

Aktivitas Enzimatis Biakan Kapang *Aspergillus* Section *Nigri* DUCC (*Diponegoro University Culture Collection*) Dan Identifikasi Molekuler Isolat Potensial

Enzymatic Activity of *Aspergillus* Section *Nigri* Fungi Culture DUCC (*Diponegoro University Culture Collection*) and Molecular Identification of Potential Isolates

Zalia Sabrini, Isworo Rukmi dan Rejeki Siti Ferniah

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275
Corresponding Author ; isworo.rukmi@gmail.com

Abstract

The enzyme amylase, cellulase and protease are an extracellular enzymes are many produced by microorganisms such as fungi *Aspergillus* section *Nigri*. This research aims to find out the potential biakanes of *Aspergillus* section *Nigri* DUCC collection (*Diponegoro University Culture Collection*) which is capable to produce some enzymes that consists of amylase, protease and celullase and also identification in molecular based. Activity enzymatic assay of *Aspergillus* section *Nigri* with semi-quantitative method using selective medium, CMC for cellulolytic, Starch agar 1% for amylolytic and *Skim Milk* agar for proteolytic. Biakane potential is determined by looking at the Enzymatic Index (EI) is highest for all of three enzyme. Molecular identification is using the universal primer ITS4 and ITS5. The results showed that the culture of DUCC K207 has high activity for all of three enzyme. Index enzymatic of isolate DUCC K207, 1.55 mm for amylolytic, 1.49 mm for cellulolytic and 1, 24 mm for proteolytic. Result of molecular identification DUCC K207 known as *Aspergillus niger* that has 100% similarity with *Aspergillus niger* MH 109325.1.

Key words: amylase, protease, cellulase, potential isolate and *Aspergillus niger*

Abstrak

Enzim selulase, amilase dan protease merupakan enzim ekstraselular yang banyak dihasilkan oleh mikroorganisme diantaranya adalah kapang *Aspergillus* section *Nigri*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui biakan potensial kapang *Aspergillus* section *Nigri* koleksi DUCC (*Diponegoro University Culture Collection*) yang mampu menghasilkan enzim amilase, selulase dan protease dan mengidentifikasinya secara molekuler. Uji aktivitas enzimatis dari kapang *Aspergillus* section *Nigri* secara kuantitatif dilakukan pada medium selektif, yaitu CMC agar untuk selulolitik, Amilum 1% agar untuk amilolitik dan *Skim Milk* agar untuk proteolitik. Biakan potensial ditentukan dengan melihat Indek Enzimatis paling tinggi untuk ketiga enzim tersebut. Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan primer *universal* ITS4 dan ITS5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biakan DUCC K207 mempunyai aktivitas tinggi untuk ketiga enzim tersebut. Indeks enzimatis dari biakan DUCC K207 berturut-turut 1,55 mm untuk amilolitik, 1,49 mm dan 1,24mm untuk proteolitik. Hasil identifikasi molekuler DUCC K207 diketahui sebagai *Aspergillus niger* yang memiliki 100% kemiripan dengan *Aspergillus niger* MH109325.1.

Kata kunci: Amilase, selulase, protease, biakan potensial dan *Aspergillus niger*

PENDAHULUAN

Kapang *Aspergillus* section *Nigri* atau *black Aspergillii* merupakan subgenus dari *Aspergillus* yang tersebar secara luas di dunia dan dapat hidup di berbagai substrat. *Aspergillus* section *Nigri* terdiri dari 26 spesies dan koloninya dicirikan bewarna coklat gelap hingga hitam (Klich, 2002; Samson, 2004). *Aspergillus* section *nigri* berperan penting dalam proses bioteknologi dan dimanfaatkan enzim ekstrasullernya untuk komersil (Slivinski, 2007). Spesies dari *Aspergillus* section *Nigri* telah dipelajari secara

ekstensif sebagai produsen enzim terbaik dalam memroduksi enzim amilase, selulase, protease, pectinase dan phytase (Gautam, *et al.*, 2010; Shivani, 2015, Tatiana, 2017; Akhtar, 2014). Enzim selulase dalam jumlah yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri seperti bioteknologi makanan, kertas, tekstil dan pertanaian (Nur & Iwan, 2005).

Protease kapang sangat berperan dalam industri fermentasi selain itu juga protease kapang dapat dimanfaatkan untuk bioremediasi (Milala, *et al.*, 2016). *Aspergillus* section *nigri* merupakan

kelompok yang sulit untuk diklasifikasikan dan diidentifikasi. Menurut Samson (2007) identifikasi *Aspergillus* section *Nigri* pada tingkat spesies sangat sulit apabila menggunakan metode fenotip tradisional dan karakteristik morfologi, karena tidak dapat memisahkan antar spesies. Hal tersebut disebabkan *Aspergillus* section *Nigri* memiliki banyak variasi dan karakter morfologi maupun fisiologi. Teknik identifikasi berbasis analisis sekuensing banyak digunakan, karena efektif dan akurat dalam mengidentifikasi dan membedakan spesies kapang. Salah satu lokus yang digunakan untuk identifikasi spesies kapang adalah daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Daerah ITS merupakan daerah yang paling sering digunakan untuk mengidentifikasi kapang pada tingkat spesies, karena laju evolusi pada daerah tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan daerah rDNA (Crous, *et al.*, 2009).

Pada penelitian ini biakan dikatakan potensial apabila biakan tersebut dapat memproduksi enzim amilase, selulase dan protease dan memiliki nilai *Enzymatic Index* (EI) yang tinggi dibandingkan biakan lain. Biakan *Aspergillus* section *nigri* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan biakan koleksi DUCC (*Diponegoro University Culture Collection*)

BAHAN DAN METODE

Uji Enzimatis

Uji aktivitas amilolitik, selulolitik dan proteolitik secara berturut-turut dilakukan pada medium Amilum agar 1%, CMC agar dan *Skim Milk* agar dalam cawan petri. Inkubasi dilakukan selama 4 hari pada suhu ruang. Hidrolisis amilum, selulosa dan protein diamati dengan munculnya zona bening di sekitar koloni.

Indek Enzimatis

Indek enzimatis (*Enzymatic Index*) (Kaur, 2016).

$$\text{Indeks Enzimatis} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Spesies kapang yang memiliki indek enzimatis lebih dari 1,50 dapat digolongkan sebagai kapang potensial (Florencio, 2012). Biakan yang memiliki indek enzimatis tertinggi dan dapat memproduksi ketiga enzim (amilase, selulase dan protease) ditentukan sebagai biakan paling berpotensi, selanjutnya diidentifikasi secara molekuler menggunakan daerah ITS

Ekstraksi DNA, Amplifikasi dan Sequencing

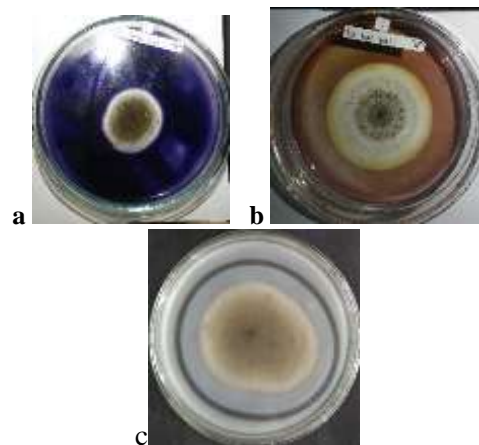
DNA biakan DUCC K207 diekstraksi menggunakan metode *Chelex* (Wu, 2013). Primer universal ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') dan ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGTAAC AAG G 3') digunakan dalam amplifikasi DNA (White *et al.*, 1990).

PCR mix tersusun atas DNA *template* 1 µL, *MyTaq kit* 12,5 µL, primer *forward* (10 pmol) 2 µL, primer *reverse* (10pmol) 2 µL, ddH₂O 7,5 µL dengan total volume akhir 25 µL. Program reaksi PCR menurut Bisbal (2009) sebagai berikut: *predenaturasi* 95°C selama 3 dalam satu siklus kemudian dilanjutkan siklus amplifikasi sebanyak 30 siklus yang tersusun atas *denaturasi* pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 56°C selama 30 detik, dan *extension* pada 72°C selama 1 menit. *Final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit serta suhu *hold* 4°C. DNA yang telah teramplifikasi selanjutnya dianalisis dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1% dan di *sekuensing*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji enzimatis

Uji selulolitik, amilolitik dan proteolitik lima belas biakan kapang *Aspergillus* section *Nigri* DUCC yang diisolasi dari tanah kapur, jamu dan roti menunjukkan hasil yang bervariasi, 9 biakan memiliki kemampuan amilolitik, 13 biakan memiliki kemampuan selulolitik dan 13 biakan memiliki kemampuan proteolitik. Biakan yang memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim amilase, selulase dan protease ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni kapang (Gambar 1). Larutan *iodine* digunakan sebagai indikator aktivitas amilolitik dan selulolitik untuk memperjelas zona bening yang terbentuk dalam medium selektif.

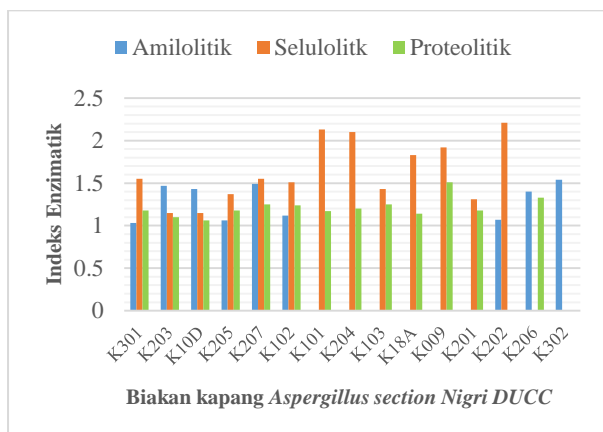


Gambar 1. Zona bening yang terbentuk (a) amilase (b) selululase (c) protease

Biakan kapang *Aspergillus* section *Nigri* DUCC menunjukkan IE amilolitik sebesar 1,03-1,55 (Gambar 2), kemampuan amilolitik dari kapang *Aspergillus* dapat bervariasi. Flores (2010) mendapatkan genus *Aspergillus* dengan kemampuan amilolitik kurang dari 2. Kelompok *Aspergillus* yang diteliti Khokhar (2011), memiliki kemampuan amilolitik dengan nilai $IE\ 0,99 \leq 2,30$, nilai IE tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan nilai IE spesies kapang section *Nigri* pada penelitian ini.

A. niger, *A. brevipes* dan *Aspergillus* sp. biakan dari tanah beberapa persawahan di daerah Surin, Thailand menunjukkan aktivitas selulolitik dengan nilai IE 2,00-3,00 (Reanprayoon, 2012). Agustini, *et al* (2012) melakukan uji secara kualitatif terhadap produksi selulase menggunakan medium CMC, hasilnya menunjukkan *A.niger* ditemukan sebagai spesies yang dapat memproduksi selulase dengan nilai EI 2,40. Seluruh biakan kapang *Aspergillus* section *Nigri* DUCC memiliki nilai IE 1,06 - 2,21 (Gambar 2).

Tiga belas biakan kapang *Aspergillus* section *Nigri* DUCC yang memiliki kemampuan proteolitik sebesar IE 1,06–1,51 (Gambar2), sifat ini mirip dengan *A. aculeatus*, *A. aculeatinus* dan *A. niger* yang diisolasi dari tanah dan serasah hutan atlantik memiliki kemampuan proteolitik dengan nilai IE 1,16–1,40 (Tatiana, 2017). Isolat *A. niger* dan *A. flavus* yang diisolasi Sunitha (2013) dari tanaman obat tidak memiliki kemampuan proteolitik.



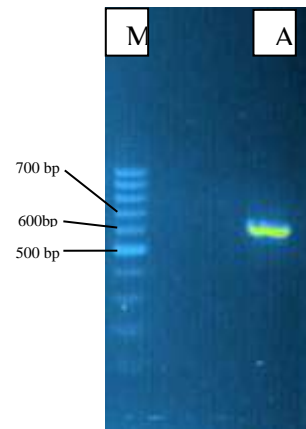
Gambar 2. Aktivitas enzimatis biakan-biakan kapang *Aspergillus* section *Nigri* DUCC.

Uji kemampuan enzimatis digunakan untuk menentukan biakan potensial. Hasil uji enzimatis menunjukkan bahwa biakan *Aspergillus* section *Nigri* DUCC K207 sebagai biakan potensial

karena mampu memproduksi enzim amilase, selulase, dan protease dengan nilai indek enzimatis 1,55 mm untuk amilolitik, 1,49 mm dan 1,24mm untuk proteolitik. Kultur *Aspergillus* section *Nigri* selanjutnya diidentifikasi secara molekuler.

Identifikasi Molekuler

DNA genom yang telah diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan primer ITS 4 dan ITS 5. Fragmen yang teramplifikasi sekitar 600bp, sesuai dengan ukuran target (Gambar 3).



Gambar3. Daerah ITS biakan DUCC K207 diamplifikasi dengan primer ITS 4 dan ITS 5. Keterangan: A: DUCC K207 M: Marker

Biakan DUCC K207 memiliki kemiripan 100% dengan *Aspergillus niger* MH109325.1, nilai *identity* dan *Query Cover* sebesar 100%. Nilai *identity* 100% menandakan tidak adanya gaps. Biakan *A. sec Nigri* 1 memiliki panjang basa nukleotida sebesar 623bp, yang terbagi menjadi 4 daerah, basa nukleotida 1-54 merupakan daerah 18S, 55-239 daerah ITS1, 240-380 daerah 5,8S dan 566-623 merupakan daerah 28S.

Coronado (2017) dalam penelitiannya menyatakan *Aspergillus niger* MF422153.1 dan *Aspergillus niger* MF422165.1 yang diisolasi dari lukisan Lamina abad ke 19 memiliki kemampuan selulolitik sebesar 1,08 dan 0,92. Pengujian kemampuan selulolitik pada *Aspergillus niger* MF422153.1 dan *Aspergillus niger* MF422165.1 menggunakan media CMC sama seperti yang digunakan dalam penelitian ini. Kemampuan selulolitik DUCC K207 sebesar 1,49 lebih tinggi dibandingkan dengan *Aspergillus niger* MF422153.1 dan *Aspergillus niger* MF422165.1.

Penjajaran urutan basa DUCC K207 dengan *Aspergillus niger* MH109325.1, *Aspergillus niger* MF422153.1 dan *Aspergillus niger* MF422165.1 memperlihatkan adanya 3 basa yang berbeda.

KESIMPULAN

Biakan *Aspergillus* section *Nigri* koleksi DUCC yang memiliki kemampuan selulolitik, amilolitik dan proteolitik yaitu DUCC 301, DUCC 203, DUCC K10D, DUCC 205, DUCC K207 dan DUCC 102. Biakan yang memiliki kemampuan amilolitik, selulolitik dan proteolitik tertinggi yaitu DUCC K207, merupakan spesies *Aspergillus niger* yang memiliki kemiripan 100% dengan *Aspergillus Niger* MH109325.1

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DUCC (*Diponegoro University Culture Collection*) untuk biakan yang digunakan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, L., Efiyanti, L., Faulina, S.A., Santoso, E. 2012. Biakanion and Characterization of Cellulase and Xylanase-Producing Microbes Biakaned from Tropical Forest in Java and Sumatra. *Internasional Journal of Environment and Bioenergy* 3(3):154-167.
- Anilkumar, R. & Pradeep, N. 2017. Screening and Identification of Halotolerant Protease Producing Fungi from Mangrove Sediments of Kerala. *Internasional Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 13(3): 237-252.
- Bisbal, F., Jose, V., Daniel, R. 2009. ITS-RFLP characterization of black *Aspergillus* Biakanes Responsible for ochratoxin A contamination in cocoa beans. *Europe Food Techno* 229: 751-755.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z. & Samson, R. A., 2009. *Fungal Diversity*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Netherland.
- Florencio, C and Farinas, C. 2012. Correlation Between Agar Plate Screening And Solid-State Fermentation For The Prediction Of Cellulase Production by *Trichodema* stains. *Enzyme Research* 2012: 1-7.
- Gautam, S., Bundela, P., Pandey, A., Awasthi, M., Sarsaiya, S, 2010. Screening of Cellulolytic Fungi for Management of Municipal Solid Waste. *Journal of Applied Science in Environment Sanitation* 5(4): 391-395.
- Kasana, R., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for The Detetion of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Grams's Iodine. *Curr Microbial* 57(5): 503-507.
- Kaur, A., Urmina, G., 2016. Biakanion and Qualitative selection of Fungi for Production of Lignocellulolytic Enzyme. *Internasional Journal of Current Microbiologi and Applied Science* 5(6): 718-730
- Khokhar, I., Irum, M., Sobia, M. 2011. Biakanion and Screening of Amylolytic Filamentous Fungi. *Journal of Applied Science and Environmental Management* 15(1): 203-206.
- Klich, M., 2002. *Identification of Common Aspergillus species*. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelaures.
- Milala, M. A., Jatau, I. A. & Abdulrahman, A. A., 2016. Production and optimization of protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis* using Response Surface Methodology. *Journal of Biotechnology and Biochemistry* 2(7): 1-7.
- Reanprayoon, P., Wattanachai, P., 2012., Tropical Soil Fungi Producing Cellulase and Related Enzymes in Biodegradation., *Journal of Applied Science* 12(18): 1909-1916.
- Samson, R A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J C., Varga, J, 2007. Diagnostic Tools to Identify *Black Aspergergilli*. *Study Mycology* 59: 129-145.
- Samson, R A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J C., Varga, J, 2007. Diagnostic Tools to Identify *Black Aspergergilli*. *Study Mycology* 59: 129-145.
- Shivani, Dubey & Jain, Sudhir. 2015. Extracellular Enzymatic Profile of Fungal Deteriogens of Historical Palace of Ujjain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4(5): 122-132.
- Sunitha, V., Nirmala, D., Srinivas, D. 2013. Extracellular Enymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Biakaned from Medical Plants. *World Journal of Agricultural Science* 9(1):1-9.
- Tatiana, F and Marcelo, E F. 2017. Bioprospecting *Aspergillus* section *Nigri* in Atlantic Forest Soil and Plant Litter. *Agricultural Microbiology* 84: 1-7.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. Academic Press, USA.
- Wu, C. C., Haieh, W. L. & Tang, C., 2013. Internal Transcribed Spacer Sequence-Based Identification and Phylogenetic Relationship of *I-TiaoGung* Originating From *Flemingia* and *Glycine*

Zalia Sabrini, Isworo Rukmi dan Rejeki Siti Ferniah

(Leguminosae) in Taiwan. *Elsevier: Journal*

of Food and Drug Analysis 21: 356-362.