

**POTENSI KAPANG *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* DAN *Neurospora sitophila*  
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM FITASE DAN AMILASE PADA SUBSTRAT AMPAS TAHU**

**THE POTENTIAL OF *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* AND *Neurospora sitophila* TO  
PRODUCE PHYTASE AND AMYLASE ENZYME ON SOYBEAN CURD RESIDUE**

**Atit Kanti\***

InaCC-Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor, 16911

Submitted: 29 September 2016, Accepted: 6 January 2017

**INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal untuk produksi enzim amilase dan fitase pada media ampas tahu menggunakan *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) dan *Neurospora sitophila* (*N. sitophila*) sebagai starter. Uji kemampuan produksi enzim fitase dan amilase oleh *A. niger*, *R. oryzae* dan *N. sitophila* dilakukan menggunakan media ampas tahu yang disterilisasi. Pemilihan ketiga isolat ini diawali dengan uji produksi enzim amilase pada kultur cair yang mengandung 2% pati, dan uji fitase dilakukan pada media yang mengandung 0,5% sodium fitat. Hasil uji pada medium cair selanjutnya digunakan untuk uji produksi enzim amilase dan fitase pada sistem fermentasi padat (SSF) menggunakan ampas tahu sebagai media fermentasi. Untuk mendapatkan produksi enzim yang tinggi dilakukan melalui optimasi waktu inkubasi, suhu inkubasi dan pH media. Fitase dan amilase dapat diproduksi dengan media ampas tahu oleh *R. oryzae*, *A. niger* dan *N. sitophila*. Kondisi optimum untuk produksi fitase, yaitu waktu inkubasi pada hari keempat untuk ketiga kapang, suhu 25°C untuk *R. oryzae* dan *A. niger*, suhu 30°C untuk *N. sitophila*, pH 8 untuk *R. oryzae*, pH 6 untuk *A. niger* dan *N. Sitophila*. *Neurospora sitophila* menghasilkan amilase optimum pada suhu 35°C, sedangkan *A. niger* dan *R. oryzae* optimum pada suhu 30°C. Aktivitas enzim amilase optimum adalah 162,23 U/g; 181,21 U/g dan 192,11 berturut turut oleh *R. oryzae*, *A. niger* dan *N. Sitophila*. Penurunan aktivitas produksi amilase menurun oleh *R. oryzae* pada suhu 40°C. Amilase diproduksi optimal pada pH 6-7. Aktivitas fitase yang dihasilkan oleh *R. oryzae*, *A. niger* dan *N. sitophila*, yaitu sebesar 51,32 U/g, 53,48 U/g, dan 60,54 U/g. Pakan ternak yang mengandung asam fitat mampu dihidrolisis oleh fitase pada kondisi optimum. Ketiga kapang juga menghasilkan enzim amilase pada media ampas tahu mengindikasikan bahwa ampas tahu merupakan susbtrat yang baik untuk produksi enzim hidrolisis yang berguna untuk meningkatkan nilai nutrisi pakan ternak.

(Kata kunci: Amilase, Ampas tahu, *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila*, Phytase, *Rhizopus oryzae*)

**ABSTRACT**

The objective of the study was to obtain the optimal condition to produce phytase and amylase enzyme using soybean curd residue with *Aspergillus niger* (*A. niger*) and *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) and *Neurospora sitophila* (*N. sitophila*) as inoculants. These isolates were selected due to their ability to produce amylase in 2% of starch medium, and phytase in 0.5% of sodium phytase contain medium. Optimization of phytase and amylase production were performed on incubation time, pH, and temperature. Phytase and amylase were produced by these 3 isolates on soybean curd residue. Phytase production was achieved at 4 days incubation time. The optimal condition for phytase production varied depend on isolates. *R. oryzae* was optimal at pH 8, 25°C, while *A. niger* and *N. sitophila* were at pH 6.0-7.0 at 30°C. Amylase production was optimal at pH 6.0-7.0 after 3-4 days. Amylase production by *R. oryzae* was inhibited at 40°C. Application of phytase in poultry feed increase phosphate release. The activity of phytase produced by *R. oryzae*, *A. niger*, and *N. sitophila* were 51.32 U/g, 53.48 U/g, and 60.54 U/g respectively. Maximum amylase activity was 162.23 U/g; 181.21 U/g and 192.11 for *R. oryzae*, *A. niger* and *N. Sitophila* respectively. Soybean curd residue (SCR) was good substrate for phytase and amylase production which implies that SCR is a good for poultry feed and hydrolytic enzyme production.

(Key words: Amylase, *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila*, Phytase, *Rhizopus oryzae*, Soybean curd residue)

\* Korespondensi (corresponding author):  
Telp. +62 812 8373 2584  
E-mail: atityeast@gmail.com

## Pendahuluan

Enzim fitase dan amilase merupakan enzim yang banyak digunakan di sektor industri pangan, pakan, dan kesehatan. Pada sektor peternakan penggunaan enzim fitase dan amilase sudah banyak diterapkan sejak tahun 2000-an. Penambahan enzim fitase untuk fortifikasi pakan ternak bertujuan untuk meningkatkan nilai cerna pakan (Selle dan Ravindran, 2007). Masalah utama yang dialami oleh peternak ayam adalah biaya produksi yang sangat tinggi yang disebabkan oleh mahalannya harga pakan (Kumar et al., 2012). Biaya produksi yang cukup tinggi ini menjadi makin mahal disebabkan oleh sebagian besar pakan yang diberikan kepada ternak belum efisien dicerna oleh ternak ayam (Dersjant-Li et al., 2015). Hal ini disebabkan oleh bahan utama pakan sebagian besar berupa biji-bijian yang mengandung fitat. Limbah hasil pertanian yang digunakan sebagai pakan ternak umumnya mengandung asam fitat. Asam fitat merupakan senyawa anti-nutrien yang dapat menurunkan nilai nutrisi atau nilai gizi pada tanaman biji-bijian dan sereal bagi hewan ternak maupun manusia (Kumar et al., 2012). Asam fitat memiliki kemampuan yang kuat untuk membentuk kelat multivalen dengan mineral khususnya magnesium, timah, kalsium dan besi. Ikatan yang terbentuk antara asam fitat dengan mineral sangat tidak larut dalam garam (Sajjadi dan Carter, 2004). Asam fitat dapat pula berikatan dengan protein dan beberapa asam amino (Quan et al., 2002). Adanya asam fitat yang dapat berikatan dengan ion logam, protein dan asam amino dapat mengganggu penyerapan senyawa tersebut oleh hewan ternak dan juga pada usus manusia. Sehingga mutlak diperlukan enzim yang mampu memutus ikatan asam fitat dengan protein, asam amino dan mikro element. Penambahan enzim fitase berfungsi memutus ikatan ester yang mengikat asam amino, lemak dan mikroelemen pada asam fitat. Fungi terutama *Aspergillus ficoum* terbukti mampu menghasilkan fitase cukup tinggi.

Fortifikasi ransum ayam dengan enzim fitase dan amilase diperlukan untuk meningkatkan nilai cerna ransum karena penambahan enzim amilase pada pakan ternak bertujuan untuk meningkatkan pencernaan karbohidrat di dalam saluran pencernaan pada ternak ayam umur satu minggu, dan meningkatkan berat badan sekitar 9,4% per hari (Gracia et al., 2003).

Penambahan alpha amilase sebesar 700 U pada pakan ternak yang mengandung jagung dan kedelai meningkatkan nilai cerna dari ayam broilers (Gracia et al., 2003). Penambahan enzim alpha amilase juga meningkatkan total protein pada broiler dan mengurangi kandungan lemak (Ghosh et al., 2001). Fungi terutama *Aspergillus niger*, efektif menghasilkan fitase dan amilase (Siala et al., 2012; Sivaramakrishnan et al., 2007). *Aspergillus niger* (*A. niger*) dan *Neurospora sitophila* (*N. sitophila*) dipilih sebagai penghasil fitase dan amilase karena keduanya termasuk dalam kelompok *generated as safe* (GRAS) (Schuster et al., 2002; Davis dan Perkins, 2002).

Ampas tahu merupakan substrat yang belum banyak dimanfaatkan untuk pembentukan enzim (Kalsum dan Sjoftan, 2008; Shi et al., 2011), pada hal ampas tahu mengandung protein (16-24%), dan karbohidrat (52-56%) (Li et al., 2013). Kandungan nutrisi tersebut cukup baik sebagai substrat untuk pembuatan enzim amilase dan fitase. Biji kedelai sebagai bahan dasar pembuatan tahu juga mengandung asam fitat yang baik untuk substrat enzim fitase. Biji kedelai juga mengandung kompleks karbohidrat yang cukup baik untuk produksi enzim amilase (Shi et al., 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk menggunakan *A. niger*, *N. sithophila* dan *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) sebagai inokulan untuk memproduksi enzim amilase dan fitase dengan substrat ampas tahu. Penambahan enzim amilase dan fitase pada pakan ternak dapat dalam bentuk tunggal ataupun dicampur dengan enzim fitase.

## Materi dan Metode

### Materi

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ampas tahu dari pabrik tahu Cibeureum Bogor, media *potato dextrose agar* (PDA), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kalium antimonyl, amonium molibdat, asam askorbat, akuades, akuades steril, 100 mM buffer asetat pH 5 dan 5.2, 100 mM buffer fosfat pH 6, 7, dan 8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kalsium fitat, serta pakan ternak. Mikrobia yang digunakan adalah isolat *Neurospora sitophila*, *Aspergillus niger*, dan *Rhizopus oryzae* yang merupakan koleksi dari *Indonesia Culture Colection* (Ina-CC) LIPI.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer SHIMADZU UV-VIS mini 1240, laminar *bio clean bench* MCV-B131F (T), *autoclave*

TOMY SX-500, table-top high speed micro refrigerated centrifuge H-15FR, inkubator CB-5 suhu 25, 30, 35, dan 40°C, neraca analitik, labu erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, gelas piala, pipetmikro 1000 µL dan 200 µL, tip 1000 µL dan 200 µL, tabung *ependorf*, tabung falkon, dan penangas air.

## Metode

**Penyiapan inokulan.** *Aspergillus niger*, *N. sitophila*, dan *R. oryzae* diisolasi dari berbagai jenis makanan fermentasi di Indonesia. Isolat tersebut dipilih karena menghasilkan enzim fitase pada substrat cair dengan glukosa (Sigma G8270) sebagai sumber karbon dan sodium phytate (Sigma P8810) sebagai sumber fosfat. Ketiga isolat tersebut ditumbuhkan pada media PDA (Sigma P2182) selama 5 hari pada suhu 30°C. Spora yang tumbuh dipanen dengan menggunakan akuades steril. Jumlah spora dihitung menggunakan hemasitometer. Jumlah spora untuk inokulan yaitu  $3,4 \times 10^8$  per ml inokulan.

**Pengujian produksi enzim fitase dan amilase pada kultur cair.** Pengujian kemampuan produksi enzim fitase pada kultur cair dilakukan mengikuti Buckle (1988). Sebanyak 5 ml inokulan dari *A. niger*, *N. sitophila*, dan *R. oryzae* dengan jumlah spora  $3,4 \times 10^8$  per ml dimasukkan ke dalam 100 ml medium yang mengandung 0,5% Na-phytate, dengan pH awal medium 6,8. Kultur diinkubasi pada suhu 30°C dengan kecepatan pengoyangan 135 putaran per menit. Sedangkan pengukuran aktivitas enzim alpha amilase dilakukan menggunakan media yang mengandung 2% pati yang diinkubasi pada suhu yang sama dengan fitase (Freitas *et al.*, 2014).

**Optimasi produksi fitase dengan solid state fermentation.** Ampas tahu dengan kadar air awal 85% dikeringkan menggunakan oven (Isuzu Hot Air Rapid Drying Oven Soyokaze, Japan) pada suhu 60°C untuk mendapatkan kadar air awal 50 sampai dengan 85% dimasukkan ke dalam plastik dengan total 100 gram dan disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C 1 atm. Kultur *A. niger* yang berada pada media PDA diberi akuades steril sebanyak 10 ml dan diaduk hingga spora pada media PDA larut, selanjutnya dimasukkan ke dalam media fermentasi. Bahan-bahan tersebut dicampur hingga rata. Media fermentasi diinkubasi selama lima hari pada suhu 30°C. Fermentasi

dengan *A. niger* dan *R. oryzae* dilakukan seperti *N. sitophila*.

Optimasi produksi fitase dilakukan dengan beberapa parameter. Pertama dilakukan optimasi waktu inkubasi untuk mendapatkan waktu yang optimum untuk pengunduhan enzim. Optimasi waktu inkubasi dilakukan selama 5 hari. Selama waktu tersebut, aktivitas enzim amilase dan fitase diamati. Data hasil aktivitas enzim amilase dan fitase untuk masing-masing hari tidak disajikan. Data yang disajikan hanya pada saat aktivitas enzim tertinggi. Waktu inkubasi optimum selanjutnya digunakan untuk optimasi suhu inkubasi. Suhu fermentasi diatur (25, 30, 35, dan 40°C). Data yang didapatkan dari waktu inkubasi dan suhu fermentasi, selanjutnya dijadikan sebagai acuan dalam penentuan pH fermentasi. Penentuan pH fermentasi di antara 5 sampai dengan 8, yaitu dengan menggunakan buffer asetat 100 mM pH 5, buffer fosfat pH 6,7, dan 8. Data dianalisis secara deskriptif dengan perbandingan data rerata yang dilengkapi dengan standar deviasi. Ulangan sampel untuk masing-masing perlakuan adalah tiga. Data dianalisis dengan SPSS 17.

**Ekstraksi fitase dan amilase dari A. niger, N. sitophila dan R. oryzae.** Padatan hasil fermentasi sebanyak 1 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung falcon volume 15 ml (Falcon™ Conical Centrifuge Tube). Akuades steril sebanyak 9 ml dimasukkan ke dalam tabung falkon. Tabung falkon dikocok hingga 15 menit. Sampel pada tabung falkon dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* sebanyak 2 ml. Sampel disentrifus menggunakan (H-15FR Kokusan, Japan) pada 4°C dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan sampel ekstrak kasar fitase dan amilase.

**Uji aktivitas fitase.** Penentuan aktivitas enzim fitase pada SSF dilakukan mengikuti (Nakamura *et al.*, 2000). Ekstrak kasar enzim sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama disimpan pada suhu ruang, sedangkan tabung kedua dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Tabung kedua digunakan sebagai blanko dalam uji aktivitas enzim. Masing-masing sampel ditambahkan 50 µL kalsium fitat 0,5% dalam buffer asetat 100 mM pH 5,2. Sampel diinkubasi selama 30 menit pada 25°C. Akuades sebanyak 100 µL digunakan untuk blanko spektro. Reagen

campuran ditambahkan ke dalam setiap sampel sebanyak 160  $\mu\text{L}$ . Sampel didiamkan selama 20 menit hingga muncul warna biru. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer SHIMADZU UV-VIS mini 1240 pada panjang gelombang 880 nm. Aktivitas fitase dinyatakan dalam unit per gram substrat (U/g).

Aktivitas enzim (U/g)=

$$[\text{PO}_4] \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{BM} (\mu\text{g}/\mu\text{mol})} \\ \times \frac{1}{\text{waktu (menit)}} \times \frac{\text{VT}}{\text{VE}} \times \frac{10 \text{ mL enzim}}{1 \text{ g substrat}} \times \text{FP}$$

Keterangan:

AE = aktivitas enzim fitase (U/g)

BM = bobot molekul fosfat ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )

VE = volume enzim yang ditambahkan ( $\mu\text{L}$ )

VT = volume total ( $\mu\text{L}$ )

FP = faktor pengenceran

**Pengukuran aktivitas amilase pada SSF.** Ekstrak kasar enzim kondisi optimum sebanyak 125  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama disimpan pada suhu ruang, sedangkan tabung kedua dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Tabung kedua digunakan sebagai blanko dalam uji aktivitas enzim. Masing-masing sampel ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  amilum 1% dalam buffer asetat 100 mM pH 5,2. Kedua tabung diinkubasi selama 30 menit pada 25°C. Akuades sebanyak 100  $\mu\text{L}$  digunakan untuk blanko spektro. Asam dinitrosalisilat (DNS) ditambahkan ke dalam setiap sampel sebanyak 250  $\mu\text{L}$ . Sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit hingga larutan berubah warna menjadi merah bata atau coklat. Sampel didiamkan hingga dingin. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer SHIMADZU UV-VIS mini 1240 pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas amilase dinyatakan dalam unit per gram substrat (U/g). Masing-masing sampel dilakukan 3 kali ulangan.

Aktivitas enzim (U/g) =

$$[\text{glukosa}] \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{BM} (\mu\text{g}/\mu\text{mol})} \\ \times \frac{1}{\text{waktu (menit)}} \times \frac{\text{VT}}{\text{VE}} \times \frac{10 \text{ mL enzim}}{1 \text{ g substrat}} \times \text{FP}$$

Keterangan:

AE = aktivitas enzim amilase (U/g)

BM = bobot molekul glukosa ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )

VE = volume enzim yang ditambahkan ( $\mu\text{L}$ )

VT = volume total ( $\mu\text{L}$ )

FP = faktor pengenceran

**Hidrolisis asam fitat pada pakan ternak.** Padatan hasil fermentasi pada kondisi

optimum yang telah dihaluskan sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam tabung falkon yang berisi akuades sebanyak 9 ml. Tabung falkon dikocok hingga 15 menit. Sampel pada tabung falkon dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* sebanyak 2 ml. Sampel disentrifus pada 4°C dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Ekstrak kasar yang diperoleh sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Akuades sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam tabung reaksi lainnya, digunakan sebagai kontrol negatif. Pakan ternak ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dengan 20 ml akuades. Pakan ternak 5% yang telah dibuat sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam setiap sampel. Sampel diinkubasi selama 30 menit pada 25°C. Reagen campuran ditambahkan ke dalam setiap sampel sebanyak 160  $\mu\text{L}$ . Sampel didiamkan selama 20 menit hingga muncul warna biru. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer SHIMADZU UV-VIS mini 1240 pada panjang gelombang 880 nm.

## Hasil dan Pembahasan

*Aspergillus niger*, *R. oryzae* dan *N. sitophila* menghasilkan enzim fitase dan amilase. Kemampuan produksi enzim fitase dan amilase pada kultur cair oleh *A. niger*, *R. oryzae*, dan *N. sitophila* bervariasi satu dengan yang lain (Tabel 1). *Neurospora sitophila* menghasilkan aktivitas enzim fitase tertinggi, sedangkan aktivitas enzim amilase tertinggi dihasilkan oleh *R. oryzae*. Ketiga fungi tersebut selanjutnya digunakan sebagai inokulan untuk fermentasi padat (*solid state fermentation*). Salah satu fungi yang banyak dilaporkan menghasilkan enzim fitase adalah *Aspergillus* sp. yang telah dilaporkan mempunyai rentang aktivitas fitase pada kondisi pH 2,5-5,0. Namun produksi fitase terhambat jika media mengandung posfat >20 mg/L (Gargova et al., 1997). *Rhizopus oligosporus* strain CT11K2, yang umum ditemukan pada tempe menghasilkan ektra dan intracellular fitase. Kedua enzim tersebut aktif pada pH 4,5 (Buckle, 1988). *Aspergillus niger*, *R. oryzae*, dan *N. sitophila* aktif menghasilkan enzim fitase dan amilase pada pH 6,8.

### Kondisi optimum produksi fitase pada SSF

Waktu inkubasi optimum. Waktu inkubasi pada saat fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas fitase. Optimasi produksi fitase dengan parameter waktu inkubasi

dilakukan selama lima hari. Fungi *R. oryzae*, *A. niger*, dan *N. sitophila* menghasilkan aktivitas fitase optimum pada hari yang sama, yaitu pada hari ke-4. Aktivitas fitase yang dihasilkan oleh *R. oryzae*, *A. niger* dan *N. sitophila*, adalah sebesar 51,32 U/g, 53,48 U/g, dan 60,54 U/g (Gambar 1). *Neurospora sitophila* menghasilkan enzim fitase secara signifikan paling tinggi jika dibandingkan dengan *R. oryzae* dan *A. niger*.

Nilai aktivitas fitase yang paling tinggi dari ketiga fungi dihasilkan oleh *N. sitophila*. Kemampuan produksi enzim fitase tidak hanya dipengaruhi oleh waktu fermentasi tetapi juga formulasi substrat. Komposisi media yang mengandung (b/b): manitol, 2,05%; ammonium sulfate, 2,84% and phosphate, 0,38% mampu meningkatkan produksi enzim fitase pada *R. oryzae* sekitar 59% (Rani dan Ghosh, 2011). *Pichia pastoris* menghasilkan enzim fitase maksimum pada 100 jam waktu inkubasi (Hang *et al.*, 2009). Hal tersebut mengindikasikan perlunya formulasi substrat dan waktu inkubasi untuk meningkatkan produksi enzim fitase dengan inokulan kapang dan khamir.

**Suhu fermentasi optimum.** Suhu berpengaruh terhadap produksi enzim fitase. *Rhizopus oryzae* mempunyai aktivitas optimum pada suhu 25-30°C. Pada suhu yang lebih tinggi, produksi enzim fitase oleh *R. oryzae* akan menurun. *A. niger* dan *N. sitophila* optimum pada suhu 30°C (Gambar 2). Suhu fermentasi untuk SSF akan berpengaruh kepada kecepatan pertumbuhan biomassa dan produksi enzim. Suhu yang efektif untuk meningkatkan pertumbuhan tergantung kepada jenis kapang. *Rhizopus oligosporus* yang ditumbuhkan pada media ampas kelapa pH 5,3, menghasilkan aktivitas enzim fitase tertinggi pada waktu fermentasi 4 hari (Sabu *et al.*, 2002). Sedangkan *A. niger* menghasilkan enzim fitase paling tinggi setelah 3 hari inkubasi pada media yang mengandung 1 g/L gum, pada suhu 30°C

(Papagianni *et al.*, 2001). *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, *Mucor racemosus* NRRL 1994 dan *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 menghasilkan enzim fitase tertinggi pada medium yang mengandung tepung canola, jagung, kedelai, dan dedak pada suhu  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (Bogar *et al.*, 2003). Hal tersebut menunjukkan suhu sekitar 30°C cukup optimal untuk memproduksi enzim fitase.

Waktu inkubasi optimum yaitu hari keempat selanjutnya digunakan untuk menentukan suhu optimum dalam memproduksi fitase. Optimasi produksi fitase dengan parameter suhu fermentasi menggunakan empat suhu inkubasi, yaitu 25, 30, 35, dan 40°C. Kapang *N. sitophila*, *R. oryzae* dan *A. niger* memiliki aktivitas optimum pada rentang suhu serupa.

**pH fermentasi optimum.** Optimasi produksi fitase dengan parameter pH fermentasi dilakukan pada hari keempat dengan suhu fermentasi 25°C untuk *R. oryzae*, sedangkan *A. niger* dan *N. sitophila* pada suhu 30°C. Nilai pH fermentasi yang digunakan adalah pH 5, 6, 7, dan 8. Kapang *R. oryzae*, *A. niger*, dan *N. sitophila* memiliki aktivitas optimum pada pH yang berbeda. *Rhizopus oryzae* menghasilkan aktivitas optimum pada pH 8, dengan nilai aktivitas fitase sebesar 177,32 U/g (Gambar 3). *Aspergillus niger* dan *N. sitophila* memiliki aktivitas optimum pada pH 6-7, dengan nilai aktivitas fitase sebesar 157,29 U/g dan 196,6 U/g (Gambar 3). Kapang yang menghasilkan nilai aktivitas tertinggi adalah *N. sitophila*.

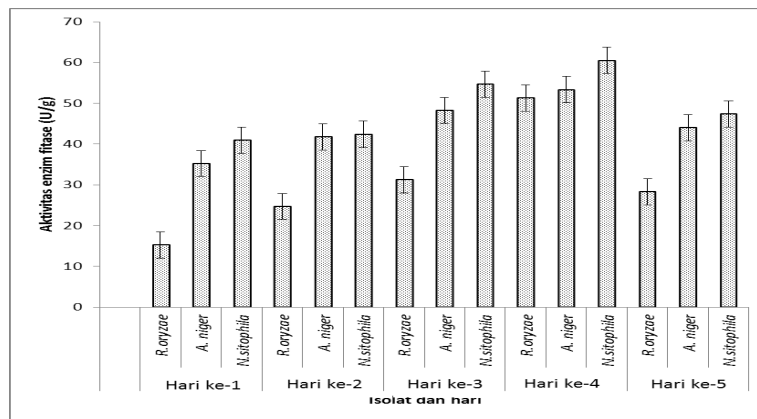
Faktor pH berpengaruh terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi enzim fitase. *Aspergillus ficuum* menghasilkan enzim fitase optimal pada pH 6,8 -7,0 (Han *et al.*, 1987; Ramachandran *et al.*, 2005).

Penelitian produksi enzim fitase menggunakan ampas tahu masih belum banyak dilakukan. Umumnya penelitian produksi enzim fitase menggunakan hasil samping produksi minyak kelapa, minyak

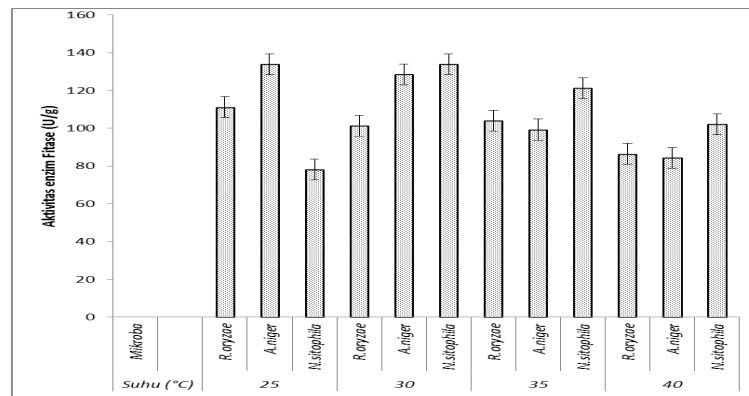
Tabel 1. Produksi enzim fitase dan amilase oleh *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* dan *Neurospora sitophila* yang diuji pada 96 jam setelah inkubasi pada suhu 30°C, pada perlakuan penggoyangan 135 rpm (*phytase and amylase production by Aspergillus niger, Rhizopus oryzae and Neurospora sitophila on submerge culture, agitated at 135 rpm, incubation temperature was 30°C*)

Isolat	Fitase (unit)	Amilase (unit)
<i>Aspergillus niger</i>	2,7±0,5	3,4±0,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	1,5±0,4	4,2±0,2
<i>Neurospora sitophila</i>	2,9±0,3	3,2±0,3

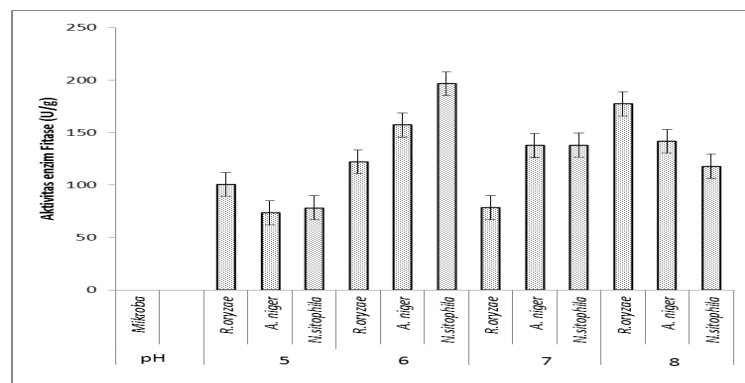
N = 3, fitase diukur menggunakan substrat yang mengandung 0,5% Na-phytate, amilase diukur pada substrate yang mengandung 2% CMC, pH 6,8.



Gambar 1. Profil aktivitas enzim fitase selama inkubasi pada sistem fermentasi padat (SSF) (*phytase activities profile during solid state fermentation (SSF)*).



Gambar 2. Profil produksi enzim fitase oleh *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, dan *Neurospora sitophila* pada suhu 25-40°C pada sistem SSF (*phytase production profile by Rhizopus oryzae, Aspergillus niger and Neurospora sitophila at 25-40°C on SSF*).



Gambar 3. Pengaruh pH awal media terhadap produksi enzim fitase pada sistem fermentasi padat (SSF) (*the effect of initial pH on phytase production at SSF condition*).

zaitun, minyak kelapa sawit, dan biji kapas (Ramachandran et al., 2005). Penambahan enzim fitase pada ampas tahu (*soybean curd residue*) meningkatkan nilai nutrisi dan memacu pertumbuhan ikan (Selle dan Ravindran, 2007). Penelitian ini berhasil

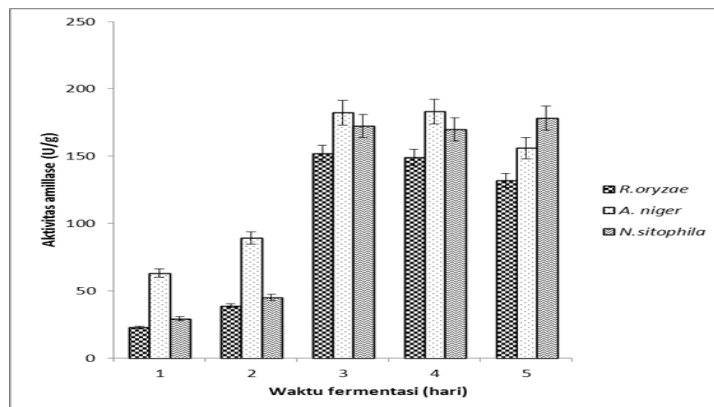
menggunakan ampas tahu sebagai media pemuatan enzim fitase menggunakan *A. niger*, *R. oryzae* dan *N. sithophila*.

**Enzim amilase.** Waktu inkubasi berpengaruh terhadap produksi enzim amilase pada sistem SSF. Produksi enzim

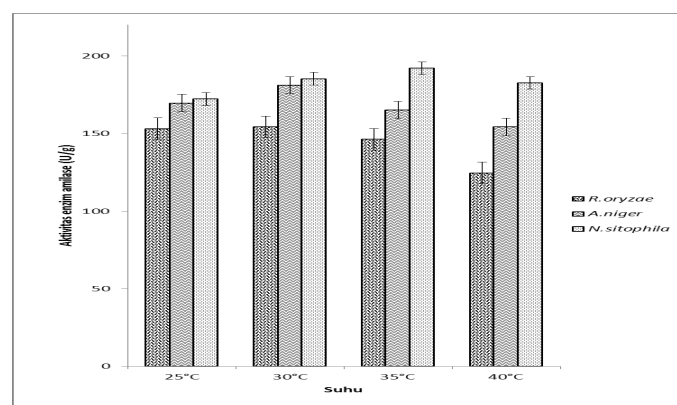
amilase tertinggi dicapai pada hari ke 3-4 (Gambar 4), dan pada suhu sekitar 30-35°C (Gambar 5). Kemampuan produksi amilase bervariasi antara satu inokulan dengan yang lain. *Aspergillus niger* dan *N. sitophila* memproduksi amilase sekitar 171 Unit, sedangkan *R. oryzae* sedikit lebih rendah. Produksi enzim amilase juga dipengaruhi oleh pH. Produksi enzim amilase terbaik didapatkan pada pH 6-7 (Gambar 6).

Hasil yang didapatkan hampir sama dengan *R. oryzae* dan *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* pada sistem fermentasi *submerge* menghasilkan enzim amilase optimum pada waktu inkubasi 4 hari pada suhu 30°C (Freitas *et al.*, 2014). Banyak fungi jenis lain yang dilaporkan menghasilkan enzim amilase seperti *A. niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Emericella*

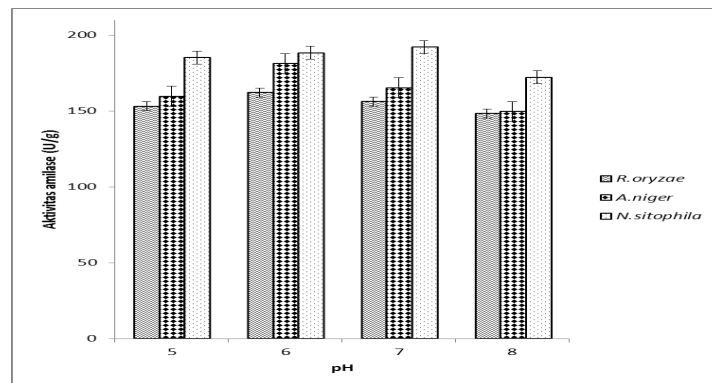
*nidulans*, *Mucor racemosus*, *Mycosphaerella tassiana*, *Penicillium chrysogenum* dan *Rhizopus stolonifer*. Kapang tersebut menghasilkan enzim amilase maksimum pada hari ke 6 pada suhu 30°C. Penambahan pati dan ammonium sulfat meningkatkan produksi enzim (Saleem dan Ebrahim, 2014). *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 pada sistem fermentasi SSF, yang ditumbuhkan pada sisa media pembuatan bir yang diperkaya dengan soybean meal, calcium chloride and magnesium sulphate, menghasilkan enzim amilase optimum pada suhu 30°C, kelembaban media awal 70% dengan inokulan  $1 \times 10^7$  spores/g substrat (Francis *et al.*, 2003). Hasil penelitian ini menunjukkan pH media yang optimal untuk menghasilkan enzim amilase adalah sekitar 6-7 (Gambar 5-7) yaitu sekitar 162,23 U/g untuk *R. oryzae*,



Gambar 4. Optimasi waktu fermentasi untuk *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, dan *Neurospora sitophila* untuk produksi enzim amilase pada suhu kamar (optimization of fermentation time for *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, and *Neurospora sitophila* for amylase production at ambient temperature).



Gambar 5. Optimasi suhu untuk produksi amilase oleh *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, dan *Neurospora sitophila* (temperature optimization for amylase production by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, and *Neurospora sitophila*).



Gambar 6. Pengaruh pH awal media terhadap produksi enzim amilase pada sistem fermentasi padat (SSF) (effect of initial pH of media on amylase production in solid state fermentation (SSF)).

181,36 U/g untuk *A. niger*, dan 188,36 untuk *N. sitophila*.

Produksi enzim amilase juga dapat dilakukan menggunakan medium ketela yang dimasak dan tanpa dimasak, dengan *R. oryzae* 28627 pada sistem SSF. Peningkatan kandungan protein terjadi pada singkong yang dimasak, namun aktivitas amilase tertinggi didapatkan pada media singkong mentah (Soccol et al., 1994). *Neurospora sitophila* menghasilkan amilase optimum pada suhu 35°C, sedangkan *A. niger* dan *R. oryzae* optimum pada suhu 30°C. Penurunan aktivitas produksi amilase menurun oleh *R. oryzae* pada suhu 40°C.

*Botryodiplodia theobromae* dan *R. oryzae* menghasilkan enzim amilase pada substrat yang mengandung 2% dan limbah cair pembuatan pati dengan pH6, yang diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30°C. Penambahan amonium asetat atau ammonium nitrate meningkatkan produksi enzim amilase (Ray, 2004).

#### Kemampuan hidrolisis asam fitat pada pakan ternak

Hidrolisis asam fitat pada pakan ternak menggunakan ekstrak kasar enzim dari hasil fermentasi dengan kondisi 4 hari fermentasi pada suhu 25°C untuk *R. oryzae*, dan dan

30°C untuk *A. niger* dan *N. sitophila*. Kondisi pH yang digunakan yaitu pH 8 untuk *R. oryzae*, pH 6 untuk *A. niger* dan *N. sitophila*. Konsentrasi fosfat yang dihasilkan dari proses hidrolisis tersebut lebih besar dari kontrol yang digunakan. Konsentrasi fosfat yang dihasilkan dari *A. niger*, *R. oryzae*, dan *N. sitophila* adalah sebesar 1145,56-1247,56 mg/L, 1256,34-1658,34 mg/L, dan 1686,75-1989,75 mg/L.

Asam fitat merupakan zat anti-nutiren yang dapat mengganggu fungsi dan komponen nutrisi pada pangan. Asam fitat adalah agen pengkelat yang sangat kuat, dapat berikatan dengan mineral, protein dan beberapa asam amino (Ahmad et al., 2000). Pakan ternak umumnya mengandung asam fitat, dengan adanya asam fitat pada pakan terak dapat menurunkan ketersediaan mineral bagi hewan ternak. Asam fitat pada pakan ternak dapat dihidrolisis oleh fitase dengan memutus ikatan fosfat dari asam fitat menjadi inositol dan fosfat anorganik (Guo et al., 2007).

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa fitase yang dihasilkan oleh *N. sitophila*, *R. oryzae* dan *A. niger* mampu menghidrolisis asam fitat pada pakan lobster. Hasil tersebut ditunjukkan dengan tingginya konsentrasi fosfat yang

Table 2. Efektivitas pelarutan posfat oleh enzim fitase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae*, *Neurospora sitophila* dan *Neurospora sitophila* pada pH 6, konsentrasi fosfat yang dihasilkan dari proses hidrolisis tersebut lebih besar dari kontrol

(phosphate solubility efficacy by *Rhizopus oryzae*, *Neurospora sitophila* and *Neurospora sitophila* at pH 6, released phosphate by enzyme treatment was higher compare to control)

Isolat	Pakan ternak A (feed A)	Pakan ternak B (feed B)
<i>Aspergillus niger</i>	1145,56±24,78	1247,56±29,78
<i>Rhizopus oryzae</i>	1256,34±26,89	1658,34±28,82
<i>Neurospora sitophila</i>	1686,75±23,67	1989,75±25,97
Kontrol (control)	435,56±23,67	521,43±29,68



dihasilkan dari hidrolisis asam fitat oleh fitase apabila dibandingkan dengan kontrol yaitu 435,56 sd 521,43 (Tabel 2). Adanya fitase pada pakan ternak dapat meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi hewan ternak, khususnya hewan ternak monogastrik.

### Kesimpulan

Fitase dan amilase dapat diproduksi dengan media ampas tahu oleh *N. sitophila*, *R. oryzae* dan *A. niger*. Kondisi optimum untuk produksi fitase, yaitu waktu inkubasi pada hari keempat untuk ketiga kapang. Pengaturan suhu inkubasi perlu dilakukan, yaitu suhu 25°C *R. oryzae*, dan 30°C untuk *N. sitophila* dan *A. niger* serta pH 8 untuk *R. oryzae* dan 6-7 untuk *N. sitophila* dan *A. niger*. Ketiga kapang juga menghasilkan enzim amilase pada media ampas tahu, sehingga media tersebut dapat digunakan untuk produksi enzim hidrolisis yang berfungsi untuk meningkatkan nilai nutrisi pakan ternak.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Rosliana Purwaningdyah, Yeni Yuliani, Rizka Syahputri yang telah membantu pekerjaan laboratorium dan Dr. Lisman Suryanegara sebagai koordinator Proyek Pengembangan Produk komersial LIPI tahun 2015-2016.

### Daftar Pustaka

- Ahmad, T., S. Rasool, M. Sarwar, A. U. Haq, and Z. U. Hasan. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83: 103-114. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00122-4](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00122-4).
- Bogar, B., G. Szakacs, J. C. Linden, A. Pandey, and R. P. Tengerdy. 2003. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J. Industrial Microbiol. Biotech.* 30: 183-189. <http://doi.org/10.1007/s10295-003-0027-3>.
- Buckle, K. A. 1988. Characterization of extra- and intracellular phytases from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 67-79. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90086-4](http://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90086-4).
- Davis, R. H. and D. D. Perkins. 2002. Timeline: Neurospora: a model of model microbes. *Nature Reviews. Genetics*, 3: 397-403. <http://doi.org/10.1038/nrg797>.
- Dersjant-Li, Y., A. Awati, H. Schulze, and G. Partridge. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.* <http://doi.org/10.1002/jsfa.6998>.
- Francis, F., A. Sabu, K. M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs, and A. Pandey. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Engin. J.* 15: 107-115. [http://doi.org/Pii\\_S1369-703x\(02\)00192-4](http://doi.org/Pii_S1369-703x(02)00192-4).
- Freitas, A., B. Escaramboni, A. Carvalho, V. Lima, and P. Oliva-Neto. 2014. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. oligosporus from industrial waste in acquisition of glucose. *Chemical Papers* 68: 442-450. <http://doi.org/10.2478/s11696-013-0466-x>.
- Gargova, S., Z. Roshkova, and G. Vancheva. 1997. Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology* 11: 221-224. <http://doi.org/10.1023/A:1018426119073>.
- Ghosh, K., K. Chakraborty, S. K. Sen, and A. K. Ray. 2001. Effects of thermostable bacterial  $\alpha$ -amylase on growth and feed utilization in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Israeli J. Aquaculture - Bamidgeh* 53: 101-109.
- Gracia, M. I., M. J. Aranibar, R. Lázaro, P. Medel, and G. G. Mateos. 2003. Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poult. Sci.* 82: 436-442. <http://doi.org/10.1093/ps/82.3.436>
- Guo, M. J., Y. P. Zhuang, J. Chu, S. L. Zhang, A. S. Xiong, R. H. Peng, and Q. H. Yao. 2007. Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* FPHY34. *Process Biochemistry*, 42: 1660-1665.

- <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.09.003>.
- Han, Y. W., D. J. Gallagher, and A. G. Wilfred. 1987. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Industrial Microbiol.* 2: 195-200. <http://doi.org/10.1007/BF01569540>.
- Hang, H., X. Ye, M. Guo, J. Chu, Y. Zhuang, M. Zhang, and S. Zhang. 2009. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 185-188. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.12.002>.
- Kalsum, U. dan O. Sjoftan. 2008. Pengaruh waktu inkubasi campuran ampas tahu dan onggok yang difermentasi dengan *Neurospora sitophila* terhadap kandungan zat makan. In: Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Agribisnis Peternakan Ramah Lingkungan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. pp. 226–232.
- Kumar, V., A. K. Sinha, H. P. S. Makkar, G. De Boeck, and K. Becker. 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* <http://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>.
- Li, S., D. Zhu, K. Li, Y. Yang, Z. Lei, and Z. Zhang. 2013. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. *ISRN Industrial Engineering*: 1-8. <http://doi.org/10.1155/2013/423590>
- Nakamura, Y., H. Fukuhara, and K. Sano. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 841-844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830502>.
- Papagianni, M., S. E. Nokes, and K. Filer. 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*, effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technol. Biotech.* 39: 319-326.
- Quan, C. S., S. Fan, L. H. Zhang, Y. J. Wang, and Y. Ohta. 2002. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J. Biosci. Bioengineering* 94: 419-425. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80219-5](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80219-5).
- Ramachandran, S., K. Roopesh, and K. M. Nampoothiri. 2005. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry* 40: 1749-1754. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.040>.
- Rani, R. and S. Ghosh. 2011. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresource Technology* 102: 10641-10649. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.075>.
- Ray, R. C. 2004. Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. *J. Environ. Biology* 25: 489-495.
- Sabu, A., S. Sarita, A. Pandey, B. Bogar, G. Szakacs, and C. R. Soccol. 2002. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102: 251-260. <http://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:251>.
- Sajjadi, M. and C. G. Carter. 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture Nutr.* 10: 135-142. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2003.00290.x>.
- Saleem, A. and M. K. H. Ebrahim. 2014. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *J. Taibah University Sci.* 8: 90-97. <http://doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.09.002>.
- Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J. Frisvad, and P. Van Dijck. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426-435. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>.
- Selle, P. H. and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 1-41. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>.

- Shi, M., Y. Yang, Y. Li, Y. Wang, and Z. Zhang. 2011. Optimum condition of ecologic feed fermentation by *Pleurotus ostreatus* using soybean curd residue as raw materials. *Int. J. Biol.* 3: 2-12. <http://doi.org/10.5539/ijb.v3n4p2>.
- Siala, R., F. Frikha, S. Mhamdi, M. Nasri, and A. S. Kamoun. 2012. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. *The Scientific World Journal*, 1-11. <http://doi.org/10.1100/2012/564932>.
- Sivaramakrishnan, S., D. Gangadharan, K. M. Nampoothiri, C. R. Soccol, and A. Pandey. 2007. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 66: 621-626.
- Soccol, C. R., I. Iloki, B. Marin, and M. Raimbault. 1994. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus strains* in submerged and solid. *J. Food Sci. Technol.* 31: 320-323. <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/OV/OV201204679004679.xml;IN19950029562>.