

PENGARUH pH DAN KATION TERHADAP AKTIFITAS ENZIM β-GLUKOSIDASE YANG DIHASILKAN DARI *A. foetidus* (Naka.)

Trirakhma Sofihidayati
Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Pakuan Bogor
Email: sofihidayati9@gmail.com

ABSTRAK

Selulase adalah enzim yang terlibat dalam proses degradasi selulosa. Enzim ini merupakan campuran dari enzim endoglukanase, eksoglukanase, dan β-glukosidase. Limbah agro industri yang diolah menggunakan kapang *Aspergillus foetidus* diperkirakan dapat dimanfaatkan sebagai sumber enzim selulase untuk mendegradasi limbah dengan biaya yang lebih murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan kation terhadap aktivitas enzim β-glukosidase yang dihasilkan dari kapang *A. foetidus* (Naka.). Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim β-glukosidase dari *A. foetidus* yang diinkubasi pada suhu ruang di medium yang mengandung 3% polard selama 6 hari menghasilkan aktivitas sebesar 3.56 U/mL. Aktivitas optimum enzim α-glukosidase terjadi pada kondisi medium dengan pH 5.0 dan suhu 60 °C. Enzim α-glukosidase relatif stabil pada pH 4,2 – 5,0 dan suhu penyimpanan 28 dan 40 °C, tetapi tidak stabil pada suhu 80 °C. Aktivitas β-glukosidase meningkat dengan adanya penambahan kation-kation Mg²⁺, Ba²⁺, dan Mn²⁺ dengan konsentrasi akhir 1 mM dan 5 mM. Penambahan 1 mM ion Fe²⁺ menurunkan aktivitas enzim, tetapi penambahan 5 mM ion Fe²⁺ meningkatkan aktivitas enzim sebesar 39%.

Kata kunci: Enzim α-glukosidase, *A. foetidus*, degradasi selulosa

THE EFFECT OF pH AND ADDITION OF CATIONS ON THE ACTIVITES OF β-GLUKOSIDASE PRODUCED FROM *Aspergillus foetidus* (Naka.)

ABSTRACT

The α-glucosidase is the enzyme involved in the degradation process of cellulose. This enzyme was expected could be produced from the fermentation of agro-industry waste product using *A. foetidus* (Naka.) mold. This study was aimed to determine the effect of pH and addition of cations on the activity of α-glucosidase enzyme from *A. foetidus*. The results show that the highest activity of β-glukosidase produced from *A. foetidus* which was grown on the medium contained 3% wheat pollard in room temperature reached at days 6 of incubation period. The activity was as much as 3.56 U/mL. The optimum activity β-glucosidase was reached at pH 5.0 and temperature 60° C. The stable condition of the β-glucosidase is observed in the pH ranged from 4.2 to 5.0. Addition of Mg²⁺, Ba²⁺, and Mn²⁺ cations at concentration of 1 mM and 5 mM proved increasing the activity of the enzyme meanwhile addition of 1 mM Fe³⁺ decreased the activity of the enzyme. On the contrary, the addition of 5 mM increases the enzyme activity up to 39%.

Keywords : β-glucosidase, *A. foetidus*, cellulose degradation

PENDAHULUAN

Selulase adalah enzim yang terlibat dalam proses degradasi selulosa, yaitu komponen utama yang memiliki polimer ikatan β antar molekul glukosa didalamnya. Enzim ini merupakan campuran dari enzim endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase. Enzim β -glukosidase memutuskan ikatan $\beta(1\rightarrow4)$ glikosida antara 2 molekul glukosa atau molekul selobiosa dan mengkatalis proses hidrolisis residu ujung non pereduksi pada β -D-glukosa dengan melepaskan unit glukosa. Enzim selulase dibutuhkan oleh organisme seperti jamur, bakteri, rayap, maupun hewan ruminansia untuk bisa mengkonsumsi senyawa selulosa. Saat enzim endoglukanase dan eksoglukanase mendegradasi selulosa, akan dihasilkan molekul selobiosa yang pada akhirnya akan menghambat aktivitas kerja enzim-enzim tersebut. Pada fase ini dibutuhkan peranan enzim β -glukosidase untuk dapat menghidrolisis selobiosa menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu glukosa. Beberapa penelitian melaporkan bahwa limbah agro industri dapat menjadi substrat yang baik untuk memproduksi enzim α -amilase dan β -glukosidase. Penelitian-penelitian lain juga menunjukkan bahwa beberapa spesies kapang juga dapat menghasilkan enzim-enzim ini. Limbah agroindustri dan kapang jika digunakan secara bersamaan keduanya diperkirakan dapat digunakan secara sinergis untuk meningkatkan daya degradasi limbah-limbah pertanian dengan biaya yang lebih murah, karena penggunaan enzim komersial untuk proses degradasi limbah pertanian dan industri sangat tidak ekonomis (Rajasekar, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan kation terhadap aktivitas enzim α -glukosidase yang dihasilkan dari kapang *A. foetidus*.

METODE PENELITIAN

Bahan

Isolat kapang *A. foetidus* (Naka.) koleksi Balai Penelitian Ternak Ciawi. *pollard* (dedak gandum untuk pakan ternak) dari PT. Indofeed-Bogor, *potato dextrose agar* (PDA), medium Manels, medium Dubos.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pipet mikro, autoklaf, alat sentrifugal berpendingin, spektrofotometer, jarum ose, pH meter, *vorteks*, neraca analitik, *rotary shaker*, blender, dan peralatan gelas.

CARA KERJA

Pembuatan Polard NaOH

Kedalam 1 liter larutan NaOH 0.5% (b/v) ditambahkan sebanyak 50 gram *polard* kering. Campuran dididihkan selama 60 menit dalam penangas air. Setelah didinginkan sampai suhu kamar, campuran disaring dengan kain tipis dan dicuci dengan air sampai air perasan mempunyai pH netral. Selanjutnya *polard* NaOH dikeringkan dengan *blower* pada suhu 40° C. *Polard* yang telah kering kemudian digiling dengan blender.

Produksi Enzim β -glukosidase

Isolat *A. foetidus* untuk memproduksi enzim α -glukosidase ditanam pada media agar miring PDA dan diinkubasi selama 5 hari (Haryati *et al.* 1997). Spora yang dihasilkan kemudian disuspensikan ke dalam 5 mL larutan NaCl 0.85% menjadi larutan inokulum. Sebanyak 2 mL larutan inokulum diinokulasikan pada 50 mL media Mandels yang mengandung 3% *polard* NaOH, 0.3% ekstrak khamir, dan 0.075% *bacto pepton*, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 150 rpm selama 6 hari. Untuk mengetahui aktivitas enzim, dilakukan pengujian pada hari ke 5, 6 dan 7.

Penentuan Aktivitas β -glukosidase

Aktivitas enzim β -glukosidase ditentukan dengan mengukur pelepasan *p*-nitrofenol dari *p*-NPG (Lin *et al.* 1999). Filtrat enzim, larutan buffer asetat pH 5.0 dan substrat *p*-NPG 0.3% (b/v) diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50 °C. Absorban diukur pada panjang gelombang 400 nm.

Penentuan pH dan Suhu Optimum Enzim

Penentuan pH optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada kisaran pH 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8 dan 6.2. Sedangkan penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada variasi suhu 40, 50, 55, 60, 65, dan 70° C.

Penentuan pH Stabilitas enzim

Penentuan pH stabilitas dilakukan dengan menginkubasi enzim dalam buffer asetat (pH 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, dan 6.2) pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi berakhir, aktivitas enzim ditentukan pada kondisi pH optimum dan suhu optimum.

Aktivitas enzim β -glukosidase ditentukan dengan mengukur pelepasan *p*-nitrofenol dari *p*-NPG. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 400 nm. Kadar *p*-nitrofenol yang dihasilkan ditentukan berdasarkan kurva standar. Aktivitas β -glukosidase dinyatakan dalam satuan Unit/mL. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis pembentukan satu mikromol (10^{-6} mol) *p*-nitrofenol per-menit pada kondisi percobaan.

Penetapan Aktivitas Enzim Terhadap Pengaruh Kation

Pengaruh ion logam ditentukan dengan menambahkan masing-masing, FeCl₃, MgCl₂, BaCl₂, dan MnCl₂ dengan konsentrasi akhir 1 dan 5 mM dalam campuran reaksi. Komposisi campuran reaksi terdiri dari, enzim, substrat *p*-NPG 0.3%, dan bufer asetat, selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada kondisi suhu dan pH optimum. Aktivitas β -glukosidase ditentukan dengan mengukur pelepasan *p*-nitrofenol dari *p*-NPG.

$$\text{Aktivitas } \beta\text{-glukosidase} = \frac{[\text{nitrofenol}]_{\text{sampel}} (\mu\text{g/mL}) - [\text{nitrofenol}]_{\text{kontrol}} (\mu\text{g/mL})}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{BMnitrofenol (139 } \mu\text{g}/\mu\text{mol)}} \times \text{fp}$$

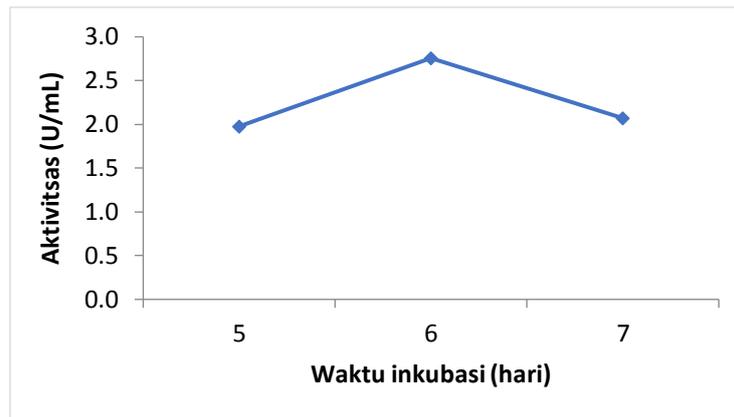
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan pH dan Suhu Optimum Enzim

Penetapan pH maupun suhu optimum mutlak dilakukan sebagai prasyarat penetapan aktivitas enzim karena perubahan suhu maupun pH dapat mempengaruhi stabilitas enzim ataupun afinitas enzim sebagai aktivator dan inhibitor. Dengan diketahuinya pH dan suhu optimum, aktifitas selulolitik yang mikroba dapat diaplikasikan secara

optimal untuk mendegradasi selulosa secara maksimal

Hasil uji penetapan aktivitas enzim β -glukosidase isolat kapang *A. foetidus* diperoleh data bahwa aktifitas optimum enzim sebesar 2.76 U/mL dicapai pada hari inkubasi ke 6. Gambar 1 menampilkan aktivitas enzim β -glukosidase pada lama inkubasi yang berbeda.

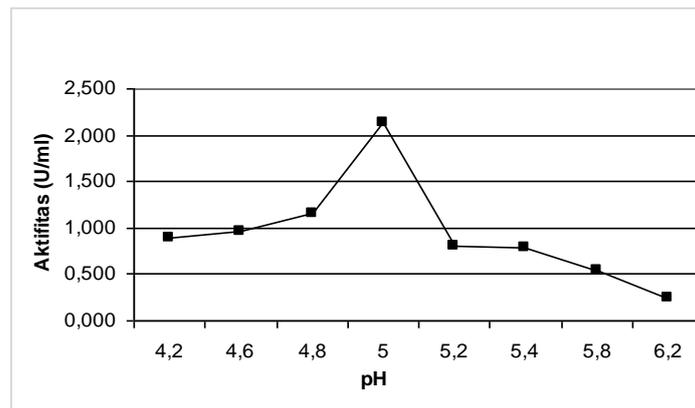


Gambar 1. Aktivitas β -glukosidase terhadap variasi waktu inkubasi

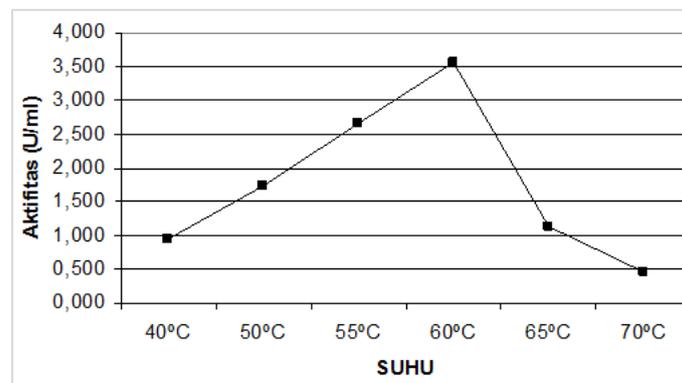
Pengujian aktivitas enzim α -glukosidase pada berbagai kondisi pH ditampilkan Gambar 2. Pada gambar terlihat bahwa β -glukosidase mempunyai pH optimum 5.0, dengan aktivitas sebesar 2.13 U/mL. Pada pH 5.2, aktivitasnya turun sebesar 61% menjadi 0.81 U/mL, sedangkan pada pH 4.8, β -glukosidase mempunyai aktivitas sebesar 1.15 U/mL. Sebagian besar kapang umumnya mempunyai pH optimum dibawah 7, dan sebagian besar enzim umumnya mempunyai pH optimum antara 4-8. Pada penelitian sebelumnya, Setyaningsih (2007) menyatakan bahwa pH optimum enzim β -glukosidase yang dihasilkan *A. niger* adalah 4.5, sedangkan Oktavia (2014) menemukan aktivitas optimum β -glukosidase pada isolat kapang *EN* (isolat dari *Enhalus sp*) yang dikulturkan pada media yang mengandung limbah agar-agar terjadi pada pH 4. Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa pH optimum enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari

limbah rumput laut adalah pada pH 5.0 Dini (2017).

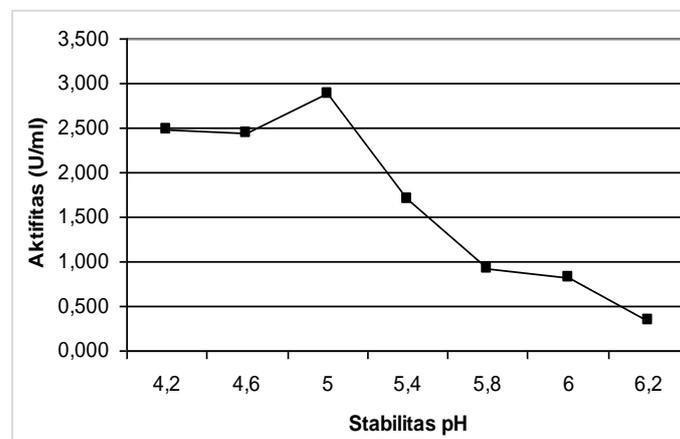
Selain pH, suhu medium juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Pada Gambar 3, terlihat bahwa β -glukosidase mempunyai suhu optimum 60° C, dengan aktivitas sebesar 3.56 U/mL. Pada kondisi diatas suhu optimum, aktivitas β -glukosidase menurun 68%, menjadi 1.12 U/mL, bahkan pada suhu 70° C, aktivitasnya tinggal 13% atau sebesar 0.45 U/mL. Namun pada kondisi sedikit dibawah dibawah suhu optimum, yaitu pada suhu 50° C, aktivitas enzim β -glukosidase relatif stabil, walaupun aktivitasnya turun sebesar 51% menjadi 1.74 U/mL, sedangkan pada suhu 40° C aktivitasnya hanya 0.95 U/mL. Suhu optimum pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Setyaningsih (2007) yang menemukan suhu 60° C sebagai suhu optimum aktivitas enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. niger*.



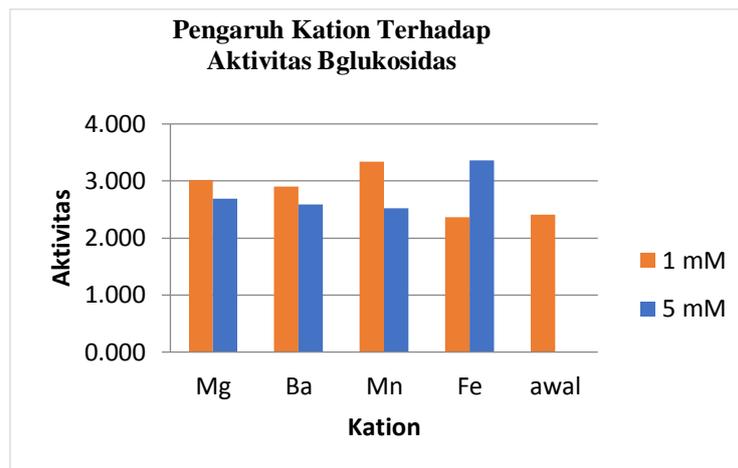
Gambar 2. Aktivitas β -glukosidase terhadap variasi pH



Gambar 3. Aktivitas β -glukosidase terhadap variasi suhu



Gambar 4. Stabilitas β -glukosidase terhadap variasi pH



Gambar 5. Pengaruh kation terhadap aktivitas β-glukosidase

Peningkatan aktivitas enzim yang tajam, yaitu 46% pada pH optimum berkaitan dengan perubahan yang terjadi pada struktur atau muatan gugus ionik enzim yang terdapat pada sisi aktif enzim. Hal ini mengakibatkan konformasi sisi aktif enzim menjadi lebih efektif dalam mengikat substrat, yang selanjutnya akan diubah menjadi produk. Pada pH yang rendah enzim akan mengalami protonisasi sehingga kehilangan muatan negatifnya, sedangkan pada pH yang tinggi substrat akan mengalami ionisasi dan kehilangan muatan positifnya. Dengan berubahnya muatan, maka struktur tersier atau kuarterner akan berubah, akibatnya protein β-glukosidase akan terbuka dan kehilangan aktivitasnya.

Pengaruh kation terhadap aktivitas β-glukosidase

Pengaruh kation terhadap aktivitas enzim β-glukosidase yang dikarakterisasi menggunakan senyawa-senyawa FeCl_3 , MgCl_2 , BaCl_2 , dan MnCl_2 ditampilkan pada Gambar 5. Penambahan 1 mM dan 5 mM masing-masing senyawa MgCl_2 , BaCl_2 , dan MnCl_2 dapat meningkatkan aktivitas β-glukosidase, sedangkan penambahan 1 mM FeCl_3 menurunkan aktivitas β-glukosidase sebesar 2%. Namun penambahan 5 mM senyawa FeCl_3 ternyata mampu meningkatkan aktivitas β-

glukosidase hingga 60%. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil-hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut juga dapat ditingkatkan dengan penambahan 10 mM FeCl_3 , sedangkan penambahan 10 mM kation Zn^{2+} justru menurunkan aktivitas enzim (Dini, 2017).

Sebagian enzim mengandung ion logam yang terikat erat atau memerlukan ion logam untuk aktivitasnya. Ion logam dapat meningkatkan pengikatan substrat dan proses katalisis dengan membentuk beberapa jenis kompleks jembatan dari enzim, logam dan substrat. Tetapi kelebihan ion logam dapat menghambat aktivitas enzim karena senyawa nukleotida di- dan tri-fosfat yang membentuk kompleks yang stabil dengan kation tersebut. Selain ion Fe^{3+} dan Mg^{2+} yang berfungsi dalam protein heme, ion-ion logam yang paling sering terlibat dalam katalisis enzimatis adalah Mn^{2+} dan Ca^{2+} . Keempat kation tersebut bekerja mengaktifkan enzim selulase dari bakteri PMP-0126Y (Munifah, 2013).

SIMPULAN

Aktivitas β-glukosidase maksimum dari *A. foetidus* (Naka.) dihasilkan pada hari ke 6 inkubasi pada media Mandels dengan penambahan 3% *polard*. Nilai pH

optimum bagi aktivitas β -glukosidase *A. foetidus* (Naka.) berada pada 5.0 dan suhu optimum pada 60 °C. Beta-glukosidase relatif stabil pada pH 4.2 - 5.0 dan pada penyimpanan suhu 28 °C dan 40 °C, tetapi tidak stabil pada suhu 80 °C. Aktivitas β -glukosidase meningkat dengan adanya penambahan kation-kation Mg^{2+} , Ba^{2+} , dan Mn^{2+} dengan konsentrasi akhir 1mM dan 5mM, sedangkan penambahan 1mM ion Fe^{2+} justru menurunkan aktivitas enzim tetapi penambahan 5 mM ion Fe^{2+} meningkatkan aktivitas sebesar 39%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bagaimana memproduksi dan mengisolasi enzim beta-glukosidase dari *A. foetidus*, kemudian mengaplikasikannya secara optimal sebagai enzim selulase yang bermanfaat untuk mendegradasi limbah-limbah agroindustri.

DAFTAR PUSTAKA

- Dini, I.R. dan I. Munifah. 2014. Produksi dan karakterisasi enzim selulase ekstrak kasar dari bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian*. 6(3).
- Hermansyah, H. dan R. Rizky. 2014. Produksi enzim hidrolisis α -amilase dan β -glukosidase dari *Aspergillus niger* dalam substrat sekam padi, bagas dan tongkol jagung dengan metode fermentasi solid. *Rekayasa Bioproses*. Program Studi Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.
- Oktavia, Y., A. Andhika, T. Nurhayati dan T. Kustiariyah. 2014. Karakterisasi enzim kasar selulase kapang Endofit dari lamun. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 6 (1): 200-218.
- Rajasekar, A. 2013. Production and optimization of amylases using *Aspergillus niger*. *International Journal of Scientific and Engineering Research*. 4(7): 2497.
- Setyaningsih, D., K. Tresnawati, M. T. Soehartono dan A. Apriyantono. 2007. Pengaruh aktivitas β -glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanili. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 16 (1): 28-35.
- Munifah, I. 2014. Produksi dan karakterisasi enzim selulase dari limbah pengelolaan rumput laut. *Jurnal Teknologi Pengelolaan Limbah*. 16 (3): 221-228.

