

PENGARUH pH DAN KATION TERHADAP AKTIVITAS ENZIM β -GLUKOSIDASE *Aspergillus foetidus* (Naka.)

Trirakhma Sofihidayati

Beta-glucosidase enzyme production from *Aspergillus foetidus* (Naka.) on the medium which contained 3% wheat pollard, in room temperature and incubation time of 6 days produced activity as much as 3.56 U/ml. The optimum level of activity β -glucosidase is reached when the pH 5.0 as well as temperature 60° C. The stable condition of the β -glucosidase is observed in the range pH 4.2 – 5.0.

The activity of β -glucosidase increases when added by cations Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Mn^{2+} at concentration of 1 mM, and by Fe^{3+} at concentration of 5 mM.

Key word : cellulolytic enzyme, β -glucosidase and characteristic

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 dengan menggunakan kapang diperkirakan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan daya cerna limbah tersebut dengan biaya yang lebih murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan kation terhadap aktivitas enzim β -glukosidase yang dihasilkan dari kapang *Aspergillus foetidus* (Naka.) koleksi Balai Penelitian Ternak Ciawi. Produksi enzim β -glukosidase dari *Aspergillus foetidus* (Naka.) pada medium yang mengandung 3% polard pada suhu ruang, dan waktu inkubasi 6 hari menghasilkan aktivitas sebesar 3.56 U/ml. Aktivitas optimum enzim β -glukosidase berada pada pH 5.0 dan suhu 60 °C. Enzim β -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 Mg^{2+} , Ba^{2+} , dan Mn^{2+} dengan konsentrasi akhir 1mM dan 5 mM, sedangkan penambahan 1mM ion Fe^{2+} justru menurunkan aktivitas enzim tetapi penambahan 5 mM ion Fe^{2+} meningkatkan aktivitas sebesar 39%.

PENDAHULUAN

Selulase adalah enzim yang terlibat dalam proses degradasi selulosa, yaitu komponen utama yang memiliki polimer ikatan β antara 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 selulosa. Saat enzim endoglukanase dan eksoglukanase mendegradasi selulosa, akan dihasilkan molekul selobiosa, yang pada akhirnya molekul ini akan menghambat aktivitas kerja enzim itu sendiri. Disinilah dibutuhkan peranan enzim β -glukosidase untuk dapat menghidrolisis selobiosa menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu glukosa. Limbah agro industri banyak dilaporkan dapat menjadi substrat yang baik untuk memproduksi enzim α -amilase dan β -glukosidase. Dan beberapa spesies kapang yang telah diteliti juga dapat menghasilkan enzim-enzim ini. Keduanya diperkirakan dapat digunakan

secara sinergis untuk meningkatkan daya cerna limbah pertanian tersebut dengan biaya yang lebih murah karena penggunaan enzim komersial untuk proses enzimatik pada limbah pertanian dan industri sangat tidak ekonomis (Rajasekar, 2013),

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan kation terhadap aktivitas enzim β -glukosidase yang dihasilkan dari kapang *Aspergillus foetidus* (Naka.) koleksi Balai Penelitian Ternak Ciawi..

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah pollard dari PT. Indofeed-Bogor, *potato dextrose agar* (PDA), medium Mandels, medium Dubos, dan sumber isolat yang diperoleh dari koleksi Balitnak Ciawi.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pipetmikro, sentrifus berpendingin, sentrifus, autoklaf, Spektrofotometer, pH meter, neraca analitik, vorteks, ose, *rotary shaker*, blender, dan peralatan gelas.

CARA KERJA

1. 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.

2. Produksi Enzim β -glukosidase

Isolat yang digunakan untuk memproduksi enzim β -glukosidase ditanam pada media agar miring PDA dan diinkubasi selama 5 hari (Haryati *et al.* 1997). Kemudian spora disuspensikan dalam 5 ml larutan NaCl 0.85%. Sebanyak 2 ml 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.

3. Penentuan Aktivitas Enzim

a. Penentuan Aktivitas β -glukosidase

Aktivitas 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..

b. 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.

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 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 permenit pada kondisi percobaan.

d. 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.

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

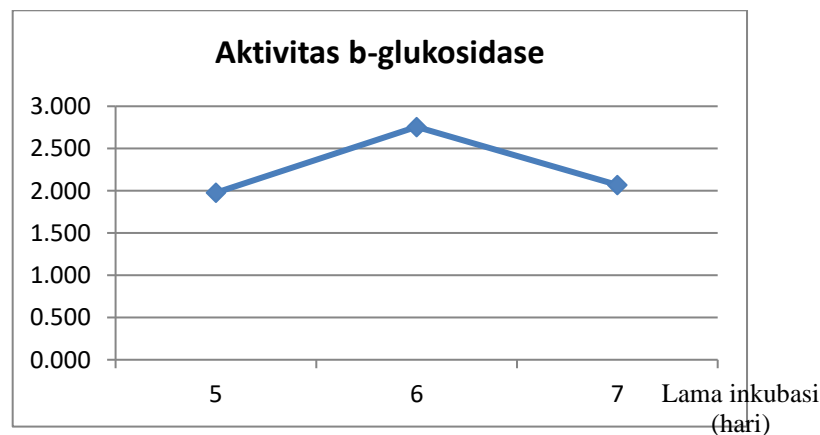
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan pH dan Suhu Optimum Enzim

Penetapan pH maupun suhu optimum mutlak dilakukan sebagai prasyarat penetapan aktivitas enzim. Karena perubahan suhu dan ataupun pH, dapat mempengaruhi stabilitas enzim, pH buffer, ataupun afinitas enzim sebagai aktivator dan inhibitor. Dengan diketahuinya pH dan suhu optimum, enzim dapat dimanfaatkan dalam aplikasi

mikroba selulolitik untuk mendegradasi selulosa secara maksimal

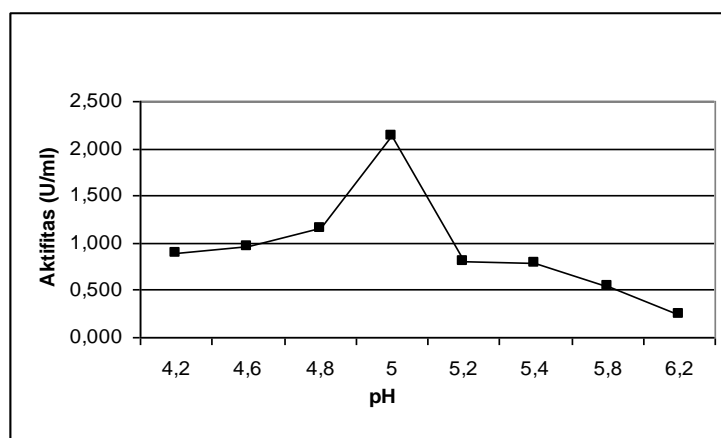
Dari hasil penetapan aktivitas enzim β-glukosidase isolat kapang *Aspergillus foetidus* (Naka.) (RM 3D) pada hari ke 5, 6 dan 7, diperoleh hasil aktivitas optimum yaitu sebesar 2.76 U/ml pada hari ke 6 inkubasi. Gambar 1 menampilkan aktivitas enzim β-glukosidase pada lama inkubasi yang berbeda.



Gambar 1. Aktivitas β-glukosidase terhadap variasi pH

Pengujian aktivitas enzim β -glukosidase pada berbagai kondisi pH disajikan 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

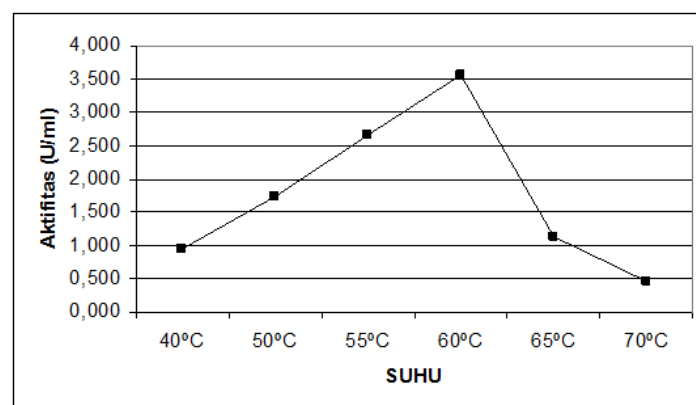
mempunyai aktivitas sebesar 1.15 U/ml. Sebagian besar kapang umumnya mempunyai pH optimum dibawah 7, dan sebagian besar enzim umumnya mempunyai pH optimum antara 4-8. Pada penelitian sebelumnya, Setyaningsih (2007) menyatakan pH yang



Gambar 2. Aktivitas β -glukosidase terhadap variasi pH

optimum β -glukosidase pada *A. niger* adalah 4.5. Sedangkan Oktavia (2014)) menemukan aktivitas β -glukosidase yang optimum pada isolat kapang *EN* (isolat dari *Enhalus* sp.) yang dikulturkan pada

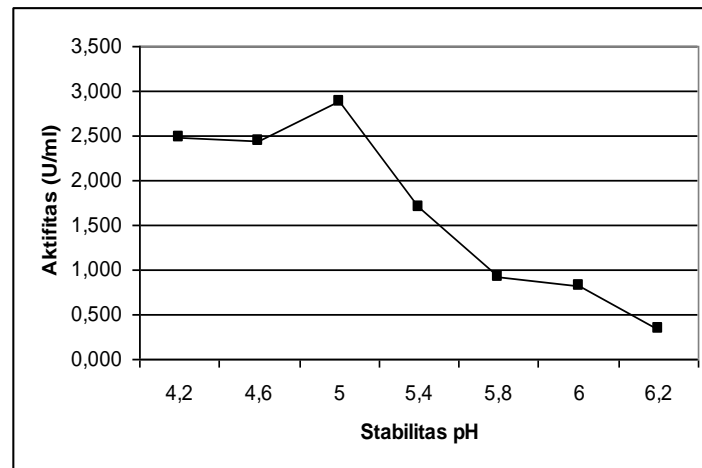
media yang mengandung limbah agar-agar adalah pada pH 4. Dan Dini (2017) menemukan pH 5.0 sebagai pH optimum enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut.



Gambar 3. Aktivitas β -glukosidase terhadap variasi suhu

Selain pH, suhu medium juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Pada gambar 3, 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 dibawah suhu optimum β -glukosidase

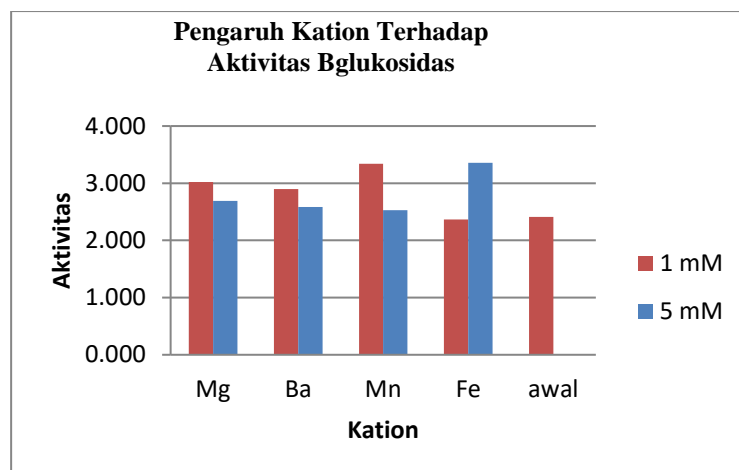
relatif stabil, pada suhu 50° C aktivitasnya masih 51% atau sebesar 1.74 U/ml, sedangkan pada suhu 40° C aktivitasnya hanya 0.95 U/ml. Suhu optimum pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Setyaningsih (2007) yang menemukan suhu 60° C sebagai suhu optimum aktivitas β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A.niger*.



Gambar 4. Stabilitas β -glukosidase terhadap variasi pH

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.



Gambar 5. Pengaruh kation terhadap aktivitas β-glukosidase.

Pengaruh kation terhadap aktivitas β-glukosidase

Selanjutnya aktivitas β-glukosidase yang dikarakterisasi dengan 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%, sedangkan penambahan 5 mM senyawa tersebut meningkatkan aktivitas β-glukosidase hingga 60 %. 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 dapat 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).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas β -glukosidase maksimum dari *Aspergillus foetidus* (Naka.) dihasilkan pada hari ke 6 inkubasi dengan menggunakan 3% polard. Nilai pH optimum bagi aktivitas β -glukosidase *Aspergillus 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%.

DAFTAR PUSTAKA

- Dini, I.R. dan Ifah Munifah, 2017. *Produksi dan Karakterisasi Enzim Selulase Ekstrak Kasar dari Bakteri Yang Diisolasi dari Limbah Rumput Laut*. Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian. Vol.06.No.03.2014.
- Hermansyah, H. dan Rizky R., 2014. *Produksi Enzim Hidrolisis α -amylase dan β -glukosidase dari Aspergillus niger Dalam Substrat Sekam Padi, Bagas dan Tongkol Jagung Dengan Metode Fermentasi Solid*. Rekayasa Bioproses, Departemen Teknik Kimia. Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia.
- Oktavia, Y. Aulia Andhika. Tati Nurhayati dan Kustiariyah T.. 2014. *Karakterisasi Enzim Kasar Selulase Kapang Endofit dari Lamun*. Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, Vol 6, no.1. Hlm .200-218.
- Rajasekar, A. 2013. *Production and Optimazation of Amylases Using Aspergillus niger*. International Journal of Scientific and Engineering Research, Volume 4.issue7,2497
- Setyaningsih, D. et al. 2007. *Pengaruh Aktivitas β -glukosidase Eksternal Dari Kapang Terhadap Kadar Vanilin Buah Vanili*. Departemen Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. J.Tek. Ind. Pert. Vol 16 (1), 28-35
- <https://melicemre.wordpress.com> > β -glukosidase . Diakses pada 26 Desember 2017
- <https://jurnalbatan.co.id> > Munifah, I. 2017. *Produksi dan Karakterisasi Enzim Selulase Dari Limbah Pengelolaan Rumput Laut*. Jurnal Teknologi Pengelolaan Limbah.Vol 16.No 3(2013)

