Jurnal Matematika dan Pengetahuan Alam
Volume 9, Nomor 1, Tahun 2000

ISSN 0853-0033

PENAPISAN DAN UJI PRODUKTIFITAS MUTAN *Aspergillus niger* UNTUK PRODUKSI ENZIM GLUKOSA OKSIDASE

(Screening And Productivity-Assay Of *Aspergillus Niger* Mutant For Production Of Glucose Oxidase Enzyme)

Abdi Dharma, Marniati Salim, Dedi Harliyansyah
Laboratorium Bikimia Jurusan Kimia Universitas Andalas Padang

ABSTRACT

The *Aspergillus niger* have been mutated, screened and applied for glucose oxidase production. The *A. niger* was mutated by irradiation of its suspension spore with gamma ray at doses 3, 3,5, 4,0 and 4,5 kGray, and then spores were spread over the potato dextrose agar (PDA) medium. The survival spores, that grows after two days incubation were isolated and considered as mutant. There were 63, 18, 4 and 0 (zero) mutants isolated from irradiated spores at dose 3, 3,5, 4, and 4,5 respectively. The mutants were screened for the production of glucose oxidase on screening medium containing $K_3[Fe(CN)_6]$ and $FeCl_3$ as chromogen. It was detected 25 out of 85 mutants that excreted GOD to the medium. It were detected that 9 out of 25 mutants developed higher diameter of blue area around their colonies (produced higher GOD) then developed by the wild type. Next, the nine mutants were tested their ability to produce GOD on fermentation. Four of the nine mutants produced higher GOD than by wild type on fermentation broth. They are *A. niger* mutant B10, C31, C32 and C33 which produced GOD 1,38, 1,54, 1,89 and 1,3 time higher respectively then by wild type.

Key Word: *Aspergillus niger*, mutation, glucose oxidase.

PENDAHULUAN

Glukosa oksidase (GOD) termasuk golongan enzim oksidoreduktase dengan Mr. 186. 000, mengkatalisis β-D-glukosa menjadi asam glukonat dan H_2O_2. Enzim ini dapat diproduksi oleh *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* (Bennett & Klich, 1992) dan *Pennicillium notatum*. (Arica & Hasirci, 1993; Hatzinikolaou et al., 1996) GOD merupakan enzim intra dan ekstrasellular yang umumnya diisolasi dari miselium kapang (Helmuth et al., 1995).

Enzim GOD dewasa ini digunakan untuk berbagai keperluan antara lain sebagai komponen pada diagnosa klinis penentuan kadar gula darah (Anderson & Cockayne, 1993), kadar gula urin (Shimohigoshi et al., 1995), analisa kadar glukosa pada makanan (Ukeda et al., 1996), penghilang oksigen bebas pada protein, jus, mayones serta sebagai pengawet untuk berbagai makanan olahan (Belitz & Grosch, 1982).

Berbagai teknik telah dilakukan untuk meningkatkan kemampuan *Aspergillus niger* untuk menghasilkan GOD, antara lain dengan menambahkan berbagai penghambat metabolik didalam medium fermentasi (Fiedurek & Gromada, 1997a), dengan mutasi genetik *A. niger* secara kimia dan radiasi ((Fiedurek & Gromada, 1997; Gromada & Fiedurek, 1997), ataupun dengan rekombinasi gen (Pluschkell et al., 1996; Hellmuth et al., 1995).

Pada penelitian ini dilakukan mutasi galur liar (induk) *Aspergillus niger* dengan meradiasi kapang dengan sinar gamma, kemudian dilakukan penapisan terhadap mutan overproduksi glukosa oksidase dengan metoda medium tapis padat (agarized skrining medium) dengan indikator pasangan kromogen $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$. Chromogen mengalami perubahan warna oleh H_2O_2 yang yang dihasilkan dari reaksi oksidasi glukosa yang dikatalis oleh glukosa oksidase (Dharma et al., 2000).

MATERIAL DAN METODA

Alat-alat yang digunakan

Sumber radiasi sinar gamma dari fasilitas Gamma-Ray Installation rumah sakit Dr. M. Djamil, Padang. Peralatan lain yang digunakan antara lain Spektrofotometer model Spectronic-20, pH-meter Jenway 3310, sentrifuse Centromix (P. Selecta), timbangan analitik Metler PM 480 delta Range^R, bunsen serta berbagai peralatan laboratorium umum lainnya.

Medium dan zat kimia yang digunakan

Medium Potato Dekstrosa Agar (PDA) yang mengandung (g/l); ektrak kentang 40, dektrosa 4, agar 10, pH 3,5-4,0. Medium tapis yang setiap liternya mengandung (g); glukosa 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5, KCl 0,5 agar 14,5 dan dengan indikator (kromogen) 10 ml $FeCl_3$ 0,025 M dan 10 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,025 M. Medium produksi terdiri dari (g/l); glukosa 20, K_2HPO_4 1, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5, KCl 0,5, $FeSO_4$ 0,01 dan bacto pepton 2,0.

Zat kimia yang digunakan larutan H_2O_2 0,01 M (distandarisasi dengan $KMnO_4$), larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0, larutan glukosa 20 mmol/l, larutan H_2SO_4 25 % v/v. Semua bahan kimia di atas diperoleh dari Merck. Untuk uji aktifitas enzim digunakan larutan o-dianisidin (Aldrich) 132 mg/l dan larutan horseradish peroksidase 1200 unit/l (Sigma).

Metoda

Mutasi *Aspergillus niger*

Masing-masing 1 ml suspensi spora ($2,5.10^7$ spora/ml) diradiasi dengan sinar gamma dosis 3,0, 3,5, 4,0 dan 4,5 kGray lalu dibiarkan selama 2 jam. Selanjutnya dituangkan pada petridis yang telah mengandung medium PDA. Setelah tumbuh koloni mutan dari *Aspergillus niger* yang berbentuk bintik-bintik putih pada medium (mulai hari kedua), maka setiap koloni yang tumbuh diisolasi dengan mengambil koloni yang baru muncul dengan spatula dan kemudian ditanam pada PDA miring dalam tabung reaksi. Koloni yang tumbuh pada PDA miring tersebut diperbanyak dengan menanamkannya pada tabung lain sehingga didapat stok-stok koloni yang akan ditapis.

Penapisan Mutan *A. niger* Penghasil GOD Tinggi

Penapisan mutan *A. niger* penghasil GOD dilakukan dengan menggunakan chromogen pasangan $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$. Penggunaan senyawa ini sebagai chromogen dalam mendeteksi aktivitas oksidase belum pernah dilaporkan sebelumnya. Metoda ini cukup sederhana dan reagen banyak bisa didapatkan dengan harga yang relatif murah.

Penapisan dilakukan denga prosedur berikut: Satu mata ose spora mutan *Aspergillus niger* diinokulasikan pada medium tapis. Munculnya warna biru disekitar koloni mengindikasikan adanya oksidase, warna ini akan teramati setelah beberapa hari inkubasi. Mutan menghasilkan zona biru yang lebih luas dibandingkan dengan oleh galur induk perkirakan sebagai mutan yang menghasilkan oksidase tinggi. Mutan yang memberikan zona biru yang lebih luas diuji selanjutnya dengan menggunakannya dalam fermentasi gula pada medium cair (medium fermentasi).

Uji Aktifitas GOD

Untuk penentuan aktivitas enzim GOD kasar dilakukan dengan metoda Arica (Arica & Hasirci, 1993) yang dimodifikasi. Pelet-pelet yang diperoleh dari medium fermentasi dicuci 3 kali, disaring dan ditimbang lalu disuspensikan dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7,0 lalu dipecah selnya dengan menggunakan mortar. Bubur sel disentrifuse pada 3500 rpm selama 20 menit, lalu 1,0 ml supernatannya diambil dan kedalamnya ditambahkan larutan glukosa 20 mmol/l dan campuran ini dijenuhkan dengan O_2 selama 30 menit. Selanjutnya kedalam campuran reaksi diatas ditambahkan 1,5 ml larutan o-dianisidin 132 mg/l dan 1 ml larutan horseradih peroksidase 600 unit/l dan campuran reaksi diinkubasi selama 30 menit pada 35 °C. Setelah itu reaksi dihentikan dengan menambahkan 1,5 ml H_2SO_4 30% kedalam campuran reaksi. Selanjutnya capuran reaksi disentrifus dan serapan dari supernatan diukur pada 625 nm. Sebagai blanko digunakan aquades sebagai pengganti supernatan dalam campuran reaksi. Sebagai standar digunakan larutan H_2O_2 dengan konsentrasi 6,25 hingga 50 µmol/l.

Penentuan Berat Kering Masa kapang hasil Fernetasi

Campuran fermentasi yang sudah dihomogenkan diambil sebanyak 3 ml, kemudian dikeringkan didalam oven sampai beratnya tidak lagi berkurang. Berat massa yang tinggal ditimbang dan dicatat sebagai berat kering masa kapang hasil fermentasi.

HASIL DAN DISKUSI.

Mutasi dan Seleksi

Dari penanaman spora (2,5. 10^7 spora) yang sudah disinari diperoleh 63, 18 dan 4 mutan yang berhasil tumbuh dan diisolasi, dari dosis radiasi berturut-turut 3,0, 3,5, dan 4,0 kGray. Sedangkan spora yang disinari dengan dosis 4,5 kGray tidak ada yang selamat atau hidup setelah ditanam pada medium tumbuhnya. Koloni yang berhasil diisolasi tersebut ditanam pada medium PDA untuk dijadikan bibit dan diperbanyak dengan menanamnya pada tabung-tabung reaksi yang berisi medium PDA untuk seleksi (tapis) pada medium padat dan medium cair (medium fermentasi). Koloni-koloni yang berhasil diisolasi tersebut mula-mula ditapis dalam medium tapis yang mengandung $K_3[Fe(CN)_6]$ dengan pasangan oksidatifnya $FeCl_3$. Biakan yang mengekskresikan H_2O_2 pada medium tapis akan memberikan perubahan warna dari kuning pucat ke biru tua. Ini disebabkan oleh adanya reaksi $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$ dengan H_2O_2 yang dihasilkan dari aktivitas enzim glukosa oksidase yang dihasilkan *Aspergillus niger* pada medium tapis, reaksinya sebagai berikut (Vogel, 1978)

$$\text{Glukosa} \xrightarrow{\text{GOD}} \delta\text{-glukonolakton} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 2[Fe(CN)_6]^{3-}\text{ (kuning)} \rightarrow 2[Fe(CN)_6]^{4-} + 2H^+ + O_2$$

$$4Fe^{3+} + 3[FeCN]^{4-} \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3\downarrow\text{(biru tua)}$$

Dari seluruh koloni yang berhasil diisolasi tersebut (83 mutan) dilakukan seleksi pada medium tapis dan diperoleh 25 mutan yang memperlihatkan zona aktifitas enzim yang seukuran hingga lebih besar dari galur induk. Dari 25 mutan yang berhasil ditapis pada tahap awal tersebut dilakukan penapisan lagi dan diperoleh 9 mutan yang zona aktivitasnya lebih besar dari aktifitas galur induk. Dari 9 koloni yang diperkirakan overproduksi glukosa oksidase tersebut dilakukan uji kuantitatif produksi glukosa oksidase dengan fermentasi

Hasil Fermentasi .

Sembilan mutan yang memperlihatkan aktifitas GOD tinggi pada medium tapis dilakukan uji fermentasi dengan memakai gula sebagai sumber karbon. Data dari fermentasi dapat dilihat pada tabel dibawah:

Tabel. 1. Aktifitas GOD kasar dan berat kering kapang hasil fermentasi.

Mutan	Berat Kering (g/ml)	Aktifitas GOD (Unit)	Kelipatan Aktifitas GOD dari WT
B2	0,020	0,260	0,49
B10	0.050	0,935	1,38
B11	0,022	0,309	0,45
C31	0,032	1,063	1,54
C32	0,280	1,312	1,89
C33	0,029	0,900	1,30
C45	0,028	0,339	0,49
C48	0,065	0,495	0,71
C51	0,036	0,656	0,98
WT (induk)	0,031	0,691	1,00

Sebagaimana terlihat pada Tabel. produksi massa sel mengalami fluktuasi yang besar. Namun demikian massa sel yang tinggi itu tidak menjamin adanya overproduksi glukosa oksidase, sebagaimana yang diperlihatkan oleh mutan C48 yang mempunyai massa sel besar tetapi aktivitas GOD kecil. Dalam Percobaan ini dilakukan dalam duplo. Data di atas adalah hasil rata-ratanya.

PH akhir medium fermentasi yang didapatkan tidak banyak berfluktuasi, yaitu berkisar antara 3,5 hingga 4,0.

Dari data fermentasi diatas didapatkan 4 mutan yang memproduksi glukosa oksidase lebih tinggi dari yang dihasilkan oleh galur induk. Mutan tersebut adalah B10, C31, C32 dan C33. Peningkatan produksi GOD yang dihasilkan oleh mutan B10, C31, C32 dan C33 adalah berturut-turut sebesar 1,38, 1,54, 1,89 dan 1,30 kali lipat lebih besar dari yang dihasilkan oleh galur induk.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan tentang metoda radiasi sinar gamma untuk menghasilkan mutan overproduksi GOD, penggunaan khromogen $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$, untuk penapisan aktifitas GOD, dan fermentasi gula untuk produksi GOD dengan mutan *A. niger* didapatkan hasil sebagai berikut :

1. Untuk mendapatkan mutan *Aspergillus niger* yang overproduksi glukosa oksidase dapat dilakukan dengan radiasi sinar gamma (Cobalt-60) pada rentangan dosis 3,0 – 4,0 kGray.

2. $K_3[Fe(CN)_6]$ dan $FeCl_3$ adalah pasangan oksidatif yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas oksidase yang dihasilkan oleh kapang pada medium padat. Dalam hal ini untuk setiap liter medium ditambahkan 10 ml 0,025 M pasangan chromogen..
3. Produksi enzim glukosa oksidase dengan fermentasi menggunakan mutan *A. niger* B10, C31, C32 dan C33 adalah lebih besar berturut-turut 1,38, 1,54, 1,89 dan 1,30 kali lipat dari produksi oleh galur induk.

Ucapan Terima Kasih

Terima Kasih disampaikan kepada Due Like Project yang sudah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, S. C., Cockayne, S. (1993) Clinical Chemistry, WB. Saunders, USA

Arica, M. Y., Hasirci. V. (1993) Immobilization of Glucose Oxidase: A Comparission of Entrapment and Covalent Bonding, J. Chem. Tech. Biotechnol, 93, 287-292.

Bennett, J.W., Klich, M. A. (editor), 1992., *Aspergillus* : Biology and Industrial Applications, Butterworth-Heinemann, USA.

Belitz, H. D., Grosch W. (1982) Food Chemistry , Springer Verlag Heilberg, Germany.

Dharma, A., Dedi Harliyansyah, Marniati Salim (2000) Metoda Sederhana Deteksi Aktifitas Enzim Glukosa Oksidase Dari *Aspergillus Niger* Didalam Medium Padat, (J. Kimia Andalas. In Press)

Fiedurek, J. & Gromada, A. (1997a) Selection of Biochemical Mutant of *Aspergillus niger* With Enhanced Catalase Production, J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 313-316.

Fiedurek, J. & Gromada, A. (1997b) Selective isolation of *Aspergillus niger* mutants With Enhanced Glucose Oxidase Production. J. Appl. Microbiol. 82: 648-652.

Gromada, A., Fiedurek, J. (1997) Selective Isolation Mutant of *Aspergillus niger* With Enhanced Glucose Oxidase Production. J. Appl. Microbiol. 82: 648-652.

Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P., Stougaard, P. (1996) A New Glucose Oxidase From *Aspergillus niger* Characterization and Regulation Studies Enzyme and Gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 371-381

Hellmuth, K., Pluschkell, S., Jung, J. K., Ruttkowski, E., Rinas, U. (1995) Optimization of Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* Using Genetic and Proses Engineering Techniques. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 978-984.

Pluschkell, S., Hellmuth, K., Rinas, U. (1996) Kinetics of Glucose Oxidase Excretion by Recombinant *Aspergillus niger*, Biotechnol. Bioeng. 51: 215-220

Shimohigoshi, M., Yokoyama, K., Karube, I. (1995) Development of Bio-thermochip and its aplication for the detection of glucose in urine. Anal Chem. Acta. 303: 295-299

Ukeda, H., Fujita, Y., Ohira, M., Sawamura, M. (1996) Immobilized Enzyme-Based Microtiter Plate Assay for Glucose in Foods. J. Agric. Food Chem. 44: 3858-3863.

Vogel, A. I (1978)., Buku Text Analisis Anorganik Kualitatif Makro & Semimikro (alih bahasa oleh Ir. L. Setiono & Dr. A. Hadya Putjaatmaka, edisi ke-2, PT. Havey Indah, Jakarta.