

Aktivitas Enzim dan Identifikasi Fenotipik Isolat Kapang *Aspergillus* Kelompok *Flavi* Dari DUCC (*Diponegoro University Culture Collections*)

Enzyme Activity and Identification of phenotypic isolates of *Aspergillus* molds from the *Flavi* group from DUCC (*Diponegoro University Culture Collections*)

Radhita Karima, MG Isworo Rukmi dan Hermin Pancasakti Kusumaningrum

Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275

E-mail : radhitakarima@yahoo.com

E-mail : isworo.rukmi@gmail.com

E-mail : herminpk@live.undip.ac.id

Abstract

Fungi has an important role as decomposer since they can produce hydrolytic enzymes. The enzyme produced by fungi can be useful for industrial and biotechnology purposes. *Aspergillus section Flavi* are known to have the ability in producing several enzymes. The aims of this study were to find out the ability of *Aspergillus section Flavi* from Diponegoro University Culture Collection in producing amylase, protease and cellulase enzymes and also identify the species using phenotypic method. The fungal enzymatic activity was examined by calculating enzymatic index on specific media. The results showed that all isolates have a potential as enzyme producers. Phenotypic identification were characterized based on macro- and micromorphology. Isolates F130, F80CB, F138 dan F10A were identified as *A.tamarii*, while F43 and F20A were identified as *A.flavus*.

Keywords: *Aspergillus section Flavi*, *Amylolytic*, *Cellulolytic*, *Proteolytic*, *phenotype identification*

Abstrak

Kapang memiliki peran penting sebagai dekomposer karena memiliki enzim hidrolisis. Enzim yang dihasilkan kapang dapat bermanfaat dalam bidang industri maupun bioteknologi. *Aspergillus* kelompok *Flavi* diketahui memiliki potensi dalam menghasilkan enzim. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui kemampuan isolat kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* koleksi *Diponegoro University Culture Collection* (DUCC) dalam menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase kemudian isolat diidentifikasi secara fenotipik untuk mengetahui spesiesnya. Uji aktivitas enzimatis dilakukan dengan menghitung indeks enzimatis pada media spesifik. Hasil penelitian menunjukkan semua isolat memiliki potensi dalam menghasilkan enzim. Identifikasi fenotipik dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil identifikasi menunjukkan isolat F130, F80CB, F138 dan F10A merupakan spesies *A. tamarii* sedangkan F43 dan F20A merupakan spesies *A. flavus*.

Kata kunci: *Aspergillus kelompok Flavi*, *Amilolitik*, *Selulolitik*, *Proteolitik*, *Identifikasi fenotip*

PENDAHULUAN

Kapang merupakan organisme yang dapat ditemukan di berbagai tempat. Kapang memiliki peran sebagai decomposer sehingga memiliki kemampuan dalam menguraikan substrat. Kemampuan tersebut dikarenakan kapang mampu menghasilkan enzim hidrolitik.

Aspergillus merupakan salah satu genus kapang yang memiliki kelompok terbesar,

salah satunya yang sering ditemukan di alam ialah kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi*. *Aspergillus* kelompok *Flavi* dicirikan dengan memiliki konidia berwarna kuning kehijauan, hijau kecoklatan hingga coklat. Konidiofor hyaline serta permukaan konidiofor biasanya bertekstur kasar. (Samson *et al.*, 2014; Gams *et al.*, 1985; Klich.,2002)

Enzim yang dihasilkan oleh kapang dapat

berperan penting di industri karena keuntungannya yakni dapat diproduksi secara besar dan mudah dimanipulasi untuk mendapatkan produk yang diinginkan (Morya *et al.*, 2008). Enzim yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus* diantaranya adalah enzim amilase, selulase dan protease. Ketiga enzim tersebut merupakan enzim yang sering digunakan di bidang industry dan bioteknologi (Mosjov, 2016)

Aspergillus kelompok *Flavi* diketahui memiliki potensi dalam menghasilkan enzim ekstraselular yang bermanfaat di bidang industri dan bioteknologi (Soares, *et al.*, 2012). Beberapa spesies dari genus *Aspergillus* ini merupakan kelompok *Flavi* seperti *A. flavus*, *A. oryzae* dan *A. tamarii* (Park *et al.*, 2017).

Identifikasi pada jamur diperlukan untuk mengetahui dan mengenali jamur yang diamati, yang dapat dilakukan secara fenotipik dengan karakterisasi morfologi maupun genotipik dengan molekuler. Menurut Bills & Polishok (1994) dalam Ilyas (2009), pendekatan identifikasi pada isolat kapang berdasarkan ciri dan karakter fenotip atau morfologi dapat diterapkan sebagai alternatif dalam identifikasi kapang. Karakter morfologi merupakan ciri dari bentuk eksternal atau penampakan luar. Karakter morfologi yang digunakan pada identifikasi kapang dapat berupa makroskopis maupun mikroskopis. Karakter-karakter tersebut meliputi, bentuk konidia, warna konidia, seriasi, panjang konidiofor, ukuran dan bentuk vesikel, fialid, konidia, dan metulae (Samson, 2014). Dengan Identifikasi secara fenotipik dapat diketahui hubungan kekerabatan suatu organisme dengan menggunakan pendekatan fenetik.

Tujuan dari penelitian ini yakni untuk mengetahui kemampuan kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* koleksi *Diponegoro University Culture Collection* dari berbagai sumber yang potensial dalam menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase serta mengidentifikasi secara fenotipik isolat potensial.

BAHAN DAN METODE

Uji Aktivitas Enzim

Uji aktivitas selulolitik dilakukan pada media CMC, aktivitas amilolitik dilakukan pada medium amilum agar 1%, sedangkan aktivitas

proteolitik diamati pada medium skim milk agar dalam cawan petri. Inkubasi dilakukan selama 5 hari pada suhu ruang. Aktivitas proteolitik, amilolitik dan selulolitik diamati dengan munculnya zona bening di sekitar koloni. Indeks enzimatik selulolitik, amilolitik dan proteolitik dihitung dengan membagi diameter zona bening dan diameter koloni.

$$\text{Indeks} = \frac{\text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Identifikasi Fenotipik

Pengamatan ciri-ciri morfologi kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi*.

Pengamatan ciri-ciri morfologi yang dilakukan pada enam isolat kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* koleksi dari DUCC berdasarkan pada acuan deskripsi *Aspergillus* pada *Identification of Common Aspergillus* (Klich, 2002) dan *Food and Indoor Fungi* (Samson *et al.*, 2010). Pengamatan dilakukan pada koleksi kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* yang telah ditumbuhkan pada empat media berbeda yakni *Czapex-dox Agar*, *Malt Extract Agar*, *Czapex Yeast Agar* dan *Czapex Yeast Sucrose 20%* selama 7 hari pada suhu 25⁰C. Ciri-ciri morfologi yang diamati yakni secara makroskopis dan mikroskopis

Analisis fenetik

Analisis fenetik pada enam isolat kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* dilakukan berdasarkan pada similaritas yang teramati dan dimiliki oleh masing-masing individu. Setiap ciri-ciri morfologi yang muncul diterjemahkan dalam bentuk angka (biner). Bernilai (1) untuk adanya ciri-ciri yang teramati dan bernilai (0) jika tidak ada ciri-ciri morfologi yang teramati. Matriks jarak dihitung menggunakan rumus,

$$S = \frac{2NAB}{(NA+NB)}$$

S merupakan indeks similaritas, NAB adalah jumlah ciri yang ditemukan pada 2 sampel, NA adalah ciri yang terdapat pada sampel A dan NB adalah ciri yang terdapat pada sampel B. Matriks jarak maupun fenogram tersebut dihasilkan dengan menggunakan metode UPGMA

(unweighted pair group with arithmetic average) dalam program komputer NTSYS-pc (numerical taxonomy system).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Enzimatis

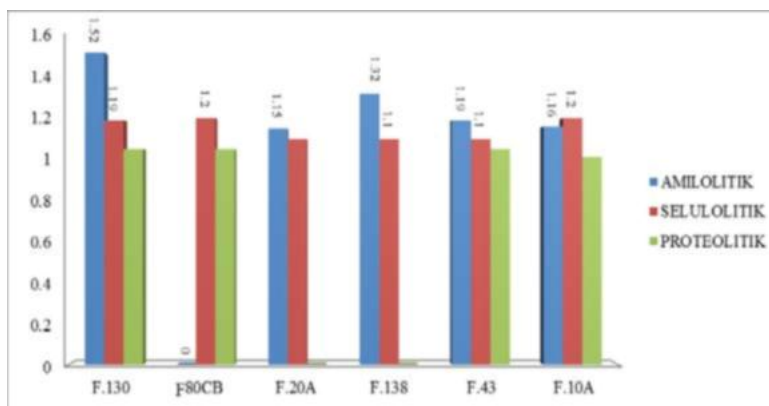
Hasil uji aktivitas proteolitik, amilolitik dan selulolitik dari keenam isolat *Aspergillus* Kelompok *Flavi* DUCC memiliki potensi sebagai penghasil enzim. Tiga dari enam isolat *Aspergillus* kelompok *Flavi* yang diuji memiliki aktivitas amilolitik, selulolitik dan proteolitik, sedangkan tiga isolat lainnya hanya memiliki aktivitas dua dari tiga enzim yang diuji. Semua isolat *Aspergillus* kelompok *Flavi* DUCC memiliki aktivitas selulolitik.



Gambar 1. Aktivitas enzimatis dari isolat *Aspergillus* kelompok *Flavi* (A). Proteolitik (B).Selulolitik & (C). Amilolitik

Kapang *Aspergillus* diketahui merupakan genus kapang yang mampu menghasilkan selulase. Beberapa spesies kapang mampu menghidrolisis selulosa untuk memenuhi kebutuhannya, salah satu diantaranya adalah *Aspergillus* (Imran *et al.*, 2018).

Indeks aktivitas enzimatis dari tiap isolat *Aspergillus* kelompok *Flavi* DUCC menunjukkan hasil yang bervariasi (Gambar 2). Kemampuan dalam menghasilkan enzim pada setiap spesies kapang akan bervariasi, bahkan dapat terjadi pada satu spesies yang sama (Maia *et al.*, 2017). Banyak faktor yang mempengaruhi hal tersebut, seperti pH dan suhu yang dapat mempengaruhi jumlah dan aktivitas enzimatis dari mikroorganisme



Gambar 2. Indeks aktivitas enzimatis isolat DUCC

Khokar *et al.* (2011), menyatakan bahwa *Aspergillus* merupakan genus yang mampu menghasilkan enzim dan diminati di bidang industri termasuk diantaranya adalah kelompok *Flavi*. Hal tersebut karena spesies dari *Aspergillus* kelompok *Flavi* mudah dikultivasi dan menghasilkan enzim ekstraselular yang berguna untuk bidang industry maupun bioteknologi.

Identifikasi Fenotipik dan Analisis Fenetik

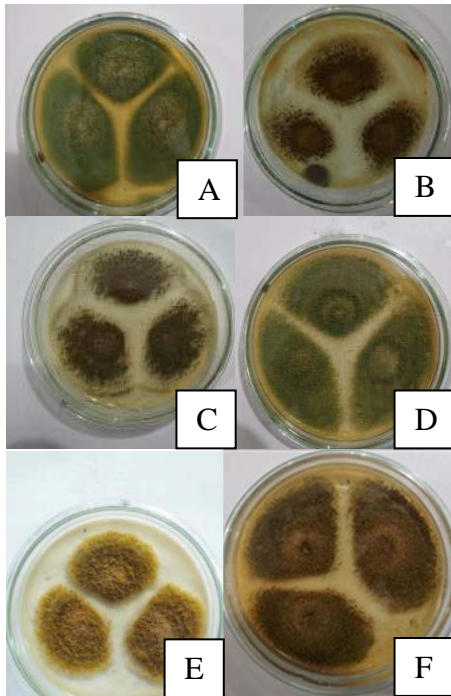
Ciri morfologi yang diamati isolat kapang pada media MEA, CZ, CYA dan CYAS20% dapat dilihat pada Gambar 3. Pertumbuhan kapang *Aspergillus* kelompok *Flavi* pada keempat media selama masa inkubasi 7 hari pada suhu 25⁰C menunjukkan perbedaan pada diameter koloni serta penampakan morfologi. Ciri tersebut digunakan untuk menentukan spesies sesuai dengan kunci identifikasi.

Hasil identifikasi isolat kapang menurut Klich (2002) dan Samson *et al.* (2010), Berdasarkan ciri- ciri makroskopis dan mikroskopik masing-masing, isolat F130, F10A, F. 80CB dan F138 diidentifikasi sebagai spesies *A.tamarii*, sedangkan isolat F43 dan F20A diidentifikasi sebagai spesies *A.flavus*.

Isolat F130, F10A, F.80 CB dan F138 diidentifikasi sebagai spesies *A. tamarii*. Menurut Klich (2002) ciri spesies dari *A. tamarii* yaitu, diameter koloni pada media CYA sebesar 45-70 mm, warna koloni pada media CYA adalah kuning kecoklatan atau hijau kecoklatan, vesikel globose hingga *pyriform*, dan konidia berbentuk

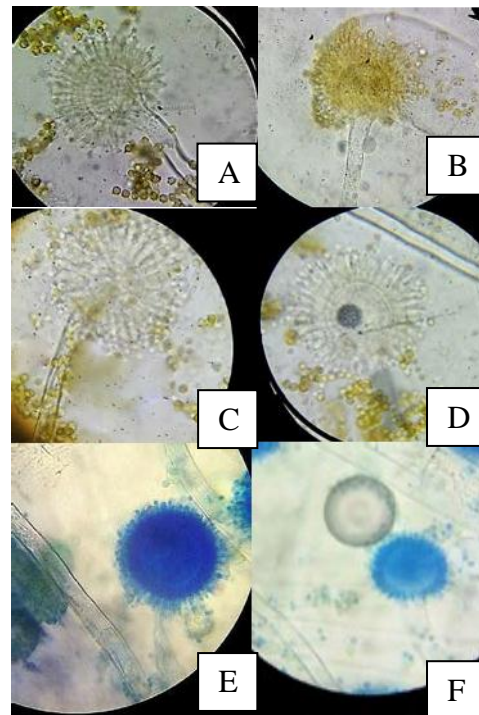
globose dengan permukaan kasar. Ketiga isolat yang diidentifikasi sebagai *A.tamarii* memiliki potensi menghasilkan enzim yang diuji dengan indeks enzimatis yang bervariasi (Gambar 2.). *A. tamarii* sendiri dikenal mampu menghasilkan amilase, protease dan selulase. Spesies *A. tamarii* merupakan spesies yang telah dikenal luas dalam industri pangan dan industri fermentasi karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim amilase dan protease, selulase (Varga, 2011; Andriani *et al.* 2013),

Isolat F43 dan F20A diidentifikasi sebagai spesies *A. flavus*. Menurut Klich (2002) ciri dari *A. flavus* memiliki ciri konidia berwarna kehijauan pada media MEA dan berwarna kuning terang pada media CYA20S. Konidia bertekstur halus hingga kasar. Mempunyai metulae dan fialid (Biseriate), namun sering ditemukan juga hanya memiliki fialid (uniseriate). *A.flavus* diketahui mampu menghasilkan enzim amilase, selulase dan protease (Geetha *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2014; Chellapandi, 2009)



Gambar 3. Penampakan koloni dari spesies (A) F20A (B). F138 (C). F80CB dan (D). F43 (E). F130. (F)F10A pada media MEA (*Malt Extract Agar*) (7 hari, 25 °C).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat kapang yang teridentifikasi sebagai spesies yang sama, ternyata dapat menunjukkan sifat enzimatis yang berbeda. Hal ini terjadi pada isolate F130, F10A, F80CB dan F138 yang teridentifikasi sebagai *A. tamarii*. Isolat F130, F10A mampu menghasilkan amilase, protease dan selulase, sedangkan F80CB hanya menghasilkan selulase dan protease dan F138 hanya menghasilkan amilase dan selulase. Isolat F43 dan F20A Teridentifikasi sebagai *A. flavus*, namun terdapat perbedaan dalam sifat enzimatisnya. F43 memiliki aktivitas amilase, protease dan selulase, sedangkan F20A hanya memiliki aktivitas selulase dan amilase.



Gambar 4. Morfologi mikroskopis (A). F10A, (B).F130 (C). F80CB, (D). F138, (E). F43, (F). F20A. pada media MEA (*Malt Extract Agar*) (7 hari, 25 °C)

Hal tersebut dapat disebabkan karena isolat- isolat tersebut merupakan strain yang berbeda. Kemampuan enzimatis setiap kapang akan berbeda, bahkan diantara spesies yang sama namun berbeda strain (Anasontzis *et al.*, 2017), Menurut Januzs *et al.*, (2015) kapang memiliki keberagaman metabolisme diantara strain dalam spesies yang sama. Analisis mendalam diperlukan untuk mengetahui kemampuan strain kapang dalam menghasilkan enzim. Optimasi pH , suhu dan substrat sangat diperlukan untuk mengetahui kemampuan terbaik isolat dalam menghasilkan enzim. (Shafique *et al.*, 2009)

Analisis hubungan kekerabatan isolat dilakukan berdasarkan ciri morfologi (fenotip). Keragaman fenotip dari masing-masing isolate ditunjukkan dengan adanya perbedaan ciri-ciri morfologi dari masing-masing isolat yang dibandingkan. Semakin banyak perbedaan dari ciri morfologi menyebabkan semakin tinggi nilai ketidaksamaan antar spesies Semakin banyak karakter yang dimiliki bersama di antara individu yang dibandingkan, maka semakin dekat hubungan kekerabatan, dan berlaku pula dengan sedikitnya kesamaan karakter yang dimiliki bersama, maka hubungan kekerabatan semakin jauh. (Suratman *et al.*, 2000)

Data ciri morfologi isolat yang telah diterjemahkan dalam bentuk angka (biner) kemudian diolah dengan menggunakan program NTSys 2.1 sehingga menghasilkan fenogram yang dapat di lihat pada Gambar.6 fenogram dibagi menjadi dua klaster besar yaitu klaster pertama yaitu terdiri dari isolat F80CB, F138 , F130 dan F10A yang merupakan satu spesies yang sama yaitu *A. tamarii* sedangkan klaster kedua terdiri dari isolat F43 dan isolat F20A yang merupakan spesies *A. flavus*. Koefisien kesamaan tertinggi ditunjukkan oleh isolat F80CB dan F138 dengan nilai sebesar 0,83. Diketahui isolat F80CB dan isolat F138 keduanya diidentifikasi sebagai spesies yang sama yaitu *A. tamarii*. Koefisien tertinggi kedua yakni pada F43 dan F20A sebesar 0,81, keduanya diidentifikasi sebagai satu spesies yang sama yaitu *A. flavus*

Tabel 1. Koefisien Kesamaan Fenotip

Kode Isolat	F130	F138	F10A	F80CB	F43	F20A
F130	*	*	*	*	*	*
F138	0,80	*	*	*	*	*
F10A	0,71	0,67	*	*	*	*
F80CB	0,77	0,83	0,7	*	*	*
F43	0,51	0,43	0,48	0,51	*	*
F20A	0,42	0,54	0,49	0,52	0,81	*

Besarnya koefisien kesamaan menunjukkan individu memiliki kesamaan ciri morfologi. Menurut Fajar *et al.* (2012) menyatakan kesamaan karakter fenotip yang sama menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan secara fenotip dan perbedaan besar karakter fenotip menunjukkan hubungan kekerabatan fenotip yang jauh. Nilai koefisien kesamaan terendah yakni antara F20A dan F130 dengan nilai sebesar 0.42, hal tersebut menunjukkan banyaknya perbedaan pada ciri morfologi kedua individu. Kedua isolat diidentifikasi sebagai spesies yang berbeda yakni F20A merupakan spesies *A. flavus* dan F130 merupakan spesies *A. tamarii*. Nilai koefisien kesamaan yang rendah dapat mengindikasikan jauhnya hubungan genetik, sebaliknya nilai koefisien kesamaan yang tinggi dapat mengindikasikan dekatnya hubungan genetik pada

Individu Isolat F130 dan F10A berada di cabang yang berbeda meskipun keduanya diidentifikasi sebagai spesies yang sama. Hal tersebut disebabkan karena adanya perbedaan ciri diantara isolat tersebut. Meskipun diidentifikasi sebagai spesies yang sama namun tiap isolat tidak memiliki ciri yang sama secara identik. Isolat memiliki perbedaan contohnya yakni perbedaan pada diameter koloni, warna koloni atau bahkan pada aktivitas enzim yang dihasilkan oleh isolat

KESIMPULAN

Enam Isolat *Aspergillus* kelompok *Flavi* koleksi DUCC diketahui memiliki potensi dalam menghasilkan enzim yang diuji yakni amilase, selulase dan protease. Hasil identifikasi fenotipik menunjukkan F130, F10A, F138 dan F80CB diidentifikasi sebagai spesies yang sama yaitu *A.tamarii*, sedangkan isolat F43 dan F20A diidentifikasi sebagai isolat *A. flavus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anasontzis, G.E., N. T. Thuy., D. T. M.Hang., H.T. Huong. ,D. T. Thanh., D. D. Hien, V.N. Thanh & L. Olsson. 2017. Rice Straw Hydrolysis Using Secretomes from Novel Fungal Isolates from Vietnam. *Journal Biomass and Bioenergy*. 99:11-20
- Andriani, Y., S.Sastrawibawa., R. Safitri., Abun. 2013. Growth and Activity of Cellulase-Amylase Enzyme *Penicillium Nalgioense* and *Aspergillus tamarii* Molds Isolated from Cow Rumen Fluid. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* 17:1-6
- Chellapandi, P. 2009. Production and Preliminary Characterization of Alkaline Protease from *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Terreus*. *Journal of chemical*, 7(2): 479-82.
- Fajar, M.T.I., Purnomo, & Handayani. 2016. Hubungan Kekerabatan Fenetik *Lycopersicon esculentum* Mill. Kultivar *Betavila F1*, *Fortuna F1* dan *Tymoti F1* Berdasarkan Tingkat Kesamaan Fenotip. *Biota*. 1 (2): 91–97
- Gams, W. and Samson. 1985. Typification of *Aspergillus* and related teleomorph genera. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*, eds R.A. Samson and J.I. Pitt. New York: Plenum Press.
- Geetha, K.N., K. Jeyaprakash & Y. P. Nagaraja. 2011. Isolation, Screening of *Aspergillus flavus* and Its Production Parameters for α -amylase Under Solid State Fermentation. *Journal of Applied and Natural Science* 3 (2): 268-273
- Ilyas, M. 2007. Isolasi dan Identifikasi Mikroflora Kapang pada Sampel Serasah Daun Tumbuhan di Kawasan Gunung Lawu, Surakarta, Jawa Tengah. *Biodiversitas* 8(2):105-10.
- Ilyas, M. 2009. Kelimpahan dan Keragaman Kapang pada Sampel Tanah di Sekitar Kawasan Taman Nasional Gunung Ciremai, Jawa Barat. *Jurnal Biologi Indonesia* 5 (3): 245-257
- Imran, M., Z. Anwar., M. Zafar., A.Ali & M. Arif. 2018. Production and Characterization of Commercial Cellulase Produced Through *Aspergillus niger* IMMIS1 After Screening Fungal Species. *Pak. Journal Botany*., 50(4): 1563-1570.
- Janusz, G., F. Czuryło, B. Rola, J. Sulej, A. Pawlik. 2015. Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 121-133
- Khokar, I., I. Mukhtar & S. Musthaq. 2011. Comparative Studies on the Amylase and Cellulase Production of *Aspergillus* and *Penicillium*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 4(15):657-661.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Netherland: Centraalbureau Voor Schimmecultures.
- Maia, T.F., M.E. Fraga., 2017. Bioprospecting *Aspergillus* section *Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. *Arq. Inst. Biol.*, 84:1-7,
- Mojsov, K.D., 2016. *Aspergillus* Enzymes For Food Production. *Journal Nature Future Devepvelopment Microbial Biotechnology Bioengineering* 16(1):215-222
- Morya, V., D Yadav. 2008. Isolation and screening of different isolates of *Aspergillus* for amylases production. *The International Journal of Microbiology*. 7 (1):1-8.
- Park, Hee-Soo , Sang-Cheol Jun, Kap-Hoon Han, Seung-Beom Hong, Jae-Hyuk Yu. 2017. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industri Important *Aspergillus* Fungi. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier inc. :1-202.
- Reddy, P.L.N., B.S Babu., A. Radhaiah., A.sreemulu. 2014. Screening, Identification and Isolation of Cellulolytic fungi from soils of Chittoor District, India.

- International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 3(7) :761-771
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, Netherlands.
- Samson, R.A.; C.M. Visagie; J. Houbraken; S.-B. Hong; V. Hubka; C.H.W. Klaassen; G. Perrone; K.A. Seifert; A. Susca; J.B. Tanney; J. Varga; S. Kocsube; G. Szigeti; T. Yaguchi & J.C. Frisvad. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141-173
- Shafique, S., R. Bajwa & S. Shafique. 2009. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for Extra Cellular alpha-amylase Activity. *Journal of Botany*, 41(2): 897-905
- Suratman, P., D., & Setyawan 2000. Analisis Keragaman Genus *Ipomoea* Berdasarkan Karakter Morfologi. *Biodiversitas*, 1, 72-79.
- Varga, J., Frisvad, J.C. & Samson .2011. Two New Alfatoxin Producing Species, And An Overview *Aspergillus* Kelompok *Flavi*. *Studies in Mycology*: 57-80