmol/min/mL.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 dan mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi produksinya, yaitu pH awal medium fermentasi, waktu inkubasi fermentasi, perbandingan kandungan air terhadap substrat media fermentasi, suhu inkubasi fermentasi dan penambahan larutan garam mineral Mandels (Mandels dan Reese, 1957). Proses fermentasi dilakukan dengan teknik fermentasi media padat menggunakan substrat dedak. Hasil fermentasi diekstrak dan terhadap ekstrak kasar dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan substrat *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG), uji protein dan ditentukan aktivitas spesifiknya.

Bahan dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KNa-Tartrat, pereaksi Folin-Ciocalteu, *Bovine Serum Albumin*

(BSA), *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Sigma Aldrich), CH₃COONa, asam asetat 96%, Potato Dextrose Agar (PDA), larutan garam mineral Mandels : urea 0,3 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g/L, KH₂PO₄ 2,0 g/L, CaCl₂·2H₂O 0,4 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,3 g/L, pepton 1,0 g/L, Tween 80 0,2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0,005 g/L, MnSO₄·7H₂O 0,0016 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0,0016 g/L, dan CoCl₂·6H₂O 0,02 g/L. Peralatan yang digunakan antara lain Spektrofotometer UV/Vis (Optizen 2120 uv, Mecacys Co., Ltd, Korea Selatan), *sentrifuge refrigerator* (Combi 514R, Hanil Scientific InC, Korea Selatan), pH meter (Seven Easy S20, Mettler Toledo, USA).

Substrat Media Fermentasi

Substrat yang digunakan sebagai media fermentasi pada penelitian ini adalah dedak padi yang diperoleh dari daerah Karawang, Jawa Barat.

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat kapang *Aspergillus niger* BIO 2173 yang diisolasi dari gabah, diperoleh dari Laboratorium Fitopatologi, *Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology* (SEAMEO BIOTROP), Bogor.

Metode

Penyegaran (Regenerasi) *Aspergillus niger*

Penyegaran kapang *Aspergillus niger* dilakukan dengan menumbuhkan kapang yang berasal dari media agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kapang *Aspergillus niger* diinokulasikan pada tabung reaksi berisi media agar miring PDA steril secara aseptis, selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari (Ahmed *et al.*, 2015).

Produksi dan Ekstraksi β -Glukosidase

Produksi β -glukosidase dilakukan dengan fermentasi media padat menggunakan substrat dedak padi berukuran 40 mesh. Ke dalam 10 g substrat ditambahkan akuades sebanyak 10 mL. Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL dan disterilisasi dalam autoklaf pada 121°C selama 30 menit. Setelah dingin, ke dalam

masing-masing erlenmeyer tersebut diinokulasi dengan *Aspergillus niger* hasil peremajaan yang berusia 5 hari sebanyak 1 mL suspensi spora (10⁷ spora). Selanjutnya, diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28°C dengan pH awal media fermentasi 6,0. Jumlah spora kapang *Aspergillus niger* yang digunakan ditentukan dengan *hemocytometer* (Junior *et al.*, 2014; Razaet *al.*, 2011).

Hasil fermentasi diekstrak dengan larutan penyangga asetat 0,05 M (pH 5,0) sebanyak 50 mL kemudian digoyang dengan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 1 jam. Selanjutnya, larutan tersebut disaring menggunakan kain kasa untuk menghilangkan miselia. Filtrat yang dihasilkan kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit (Junior *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2011). *Supernatant* yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim untuk selanjutnya ditentukan aktivitas dan aktivitas spesifiknya.

Penentuan Kondisi Maksimum Produksi β -Glukosidase

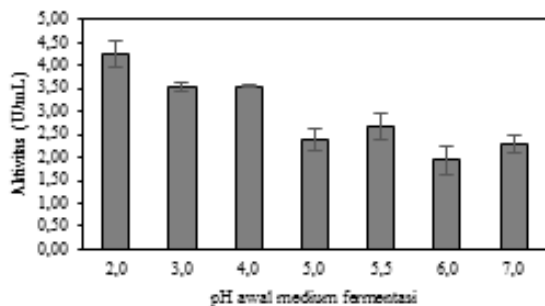
Penentuan kondisi fermentasi maksimum untuk produksi β -glukosidase dilakukan dengan pengujian terhadap faktor-faktor yang mempengaruhi produksi enzim, yaitu pH awal medium fermentasi, waktu inkubasi fermentasi, perbandingan kandungan air terhadap substrat medium fermentasi, suhu inkubasi fermentasi dan penambahan larutan garam mineral Mandels pada medium fermentasi. Berikut ini adalah prosedur pengujian terhadap faktor-faktor yang mempengaruhi produksi β -glukosidase:

- a. Pengujian terhadap pengaruh pH dilakukan dengan mengatur pH awal medium fermentasi pada kisaran pH dari 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; dan 7,0 menggunakan 1 mmol/L HCl atau 1 mmol/L NaOH. Nilai kisaran pH 2,0 – 7,0 mengacu pada penelitian Qian *et al.* (2012). Fermentasi dilakukan dengan menambahkan 10 mL pelarut (pH 2,0 – 7,0) ke dalam 10 g substrat, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari.
- b. Pengujian terhadap pengaruh waktu inkubasi fermentasi dilakukan dengan menambahkan 10 mL akuades ke dalam 10 g substrat, kemudian diinkubasi pada suhu inkubasi 28°C dengan variasi waktu inkubasi selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 hari, dan pH awal medium fermentasi 6,0. Penambahan volume akuades sebanyak 10 mL ke dalam 10 g substrat,

- mengacu pada penelitian Raza *et al.* (2011). Nilai pH 6,0 adalah pH awal media yang terukur tanpa penambahan HCl atau NaOH.
- Pengujian terhadap pengaruh variasi perbandingan kandungan air terhadap substrat media fermentasi, dilakukan dengan menambahkan masing-masing sebanyak 5, 10, 15, 20 dan 25 mL akuades ke dalam 10 g substrat dalam erlenmeyer 100 mL. Inkubasi fermentasi dilakukan pada suhu 28°C selama 7 hari dan pH awal media fermentasi 6,0.
 - Pengujian terhadap pengaruh suhu inkubasi fermentasi dilakukan pada variasi suhu 28°C, 32°C, dan 36°C dengan waktu inkubasi selama 7 hari dan pH awal media fermentasi 6,0.
 - Pengujian terhadap pengaruh penambahan larutan garam mineral Mandels dilakukan dengan fermentasi pada kondisi maksimum dengan menambahkan larutan garam mineral Mandels sebanyak 10 mL ke dalam 10 g substrat. Sebagai pembanding dilakukan juga fermentasi dengan substrat sebanyak 10 g dan akuades 10 mL (Raza *et al.*, 2011).

Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar β -Glukosidase

Aktivitas ekstrak kasar β -glukosidase ditentukan dengan menggunakan *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) sebagai substrat. Sebanyak 1,0 mL larutan 2 mM substrat *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside dalam 0,05 M larutan penyangga natrium asetat (pH 5,0) diinkubasi pada suhu 40°C selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 0,1 mL larutan ekstrak kasar. Setelah 10 menit, reaksi dihentikan dengan menambahkan 2,0 mL larutan 1 M Na_2CO_3 . Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang



Gambar 1. Efek pH Awal Medium Fermentasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173

gelombang 405 nm. Satu unit (U) β -glukosidase dinyatakan sebagai jumlah ekstrak kasar yang mengkatalisa hidrolisis *p*-NPG untuk melepaskan 1 μmol *p*-nitrophenol per menit pada kondisi percobaan (Herr *et al.*, 1978).

Penentuan Kadar Protein dalam Ekstrak Kasar β -Glukosidase

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar. Selanjutnya, kadar protein digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik yang merupakan rasio dari aktivitas enzim terhadap kadar protein (Lowry *et al.*, 1951).

Hasil dan Pembahasan

Efek pH Awal Medium Fermentasi terhadap Produksi β -Glukosidase

Nilai pH medium fermentasi dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme sehingga berpengaruh terhadap produksi metabolit. Untuk mengetahui pengaruh pH terhadap produksi β -glukosidase dilakukan fermentasi padat *Aspergillus niger* BIO 2173 menggunakan substrat dedak dengan rentang pH awal medium fermentasi, yaitu pH 2,0 – 7,0. Nilai pH yang diatur adalah pH kondisi awal fermentasi, sedangkan terhadap pH selama proses berlangsung tidak dilakukan pengendalian. Pada **Gambar 1** dan **Tabel 1** dapat dilihat pengaruh pH awal medium fermentasi terhadap aktivitas,

Tabel 1. Aktivitas Spesifik dan Kadar Protein Ekstrak Kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 pada Berbagai pH Awal Medium Fermentasi

pH awal medium fermentasi	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
2,0	2,03 ± 0,08	2,10 ± 0,07
3,0	2,01 ± 0,06	1,76 ± 0,01
4,0	2,25 ± 0,05	1,58 ± 0,03
5,0	2,39 ± 0,06	1,01 ± 0,13
5,5	1,93 ± 0,13	1,38 ± 0,06
6,0	2,06 ± 0,24	0,94 ± 0,05
7,0	1,98 ± 0,10	1,16 ± 0,04

aktivitas spesifik dan kadar protein ekstrak kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173.

Produksi β -glukosidase pada rentang pH awal medium fermentasi 2,0 – 7,0 menghasilkan ekstrak kasar β -glukosidase dengan nilai aktivitas 1,94 – 4,25 U/mL dan nilai aktivitas spesifik 0,94 – 2,10 U/mg protein. Produksi β -glukosidase mencapai maksimum pada pH awal medium fermentasi 2,0. Selanjutnya, peningkatan pH awal medium fermentasi menyebabkan penurunan aktivitas dan aktivitas spesifik ekstrak kasar β -glukosidase. Penurunan produksi β -glukosidase dengan meningkatnya pH awal medium fermentasi disebabkan karena sebagian besar kapang berfilamen tumbuh lebih baik pada pH asam dan karenanya menghasilkan produksi enzim yang lebih tinggi. Kondisi pH basa memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan kapang dan produksi enzim. Selain itu, kultivasi kapang pada nilai pH yang kurang menguntungkan juga dapat menurunkan produksi enzim dengan cara mengurangi aksesibilitas substrat (Bakri *et al.*, 2008).

Nilai pH maksimum untuk produksi β -glukosidase yang diperoleh pada penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Zahoor *et al.* (2011) yang melakukan produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* NRRL 599 dengan teknik fermentasi media cair menggunakan substrat kulit ari biji gandum mendapatkan pH maksimum pada 5,5. Raza *et al.* (2011) yang mempelajari efek pH awal medium fermentasi terhadap produksi β -glukosidase dari campuran kultur *Aspergillus niger* dan *A. oryzae* menggunakan substrat kulit ari biji gandum juga mendapatkan pH maksimum pada 5,5. Qian *et al.* (2012) mempelajari efek pH awal medium fermentasi terhadap produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* AS 3.4309 menggunakan substrat kulit ari biji gandum mendapatkan pH maksimum pada 6,0.

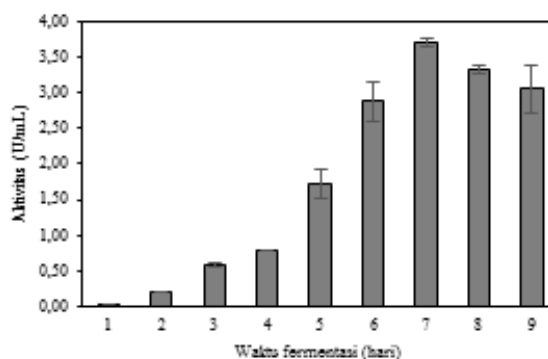
Efek Waktu Inkubasi Fermentasi terhadap Produksi β -Glukosidase

Produksi β -glukosidase dipengaruhi oleh waktu inkubasi fermentasi. Penentuan waktu inkubasi fermentasi maksimum pada produksi ekstrak kasar β -glukosidase dari *Aspergillus niger* BIO 2173 dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 1 – 9 hari. Produksi enzim akan meningkat dengan bertambahnya periode waktu inkubasi dan menurun setelah mencapai waktu

inkubasi maksimum. Pada **Gambar 2** dan **Tabel 2** dapat dilihat pengaruh waktu inkubasi fermentasi *Aspergillus niger* BIO 2173 terhadap aktivitas, aktivitas spesifik dan kadar protein ekstrak kasar β -glukosidase.

Produksi β -glukosidase pada waktu inkubasi fermentasi 1 – 9 hari, menghasilkan ekstrak kasar β -glukosidase dengan nilai aktivitas 0,03 – 3,70 U/mL dan nilai aktivitas spesifik 0,01 – 1,29 U/mg protein. Pada fermentasi hari ke-1 produksi β -glukosidase sangat rendah dan mulai meningkat secara perlahan pada fermentasi hari ke-2 sampai ke-4. Produksi β -glukosidase meningkat dengan cepat pada fermentasi hari ke-5 sampai ke-6 dan mencapai maksimum pada fermentasi hari ke-7. Penambahan waktu inkubasi fermentasi menjadi 9 hari menyebabkan penurunan aktivitas dan aktivitas spesifiknya. Penurunan produksi β -glukosidase dengan penambahan waktu fermentasi setelah mencapai produksi maksimum kemungkinan disebabkan oleh berkurangnya makronutrien dan mikronutrien di dalam media fermentasi, sejalan dengan berlangsungnya proses fermentasi, sehingga menekan fisiologi jamur yang menyebabkan inaktivasi dari mesin-mesin (organel sel) penghasil enzim (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2006).

Hasil penelitian Raza *et al.* (2011) yang melakukan produksi β -glukosidase dari campuran kultur *Aspergillus niger* dan *A. oryzae* menggunakan substrat kulit ari biji gandum dengan variasi waktu inkubasi 1 – 5 hari mendapatkan waktu inkubasi maksimum pada hari ke-3. Sementara itu, Gautam *et al.* (2011) yang melakukan produksi β -glukosidase dari



Gambar 2. Efek Waktu Fermentasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar β -glukosidase *Aspergillus Niger* BIO 2173

Tabel 2. Aktivitas Spesifik dan Kadar Protein Ekstrak Kasar β-glukosidase dari *Aspergillus niger* BIO 2173 pada berbagai Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi (hari)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
1	4,66 ± 0,01	0,01 ± 0,00
2	5,18 ± 0,08	0,04 ± 0,00
3	4,48 ± 0,33	0,13 ± 0,02
4	3,56 ± 0,01	0,22 ± 0,00
5	3,42 ± 0,00	0,50 ± 0,06
6	3,39 ± 0,24	0,86 ± 0,14
7	2,88 ± 0,18	1,29 ± 0,06
8	2,88 ± 0,05	1,15 ± 0,04
9	2,61 ± 0,51	1,19 ± 0,11

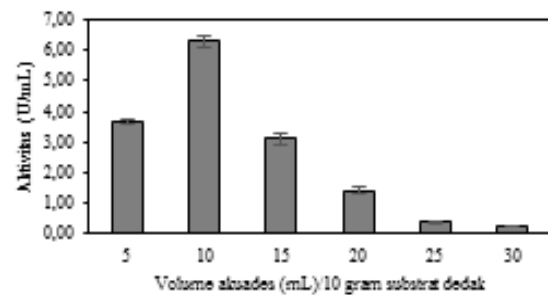
Aspergillus niger yang diinokulasi pada media basal dengan waktu inkubasi pada suhu 45°C selama 7 hari memperoleh aktivitas β-glukosidase maksimum (1,61 U/mL) pada fermentasi hari ke-3 – 5.

Efek Kandungan Air pada Substrat Medium Fermentasi terhadap Produksi β-Glukosidase

Efek dari variasi kandungan air dalam substrat medium fermentasi terhadap aktivitas, aktivitas spesifik dan kadar protein β-glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Tabel 3**. Pada substrat dedak sebanyak 10 gram yang ditambahkan akuades masing-masing sebanyak 5 – 30 mL menghasilkan ekstrak kasar β-glukosidase dengan nilai aktivitas 0,25 – 6,32 U/mL dan nilai aktivitas spesifik 0,10 – 1,99 U/mg protein.

Produksi β-glukosidase mencapai maksimum pada kandungan air 10 mL dan substrat dedak 10 gram dengan rasio perbandingan volume air terhadap substrat sebesar 1:1. Selanjutnya, penambahan volume air sampai 30 mL menyebabkan penurunan produksi ekstrak kasar β-glukosidase. Terjadinya penurunan produksi β-glukosidase dengan bertambahnya volume air, kemungkinan disebabkan oleh ketidakcukupan asupan udara akibat tingginya volume air sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba dan produksi enzim (Raza *et al.*, 2011).

Produksi β-glukosidase pada penambahan akuades sebanyak 5 mL lebih rendah



Gambar 3. Efek Perbedaan Kandungan Air yang Ditambahkan pada 10 gram Substrat Dedak terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar β-glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173

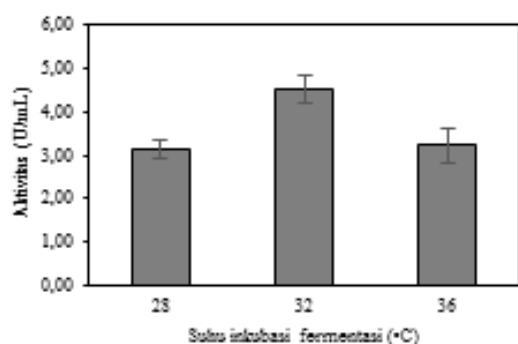
daripada 10 mL. Hal ini disebabkan karena berkurangnya volume air pada media fermentasi padat menyebabkan berkurangnya kandungan air dalam media sehingga menurunkan kelarutan nutrisi substrat dan terjadinya pengembangan (*swelling*) meningkatkan kehilangan air akibat penguapan yang cepat selama fermentasi sehingga menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Lonsane *et al.*, 1985).

Efek Suhu Inkubasi Fermentasi terhadap Produksi β-Glukosidase

Faktor fermentasi lainnya yang mempengaruhi produksi β-glukosidase selain pH, waktu inkubasi fermentasi, dan perbedaan rasio kandungan air terhadap substrat medium fermentasi, adalah suhu inkubasi fermentasi. Penentuan pengaruh suhu terhadap produksi β-glukosidase dilakukan inkubasi fermentasi pada tiga suhu yang berbeda, yaitu 28°C, 32°C dan 36°C. Pada **Gambar 4** dan **Tabel 4** dapat dilihat pengaruh suhu inkubasi

Tabel 3. Aktivitas Spesifik dan Kadar Protein Ekstrak Kasar β-glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 pada Berbagai Kandungan Air dalam 10 gram Substrat Dedak

Volume akuades (mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
5	4,80 ± 0,05	0,77 ± 0,01
10	3,18 ± 0,08	1,99 ± 0,02
15	2,80 ± 0,10	1,11 ± 0,02
20	1,98 ± 0,03	0,72 ± 0,05
25	1,98 ± 0,08	0,19 ± 0,02
30	2,47 ± 0,14	0,10 ± 0,01



Gambar 4. Pengaruh Suhu Inkubasi Fermentasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173

terhadap aktivitas, aktivitas spesifik dan kadar protein ekstrak kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2137.

Produksi β -glukosidase paling tinggi dicapai pada suhu inkubasi fermentasi 32°C. Penurunan suhu inkubasi menjadi 28°C dan peningkatan menjadi 36°C menyebabkan penurunan produksi ekstrak kasar β -glukosidase. Berkurangnya produksi pada suhu yang lebih rendah disebabkan oleh terhambatnya transport nutrisi ke dalam sel, sedangkan pada suhu tinggi terjadi peningkatan kebutuhan energi untuk pemeliharaan sel akibat dari inaktivasi protein dari jalur metabolik sehingga pembentukan produk menjadi berkurang (Rajoka *et al.*, 2004).

Suhu inkubasi maksimum yang didapatkan pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Zahoor *et al.* (2011) yang melakukan produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* NRRL 599 menggunakan substrat kulit ari biji gandum, yaitu pada suhu 30°C, dan Qian *et al.* (2012) yang melakukan produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* AS 3.4309 dengan substrat kulit ari biji gandum, mendapatkan suhu optimum pada 28°C. Sedangkan Gautam *et al.* (2011) yang melakukan produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* pada media basal mendapatkan suhu optimum antara 45°C dan 55°C dengan aktivitas sebesar 1,98 U/mL.

Efek Penambahan Larutan Garam Mineral Mandels pada Media Fermentasi terhadap Produksi β -Glukosidase

Kapang memerlukan makronutrien oksigen, hidrogen, karbon, nitrogen dan mikronutrien P, K, S, Mg, Fe, Zn, Cu untuk pertumbuhan

Tabel 4. Aktivitas Spesifik dan Kadar Protein Ekstrak Kasar β -glukosidase *Aspergillus niger* BIO 2173 yang Diproduksi dengan Suhu Fermentasi yang Berbeda

Suhu fermentasi (°C)	Kadar protein (mg m/L)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
28	2,82 ± 0,17	1,13 ± 0,14
32	2,78 ± 0,05	1,63 ± 0,14
36	3,39 ± 0,14	0,95 ± 0,09

dan aktivitas metabolitnya (Norouzian, 2008). Larutan garam mineral Mandels merupakan larutan garam yang mengandung mikronutrien (KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2) dan makronutrien (urea, ammonium sulfat, pepton) (Mandels dan Reese, 1957). Penambahan larutan garam mineral Mandels ke dalam media fermentasi *Aspergillus niger* BIO 2173 dengan substrat dedak pada kondisi fermentasi maksimum (pH 2,0; volume akuades 10 mL; suhu 32°C; waktu fermentasi 7 hari) menyebabkan peningkatan produksi β -glukosidase dengan nilai aktivitas dan aktivitas spesifik sebesar $5,24 \pm 0,57$ U/mL dan $2,46 \pm 0,04$ U/mg protein (**Tabel 5**).

Berdasarkan hasil penelitian Mandels dan Reese, (1957) dilaporkan bahwa mineral Ca dan Mg dapat mempengaruhi produksi enzim dan konsumsi glukosa. Tidak adanya Mg pada media fermentasi menyebabkan pertumbuhan yang lambat dan kurangnya produksi selulase. Produksi selulase meningkat dengan adanya penambahan MgSO_4 dan CaCl_2 pada konsentrasi hingga 0,03%.

Julia *et al.* (2016) melakukan isolasi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* NRRL3 dengan fermentasi media padat menggunakan substrat bungkil kedelai (*soybean hull*) dan limbah kertas dengan penambahan larutan garam mineral Mandels menghasilkan ekstrak kasar enzim dengan nilai aktivitas maksimum untuk substrat bungkil kedelai sebesar 0,984 U/mL, lebih tinggi 1,7 kali daripada substrat limbah kertas. Raza *et al.* (2011) melakukan seleksi terhadap 10 jenis pelarut yang digunakan pada fermentasi padat produksi β -glukosidase dari campuran kultur *Aspergillus niger* dan *A. oryzae*. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa fermentasi dengan larutan garam mineral Mandels menghasilkan produk β -glukosidase

Tabel 5. Aktivitas, Aktivitas Spesifik dan Kadar Protein Ekstrak Kasar β -glukosidase dari Fermentasi *Aspergillus niger* BIO 2173 pada Kondisi Fermentasi Maksimum (pH 2,0; Rasio Kandungan Air terhadap Substrat 1:1; Suhu Inkubasi 32°C; Waktu Fermentasi 7 hari)

Perlakuan fermentasi	Aktivitas (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
Tanpa penambahan larutan Mandels	4,13 ± 0,35	1,75 ± 0,05	2,35 ± 0,13
Dengan penambahan larutan Mandels	5,24 ± 0,57	2,13 ± 0,27	2,46 ± 0,04

yang lebih tinggi dibandingkan pelarut lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan karena medium yang menggunakan larutan garam Mandels mengandung semua nutrisi tambahan, sumber nitrogen baik organik (urea dan pepton) maupun anorganik (ammonium sulfat) dan konsentrasi Tween-80 yang tinggi, dimana komponen-komponen tersebut dapat meningkatkan produksi β -glukosidase (Chellapandi dan Jani, 2008).

Kesimpulan

Produksi β -glukosidase dari *Aspergillus niger* BIO 2173 dengan fermentasi media padat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH awal media fermentasi, waktu inkubasi fermentasi, kandungan air dalam substrat media fermentasi dan suhu inkubasi fermentasi. Produksi β -glukosidase mencapai maksimum pada pH awal media fermentasi 2,0, waktu inkubasi fermentasi 7 hari, perbandingan (rasio) kandungan air terhadap substrat dedak sebesar 1:1 dan suhu inkubasi fermentasi 32°C. Penambahan larutan garam mineral Mandels ke dalam media fermentasi pada kondisi fermentasi maksimum menyebabkan peningkatan aktivitas ekstrak kasar β -glukosidase sebesar 26,88% dibandingkan dengan fermentasi tanpa penambahan larutan garam mineral Mandels.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kemenristekdikti atas bantuan dana beasiswa karyasiswa program pascasarjana tahun 2012 - 2016.

Daftar Pustaka

Ahmed, A., Nasim, F.U.H., Batool, K., Bibi, A. (2017) 'Microbial β -glucosidase: Sources, Production and Applications', *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), pp. 31-46.

Ahmed, S.A., El-Shayeb, N.M.A., Hashem, A.G.M., Saleh, S.A.A., Abdel-Fattah, A.F. (2015) 'Chemical Modification of *Aspergillus niger* β -glucosidase and Its Catalytic Properties', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), pp. 23-28.

Bakri, Y., Jawahar, M., Arabi, M.I.E. (2008) 'Improvement of Xylanase Production by *Cochliobus sativus* in Submerged Culture', *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, pp. 602-604.

Carrillo-Sancen, G., Carrasco-Navarro, U., Tomasini-Campocoso, A., Corzo, G., Pedraza-Escalano, M.M., Favela-Torres, E. (2016) 'Effect of Glucose as a Carbon Repressor on The Extracellular Proteome of *Aspergillus niger* During The Production of Amylases by Solid State Cultivation', *Process Biochemistry*, 51(12), pp. 2001-2010.

Chellapandi, P., Jani, H.M. (2008) 'Production of Endoglucanase by The Native Strains of *Streptomyces* Isolates in Submerged Fermentation', *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), pp. 122-127.

Elshafei, A.M., Hassan, A.M., Morsi, N.M., Elghonamy, D.H. (2011) 'Purification and Some Kinetic Properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265', *African Journal of Biotechnology*, 10(84), pp. 19556-19569.

Gao, Z., Hop, D.V., Yen, L.T.H., Ando, K., Hiyamuta, S., Kondo, R. (2012) 'The Production of β -glucosidase by *Fusarium proliferatum* NBRC109045 Isolated from Vietnamese Forest', *AMB Express*, 2(1)(49), pp. 1-13.

Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., S. Sarsaiya, S. (2011) 'Optimization for The Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi' *Biotechnology Research International*, 2011, pp. 1-8.

Herr, D., Baumer, F., Dellweg, H. (1978) 'Purification and Properties of an Extracellular β -glucosidase from *Lenzites trabea*', *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(1), pp. 29-36.

- Hu, H.L., van den Brink, J.K, Gruben, B.S., Wösten, H.A.B., Gu, J.D., de Vries, R.P.(2011) 'Improved Enzyme Production by Co-Cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with Other Fungi', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, pp. 248–252.
- Ikram-ul-Haq, Javed, M.M., Khan, T.S. (2006) 'An Innovative for Hyperproduction of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes by Consortium of *Aspergillus niger* MSK-1 and *Trichoderma viride* MSK-10', *African Journal of Biotechnology*, 5(8), pp. 609-614.
- Irshad, M., Anwar, Z., Ramzan, M., Mahmood, Z., Nawaz, H. (2013) 'Characterization of Purified β -glucosidase Produced from *Trichoderma viride* Through Bio-processing of Orange Peel Waste', *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, pp. 941-944.
- Joo, A.R., Jeya, M., Lee, K.M., Lee, K.M., Moon, H.J., Kim, Y.S., Lee, J.K. (2010) 'Production and Characterization of β -1,4-Glucosidase from a Strain of *Penicillium pinophilum*', *Process Biochemistry*, 45, pp. 851-858.
- Julia, B.M., Belen, A.M., Georgina, B., Beatriz, F. (2016) 'Potential Use of Soybean Hulls and Waste Paper as Supports in SSF for Cellulase Production by *Aspergillus niger*', *Biocatalyst and Agricultural Biotechnology*, 6, pp. 1-8.
- Junior, A. B., Borges, D.G., Tardioli, P.W., Farinas, C.S.(2014) 'Characterization of β -glucosidase Produced by *Aspergillus niger* Using Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose' *Biotechnology Research International*, (2014), pp. 1-8.
- Krisch, J., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, C. (2010) 'Characteristics and Potential Use of β -Glucosidase from Zygomycetes', *Current Research, Technology Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Mendez-Vilaz (Ed.), pp. 891–896.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., Shen, Q. (2012) 'Characterization of a Thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and Its Functional Expression in *Pichia pastoris* X33', *Microbial Cell Factories*, 11(25), pp. 1-15.
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakhrisna, S.V. (1985) 'Engineering Aspects of Solid State Fermentation'. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), pp. 258-265.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) 'Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent', *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265-275.
- Mandels, M., Reese, E.T. (1957) 'Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals', *Journal of Bacteriology*, 73, pp. 269-278.
- Norouzian, D. (2008) 'Effect of Different Factors on Fermentative Production of Enzymes by Fungi. *Dynamic Biochemistry*', *Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2(1), pp. 14-18.
- Park, A.H, Hong, J.H., Kim, J.J., Yoon, J.J. (2012) 'Biochemical Characterization of an Extracellular β -glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten citrus peel', *Mycrobiology*, 40(3), pp. 173-180.
- Qian, L.C., Fu, S.J., Zhou, H.M., Sun, J.Y., Weng, X.Y.(2012) 'Optimization of Fermentation Parameters for β -glucosidase Production by *Aspergillus niger*', *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(5), pp. 583-591.
- Rajoka, M.I., Khan, S., Latif, F., Shahid, R. (2004) 'Influence of Carbon and Nitrogen Sources and Temperature on Hyperproduction of a Thermotolerant β -glucosidase from Synthetic Medium by *Kluyveromyces marxianus*', *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 117(2), pp. 75-92.
- Raza, F., Raza, N.A., Hameed, U., Ikram-ul-Haq, Mariam, I. (2011) 'Solid State Fermentation for the Production of β -glucosidase by Co-Culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*', *Park. J. Bot.*, 43(1), pp. 75-83.
- Salihu, A., Bala, M., Alam, Md.Z. (2016) 'Lipase Production by *Aspergillus niger* Using Sheanut Cake: An Optimization Study', *Journal of Taibah University of Science*, 10, pp. 850-859.
- Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H.P, Sartori, D., Alves, E. (2011) 'Identification of Fungi of The Genus *Aspergillus* Section Nigri Using Polyphasic Taxonomy' *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, pp. 761-773.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C., Pandey, A. (2013) 'Role of Significance of Beta-Glucosidases in The Hydrolysis of Cellulose for Bioethanol Production', *Bioresource Technology*, 127, pp. 500-507.
- Yang, L., Lubeck, M., Lubeck, P.S. (2017) '*Aspergillus* as a Versatile Cell Factory for Organic Acid Production', *Fungal Biology Reviews*, 31(1), pp. 33-49.

Zahoor, S., Javed, M.M., Aftab, S., Latif, F.,ul-Haq, I.,(2011) 'Metabolic Engineering and Thermodynamic Characterization of an Extracellular β -glucosidase Produced by *Aspergillus niger*', *African Journal of Biotechnology*, 10(41), pp. 8107-8116.

Zheng, W., Chen, X., Xue, Y., Hu, J., Gao, M.T., Tsang, Y.F. (2017) 'The Influence of Soluble Polysaccharides Derived from Rice Straw upon Cellulose Production by *Trichoderma reesei*', *Process Biochemistry*, 61, pp. 130-136.