

## AKTIVITAS ENZIMATIS AZOSPIRILLUM PADA SUBSTRAT ONGGOK DAN DEDAK

Oedjijono, D. Ryandini, PM. Hendrati

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzimatik isolat *Azospirillum* spp. (isolat BM1, BM2, KK1, KC1, JG3, PRD2) pada substrat onggok dan dedak. Isolat-isolat *Azospirillum* spp. telah diketahui mampu menambat N udara dan menghasilkan senyawa PGR. Penelitian diawali dengan pengujian kualitatif kemampuan enzimatik (selulolitik, amilolitik, proteolitik, dan lipolitik) dan dilanjutkan dengan pengujian enzimatik secara kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat bersifat selulolitik, amilolitik, proteolitik, dan lipolitik positif. Uji kuantitatif enzimatik terhadap isolat JG3 dan PRD2 menunjukkan bahwa : aktivitas selulolitik isolat JG3 tinggi pada masa fermentasi 60 jam, aktivitas selulolitik isolat PRD2 tinggi pada masa fermentasi 24 jam, aktivitas amilolitik isolat JG3 paling tinggi pada masa fermentasi 24 jam, aktivitas amilolitik isolat PRD2 paling tinggi pada masa fermentasi 48 jam, aktivitas proteolitik isolat JG3 dan PRD2 rendah, aktivitas lipolitik isolat JG3 dan PRD2 mulai tampak setelah masa fermentasi 12 jam. Hasil pengujian bermanfaat dalam upaya formulasi biomassa *Azospirillum* pada substrat onggok dan dedak.

Kata kunci : *Azospirillum*, aktivitas enzim, onggok, dedak

### Pendahuluan

Formulasi media onggok dan dedak untuk media pertumbuhan dan pembawa agensia biofertilizer *Azospirillum* sp. Telah dikembangkan oleh Oedjijono *dkk.* (2004). Onggok dan dedak merupakan substrat yang mengandung berbagai macam komponen, baik yang kompleks maupun yang sederhana. Kemampuan isolat *Azospirillum* dapat tumbuh pada substrat kompleks menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim pemecahnya. Aktivitas dekomposisi dedak dan onggok oleh berbagai enzim yang dihasilkan oleh *Azospirillum* spp. belum diketahui.

*Azospirillum* merupakan salah satu bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen. Bakteri ini digolongkan ke dalam kelompok bakteri *diazotrof endofitik fakultatif*. *Azospirillum* lebih dominan dalam menambat N<sub>2</sub> dibandingkan bakteri penambat N lain yang hidup bebas (James and Olivares, 1997).

Menurut Sosrosoedirdjo (1983), kandungan terbesar onggok adalah karbohidrat sekitar 67-69 %, protein 1,4-1,7 % dan lemak hanya 0,2-0,3 %. Kandungan pati onggok sekitar 60-70 % dari berat kering, sehingga onggok cukup potensial sebagai sumber C (Satiawihardja, 1982 dalam Fachda, 1989). Dedak merupakan sumber vitamin B dan E dengan kandungan tinggi, dan hanya sedikit kandungan vitamin A, C dan D ( Abbas *dkk.*, 1985). Kandungan protein dedak mencapai 1-3% dari berat kering. Tingginya kandungan protein dedak karena banyak mengandung asam amino lisin (Luh, 1980). Adanya kandungan N yang cukup tinggi tersebut menjadikan dedak cukup baik digunakan sebagai sumber N (Fardiaz *dkk.*, 1987).

Onggok dan dedak berfungsi sebagai medium pembawa dan medium pertumbuhan *Azospirillum* sp. Bakteri tersebut tetap viabel hingga lama inkubasi 8 minggu. Perbandingan onggok dan dedak yang digunakan adalah 2:3 dan pH awal medium netral memberikan pertumbuhan yang paling baik bagi *Azospirillum* (Rahmawati 2002, Parhaetani, 2003 dan Oedjijono *dkk.*, 2004).

Viabilitas *Azospirillum* sp. pada medium pembawa onggok dan dedak karena kemampuannya memanfaatkan substrat dalam medium untuk kelangsungan hidupnya. Sampai saat ini belum diketahui jenis-jenis dan aktivitas enzim dari *Azospirillum* spp.

isolat BM1, BM2 (23a), PRD2, KK1, JG3, KC1 (stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UNSOED) dalam memanfaatkan komponen substrat pembawa onggok dan dedak. Oleh karena itu dilakukan penelitian secara eksperimen dengan melakukan pengujian aktivitas enzimatis secara kualitatif dan kuantitatif.

### **Metode Penelitian**

#### **Materi penelitian :**

Isolat-isolat *Azospirillum* spp. BM1, BM2, PRD2, KK1, JG3 dan KC1 (stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UNSOED), medium campuran onggok tapioka dan dedak, medium Caceres, medium SA (*starch agar*), khemikalia uji enzimatis selulolitik, amilolitik, proteolitik, dan lipolitik.

#### **Lokasi dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi dan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Science dan Teknik Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Penelitian dilakukan mulai bulan Juni – Nopember 2007.

#### **Cara kerja**

Pengujian kualitatif kemampuan isolat-isolat *Azospirillum* spp. dalam menghasilkan enzim dilakukan dengan secara deskriptif analitis. Untuk pengujian kuantitatif aktivitas enzim dari *Azospirillum* spp. dalam medium dedak dan onggok dilakukan secara eksperimental. Pada percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan waktu inkubasi yang berbeda yaitu 0, 12, 24, 36, 48, 60 dan 72 jam. Parameter utama yang diamati adalah nilai aktivitas enzim dan parameter pendukung yang diamati adalah jumlah populasi sel *Azospirillum* dan pH akhir medium fermentasi.

##### **1. Aktivasi isolat**

Isolat *Azospirillum* spp. diaktivasi dengan menumbuhkan pada medium NA (*Nutrient Agar*) dan medium PYE cair, diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam.

##### **2. Uji kualitatif sifat enzimatis**

Isolat ditumbuhkan pada medium Starch Agar ntuk uji amilolitik, pada medium CMC Agar untuk uji selulolitik, pada medium Skim Milk Agar untuk uji proteolitik, dan medium Rhodamin Agar untuk uji lipolitik.

##### **3. Pembuatan inokulum**

Inokulum dibuat pada media PYE cair 150 ml, inkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 30 °C selama 8 jam. Kepadatan inokulum yang diinokulasi ke dalam medium percobaan adalah  $10^8$  sel/ml.

##### **4. Pembuatan medium campuran dedak dan onggok**

Onggok dan dedak digiling dan diayak, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 2x24 jam. Campuran dedak dan onggok (3 :2) sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam 150 ml akuades dalam erlenmeyer dan pH dibuat 7.0. Selanjutnya media disterilisasi dua kali menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

##### **5. Produksi ekstrak kasar enzim (Dirnawan *et al.*, 2000)**

Botol-botol Erlenmeyer berisi substrat onggok dan dedak diinokulasi dengan inokulum sebanyak 3 % (v/v), kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan goyangan 125 kali/menit pada suhu 30°C. Lama inkubasi sesuai dengan perlakuan yaitu 0, 12, 24, 36, 48, 60 dan 72 jam.

## 6. Pengujian dan pengukuran parameter

Selesai inkubasi, larutan fermentasi diukur pH nya dan dihitung jumlah populasi sel. Kultur cair kemudian disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dianalisis aktivitas enzimnya. Pengujian aktivitas amilolitik, selulolitik, proteolitik, dan lipolitik dilakukan berdasarkan (Subardjo *et al.*, (1997), Macedo, 1995 dalam Kammimura *et al.*, 1999)

## 7. Metode Analisis

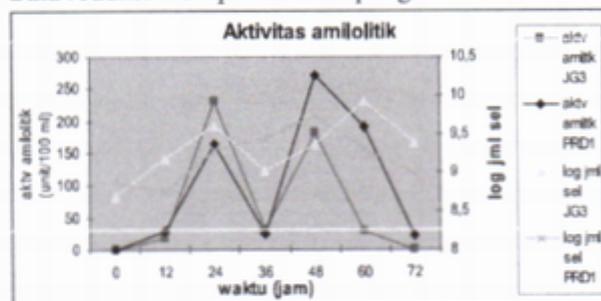
Data percobaan yang diperoleh dianalisis menggunakan pendekatan kinetika mikroba.

## Hasil dan pembahasan

Pengujian kualitatif sifat enzimatis isolat-isolat *Azospirillum* spp. (isolat-isolat *Azospirillum* sp. BM1, BM2, PRD1, KK1, JG3 dan KC1) menunjukkan hasil positif. Pemilihan dan penentuan isolat yang kemudian digunakan untuk percobaan didasarkan pada sifat-sifat isolat yang sudah lebih banyak diteliti, antara lain mampu menunjukkan aktivitas uji, mampu menghasilkan senyawa Plant Growth Regulator (PGR), dan menambat N udara. Isolat yang kemudian digunakan untuk percobaan adalah isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2.

Isolat *Azospirillum* sp. JG3 menurut Oedjijono *dkk.* (2006) memiliki sifat-sifat bentuk sel batang tidak teratur, Gram negatif, katalase +, ciri koloni putih-bulat-halus-lekuk; dan isolat *Azospirillum* sp. PRD2 memiliki bentuk sel batang, Gram negatif, katalase +, koloni merah - tidak teratur - muncul, keduanya mampu menambat N udara, mampu menghasilkan senyawa PGR IAA, Giberelin, dan cytokinin serta mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman jagung.

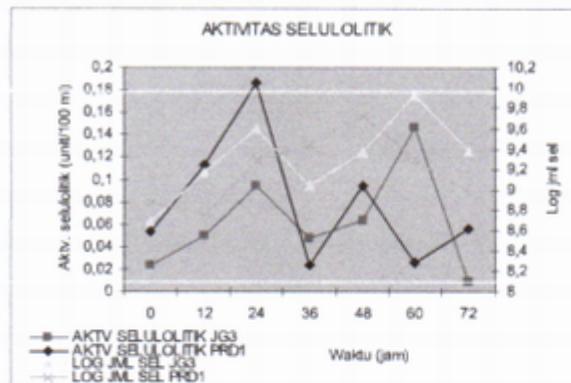
Hasil pengujian aktivitas enzim amilase selama masa inkubasi 72 jam menunjukkan bahwa kedua isolat menghasilkan aktivitas enzim amilase yang hampir sama (gambar 1). Pada masa inkubasi 12 jam aktivitas sudah tampak, dan semakin meningkat pada masa inkubasi selanjutnya. Aktivitas yang tinggi dari isolat JG3 dicapai pada masa fermentasi 24 (2,30 unit/ml) dan 48 jam pada isolat PRD2 (2,70 unit/ml). Aktivitas tersebut sesuai dengan pola pertumbuhan kedua isolat, yaitu ketika inokulum isolat JG3 memiliki laju pertumbuhan spesifik 0,081 dan isolat PRD2 memiliki laju pertumbuhan spesifik 0,055. Namun bila dilihat pada data kadar gula reduksi baik pada media fermentasi isolat JG3 maupun PRD2 menunjukkan penurunan pada masa fermentasi 48 jam, walaupun kadar tetap tinggi, sehingga tetap mendukung pertumbuhan. Gula reduksi merupakan hasil penguraian substrat amilum oleh aktivitas enzimatis isolat.



Gambar 1. Kurva aktivitas amilolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 pada media onggok dedak selama masa fermentasi 72 jam.

Aktivitas selulolitik inokulum *Azospirillum* sp JG3 dan PRD2 menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki aktivitas selulolitik mulai dari awal fermentasi yang ditunjukkan oleh peningkatan aktivitas dari 0 jam ke 12 jam. Kemampuan enzimatis

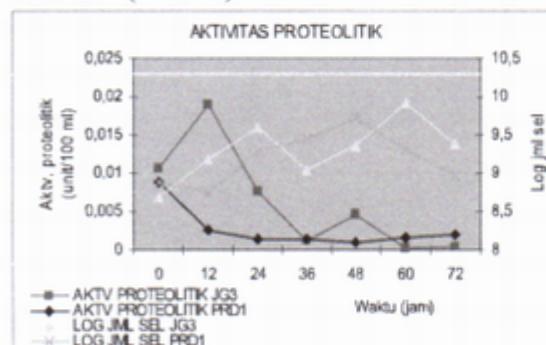
selulolitik kedua isolat sesuai dengan pola pertumbuhan inokulum seperti pada gambar 2. berikut.



Gambar 2. Kurva aktivitas selulolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 pada media onggok dedak selama masa fermentasi 72 jam.

Isolat JG3 menunjukkan aktivitas selulolitik sesuai dengan perkembangan pertumbuhan inokulum. Semakin lama masa fermentasi aktivitas semakin meningkat, aktivitas tertinggi dicapai pada jam ke 60 pada jumlah sel maksimum ( $8,32 \cdot 10^9$  sel/ml), laju pertumbuhan sel 0,106, serta kadar gula reduksi yang tinggi. Sedangkan aktivitas selulolitik isolat PRD2 semakin lama semakin menurun. Aktivitas tertinggi dicapai pada jam ke 24 pada saat hasil pertumbuhan  $1,92 \cdot 10^9$  sel/ml dengan laju pertumbuhan spesifik mencapai tertinggi 0,103. Gula reduksi pada jam ke 48 lebih rendah, menunjukkan bahwa pada masa tersebut pemakaian sumber karbon tinggi, sesuai dengan pola pertumbuhan inokulum yang meningkat dan aktivitas selulolitik yang rendah.

Aktivitas proteolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki kemampuan proteolitik rendah. Semakin lama masa fermentasi semakin rendah kemampuannya, walaupun jumlah sel meningkat (gambar 3). Hal ini diduga karena kandungan sumber N di dalam media rendah. Onggok diketahui nyaris tidak mengandung sumber N, sedangkan dedak masih mengandung sumber N dengan konsentrasi rendah (1 – 3 %).

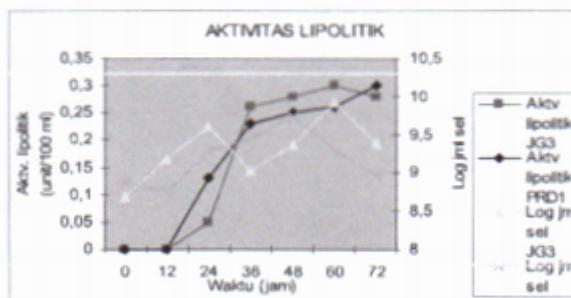


Gambar 3. Kurva aktivitas proteolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 pada media onggok dedak selama masa fermentasi 72 jam.

Isolat *Azospirillum* sp. JG3 memiliki aktivitas proteolitik di awal fermentasi dan semakin lama semakin menurun walaupun jumlah sel tinggi. Aktivitas tertinggi pada jam

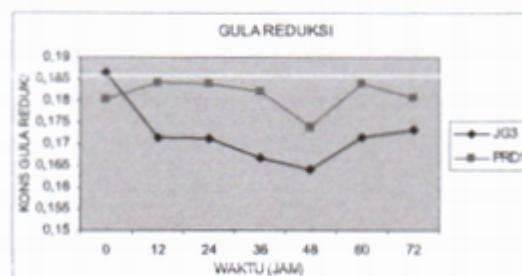
ke 12 pada saat laju pertumbuhan spesifik tinggi yaitu 0,096, sedangkan isolat PRD2 memiliki kemampuan yang lebih rendah.

Aktivitas lipolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 muncul pada pertengahan masa fermentasi yaitu setelah jam ke 12 pada saat laju pertumbuhan spesifik 0,081 (JG3) dan 1,03 (PRD2). Aktivitas mengalami peningkatan, sesuai dengan pola peningkatan jumlah sel (gambar 4). Berdasarkan pengamatan, kemungkinan inokulum belum memanfaatkan lipid sebagai sumber karbon dan sumber energi pada awal fermentasi karena kebutuhan sumber karbon terpenuhi oleh karbon lainnya, terlihat dari adanya aktivitas selulolitik dan amilolitik. Dengan demikian, kemungkinan aktivitas lipolitik belum muncul pada awal fermentasi. Biasanya lipid digunakan sebagai sumber karbon apabila sumber karbon yang mudah atau dari karbohidrat sudah mulai berkurang atau sudah tidak ada lagi (Madigan *et al.*, 2000). Namun demikian, berdasarkan pada kadar gula reduksi maka sampai dengan akhir masa fermentasi masih tersedia sumber karbon tersebut, sehingga kemungkinannya adalah aktivitas lipolitik muncul pada fase pertengahan.



Gambar 4. Kurva aktivitas lipolitik isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 pada media ongkok dedak selama masa fermentasi 72 jam.

Pengamatan terhadap kadar gula reduksi menunjukkan bahwa hingga akhir masa fermentasi 72 jam kadar masih cukup untuk mendukung pertumbuhan kedua isolat dan relatif tetap (gambar 5). Adanya gula reduksi ini menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki aktivitas enzimatis yang menguraikan komponen karbon kompleks pada substrat seperti selulosa dan amilum. Hasil penguraian karbon kompleks adalah gula turunannya dan akhirnya menghasilkan komponen gula reduksi.



Gambar 5. Kurva kadar gula reduksi isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 pada media ongkok dedak selama masa fermentasi 72 jam.

Adanya pertumbuhan inokulum kedua isolat pada media ongkok dedak cair selama masa fermentasi 72 jam juga ditunjukkan oleh adanya penurunan nilai pH media. Penurunan pH media ini disebabkan dihasilkannya senyawa-senyawa asam organik

sebagai konsekuensi proses metabolisme inokulum. Nilai pH media berkisar antara 4,91 – 6,41.

Berdasarkan pada hasil pengujian, dapat diketahui bahwa isolat *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 mampu menghasilkan aktivitas enzimatis selulolitik, amilolitik, proteolitik, dan lipolitik. Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan adanya pertumbuhan isolat pada media padat campuran onggok dan dedak. Dengan demikian, onggok dan dedak dapat dimanfaatkan sebagai media tumbuh atau media pembawa isolat *Azospirillum* sp.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan :

1. *Azospirillum* spp. mampu menghasilkan enzim selulase, amilase, protease, dan amilase
2. Aktivitas enzim *Azospirillum* sp. JG3 dan PRD2 dalam memanfaatkan dedak dan onggok sebagai substrat pertumbuhannya:
  - aktivitas selulolitik isolat JG3 tampak mulai dari awal fermentasi, paling tinggi pada masa fermentasi 60 jam
  - aktivitas selulolitik isolat PRD2 tampak mulai dari awal fermentasi, paling tinggi pada masa fermentasi 24 jam
  - aktivitas amilolitik isolat JG3 paling tinggi pada masa fermentasi 24 jam
  - aktivitas amilolitik isolat PRD2 paling tinggi pada masa fermentasi 48 jam
  - aktivitas proteolitik isolat JG3 dan PRD2 rendah
  - aktivitas lipolitik isolat JG3 dan PRD2 mulai tampak setelah masa fermentasi 12 jam

### Daftar pustaka

- Abbas, S., A. Halim, S.T. Amidarno. 1985. Limbah Pertanian Padi *dalam* Wiarno, F.G. Limbah Pertanian, Monografi, Jakarta : 268.
- Dirnawan, H., Suwanto, A. and Purwadaria, T. 2000. Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar. *Hayati* 7 (2):52-55.
- Fachda, F. 1989. Pemanfaatan Onggok dan Dedak Padi untuk Produksi Angkak oleh *Monascus purpureus*. Skripsi S1 tidak dipublikasikan. Fak. Teknologi Pertanian IPB, Bogor.
- Fardiaz, S., S. Winata dan A.Sumanto. 1987. Studi Pengembangan Fermentasi Medium Padat dalam Produksi Asam sitrat; Pengaruh Metanol dan Sumber Nitrogen. Makalah Seminar Nasional Teknologi Fermentasi. PAU Biotek ITB, Bandung.
- Faure, D., J. Desair., V. Keijers, M.A. Bekri, P. Proost, B. Henrissat, and J. Van der Leyden. 1999. Growth of *Azospirillum irakene* KBC1 on The Aryl-  $\beta$ -glucosidase Salicin Requires either salA or salB. *Journal of Bacteriology* 181 (10) : 3003-3009.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Kammimura, E.S., O. Mendieta, H.H. Sato, G. Pastore, and F. Maugeri. 1999. Production of lipase from *Geotrichum* sp. and adsorption studies of affinity resin. Departement of Food Engineering, Heste of University Compinas – SP Brazil 16 : 1
- Luh, B.S. 1980. Rice Production and Utilization. The AVI Publ.Co.INC Westport, Conecticut.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker. 2000. Brock : Biology of Microorganisms. 8<sup>th</sup> Ed. Prentice Hall International, Inc. New Jersey.
- Oedjijono, D. Ryandini, I.D.S.A.P. Peramiarti. 2004. Formulasi Biofertilizer dari Kultur Campuran Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dan Pelarut Fosfat pada Medium Onggok dan Dedak. Laporan penelitian, Fakultas Biologi Unsoed Purwokerto.
- Oedjijono dan D. Ryandini. 2006. Pemilihan Substrat Produksi Biomassa Inokulum Biofertilizer. Laporan Penelitian, Fakultas Biologi Unsoed Purwokerto.
- Parhaetani, A. 2003. Viabilitas *Azospirillum* sp. pada Medium Onggok dan Dedak dengan pH Awal Berbeda. Skripsi S1, tidak dipublikasikan. Fakultas Biologi Unsoed Purwokerto.
- Rahmawati, M. 2002. Viabilitas *Azospirillum* sp. pada Medium Carrier Campuran antara Dedak dan Onggok Tapioka dengan Suhu Inkubasi yang Berbeda. Skripsi S1, tidak dipublikasikan, Fakultas Biologi Unsoed Purwokerto.
- Schmidt-Dannert C, M. Luisa Rua, R.D. Schmidt. 1997. Two novel lipases from the thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression and properties. *Methods Enzymology* 284 : 194-219.
- Sosrosoedirdjo, R.S. 1983. Bercocok Tanam Ubi Kayu. C.V. Yasagama, Jakarta.
- Subardjo, B., J. Maryanto, Kartini, Suyata dan A. Dwiastuti. 1997. Pengembangan potensi bakteri bongkrek *Pseudomonas cocovenenans* X-188 untuk produksi gliserol, asam laktat dan lipase. *Jurnal Agrin Unsoed* 1 : 1 - 4.
- Waluyo, L. 2005. Mikrobiologi Lingkungan. Penerbit Universitas Muhammadiyah Malang UMM Press.
- Winarno, F.G. 1983. Enzim Pangan. Gramedia, Jakarta.
- Winarno, F.G. 1986. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia, Jakarta.
- Wong, D.S.W. 1995. Food Enzym : Structure and Mechanism. Chapman & Hall. New York.