

METODA SEDERHANA DETEKSI AKTIFITAS ENZIM GLUKOSA OKSIDASE DARI *Aspergillus niger* DIDALAM MEDIUM PADAT

Abdi Dharma, Dedi Harliyansyah, Marniati Salim,
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Andalas, Padang 25163

INTISARI

Tiga jenis khromogen yang berubah warna dengan H_2O_2 , telah diuji untuk aplikasi penapisan mikroba yang mempunyai aktifitas enzim glukosa oksidase (GOD) pada medium padat. H_2O_2 merupakan salah satu produk reaksi yang dikatalis enzim GOD. Kromogen tersebut adalah pasangan KI dengan kanji, $K_3[Fe(CN)_6]$ dengan $FeCl_3$, dan $KMnO_4$. Aplikasi khromogen pada penapisan yang diuji adalah dengan mencampur khromogen kedalam medium secara homogen, menuang khromogen diatas medium padat, atau menuang khromogen diatas koloni mikroba umur 5 hari didalam medium padat. Perubahan warna yang terjadi disekitar koloni diamati selama 7 hari. Pasangan ($K_3[Fe(CN)_6]$) dengan $FeCl_3$, memberikan reaksi warna terbaik untuk deteksi H_2O_2 atau penapisan mikroba dengan aktifitas enzim GOD. $KMnO_4$ tidak bisa digunakan karena bereaksi dengan medium. Pasangan KI dan pati memberikan reaksi warna dengan H_2O_2 tetapi tidak cukup sensitif untuk deteksi aktifitas enzim GOD didalam medium. Sedangkan aplikasi khromogen terbaik adalah dengan mencampur khromogen secara homogen dengan media sebelum dituang kedalam cawan petri.

ABSTRACT

Three chromogens, which change their color by H_2O_2 , have been examined for screening of microbes with glucose oxidase (GOD) activity in solid media. H_2O_2 is one of the product of reaction catalyzed by GOD. They are including the pair of KI with starch, $K_3[Fe(CN)_6]$ with $FeCl_3$, and $KMnO_4$. The application of chromogen for screening were also examined as the following. The chromogen was mixed homogeneously with medium, the chromogen was poured on the top of the solid media, or the chromogen were poured on the 5-days-colonies of screened microbes. The developing color around the colonies were monitored for 7 days after inoculated. Pair of ($K_3[Fe(CN)_6]$) with $FeCl_3$, have the better detection for H_2O_2 in the solid media. $KMnO_4$ is not appropriate for the detection of GOD activity because it react with the media producing colored product. Pair of KI and starch developed specific color with H_2O_2 in solid media, but not sensitive enough for detection of GOD activity. The best application of chromogen for screening was by mixing the chromogen with media before pouring to petridish

PENDAHULUAN

Glukosa oksidase (GOD) merupakan suatu enzim yang mempunyai nilai ekonomis yaitu sebagai bagian dari kit analisa gula darah, dan sebagai katalisa dalam proses industri asam glukonat. Asam glukonat digunakan dalam manufaktur metal, kulit dan bahan makanan. Natrium glukonat merupakan komponen pembersih pada detergen untuk memisahkan kotoran yang dilakukan oleh radikal glukonat yang tetap aktif pada larutan alkali. Garam ammonium glukonat digunakan untuk katalis asam pada pewarnaan tekstil. Garam magnesium glukonat

digunakan sebagai antispasmodic dan d-glukanolacton berfungsi sebagai bahan tambahan baking powder¹.

Asam glukonat dapat dibuat dengan oksidasi elektrolitik glukosa dalam medium alkalis dan dengan oksidasi kimia dengan hypobromite. Sekarang asam glukonat diproduksi untuk komersial secara oksidasi fermentasi dari gugus aldehid glukosa dari pati jagung menggunakan *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Acetobacter acetii*, *Penicillium chrysogenum* dan *Phenicillia* lainnya.

Buzzini et al. (1993) menggunakan sari buah anggur sebagai substrat fermentasi pembuatan asam glukonat. Kapang yang digunakan didalam fermentasi tergantung kepada bentuk sumber karbohidratnya. Untuk karbohidrat yang tidak sederhana maka diperlukan kapang yang bisa menghidrolisanya membentuk karbohidrat yang lebih sederhana, seperti cellulitic *Aspergillus terreus*. Perubahan selanjutnya dari karbohidrat sederhana menjadi asam glukonat dapat melalui fermentasi dengan kapang *Aspergillus niger*, yang mengekskresikan asam glukonat produknya ke mediana².

Sedangkan sumber karbohidrat untuk pembuatan asam glukonat dengan fermentasi juga sangat beragam. Limbah industri yang mengandung karbohidrat, seperti serat ampas industri tahu, nenas sisa (buangan) industri pengalengan nenas, molases dari limbah industri gula tebu berpotensi digunakan sebagai bahan dasar pembuatan asam glukonat.

Fermentasi pati membentuk asam glukonat memerlukan dua tahap reaksi biokimia utama, yaitu hidrolisa pati menjadi karbohidrat yang lebih sederhana (disebut hidrolisat) yang dikatalis oleh enzim glucoamilase, dan pembentukan asam glukonat dari oksidasi gugus aldehyd dari glukosa yang dikatalis oleh enzim glukose oksidase. Oleh karena itu diperlukan mutan strain *Aspergillus niger* overproduksi glucoamilase untuk menghidrolisa pati menjadi gula sederhana sekaligus overproduksi enzim GOD yang dapat merubah gula menjadi asam glukonat secara efisien. Untuk itu mutasi kapang dan deteksi serta seleksi mutan overproduksi enzim glucoamilase dan GOD dilakukan untuk dapat merubah limbah pabrik tapioka yang melimpah menjadi produk bernilai, asam glukonat.

Berbagai metoda seleksi mikroba overproduksi enzim oksidase seperti enzim GOD telah dilaporkan. Metoda ini berdasarkan pembentukan warna hasil reaksi suatu khromogen dengan H_2O_2 produk oksidasi glukosa yang dikatalis oleh glukosa oksidase. Khromogen untuk deteksi aktifitas enzim GOD ini adalah larutan gabungan antara enzim

peroksidase dengan 1% dimetil p-fenilendiamin HCl^3 , larutan tetrametil p-fenilendiamin dengan p-aminodimetil anilin oksalat⁴, o-dianisidin, larutan azino bis(3-ethylbenzothiazolines-6-sulfonicacid) (ABTS)⁵, dan pasangan 5-metil-2-benzalnonhidrazon (MBTH) dengan N,N-dimetilanilin (DMA) (Metoda Gochman), dan pasangan N,N-dimethylanilin (DEA) dengan fenol (Metoda anilin Trinder)⁶. Namun zat tersebut tidak tersedia dilaboratorium saat diperlukan, disamping itu harganya mahal. Untuk mengatasi masalah itu dilakukan penelitian mencari khromogen alternatif dari zat yang tersedia dilaboratorium untuk digunakan dalam deteksi aktifitas enzim GOD didalam media padat.

METODA PENELITIAN

Bahan kimia dan peralatan yang digunakan

Medium padat, untuk 1 L mengandung komponen sebagai berikut; 5 g glukosa, 1,0 g dikalium fosfat, 0,5 g magnesium sulfat, 0,5 g kalium klorida, dan 18,5 g agar, dan air destilasi. Kromogen uji adalah larutan kalium iodida 0,1 M dan kanji 1%, larutan kalium permanganat 0,05 M, larutan besi(III) klorida 0,025 M, dan kalium ferisianat ($K_3[Fe(CN)_6]$) 0,025 M. Mutan *Aspergillus niger* yang diperoleh dari laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Unand.

Prosedur Kerja

Uji reaksi antara khromogen dengan hidrogen peroksida.

Semua senyawa khromogen direaksikan dengan hidrogen peroksida didalam tabung reaksi. Kemudian masing masing khromogen diuji dengan masing – masing komponen dari medium padat, untuk melihat apakah khromogen bereaksi memberikan warna dengan komponen penyusun medium. Khromogen yang tidak memberikan reaksi warna dengan komponen medium diuji selanjutnya untuk mendeteksi hidrogen peroksida didalam medium padat yang dihasilkan oleh *A.niger* dengan tiga variasi berikut:

Pertama, khromogen dicampur secara merata dengan medium sebelum dituang kedalam cawan petri,

kemudian baru mikroba ditanam pada media. *Kedua*, khromogen dituang dan diratakan diatas medium padat dingin, membentuk suatu selaput tipis, kemudian spora ditanam pada medium. *Ketiga*, khromogen dituang pada koloni mikroba yang sudah ditumbuhkan selama lima hari. Perubahan warna yang terjadi disekitar koloni *A. niger* diamati selama tujuh hari.

HASIL DAN DISKUSI

Reaksi warna khromogen dengan H₂O₂

KI (tidak berwarna) bereaksi dengan H₂O₂ (tidak berwarna) memberikan I₂ yang berwarna biru dengan kanji (Tabel 1.)

Tabel 1. Reaksi warna khromogen dengan H₂O₂

No	Kromogen	Reaksi warna
1	KI + Kanji 1%	H ₂ O ₂ + H ⁺ + I ⁻ → I ₂ + H ₂ O Tidak berwarna (biru dengan kanji)
2	KMnO ₄	H ₂ O ₂ + KMnO ₄ + 6H ⁺ → 2Mn ²⁺ + 5 O ₂ + 8H ₂ O Ungu Tidak berwarna
3	K ₃ [Fe(CN) ₆]	H ₂ O ₂ + K ₃ [Fe(CN) ₆] → 2 [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ + 2H ⁺ + O ₂ Kuning kuning Fe ⁺³ + 3 [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ → Fe ₄ [Fe(CN) ₆] ₃ Kuning biru prusia

Sedangkan reaksi antara KMnO₄ (ungu) dengan H₂O₂ menghilangkan warna ungu karena oksidasi MnO₄⁻ menjadi Mn²⁺ yang tidak berwarna. Reaksi antara K₃[Fe(CN)₆] dengan H₂O₂ memberikan warna biru prusia dengan adanya Fe⁺³.

yang berpotensi digunakan dalam mendeteksi aktifitas enzim GOD didalam media padat. Oleh karena itu pasangan K₃[Fe(CN)₆] dan FeCl₃ yang selanjutnya diuji untuk menapis mikroba *Aspergillus niger* penghasil enzim GOD.

Uji pembentukan warna antara khromogen dengan komponen penyusun medium

Pemakaian khromogen dengan pencampuran homogen dengan media

Semua unsur khromogen yaitu KI 0,1 M, pati 1%, KMnO₄ 0,05 M, FeCl₃ 0,025 M, dan K₃[Fe(CN)₆] 0,025 M diuji reaksinya dengan komponen penyusun media yaitu glukosa, K₂HPO₄, MgSO₄, KCl dan agar. Semua khromogen kecuali KMnO₄ tidak memberikan warna dengan komponen penyusun medium. KMnO₄ memberikan warna dengan glukosa dan agar.

Khromogen, K₃[Fe(CN)₆] 0,025 M dan FeCl₃ 0,025M dihomogenkan dengan campuran media panas, cair dan steril, kemudian dituang kedalam cawan petri. Setelah media memadat, spora *A.niger* ditanam pada media, dan perubahan warna yang terjadi disekitar koloni diamati. Campuran media dengan khromogen berwarna kuning. Adanya aktifitas enzim GOD dari *A.niger* (menghasilkan H₂O₂) menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi biru disekitar koloni. Warna biru disekitar koloni dengan latar belakang warna kuning dapat dengan mudah diamati dan diukur garis tengahnya untuk menentukan aktifitas relatif enzim oksidase yang dihasilkan oleh *A. niger*. Pemakaian khromogen dengan cara pencampuran homogen dengan media lebih baik dibandingkan dengan dua

Pemakaian khromogen untuk menapis *A. niger* dengan aktifitas enzim GOD

Pada uji kromogen dengan H₂O₂ dan dengan komponen penyusun media, didapat kesimpulan bahwa hanya pasangan, K₃[Fe(CN)₆] dan FeCl₃

cara lainnya. Hanya saja teknik pencampuran khromogen dengan media ini kurang sesuai diaplikasikan pada khromogen yang tidak tahan panas dan kurang stabil.

Karena $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$ stabil dalam kondisi suhu tinggi, maka perlakuan pencampuran khromogen dengan media panas tidak menyebabkan kerusakan pada khromogen. Ternyata pasangan khromogen $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$ cukup sensitif untuk deteksi aktifitas enzim GOD dari *A.niger* dalam media padat.

Pemakaian khromogen dengan cara penuangan dipermukaan media padat

Khromogen dituang kemudian ditebarkan dipermukaan media padat didalam cawan petri. Setelah itu baru spora diinokulasikan dipermukaan media. Karena permukaan media menjadi basah oleh larutan khromogen, maka terlihat spora dapat bergerak dipermukaan media saat bekerja dan memindahkan cawan petri. Pertumbuhan spora yang tidak terfokus menyebabkan terjadi perubahan warna pada beberapa tempat yang bisa saja tumpang tindih satu sama lainnya sehingga sukar mengukur diameter warna biru untuk menentukan aktifitas relatif GOD. Pemakaian khromogen dengan cara ini mungkin baik untuk khromogen yang sangat sensitif dan kurang stabil terhadap panas, hanya saja perlu diusahakan sedemikian rupa agar larutan khromogen tidak menggenangi permukaan media, sehingga penyebaran spora atau mikroba dipermukaan media dapat dihindari.

Pemakaian Khromogen dengan cara menebar pada koloni mikroba

Larutan khromogen ($K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$) dituang dan ditebar dipermukaan koloni *A. niger* umur 5 hari, kemudian diamati perubahan warna khromogen yang terjadi disekitar koloni. Perubahan warna disekitar koloni akibat aktifitas oksidase dapat diamati, hanya saja cara ini mempunyai beberapa kelemahan antara lain, spora yang sudah terbentuk ditebarkan oleh larutan khromogen. Larutan ini juga bisa menghambat pertumbuhan koloni berikutnya.

KESIMPULAN

Pasangan khromogen ($K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$) dapat digunakan untuk uji aktifitas enzim oksidase didalam media padat. Sedangkan pasangan KI dengan kanji tidak cukup sensitif untuk uji aktifitas enzim oksidase didalam media padat. $KMnO_4$ bereaksi dengan komponen media sehingga tidak bisa digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

1. W. Crueger, and A. Crueger, *Biotechnology: A extbook of Industrial Biotechnology*, Science Tech, Inc, Madison, (1984).
2. P. Buzzini, M. Gubbetti, J. Rossi, M. Ribaldi, Utilization of grape must and Concentrated rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger*, in batch fermentations. *Biotechnol-Lett.* 15, 151-156 (1993).
3. R. S. Hadiotomo, *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek dan Teknik dan Proedur Dasar Laboratorium.*, PT. Gramedia, Jakarta (1993).
4. G. I. Barrow, R.K.A. Feltham, *Cowan's and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, USA (1993).
5. K. Helmuti, Optimization of Glucosa Oxidase Production by *Aspergillus niger* Using Genotic and Process Engineering Technique, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 978-984, (1995).
6. S.C. Anderson, S. Cockayne, *Clinical Chemistry*, WB Sanders Co, USA, (1993).