

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil

5.1.1. Pengukuran Bobot Biomassa

Pengukuran bobot biomassa yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus niger* Gm 11.1 pada komposisi media I sampai dengan VI pada waktu 0 – 120 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengukuran bobot biomassa pada media I s/d VI

Media Waktu (jam)	Bobot biomassa (mg/ml)					
	I	II	III	IV	V	VI
0	0,4500	1,3875	0,1250	1,4625	2,2625	0,2000
12	2,1250	0,9125	1,1250	1,1250	2,8375	1,3375
24	1,4375	0,7375	0,8750	1,9125	7,7875	3,7875
36	1,5625	0,9125	3,2500	0,5625	8,2125	2,3250
48	1,2000	0,5625	1,4750	1,3500	10,0000	2,1750
60	1,0750	1,9625	3,8625	1,5500	9,1625	2,9250
72	1,7500	0,2875	2,7250	2,1000	5,7750	3,0875
84	1,3375	1,7625	2,2625	1,1375	6,1750	0,7375
96	1,3875	1,4250	1,8000	1,1375	9,2500	2,7750
108	1,5625	1,2875	0,1000	4,1125	6,1625	2,9125
120	0,4000	2,6125	2,6250	2,8625	3,6500	2,7250

Dari tabel di atas bobot biomassa yang tertinggi pada media V pada waktu 48 jam yaitu 10,00 mg/ml, selanjutnya berturut-turut adalah media IV (108 jam) dengan 4,1125 mg/ml,

media III (60 jam) dengan bobot 3,8625 mg/ml, media VI (24 jam) dengan bobot 3,7875 mg/ml, media II (120 jam) dengan 2,6125 mg/ml dan media I (12 jam) dengan bobot 2,1250 mg/ml.

5.1.2. Pengukuran pH Fermentasi

Pengukuran pH fermentasi yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1 pada komposisi media I s/d VI dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini :

Tabel 2. Pengukuran pH fermentasi pada media I s/d VI

Media Waktu (jam)	pH Fermentasi					
	I	II	III	IV	V	VI
0	3,86	7,38	6,77	7,13	7,28	7,16
12	3,48	7,10	6,89	7,11	7,20	7,07
24	3,17	6,75	6,60	6,76	8,18	6,90
36	2,96	7,15	7,59	6,34	8,14	6,43
48	2,09	4,43	4,01	5,67	6,86	5,89
60	1,93	3,37	3,12	4,08	7,48	5,78
72	3,20	2,53	2,91	3,21	7,02	5,06
84	1,67	2,50	3,10	2,67	7,62	5,98
96	1,87	2,03	1,67	2,51	7,58	6,05
108	1,39	1,62	1,65	2,53	6,37	6,09
120	2,29	1,58	1,72	2,55	6,20	6,11

Tabel 2 menunjukkan pengukuran pH fermentasi yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1 pada komposisi media I s/d VI, pH yang paling tinggi dihasilkan oleh mediaV pada waktu 24 jam dan paling rendah dihasilkan oleh media I pada waktu 108 jam.

5.1.3. Pengukuran Aktivitas Inulinase

Uji aktivitas yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1 pada komposisi media I s/d VI dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji aktivitas inulinase rata-rata pada media I s/d VI

Media Waktu (jam)	Aktivitas inulinase (mmol/ml/menit) x 10 ⁻⁸					
	I	II	III	IV	V	VI
0	1,0947	2,5677	1,4173	0,6099	0,4366	1,5307
12	0,8426	2,3080	1,5077	0,4475	0,5446	1,8553
24	0,8779	2,5618	1,4712	0,8479	0,8299	1,4193
36	0,5931	3,0449	1,4785	1,0322	0,3848	1,0489
48	0,9373	3,5207	3,4325	1,3465	0,7204	0,5905
60	1,7018	3,7580	7,8107	0,8906	0,6031	0,7663
72	2,9373	4,4771	4,4608	1,1726	0,2387	0,6637
84	2,0171	1,9037	4,5174	3,5524	0,4287	0,7053
96	1,8514	1,6270	3,8891	3,7176	0,8583	0,7507
108	2,7603	2,0074	4,5186	4,0379	0,5287	0,6786
120	3,2425	1,5954	3,6573	3,4675	0,5224	0,9758

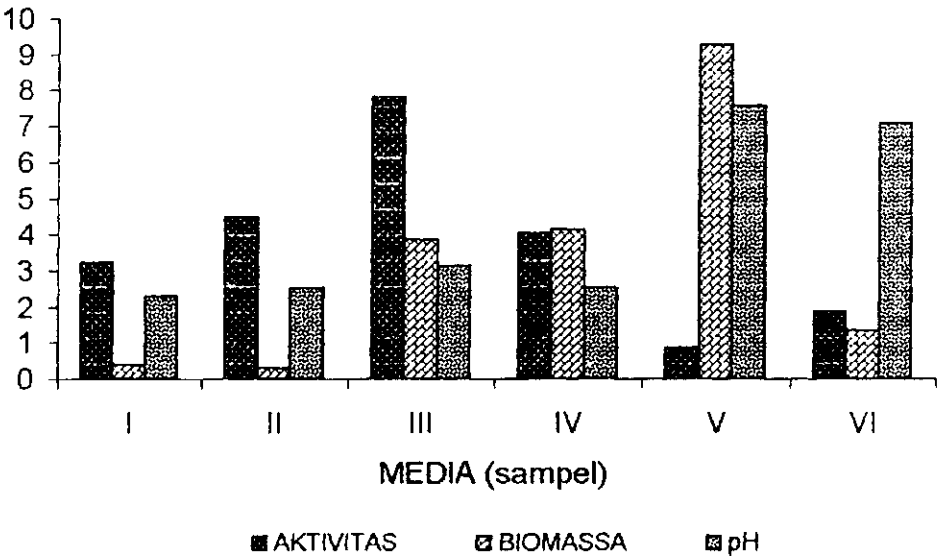
Dari tabel diatas menunjukkan aktivitas inulinase yang dihasilkan jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1. yang tertinggi adalah media III pada waktu 60 jam. Selanjutnya berturut-turut adalah media II (72 jam), media IV (108 jam), media I (120 jam), media VI (12 jam), media V (96 jam). Data aktivitas inulinase tertinggi dari media I s/d VI pada jamur *Aspergillus niger* Gmn. 11.1 dianalisis dengan metode Anava dan Duncan Jarak Berganda. Tabel 4 menunjukkan bahwa dari analisis statistik Duncan Jarak Berganda ternyata rata-rata aktivitas tertinggi dihasilkan pada komposisi media III yang berbeda nyata ($P_{0,05}$) dengan komposisi media yang lainnya.

Tabel 4. Rata-rata aktivitas inulinase bobot biomassa, pH fermentasi berdasarkan aktivitas tertinggi dari media I s/d VI

Komposisi Media	Waktu (jam)	Rata-rata Aktivitas Enzim (mmol/ml/menit)	Bobot Biomassa (mg/ml)	pH Fermentasi
I	120	$3,2425.10^{-8d}$	0,4000	2,29
II	72	$4,4771.10^{-8b}$	0,2875	2,53
III	60	$7,8107.10^{-8a}$	3,8625	3,12
IV	108	$4,0379.10^{-8c}$	4,1125	2,53
V	96	$0,8583.10^{-8f}$	9,2500	7,58
VI	12	$1,8553.10^{-8e}$	1,3375	7,07

Harga rata-rata dengan pangkat huruf berbeda adalah berbeda secara nyata pada tingkat 1% ($P_{0,01}$) berdasarkan Uji Duncan jarak Berganda.

Berdasarkan data diatas dapat dibuat grafik aktivitas inulinase, pengukuran bobot biomassa, pH fermentasi berdasarkan aktivitas tertinggi dari media I s/d VI jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1



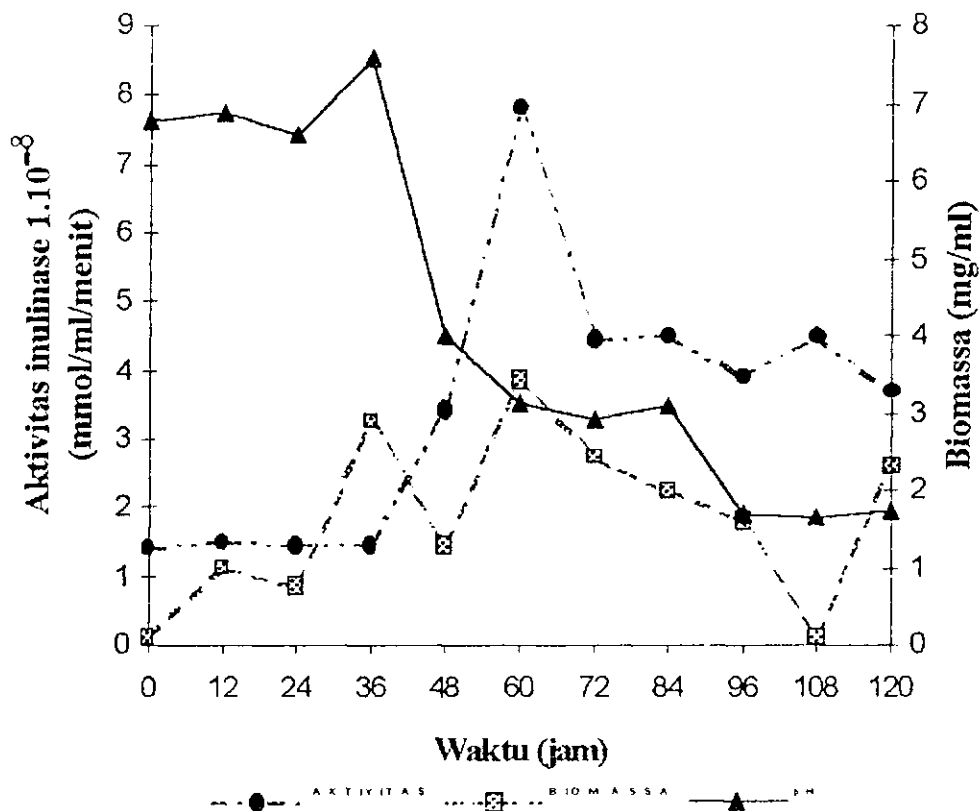
Gambar 3. Grafik aktivitas inulinase (1.10^{-8} mmol/ml/menit), bobot biomassa (mg/ml) dan pH fermentasi berdasarkan aktivitas inulinase tertinggi media I s/d media VI jamur *Aspergillus niger* Gmn. 11.1

Tabel 5 di bawah ini merupakan pengukuran aktivitas inulinase, bobot biomassa dan pH terhadap waktu fermentasi 0 – 120 jam pada komposisi media III. Pada komposisi media III (inulin 1% + (NH₄)₂HPO₄ 0,5% + MgSO₄.7H₂O 0,05%) inulinase mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan dengan enam komposisi media yang digunakan.

Tabel 5. Pengukuran bobot biomassa, aktivitas inulinase dan pH media III terhadap waktu fermentasi

Waktu (jam)	Bobot biomassa (mg/ml)	Aktivitas inulinase (mmol/ml/menit)	pH fermentasi
0	0,125	$1,4173 \cdot 10^{-8}$	6,77
12	1,1250	$1,5077 \cdot 10^{-8}$	6,89
24	0,8750	$1,4712 \cdot 10^{-8}$	6,60
36	3,2500	$1,4785 \cdot 10^{-8}$	7,59
48	1,4750	$3,4325 \cdot 10^{-8}$	4,01
60	3,8625	$7,8107 \cdot 10^{-8}$	3,12
72	2,7250	$4,4608 \cdot 10^{-8}$	2,91
84	2,2625	$4,5174 \cdot 10^{-8}$	3,10
96	1,8000	$3,8891 \cdot 10^{-8}$	1,67
108	0,1000	$4,5186 \cdot 10^{-8}$	1,65
120	2,6250	$3,6573 \cdot 10^{-8}$	1,72

Dari Tabel 5 (pengukuran bobot biomassa, aktivitas inulinase dan pH fermentasi media III dapat dibuat grafik hubungan antara aktivitas inulinase, bobot biomassa dan pH terhadap waktu fermentasi.

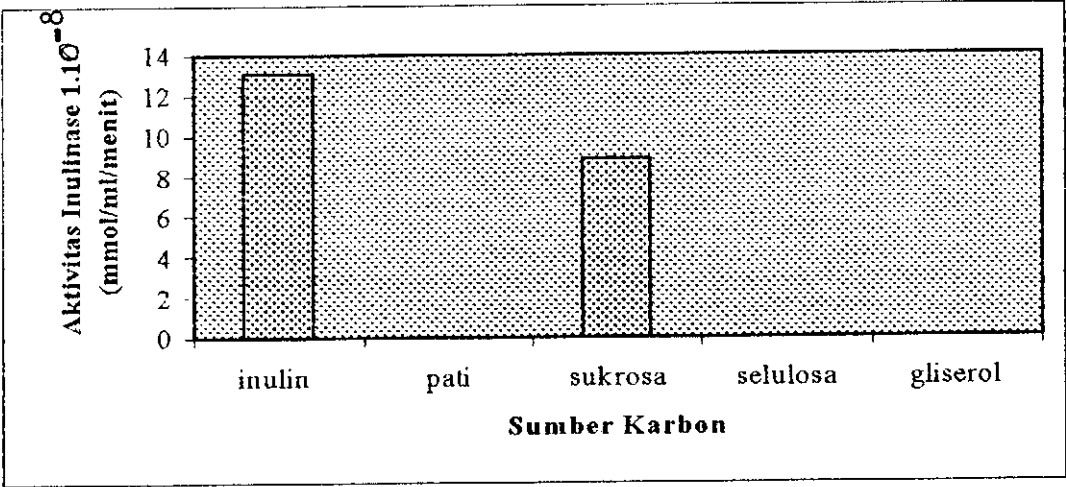


Gambar 4. Hubungan antara aktivitas inulinase , bobot biomassa dan pH terhadap waktu fermentasi pada media III

5.1.4. Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi / Aktivitas Inulinase

Berbagai sumber karbon yang berbeda yaitu inulin, pati sukrosa, selulosa, dan gliserol ditambahkan pada media (basal medium) dan diselidiki pengaruhnya terhadap produksi (aktivitas) inulinase. Pengaruh berbagai sumber karbon ini diuji pada pH 4,5 dan temperatur 50°C berdasarkan penelitian Saryono dkk. 1998 (Seri Kajian Ilmiah) mendapatkan hasil sebagai berikut:

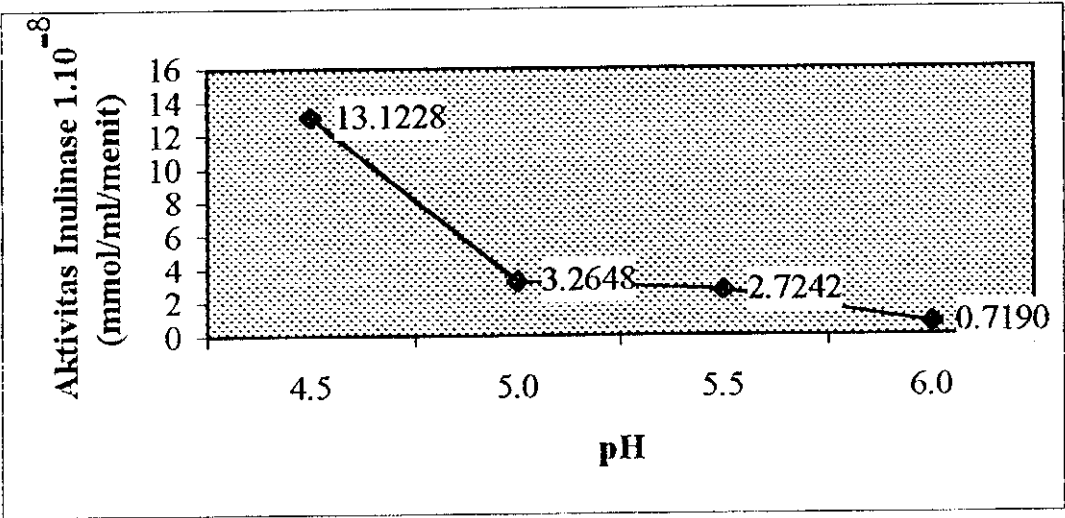
Gambar 5. menunjukkan aktivitas inulinase yang tertinggi terdapat pada penambahan sumber karbon inulin ($13,1228 \times 10^{-8}$ mmol/ml/menit) diikuti oleh sukrosa, sedangkan pati, selulosa, dan gliserol aktivitas inulinasanya nol.



Gambar 5. Grafik pengaruh sumber karbon terhadap aktivitas inulinase

5.1.5. Pengaruh pH Fermentasi terhadap Produksi Inulinase *Aspergillus niger*
Gmn 11.1 dengan Induser Inulin

Produksi inulinase dengan induser inulin diuji pada temperatur optimal 50°C pada pH 4,5 ; 5,5; 6,0.

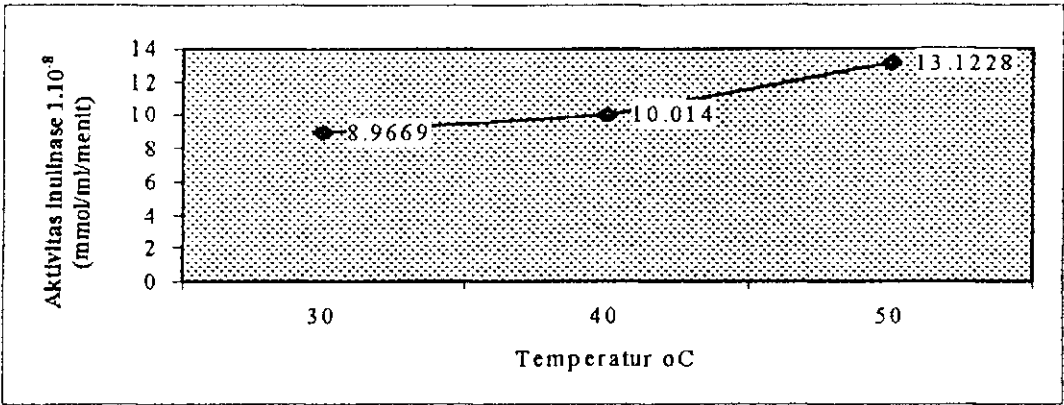


Gambar 6. Pengaruh pH terhadap aktivitas inulinase dengan induser inulin

Aktivitas inulinase tertinggi terlihat pada pH 4,5 ($13,1228 \times 10^{-8}$ mmol/ml/menit) diikuti pada pH 5,0; 5,5; 6,0 pada temperatur 50°C.

5.1.6. Pengaruh Temperatur Fermentasi terhadap Produksi Inulinase *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan Induser Inulin

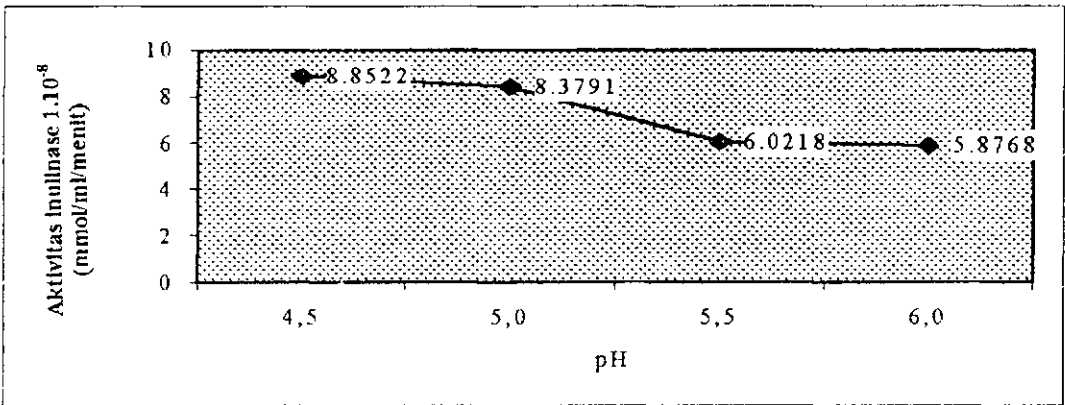
Pengaruh temperatur terhadap produksi inulinase yang diuji pada pH 4,5 dan temperatur 30°C, 40°C, dan 50°C dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh temperatur terhadap produksi inulinase dengan induser inulin

5.1.7. Pengaruh pH Fermentasi terhadap Produksi Inulinase *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan Induser Sukrosa

Pengaruh pH terhadap produksi inulinase oleh *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan induser sukrosa diuji pada temperatur 50°C.

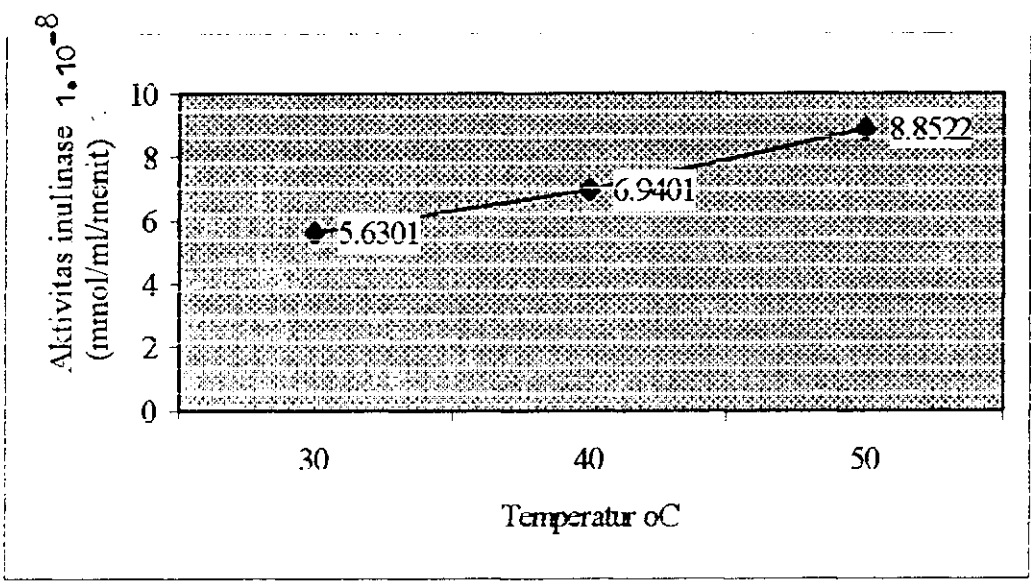


Gambar 8. Pengaruh pH terhadap aktivitas inulinase dengan induser sukrosa

Pengaruh inulinase oleh *Aspergillus niger* Gmn 11.1 tertinggi pada pH 4,5 sebesar $8,8522 \times 10^{-8}$ mmol/ml/menit diikuti oleh pH 5,0; 5,5; dan 6,0.

5.1.8. Pengaruh Temperatur Fermentasi terhadap Produksi Inulinase *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan Induser Sukrosa

Pengaruh berbagai temperatur 30°C, 40°C dan 50°C terhadap produksi inulinase oleh *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan induser sukrosa diuji pada pH 4,5 didapat hasil sebagai berikut:



Gambar 9. Pengaruh temperatur terhadap aktivasi inulase dengan induser sukrosa

Ternyata aktivitas inulinase tertinggi terdapat pada temperatur 50°C sebesar $8,8522 \times 10^{-8}$ mmol/ml/menit, yang terendah pada temperatur 30°C yaitu $4,2804 \times 10^{-8}$ mmol/ml/menit.

5.1.9. Pengaruh pH terhadap Produksi Inulinase oleh *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dengan Induser Pati, Selulosa dan Gliserol

Dari hasil penelitian yang dilakukan pada pH 4,5 dan temperatur 50°C ternyata tidak ada aktivitas inulinase pada ketiga sumber karbon baik pati, selulosa dan gliserol. Media dengan sumber karbon gliserol selain ditentukan aktivitas inulinase juga ditentukan bobot biomasnya sebesar 0,2784 mg.

5.2. Pembahasan

Produksi inulinase ekstraselular dari menggunakan alat fermentor. Fermentasi dengan menggunakan alat fermentor secara batch mempunyai beberapa kelebihan antara lain :

- a) Jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan.
- b) Kondisi optimal untuk pertumbuhan dapat diatur.
- c) Pemakaian medium lebih efisien.

Fermentor itu berfungsi memberikan kondisi lingkungan yang optimal agar sistem biologi dapat tumbuh dan memproduksi metabolit yang diinginkan.

Peremajaan jamur *Aspergillus niger* Gmn 11.1 dilakukan pada medium agar miring. Penggunaan stater yang telah diremajakan dan difermentasikan agar proses fermentasi berlangsung cepat. Dalam proses fermentasi diharapkan pertumbuhan mikroba dapat menghasilkan enzim, sedangkan pertumbuhan mikroba sendiri banyak ditentukan oleh faktor-faktor alamiah karena fermentasi merupakan proses alami sehingga faktor lingkungan sangat mempengaruhi.

Pada penelitian ini digunakan inulin untuk medium cair produksi inulinase. Inulin berfungsi sebagai sumber karbon dan dapat merangsang produksi inulinase berdasarkan

setiap komposisi medium cair produksi enzim (inokulum) digunakan inulin 1% yang berfungsi sebagai sumber nutrisi awal. Menurut Watson (1992) jamur *Aspergillus niger* Gm 11.1 akan terinduksi memproduksi enzim sesuai dengan sumber karbon yang diberikan.

Pengukuran bobot biomassa setiap 12 jam pengambilan sampel pada media I s/d VI menunjukkan ketidakaturan. Hal ini disebabkan karena sampel yang tidak homogen karena banyaknya hifa yang menempel pada dinding tabung dan selang fermentor sehingga setiap pengambilan sampel jumlah massa sel yang diambil berbeda-beda. Oleh karena itu diperlukan cara lain dalam pengukuran biomassa tersebut, seperti dilakukan nya pengambilan sampel pada tabung yang berbeda. Cara ini dilakukan dengan mengambil semua sampel dari seluruh cairan kultur kemudian disentrifuga, dicuci dengan aquades dan dikeringkan, ditimbang dengan metode gravimetri.

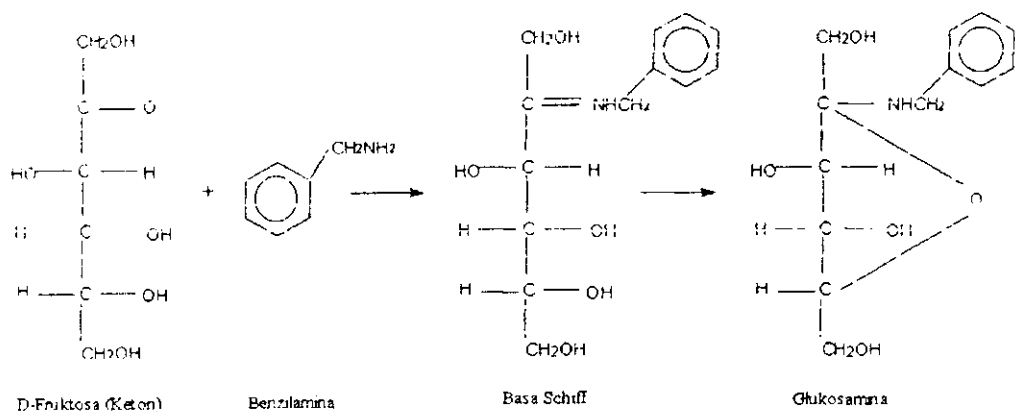
Pertumbuhan mikrobial biasanya dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa sel atau jumlah sel. Pertumbuhan dapat dipandang sebagai suatu seri reaksi kimiawi ke arah sintesis massa sel. Hasil pengukuran biomassa dinyatakan dalam mg/ml. Menurut Said (1987) jika dapat dihasilkan pertumbuhan vegetatif yang baik dari *Aspergillus niger* dan produksi enzim optimum dapat dipertahankan maka gula yang diproduksi sebagian besar akan dimetabolisme ke arah produksi daripada pembentukan massa sel.

Semakin lama waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik mikroba semakin naik sampai diperoleh fase stasioner kemudian menurun sampai akhirnya pertumbuhan berhenti. Penurunan dan berhentinya pertumbuhan disebabkan karena nutrisi-nutrisi esensial dalam medium semakin berkurang dengan bertambahnya waktu fermentasi atau terjadi akumulasi antitoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan atau kombinasi dari keduanya.

Dari hasil terlihat bahwa bobot biomassa paling tinggi dihasilkan pada media V yaitu 10,000 mg/ml dengan aktivitas 0.7204×10^{-8} mmol/ml/menit selama 48 jam fermentasi dengan pH 6,86.

Pengukuran pH bertujuan untuk mengetahui pH fermentasi pada media yang digunakan. Kita mengetahui bahwa reaksi enzim mempunyai pH optimum untuk pertumbuhan. PH medium optimum pertumbuhan kadang kala sama atau berbeda dengan pH medium optimum untuk pembentukan produk enzim, karena aktivitas enzim pada proses metabolisme sel dan untuk biosintesis enzim mempunyai kisaran optimum yang berbeda.

Aktivitas inulinase diukur dengan metode orto toluidin dikarenakan metode ini lebih mudah dan cepat. Reagen yang digunakan sedikit dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Dalam metode ini asam asetat glasial bereaksi dengan orto toluidin membentuk glukosamina dan basa schiff yang berwarna hijau dan warna ini distabilkan oleh thio urea.



Inulinase yang bersifat eksoenzim yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus niger* Gambar 11.1 akan merombak molekul inulin menjadi molekul yang lebih sederhana seperti fruktosa. Senyawa sederhana yang dihasilkan dari proses perombakan ini akan dapat diserap dengan mudah oleh sel mikroba dan dimanfaatkan untuk memacu pertumbuhan.

Menurut Saryono (1999) senyawa ini tidak dapat diserap oleh jamur penghasil inulinase itu sendiri tetapi juga dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme lain.

Hasil analisis statistik ANAVA dan uji Duncan Jarak Berganda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0.01$) aktivitas inulinase dari tiap-tiap media yang digunakan. Aktivitas inulinase pada keenam media yang digunakan tidak sama, hal ini kemungkinan terjadi karena jumlah konidial yang digunakan untuk produksi enzim tidak tepat sama dan karena komposisi media dan pH awal fermentasi yang berbeda. Hal ini juga dapat dipengaruhi oleh fluktuasi suhu kamar selama inkubasi untuk produksi enzim inulinase yang sangat dipengaruhi cuaca. Disamping itu juga ada pengaruh kontaminasi yang dapat menurunkan aktivitas inulinase meskipun tidak sampai menyebabkan aktivitas enzim hilang sama sekali. Komposisi media yang digunakan juga dapat mempengaruhi aktivitas inulinase. Apabila komposisi media yang digunakan tidak cocok maka jamur tidak akan tumbuh dengan baik atau jamur dapat tumbuh tetapi tidak dapat memproduksi inulinase dengan baik.

Data yang diperoleh dari penelitian ini memperlihatkan bahwa kultur murni *Aspergillus niger* Grm 11.1 dari Batu Malang, Jawa Timur ini mampu memproduksi inulinase dan mempunyai aktivitas inulinase pada keenam media yang digunakan. Aktivitas tertinggi pada media III yaitu $7,8107 \cdot 10^{-8}$ mmol/ml/menit dengan bobot biomassa 3,8625 mg/ml selama 60 jam fermentasi dan pH-nya menunjukkan pH 3,12. Komposisi media yang terbaik terdapat pada media III karena pada komposisi media tersebut inulinase memiliki aktivitas inulinase tertinggi, berarti pada media tersebut jamur mampu memproduksi inulinase secara maksimal.

Grafik pengaruh sumber karbon terhadap aktivitas inulinase (Gambar 5) ternyata inulin merupakan induser terbaik dibandingkan sumber karbon lainnya. *Aspergillus niger* selain mengandung inulinase juga mengandung invertase (Workman dan Day, 1983).

Tingginya aktivitas inulinase pada sukrosa kemungkinan disebabkan karena yang menghidrolisa inulin bukan hanya inulinase tetapi juga invertase. Dalam penelitian ini yang diukur hanya konsentrasi gula reduksi yang terhidrolisis sehingga kita tidak dapat menentukan enzim yang mana yang memecah inulin, karena kedua enzim tersebut dapat menghidrolisis inulin.

Untuk menentukan enzim tersebut termasuk inulinase atau invertase adalah dengan mengukur aktivitasnya pada substrat inulin dan sukrosa. Besarnya rasio aktivitas inulinase (I) dengan invertase (S) akan menentukan penggolongan enzim (Ettalibi dan Baratti *cit* Zul, 1999). Jika rasio $I/S > 10^{-2}$ dinyatakan sebagai inulinase sedangkan bila $I/S < 10^{-4}$ digolongkan invertase. Tidak adanya aktivitas inulinase pada pati, selulosa dan gliserol disebabkan karena ketiga sumber karbon ini tidak memiliki ikatan β -2-1 fruktofuranosida yang mampu dikenali inulinase. Sedangkan inulin dan sukrosa memiliki ikatan β -2-1 fruktofuranosida sehingga kedua sumber karbon tersebut mampu menginduksi produksi inulinase.

Pengaruh pH fermentasi terhadap produksi inulinase dengan variasi pH 4,5; 5,0; 5,5 dan 6,0 pada temperatur 50°C menunjukkan pada pH 4,5 mampu menginduksi produksi inulinase dengan aktivitas tertinggi $13,1228 \cdot 10^{-8}$ mmol/ml/menit. Menurut Xiao dkk. (1988) dengan strain yang berbeda *Chrysosporium pannorum* produksi inulinase tidak berbeda secara nyata pada pH 4,5–5,5 (15–21 unit/ml).

Perlakuan berbagai temperatur 30–50°C mampu menginduksi produksi inulinase dengan aktivitas tertinggi. *Aspergillus niger* Gm 11.1 masih mampu hidup pada temperatur 50°C berarti jamur tersebut bersifat termotoleran. Menurut Pelczar dan Chan (1986) temperatur optimum pertumbuhan jamur adalah 22–30°C, terutama jamur yang bersifat saprofit.