

OPTIMASI PRODUKSI DAN KARAKTERISASI SIFAT BIOKIMIAWI ENZIM GLUKANASE DARI *B. licheniformis* HSA3-1a ASAL SUMBER AIR PANAS, SULAWESI SELATAN

Hasnah Natsir

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin,

Makassar, Indonesia 90245

Email : hasnahnatsir@gmail.com

Telephone/Fax : +062 0411 586498

ABSTRAK

Enzim glukonase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis karbohidrat golongan glukon. Glukon merupakan struktur penting penyusun dinding sel jamur, khususnya jamur patogen tanaman. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mencari kondisi optimum produksi glukonase dari bakteri termofil *Bacillus licheniformis* HSA3-1a yang diisolasi dari salah satu sumber air panas di Sulawesi Selatan, selanjutnya mengarakterisasi sifat biokimia glukonase tersebut. Isolasi enzim glukonase dari isolat *B. licheniformis* HSA3-1a dimulai dengan penyiapan inokulum, kemudian melakukan optimasi produksi glukonase. Selanjutnya dilakukan uji karakteristik sifat biokimia glukonase menggunakan substrat laminarin 1% pada berbagai variasi suhu, pH dan melakukan penentuan senyawa kofaktor yang dapat bersifat sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas glukonase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim glukonase dari *B. licheniformis* HSA3-1a dapat diproduksi maksimum pada jam ke-96 waktu fermentasi dengan kondisi: konsentrasi substrat (laminarin) 1%, suhu 50°C, pH medium 7,0. Karakteristik sifat glukonase adalah enzim ini bekerja optimum pada suhu 50°C dengan pH 8,0, yang diaktifkan oleh ion logam Cu^{2+} , Ni^{2+} dan Co^{2+} 5 mM serta dihambat oleh ion Zn^{2+} 5 mM.

Kata kunci: *Bacillus licheniformis*, glukonase, glukon dan laminarin.

PENDAHULUAN

Glukon adalah polimer linier dari karbohidrat yang tersusun dari monomer glukosa dengan ikatan β -1,3 maupun β -1,6-glukon, polimer ini banyak terdapat pada dinding sel jamur (Budiarti *dkk.*, 2004). Glukonase merupakan enzim golongan hidrolitik yang dapat menghidrolisis senyawa glukon atau laminarin sebagai substratnya. Sebagian besar glukonase adalah endoglukonase yang dapat menghasilkan oligomer dengan panjang rantai antara 2-6 unit glukosa dari substrat laminarin (Katatny *dkk.*, 2000). Aktivitas biologis 1,3-

β -glukanase dari *Trichoderma* spp. merupakan aktivitas spesifik β -1,3-glukanase yang telah diuji terhadap substrat laminarin. (Katatny *dkk.*, 2000 dan Budiarti *dkk.*, 2004).

Enzim glukanase dapat diproduksi oleh bakteri dan cendawan seperti marga *Trichoderma*. Enzim ini dapat menghambat pertumbuhan *Phitophthora citrophthora*, hal tersebut terjadi karena struktur dinding sel jamur dan bakteri mengandung adalah senyawa glukan dan kitin (Benitez, *dkk.*, 2004 dan Cota, *dkk.*, 2006). Umumnya jamur dan bakteri mengandung glukan pada dinding selnya yang dapat didegradasi oleh enzim golongan glukanolitik. Salah satu contoh jamur yang mengekspresikan enzim glukanase adalah *Trichoderma* spp, jamur ini sebagai mikoparasit secara khusus menghasilkan enzim pendegradasi dinding sel patogen tanaman. *Trichoderma* spp. dapat menghasilkan enzim hidrolitik selama proses mikoparasit. Enzim tersebut berfungsi menghidrolisis filamen-filamen dinding sel cendawan patogen (Chet *dkk.*, 2004 dan Cota *dkk.*, 2006).

Mekanisme hidrolisis glukanase terhadap jamur patogen terkait adanya glukan pada dinding sel jamur yang dapat dimanfaatkan oleh enzim glukanase sebagai substratnya. Glukan yang merupakan komponen struktural dinding sel jamur berbentuk mikrofibril terdiri atas jalinan rantai polisakarida yang saling bersilangan dan membentuk anyaman (Katatny *dkk.*, 2000, Harman, 2000 dan Junaid *dkk.*, 2006).

Berdasarkan informasi pada latar belakang, maka dilakukan produksi glukanase dari *B. licheniformis* HSA3-1a dan karakterisasi sifat biokimia terhadap pengaruh suhu, pH dan pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim glukanase.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a, laminarin sebagai substrat enzim, Bovine Albumin Serum (BSA) sebagai standar protein, bahan medium (amonium sulfat, yeast ekstrak, bakto pepton, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Alat yang digunakan antara lain: neraca analitis, inkubator oven, autoclave, waterbath, shaker inkubator, spektrofotometer, dan sentrifuge.

Peremajaan Isolat dan Penyiapan Inokulum

Stok kultur *B. licheniformis* HSA3-1a dikultur dalam medium LA + laminarin 0,1% agar diperoleh isolat segar. Selanjutnya dilakukan penyiapan inokulum pada medium produksi dengan komposisi medium yang digunakan Natsir (2002) dan Natsir *dkk.*, (2010) yang dimodifikasi menggunakan substrat laminarin. Komposisi medium: amonium sulfat

0,7%, yeast ekstrak 0.05%, bakto tripton 0,1%, NaCl 0,1%, K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,01% dan laminarin 1,0% sebagai substratnya.

Optimasi Produksi Enzim Glukanase

Inokulum aktif dari biakan *B. licheniformis* HSA3-1a sebanyak 10% dimasukkan ke dalam 500 mL medium produksi ber-pH 7, kemudian dishaker pada kondisi: suhu 50°C, selama 2-5 hari dengan kecepatan aerasi 180 rpm dan setiap 12 jam dilakukan sampling untuk pengukuran OD. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel dari medium dengan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm, 30 menit, 4°C. Filtrat hasil sentrifugasi diuji aktivitas glukanase dengan metode Nelson Somogy dan analisis kadar protein dilakukan secara Lowry (Bollag and Edelstein, 1991). Hasil pengujian aktivitas enzim diperoleh data yang menunjukkan produksi glukanase optimum pada kondisi tertentu.

Pengujian Aktivitas Enzim glukanase

Prinsip pengukuran aktivitas glukanase didasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis laminarin sebagai substrat, dan menggunakan glukosa sebagai standar. Larutan enzim 250 µL ditambahkan 250 µL bufer asetat 50 mM pH 5,2 yang mengandung substrat 1,0% (laminarin). Larutan dihomogenkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan larutan 100°C selama 10 menit. Selanjutnya hasil hidrolisis enzim direaksikan dengan 250 µL reagen Nelson dan dipanaskan 100°C selama 20 menit lalu didinginkan kemudian ditambah laruta arsenomolibdat, homogenkan dan ukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm. *Satu unit aktivitas glukanase setara dengan 1 µmol glukosa yang dihasilkan per menit.*

Pengujian Kadar Protein

Pengujian ini menggunakan *Metode Lowry*, dengan komposisi Lowry B adalah Na₂CO₃ 2% dalam NaOH 0,1 N : CuSO₄ 1% : Natrium-kalium-tartrat (100 : 1 :1) dan Lowry A adalah larutan asam phospho-tungstic-phospho-molybdic (folin): aquades (1:1). Kadar protein diukur dengan menggunakan BSA (Bovine serum Albumin) sebagai standar dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (Bollag and Edelstein, 1991).

Karakterisasi Enzim Glukanase

Produksi glukanase dilakukan pada kondisi optimum kemudian dilakukan karakterisasi sifat biokimiawi glukanase terhadap suhu, pH dan pengaruh ion logam. Variasi suhu dilakukan pada kisaran 30°C–70°C dan variasi pH pada kisaran pH 5,0 sampai pH 9 (Natsir, *dkk.*, 2002 dimodifikasi Natsir *dkk.*, 2010). Untuk mengetahui pengaruh ion logam yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor digunakan beberapa jenis ion logam (MgCl₂; CaCl₂; MnCl₂; CoCl₂; NiCl₂; ZnCl₂ dan CuCl₂) dengan konsentrasi yang sama yaitu: 5 mM. Campuran enzim, ion logam, buffer dan substrat masing-masing diinkubasi selama 30 menit seperti pada penentuan suhu dan pH optimum. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada spektrofometer dengan panjang gelombang maksimum dan dilakukan perhitungan aktivitas enzim glukanase.

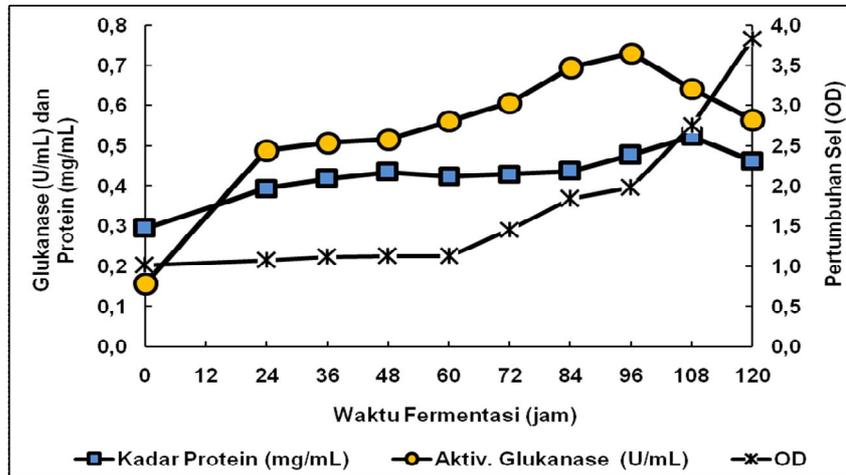
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan kondisi optimum produksi glukanase dilakukan dengan pengujian beberapa variabel antara lain: pengukuran pertumbuhan bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a, pengukuran kadar protein, dan pengujian aktivitas glukanase terhadap waktu fermentasi atau produksi enzim glukanase.

Pertumbuhan *B. licheniformis* HSA3-1a mulai terjadi fase adaptasi pada jam ke-0 sampai jam ke-60 dan pertumbuhan meningkat dengan bertambahnya waktu fermentasi sampai jam ke-96 selanjutnya meningkat tajam hingga jam ke-120 dalam hal ini masih terjadi fase logaritmik. Enzim glukanase mulai disekresikan pada jam ke-24 waktu fermentasi yaitu 0,489 U/mL dan meningkat menjadi 0,562 U/mL pada jam ke-60, kemudian menjadi 0,731 U/mL pada jam ke-96 dan selanjutnya terjadi penurunan produksi glukanase (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa kondisi optimum produksi glukanase dari *B. licheniformis* HSA3-1a adalah setelah 96 jam waktu fermentasi.

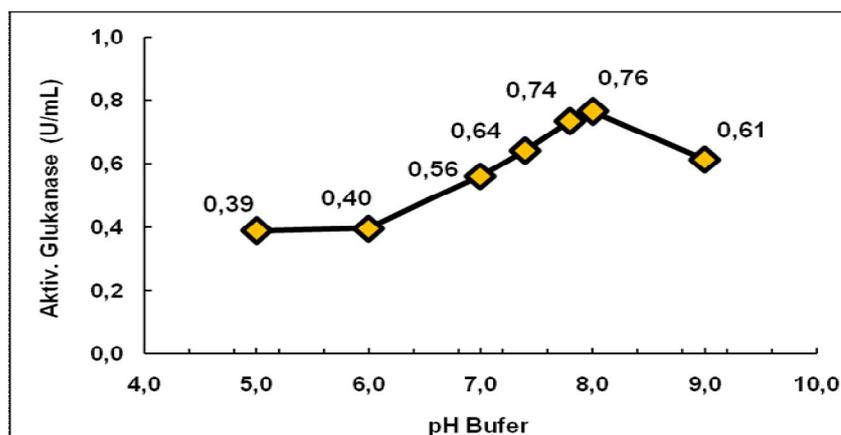
Hasil karakterisasi sifat biokimiawi glukanase ekstrak kasar yang meliputi pH, suhu, dan pengaruh senyawa kofaktor dapat dijelaskan pada grafik. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim glukanase terlihat pada Gambar 2 yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim meningkat dengan meningkatnya pH sampai pada pH 8,0. Aktivitas glukanase pada pH 6,0 adalah 0,40 U/mL yang meningkat tajam menjadi 0,56 U/mL pada pH 7,0 kemudian terus meningkat sampai pada pH 8,0 dengan aktivitas 0,76 U/mL yang merupakan aktivitas glukanase maksimum. Selanjutnya dengan peningkatan pH > 8,0

aktivitas glukonase menurun hingga 0,61 U/mL pada pH 9,0. Berdasarkan fenomena tersebut, menunjukkan bahwa kondisi pH 8,0 adalah pH optimum enzim glukonase dimana pH tersebut merupakan kondisi optimum untuk membentuk kompleks enzim substrat yang tepat dan menghasilkan produk yang maksimum.



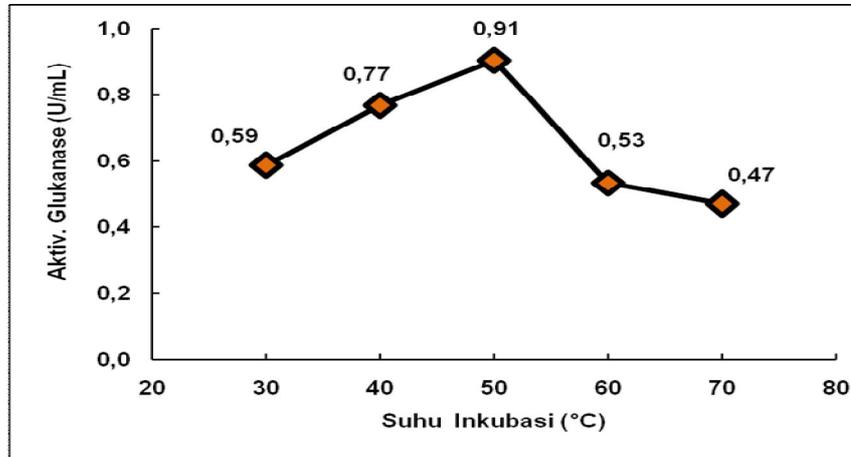
Gambar 1. Produksi glukonase *B. licheniformis* HSA3-1a pada kondisi pH medium 7,0 suhu 50°C dengan kecepatan aerasi 180 rpm.

Hasil penelitian Natsir, *et.al.*(2013) menunjukkan bahwa enzim kitinase dari bakteri yang sama yaitu *B. licheniformis* HSA3-1a memiliki pH optimum pada pH 7,0 dengan suhu optimum 50°C. Hal tersebut memberikan gambaran bahwa bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a ini dapat menghasilkan enzim glukonase dan kitinase namun terjadi pada pH optimum yang berbeda.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas glukonase *B. licheniformis* HSA3-1a pada kondisi: substrat 0,1% dan suhu 37°C dengan menggunakan bufer fosfat 0,2 M.

Suhu merupakan salah satu faktor yang memengaruhi aktivitas enzim. Perubahan suhu dapat menyebabkan terjadinya pelipatan protein atau enzim sehingga sisi aktif enzim berada pada posisi yang tepat untuk mengkatalisis substratnya.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas glukanase *B. licheniformis* HSA3-1a pada kondisi: substrat 0,1% dan pH bufer fosfat 8,0

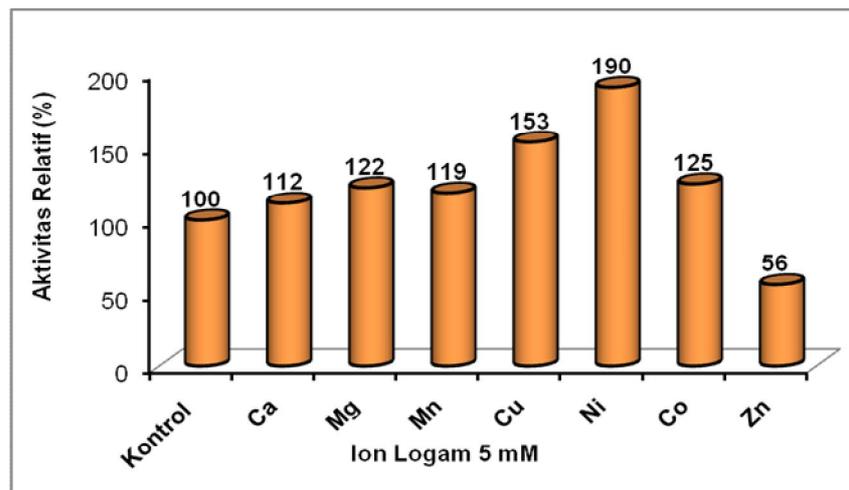
Aktivitas glukanase pada berbagai variasi suhu menunjukkan bahwa aktivitas glukanase meningkat dengan meningkatnya suhu. Pada suhu 30°C aktivitas enzim 0,59 U/mL terus meningkat menjadi 0,77 U/mL pada suhu 40°C dan selanjutnya menjadi 0,91 U/mL pada suhu 50°C kemudian aktivitas menurun dengan meningkatnya suhu menjadi 60°C dengan nilai aktivitas 0,53 U/mL dan menurun terus menjadi 0,47 U/mL pada suhu 70°C (Gambar 3). Berdasarkan data tersebut, maka dapat dikatakan bahwa aktivitas glukanase maksimum pada suhu 50°C dalam menghidrolisis substrat glukan. Hal ini sesuai dengan karakteristik sifat enzim kitinase dari *B. licheniformis* HSA3-1a yang memiliki suhu optimum 8,0 (Natsir, *et.al.*, 2013).

Suhu sangat berpengaruh dalam gerak termodinamik molekul, demikian pula molekul protein atau enzim. Suhu yang rendah menyebabkan kurangnya tumbukan antara molekul enzim dengan substrat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi gerak termodinamik molekul enzim cukup besar sehingga tumbukan antara molekul enzim dan substrat akan terjadi secara cepat. Pada suhu ekstrim tinggi protein mengalami denaturasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur protein enzim sehingga sisi aktif enzim berubah. Dengan demikian, enzim menjadi tidak aktif karena terjadi perubahan sisi aktif (Haris, 1998).

Umumnya enzim membutuhkan senyawa lain yang bukan protein dalam aktivitasnya. Salah satu zat yang dapat berfungsi sebagai senyawa yang dapat mengaktifkan atau menghambat aktivitas enzim adalah ion logam. Pada konsentrasi tertentu ion logam dapat berfungsi mengaktifkan enzim (sebagai aktivator) dan dalam konsentrasi tertentu pula dapat menghambat kerja enzim (sebagai inhibitor). Ion logam tersebut diperlukan oleh enzim sebagai komponen pada sisi aktifnya.

Aktivitas enzim glukonase dapat meningkat dengan penambahan ion logam, CuCl_2 , NiCl_2 dan CoCl_2 pada 5 mM masing-masing menjadi 153%, 190%, dan 125%, sedangkan ion CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 hanya dapat meningkat 10–20% yaitu aktivitas glukonase menjadi 112%, 122%, 119%. Adapun dengan penambahan ion logam ZnCl_2 aktivitas glukonase menurun menjadi 56% (Gambar 4). Berdasarkan fenomena pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim glukonase menunjukkan bahwa ion CuCl_2 , NiCl_2 dan CoCl_2 dapat bersifat sebagai aktivator dan ion ZnCl_2 dapat bersifat sebagai inhibitor terhadap aktivitas enzim glukonase ekstrak kasar seperti terlihat pada Gambar 4.

Hasil penelitian Natsir, dkk., (2013) menunjukkan perbedaan yaitu *B. licheniformis* HSA3-1a menghasilkan kitinase yang dapat diaktifkan oleh ion Ca^{+2} dan Mg^{+2} 1 mM, namun glukonase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut diaktifkan oleh ion CuCl_2 , NiCl_2 dan CoCl_2 . Hal ini memberikan gambaran bahwa bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a ini dapat menghasilkan enzim glukonase dan kitinase namun ion logam yang dapat mengaktifkan kedua enzim tersebut.



Gambar 4. Pengaruh ion logam 5 mM terhadap aktivitas glukonase *B. licheniformis* HSA3-1a ekstrak kasar pada suhu 50°C dan pH 8,0.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa: *B. licheniformis* HSA3-1a dapat memproduksi gluknase maksimum pada waktu fermentasi 96 jam dengan pH medium 7,0 dan suhu inkubasi 50°C. Enzim gluknase ini bekerja optimum pada pH 8,0; suhu 50°C; diaktifkan oleh ion Cu²⁺, Ni²⁺ dan Co²⁺ serta dihambat oleh ion Zn²⁺ 5 mM.

Saran

Dalam rangka pengembangan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penggunaan gluknase dari *B. licheniformis* HSA3-1a sebagai agensia fungisida terhadap jamur *Ganoderma* sp. baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* serta perlu dilakukan pemurnian enzim gluknase dari *B. licheniformis* HSA3-1a.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M DIKTI atas bantuan dana Hibah Penelitian Kompetitif Starategi Nasional Tahun 2010 melalui LP2M Univ. Hasanuddin.

DAFTAR PUSTAKA

- Benitez T, Rincon A.M., Limon, M.C., dan Codon, A.C., 2004. **Biocontrol Mechanisms of Trichoderma Strains**. *Jurnal International Microbiology*. Hal 7; 249-260.
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. 1991. **Protein Methods**. New York: Wiley-Less.
- Budiarti, S.W., Widyastuti, S.M., dan Margino, S.T., 2004. **β-1,3-Glucanase Enzyme Production by Trichoderma reesei during Mycoparasitism**. Makalah seminar Pertemuan Bioteknologi Indonesia, Malang.
- Chet, I., Viterbo, A., Shores, M., dan Harel, M., 2004. **Enhancement Of Plant Disease Resistance By The Biocontrol Agent Trichoderma asperellum**. *Journal Biokimia*. Hal 8.
- Cota, I.E., R.T. Rojas, R.S. Mundo, A.S. Estrada, and M.E.T. Hernandez. 2006. **Chitinase and 1,3-Glucanase Enzymatic Activities in Response to Infection by Alternaria alternata Evaluated and Two Stages of Development in Different Tomato Fruit Varieties**. *Scientia Horticulturae*. 112 : 42 – 50.
- Harman, 2000. **Trichoderma spp., Including T. harzianum, T. viride, T. koningii, T. hamatum and Other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Biological control: A Guide to natural enemies in North America**. (on line). www.google.com. diakses 12 Februari 2006.

- Harris, E. L. V. 1998. Concentration of Extract **Di dalam Harris ELV., and S. Angal (Eds.). *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. Oxford University IRL. Press. New York, 123 – 161.**
- Junaid, M. Rosman A., Firman, (2006), **Kemampuan Jamur *Trichoderma spp.* Menghasilkan Enzim Kitinase, β -1,3, Glukanase dan Kutinase serta daya Tumbuh *In vitro* di Permukaan Bunga dan Buah Kakao.** Tesis, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin.
- Katatny, M.H.El., W. Somitsch, K.H. Robra, M.S.El-Katatny and G.M. Gubitz, (2000), **Production of Chitinase and 1,3-Glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*.** *J. Food Technol. Biotechnol.* 38 (3) : 170 – 180.
- Natsir, H., (2002), **Ekplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Pendegradasi Kitin,** *Jurnal Marina Chimica Acta*, 3 (1): 3-6.
- Natsir, H., Tjandra, D., Rukayadi, Y. Suhartono M.T., Hwang J.K., and Pyun, Y.R. (2002), **Biochemical Characteristics of Chitinase Enzyme from *Bacillus sp.* Of Kamojang Craater, Indonesia.** *Journal of Biochem., Molecular Biology and Biophysics.* 6 (4) : 297-282.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono,M.T. and Ahmad, A. 2010. **Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus sp.* HSA3-1a.** *Indo. J. of Chem.* 10 (2): 256–260.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono,M.T. and Ahmad, A. 2013. **Isolation and Purification Thermostable Chitinase *B. licheniformis* HSA3-1a from Sulili hot springs in South Sulawesi, Indonesia,** *Int. J. of Pharm. Bio Sciences* 4 (3): (B) 1252 -1259.