ISOLASI, UJI AKTIVITAS, DAN AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM SELULASE *Penicillium* sp. LBKURCC27 SEMIMURNI MELALUI PENGENDAPAN $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

M. Sarip¹, T. T. Nugroho², H. Y. Teruna³

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

³Bidang Kimia Organik Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

muhammadsarip91@gmail.com

ABSTRACT

Enzyme activity of cellulase can be concentrated by ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation. The concentration was carried out by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% saturated precipitation. The precipitated enzyme was redissolved in 1/70 of the original crude extract volume. Enzyme activity of cellulase was assayed using CMC and avicel as the substrate. The results showed that in the concentrated enzyme preparation, the CMCcase was increased 12 fold and enzyme activity of avicelase increased 3 fold. Activity and specific activity of the final CMCcase preparation were $1.1160 \pm 0,0622$ U/mL and $7.43 \pm 0,417$ U/mg, respectively. Activity and specific activity of avicelase preparation were 0.0520 ± 0.0735 U/mL and 0.34 ± 0.487 U/mg, respectively.

Keywords: ammonium sulfate, cellulase, *Penicillium* sp

ABSTRAK

Aktivitas enzim selulase dapat ditingkatkan melalui pemekatan dengan penambahan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pemekatan dilakukan dengan menambahkan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% jenuh. Enzim yang terendapkan dilarutkan kembali dalam buffer dengan volume 1/70 kali volume ekstrak kasar semula. Aktivitas enzim selulase diuji menggunakan dua substrat CMC dan avisel. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas enzim CMCcase dalam preparat akhir meningkat hingga 12 kali dan aktivitas enzim aviselase sebesar 3 kali. Aktivitas dan aktivitas spesifik enzim CMCcase setelah pemekatan adalah $1,1160 \pm 0,0622$ U/mL dan $7,43 \pm 0,417$ U/mg. Aktivitas enzim aviselase setelah pemekatan adalah $0,0520 \pm 0,0735$ U/mL dan $0,34 \pm 0,487$ U/mg.

Kata kunci: ammonium sulfat, *Penicillium* sp, selulase

PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik dalam molekul selulosa menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu monomer glukosa. Enzim selulase salah satu enzim ekstraseluler yaitu enzim yang disintesis didalam sel dan dikeluarkan ke media tumbuhnya sehingga dapat dengan mudah dipisahkan dari miselia melalui sentrifugasi. Selulase banyak dihasilkan oleh bakteri dan jamur. Secara umum, selulase bakteri dihasilkan secara konstan sedangkan selulase jamur dihasilkan hanya pada adanya selulosa (Onsori dkk., 2005). *Penicillium* sp. merupakan jamur yang banyak digunakan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler seperti selulase. Jamur ini mampu menghasilkan enzim endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase dalam jumlah yang tinggi (Petit dkk., 2009). Aktivitas enzim dapat ditingkatkan dengan pemekatan melalui penambahan garam sehingga diperoleh aktivitas enzim dan kemurnian yang tinggi.

Pemekatan enzim dapat dilakukan dengan pengendapan protein melalui penambahan garam ammonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Prinsip pengendapan protein adalah kelarutan protein dalam larutan. Penambahan garam dilakukan dalam konsentrasi tinggi. Konsentrasi garam yang rendah meningkatkan kelarutan protein karena ion-ion berinteraksi dengan gugus bermuatan pada permukaan protein dan mengganggu dengan kekuatan elektrostatis yang kuat yang disebut proses *salting in* (Metzler, 2003). Penambahan garam dalam konsentrasi tinggi menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan hidrofobik protein kemudian berikatan dengan garam. Semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan mengendap (*salting out*). Konsentrasi garam yang ditambahkan dinyatakan sebagai persen kejenuhan (Triana, 2013).

Penggunaan garam divalen, seperti MgCl_2 , MgSO_4 , dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam pengendapan protein lebih efektif dibandingkan garam monovalen seperti NaCl dan KCl . $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sering digunakan dalam pengendapan protein karena memiliki tingkat kelarutan tinggi, tidak bersifat toksik, murah. Beberapa enzim dapat mengalami kerusakan apabila ditambahkan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Untuk jenis enzim tersebut, pengendapan enzim dapat dilakukan dengan penambahan pelarut organik, seperti metanol, etanol, 2-propanol, dan aseton. Perlakuan ini dapat menurunkan konstanta dielektrik larutan tersebut sehingga kelarutan protein menurun (Triana, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim selulase melalui pemurnian sebagian dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

METODE PENELITIAN

a. Peremajaan isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 pada media PDA

Isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 diambil dengan menggunakan ose secara aseptis dan diinokulasikan ke media PDA. Media PDA yang telah diinokulasikan isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari, atau hingga spora hijau tumbuh subur.

b. Inokulasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 pada media cair

Spora jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 yang diremajakan pada media PDA dibilas dengan larutan salin steril (NaCl 0,8%) dan dilepaskan dari media dengan menggunakan

ose secara aseptis. Larutan disaring menggunakan *glasswool* sehingga diperoleh suspensi spora. Sebagian suspensi spora diukur ODnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm ($OD_{660nm} = 0,34 \sim 7 \times 10^{12}$). Suspensi spora diinokulasikan pada media cair produksi selulase dan diinkubasi pada suhu ruang dengan dilakukan pengocokan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan putaran 150 rpm selama 120 jam.

c. Produksi enzim selulase

Produksi selulase dilakukan dengan menginokulasi 7×10^{12} spora dari isolat pada 25 mL media produksi. Kultur cair ini kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 120 jam. Selulase yang telah diproduksi dalam media produksi dipisahkan dari miselia jamur menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin pada suhu $5-10^{\circ}\text{C}$ dan kecepatan putaran 9500 rpm selama 10 menit. Filtrat disaring menggunakan kertas Whatman GF/C sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim dan disterilisasi menggunakan NalgeneTM *Sterile Disposable Bottle Top Filters* dengan membran *Poly Ether Sulfonat* (PES) $0,45 \mu\text{m}$. Ekstrak kasar enzim ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02% dan disimpan dalam pendingin. Konsentrasi gula pereduksi ekstrak kasar enzim dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

d. Pemekatan enzim selulase

Enzim diendapkan dari ekstrak kasar dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ secara perlahan dalam keadaan dingin ($5-10^{\circ}\text{C}$) sambil diaduk hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Larutan dibiarkan selama 30 menit sambil diaduk. Endapan dipisahkan dari filtrat menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan ditambahkan dengan larutan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 hingga terjadi pemekatan yang diperkirakan mencapai 70 x volume. Jadi misalnya volume awal adalah 70 mL, penambahan buffer pada endapan adalah 1 mL. Enzim pekat yang diperoleh ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02%. Konsentrasi gula pereduksi enzim selulase dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

e. Penentuan gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Analisis aktivitas enzim dilakukan menggunakan dua macam substrat *Carboxymethylcellulose* (CMC) dan avisel. Aktivitas enzim diuji sebelum dan setelah proses pemekatan. Sebanyak 500 μL substrat CMC/avisel 2% dan diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu aduk perlahan dan larutan diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* suhu 40°C . Tambahkan 500 μL reagen Nelson-Somogyi. Tabung dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Tambahkan 500 mL reagen arsenomolibdat, didiamkan selama 5 menit. Tambahkan 3 mL akuades, didiamkan selama 30 menit. Ukur absorbansi pada $\lambda=540 \text{ nm}$.

f. Penentuan kadar protein dengan menggunakan metode Lowry

Larutan sampel protein dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3,75 mL reagen C. Larutan dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah

itu tambahkan reagen folin-ciocalteau sebanyak 0,375 mL dan dihomogenkan. Tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Ukur absorbansi pada $\lambda=750$ nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim diuji menggunakan dua substrat, CMC dan avisel. Masing-masing ekstrak kasar enzim, enzim selulase pekat, dan supernatan diuji aktivitasnya. Ekstrak kasar enzim diisolasi dari media produksi cair setelah 120 jam waktu fermentasi. Enzim selulase pekat diperoleh melalui proses pengendapan dengan penambahan 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan disentrifugasi. Endapan diambil dan filtrat dipisahkan sebagai supernatan. Endapan dari proses pengendapan 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dilarutkan kembali dalam volume cairan 1/70 kali volume ekstrak kasar. Hasil uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 menggunakan substrat CMC ditunjukkan pada Tabel 1 dan substrat avisel pada Tabel 2.

Tabel 1: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (CMCase) *Penicillium* sp. LBKURCC27.

Jamur <i>Penicillium</i> sp. LBKURCC27	Rata-rata aktivitas enzim (U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat kemurnian CMCase (Endoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	0,0956±0,0028	1	0,015	6,37±0,183	1
Supernatan Enzim	0,0025±0,0001	0,02	TD	TD	TD
enzim selulase pekat	1,1160±0,0622	12	0,150	7,43±0,417	1,16

Keterangan: TD = tidak terdeteksi

Tabel 2: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (aviselase) *Penicillium* sp. LBKURCC27.

Jamur <i>Penicillium</i> sp. LBKURCC27	Rata-rata aktivitas enzim (U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat kemurnian aviselase (Endoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	0,0140±0,0198	1	0,015	0,93±1,315	1
Supernatan Enzim	0,00005±0,000	0,003	TD	TD	TD
selulase pekat	0,0520±0,0735	3	0,150	0,34±0,487	0,36

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk pemekatan enzim adalah melalui pengendapan. Pengendapan enzim selulase dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hingga konsentrasi 80% jenuh. Pengendapan ini bertujuan untuk pemurnian enzim sehingga dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim tersebut. Pengendapan enzim terjadi berdasarkan tingkat kelarutan protein dalam cairan yang dipengaruhi kekuatan ionik dalam cairan (konsentrasi garam). Penambahan garam dengan

konsentrasi tinggi dapat menurunkan kelarutan protein, hal ini disebabkan air yang semula terikat pada permukaan protein berikatan dengan garam. Interaksi antar protein akan meningkat dan interaksi antar protein-air menurun sehingga protein teragregasi dan mengendap (Triana, 2013). Asam-asam amino, peptida-peptida kecil dan molekul kecil lainnya akan tetap tinggal dalam larutan. Bergantung kadar garam, sebagian protein mengendap, dan ada yang tertinggal dilarutan.

Kelipatan pemekatan enzim selulase ditentukan dengan menghitung peningkatan aktivitas enzim selulase antara ekstrak kasar enzim dan enzim pekat hasil pengendapan. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase menggunakan metode Nelson-Somogyi. Uji aktivitas enzim selulase menggunakan dua substrat CMC dan avisel. CMC merupakan substrat yang berbentuk amorf menunjukkan adanya aktivitas enzim endoglukanase, sedangkan avisel merupakan substrat yang berbentuk kristalin menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoglukanase (Nisa dan Putri, 2013).

Aktivitas enzim CMCase dapat dilihat pada Tabel 1, yaitu ekstrak kasar enzim sebesar $0,0956 \pm 0,0028$ U/mL dan enzim pekat sebesar $1,1160 \pm 0,0622$ U/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa pemekatan hingga 70 kali volume menghasilkan kelipatan pemekatan sebesar 12 kali. Peningkatan aktivitas enzim yang diperoleh lebih kecil dibandingkan pemekatan yang dilakukan, hal ini disebabkan enzim kehilangan aktivitasnya karena pengaruh pH dan temperatur serta enzim kehilangan kofaktor selama proses pemekatan atau terdenaturasi, juga efek garam yang tersisa pada endapan karena tidak dilakukan dialisis. Aktivitas enzim aviselase dapat dilihat pada Tabel 2, yaitu ekstrak kasar enzim sebesar $0,0140 \pm 0,0198$ U/mL dan enzim pekat sebesar $0,0520 \pm 0,0735$ U/mL. Ismet, (2012) melaporkan aktivitas ekstrak kasar aviselase *Penicillium* sp. LBKURCC27 pada suhu 40°C adalah sebesar $0,0027 \pm 0,0010$ U/mL. Aktivitas aviselase yang diperoleh tidak berbeda jauh dari aktivitas avicelase pada penelitian sebelumnya. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan isolat *Penicillium* sp. LBKURCC27 juga memiliki aktivitas CMCCase. Aktivitas enzim CMCCase lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas avicelase, hal ini menunjukkan bahwa jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 juga menghasilkan enzim endoglukanase.

Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Kadar protein supernatan tidak dapat ditentukan menggunakan metode Lowry, adanya pengaruh ion NH_4^+ hasil dari proses pengendapan dapat mengganggu penentuan kadar protein. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan tingkat kemurnian suatu enzim, semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka semakin tinggi kemurnian enzim tersebut (Triana, 2005). Aktivitas spesifik CMCCase (Tabel 1) sebelum dan setelah proses pengendapan tidak mengalami peningkatan besar yaitu enzim pekat $7,43 \pm 0,417$ U/mg dan ekstrak kasar sebesar $6,37 \pm 0,183$ U/mg, hal ini menunjukkan bahwa hanya sedikit pemurnian yang diperoleh. Sebagian besar protein ikut mengendap dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% dan seluruh aktivitas CMCCase terendapkan dengan 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Aktivitas spesifik aviselase (Tabel 2) setelah pengendapan menurun drastis yaitu enzim pekat sebesar $0,34 \pm 0,487$ U/mg dan ekstrak kasar sebesar $0,93 \pm 1,315$ U/mg. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar aktivitas avisel hilang pada proses pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Oleh karena itu, dalam supernatan aktivitas eksoglukanase sangat rendah, maka kemungkinan

eksoglukanase tersebut ikut mengendap, tetapi terdenaturasi atau terinhibisi oleh sedikit garam yang tersisa pada proses pelarutan kembali.

KESIMPULAN

Pemekatan enzim selulase dengan pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% jenuh meningkatkan aktivitas enzim CMC_{Case} mencapai 12 kali yaitu untuk enzim pekat sebesar $1,1160 \pm 0,0622$ U/mL dan ekstrak kasar sebesar $0,0956 \pm 0,0028$ U/mL. Aktivitas spesifik enzim CMC_{Case} setelah pengendapan tidak mengalami peningkatan besar yaitu enzim pekat sebesar $7,43 \pm 0,417$ U/mg dan ekstrak kasar sebesar $6,37 \pm 0,183$ U/mg. Aktivitas enzim aviselase hanya meningkat 3 kali setelah pengendapan yaitu untuk enzim pekat $0,0520 \pm 0,0735$ U/mL dan ekstrak kasar sebesar $0,0140 \pm 0,0198$ U/mL. Aktivitas enzim aviselase setelah pengendapan menurun drastis yaitu enzim pekat sebesar $0,34 \pm 0,487$ U/mg dan ekstrak kasar sebesar $0,93 \pm 1,315$ U/mg.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Prof.Dr. Titania T. Nugroho dan Bapak Dr. Hilwan Yuda Teruna, M.Si yang telah memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan hasil penelitian. Penelitian ini didanai oleh skim penelitian Fundamental a.n. Prof. Dr. Titania T. Nugroho sebagai ketua tim peneliti dengan Dana Desentralisasi DP2M Dirjen Dikti, Kemendikbud, Lembaga Penelitian Univesitas Riau, nomor kontrak 321 NN.19.2/PL/2013, DIPA-023.04.2.415.92/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Ismet, R. S. 2012. Isolasi fungi selulolitik dari tanah hutan primer Pangkalan Bukit Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu, Riau. *Skripsi*. FMIPA, Universitas Riau.
- Metzler D. E. 2003. *Biochemistry–The Chemical Reactions of Living Cells*. Burlington: Elsevier Academic Pr.
- Nisa, D. dan Putri, W. D. R. 2013. Pemanfaatan selulosa dari kulit buah kakao (*Teobroma cacao L.*) sebagai bahan baku pembuatan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2 (3) : 34-42.
- Onsori, H., Zamani, M.R., Motallebi, M., Zhargami, N. 2005. Identification of over producer strain of endo- β -1,4-glucanase in *aspergillus* species : characterization of crude *carboxymethyl cellulase*. *African Journal of Biotechnology*. 4 (1) : 26-30.
- Petit, P., Lucas, E.M.F., Abreu, L.M., Pfenning, L.H., Takahashi, J.A. 2009. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *penicillium* sp. isolated from brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12.
- Triana, R. 2013. Pemurnian dan karakterisasi enzim glukosa oksidase dari isolat lokal *Aspergillus niger* (IPBCC.08.610). *Skripsi*. Departemen Biokimia-FMIPA, Institut Pertanian Bogor.