PRODUKSI ENZIM EKSTRA DAN INTRASELLULAR GLUKOSA OKSIDASE DARI MUTAN *Aspergillus niger* MG-LDYC$_{32}$

Marniati Salim, Abdi Dharma, Yesi Desrina Weni
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Produksi enzim glukosa oksidase (GOD) dari mutan *Aspergillus niger* MG-LDYC$_{32}$ [1] menggunakan sistim aerasi pada fermentor sederhana dengan kecepatan alir 27.440 mL det., selama 120 jam. Sistim non aerasi menggunakan shaker kecepatan agitasi 250 rpm. Enzim yang diproduksi secara fermentasi, difraksionasi dengan amonium sulfat. Aktifitas dan kadar protein masing-masing ditentukan dengan metoda kolorimetri dan metoda Lowry. Dari hasil penelitian enzim GOD dari mutan *Aspergillus niger* pada medium glukosa didapat kondisi optimum pada pH 6, temperatur 40°C dan waktu inkubasi 30 menit. Pada tahap pemurnian dengan ammonium sulfat 60-85% mampu meningkatkan aktifitas spesifik enzim GOD dari 5.493 unit/mg menjadi 38.724 unit/mg, dengan tingkat kemurnian 7 kali dari ekstrak kasar enzim.

ABSTRACT

The production of glucose oxidase (GOD) enzyme from mutan *Aspergillus niger* MG-LDYC$_{32}$ using simple aeration fermentation and speed 27.440 mL det., during 120 hours and non aeration with using shaker agitation 250 rpm. Produce enzyme GOD, purification with precipitaed ammonium sulphate. Activities GOD and protein concentration were determined by colometric and Lowry method. Optiinal condition of fermentation for production of GOD was as following the pH, temperature and incubation time were 6.40 °C and 30 min respectively. In step of purification ammonium sulphate 60-85% in creasing specific activities from 5.493 unit/mg be came 38.724 unit/mg, and increased of enzyme purification at 7 times of crude enzyme.

Key word : Mutan *Aspergillus niger*, glukosa oksidase

PENDAHULUAN

Glukosa oksidase (β-D glucose : Oxygen 1-oxidoreductase) diisolasi dari *Aspergillus niger*, dengan adanya oksigen, D-glukosa menghasilkan D-glukonolakton yang mengubah asam glukonat dan menghasilkan hydrogen peroksida. Enzim ini merupakan enzim ekstra dan intraselluler yang dapat digunakan sebagai diagnosa klinis penentuan kadar gula darah, analisis kadar glukosa pada makanan, penghilang oksigen bebas pada protein, mayones dan pengawet berbagai olahan bahan makanan [2].

GOD dapat diinduksi dengan penambahan molekular oksigen, glukosa, Fe^{+2} atau $CaCO_3$ [2]. Dengan dasar ini, maka dalam penelitian dicoba menggunakan modifikasi sistim aerasi untuk memproduksi enzim GOD baik galur induk maupun mutan *Aspergillus niger*, dilihat aktifitasnya dan dibandingkan dengan menggunakan shaker.

Pada sistim aerasi oksigen dialirkan melalui aerator yang dilewatkan terlebih dahulu pada HCl 30% dan NaOH 2N. Dengan menggunakan alat fermentor sederhana ini dilakukan pengamatan dan pengujian aktifitas dengan metoda kolorimetri menggunakan ortodianisidin, sedangkan mutan yang digunakan adalah MG-LDYC$_{32}$ [1].

BAHAN DAN METODA

Bahan Kimia dan Peralatan yang Digunakan

Medium PDA, medium fermentasi untuk 1 L mengandung 3 g $NaNO_3$, 1 g $KHPO_4$, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g KCl, 0,01 g $FeSO_4$, 40 g glukosa 3 g bacto pepton, 1 g $CaCO_3$, pH pada penelitian ini 6,5-6,8. Mutan *Aspergillus niger* yang digunakan dari Laboratorium Biokimia dari penelitian sebelumnya MG-LDYC-32 (MG,

mutasi dengan sinar gamma, LDYC, nama orang, 32 koloni yang ke 32) [3], alat-alat gelas yang ada di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia.

Prosedur Kerja

Fermentasi enzim produksi GOD intraseluler dari mutan *Aspergillus niger* MG-LDYC$_{32}$ pada medium fermentasi selama 120 jam pada temperatur ruang dengan kecepatan 27,440 mL/jt untuk enzim ekstraseluler fermentasi dengan agitasi 250 rpm. Hasil fermentasi ini disaring, didapatkan filtrat enzim yang merupakan enzim ekstraseluler, lalu diuji aktifitasnya. Untuk enzim intraseluler, pasta sel disuspensikan dalam buffer fosfat 0,05 M, pH 6,5, pemecahan sel di lakukan dengan mortir menggunakan pasir laut, digerus sampai halus, kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm dan suhu 27 °C, supernatan dikumpulkan, pellet (pasta sel) digerus kembali dengan 100 mL buffer fosfat, sentrifus, hasilnya disatukan. Fraksinasi dengan ammonium sulfat pada kejenuhan 0-60%, 60-85% dan 85-100%.

Untuk penentuan aktifitas GOD dilakukan dengan orto-dianisidin sebagai kromogen. Glukosa anhidrat 0,02 M inkubasi pada temperatur 37 °C selama 5 menit, tambah 1 mL GOD (H_2O_2) untuk standar, jenuhkan dengan oksigen (aerator selama 15 menit) tambahkan 1 mL peroksidase horseradish dan 1,5 mL larutan orto-dianisidin. Reaksi ini dihentikan dengan penambahan 1,5 mL H_2SO_4, ukur serapan pada λ, 530 nm dengan spektronik 20.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil fermentasi dengan pengocokan 120 jam, uji aktifitas GOD ditentukan baik untuk enzim ekstraseluler maupun intraseluler dengan menggunakan sistim pengaliran oksigen dari aerator yang kemudian dibandingkan dengan shaker, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktifitas unit ekstrak kasar enzim GOD intraseluler dan ekstraseluler dengan sistim aerasi dan shaker.

Nomor	Ekstrak Kasar Enzim	Mol H_2O_2 Sampel	A.U. mol menit	Pengamatan Warna
I. Intraseluler				
1.1	C_{32} aerasi	96,589	3,220	Kuning kemerahan
1.2	C_{32} shaker	19,934	0,664	Kuning
1.3	WT aerasi	30,175	1,006	Kuning muda
1.4	WT shaker	16,540	0,551	Kuning muda
II. Ekstraseluler				
1.1	C_{32} aerasi	24,653	0,822	Kuning muda
1.2	C_{32} shaker	13,982	0,466	Kuning muda
1.3	WT aerasi	21,288	0,709	Kuning muda
1.4	WT shaker	29,168	0,972	Kuning muda

Ket : C_{32} = Koloni ke 32; A.U = Aktifitas unit; WT = Wild type = galur induk

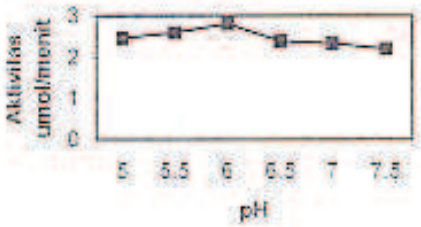
Enzim intraseluler C_{32} aerasi memberikan aktifitas unit yang tertinggi jika dibandingkan dengan W.T. maupun enzim ekstraseluler (aerasi dan shaker) telah diketahui bahwa dengan menggunakan sistim aerasi ini oksigen yang dialirkan berfungsi menginduksi pembentukan GOD & juga berfungsi sebagai substrat. Menurut Helmath (1995) penggunaan molekul oksigen dapat digunakan untuk menginduksi GOD, ditunjukan dengan terjadinya transkripsi, maka ini sesuai dengan literatur bahwa enzim intraseluler dengan adanya oksigen akan memberikan aktifitas yang tertinggi.

Untuk melihat jumlah glukosa yang digunakan GOD dapat diperoleh dengan pengukuran H_2O_2 atau konsumsi oksigen selama reaksi, terlihat dari enzim intraseluler mutan C_{32} aerasi lebih tinggi dibandingkan dengan shaker baik galur induk maupun enzim ekstraseluler (aerasi dan shaker). Fraksi dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim dengan ammonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

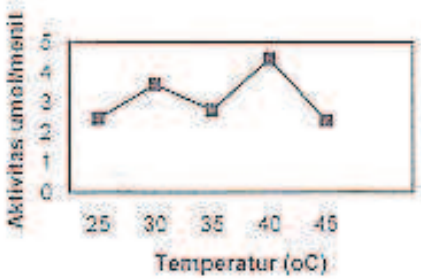
Tabel 2. Pemurnian enzim GOD dari *Aspergillus niger* dengan ammonium sulfat

Langkah Pemurnian	Volume (mL)	Protein		Enzim				
		Konst (mg/mL)	Total (mg)	AU mol/menit	AS Unit/mg	Total Unit	Hasil (%)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak kasar	25	0.586	14,639	3.219	5.493	80.415	100	1 X
$(NH_4)_2SO_4$								
FI 0-60%	15	0.267	4.002	3.369	12.627	50.533	62.840	2.299 X
FII 60-85%	15	0.115	1.719	4.437	38.724	66.565	82.772	7.049 X
FIII 85-100%	15	0.079	1.183	1.803	22.858	27.039	33.624	4.161 X

Aktifitas spesifik tertinggi didapatkan pada fraksi 60-85% yaitu 38,724 unit/mg protein dengan kadar protein enzim 0.115 atau total protein 1.719 g, fraksi ini memberikan tingkat kemurnian 7.049 X dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Sedangkan kondisi optimum didapat pada pH 6 dan temperatur 40 °C seperti gambar di bawah ini.



Gambar 1. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas enzim GOD dari A. niger pada kondisi ruang, waktu inkubasi 30 menit



Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap GOD dari A. niger pada pH 6, waktu inkubasi 30 menit dengan substrat glukosa anhidrat 0.02 M

Pada penelitian ini kadar glukosa ditentukan terhadap preparat GOD yang telah dimurnikan dengan ammonium sulfat pada λ 540 nm, suhu 40 °C, waktu inkubasi 30 menit dan pH 6 seperti terlihat pada Tabel 3. berikut ini.

Tabel 3. Penentuan kadar glukosa pada preparat sampel GOD pada pemurnian 60-85% dan 85-100% dengan regresi linier Y=-0,03930 + 1.18218X

Konsentrasi (M)	$(NH_4)_2SO_4$ 60-85%	$(NH_4)_2SO_4$ 85-100%
0.125	0.109	0.081
0.250	0.217	0.116
0.500	0.249	0.144

GOD sangat spesifik terhadap β-D glukosa. Larutan glukosa dalam air biasanya mengandung 36% α-D glukosa dan 60% β-glukosa dalam suatu kesetimbangan, karena itu dalam pengukuran standar glukosa yang digunakan dalam penentuan GOD dibiarkan dulu selama 2 jam untuk mencapai suatu kesetimbangan (Yakub, 1993). Pada penentuan kadar glukosa pada preparat GOD pemurnian dengan ammonium sulfat 60-85% lebih dari 85-100%.

KESIMPULAN

Untuk memproduksi enzim intra dan ekstraselluler GOD dari *Aspergillus niger* dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya

kebutuhan oksigen, pH dan temperatur. Aktifitas tertinggi GOD pada ekstrak kasar enzim intrasellular yang didapat dari mutan MG-LDYC$_{12}$ aerator, yaitu 3,220 mol/menit, sedangkan tahap pemurnian didapatkan aktifitas tertinggi dengan ammonium sulfat yaitu 4,437 mol/menit dan kondisi optimum pada pH 6 dan temperatur 40 °C dan waktu inkubasi 30 menit.

KEPUSTAKAAN

1. Dedi Hariyansyah. Skrining Mutan *Aspergillus niger* Over Produksi Glukosa Oksidase. Skripsi Sarjana Kimia. 2001.
2. K. Hellmuth. et. al.. Optimation of Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* Using Genetic and Process Engineering Techniques. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43. 978-984 (1995)
3. H.D. Belith and W. Grosch. Food Chemistry. Springer Verlag Heilberg. Germany. 1982.
4. Arica. M. Yakup and Hansei Vasif. Immobilization of Glucose Oxydase A Comperisson of Entrapment and Covalent Bonding. *J. Chem Tech Biotechnol.* 58. 287-292 (1993).
5. A. Dharma. D. Harliansyah. M. Salim. Metoda Sederhana Deteksi Aktifitas Enzim Glukosa Oksidase dari *Aspergillus niger* di dalam Medium Padat. *Jurnal Kimia Andalas.* Vol. 6, No. 2, hal. 101-104. Juli 2000.