

Pengaruh pH terhadap Aktivitas *Endo-1,4-β-Glucanase Bacillus* sp. AR 009

The effect of pH on *endo-1,4-β-glucanase* activity from *Bacillus* sp. AR 009

IMAN HIDAYAT*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002.

Diterima: 11 Maret 2005. Disetujui: 4 Juli 2005.

ABSTRACT

The determination of the suitable pH condition for maximizing the activity of *endo-1,4-β-glucanase* of *Bacillus* sp. AR 009 had been done. The acidity range of media for examining the enzyme activities were 4, 5, 6, 7, 8, and 9 at 37°C. The experiments show that the value of maximum activity of *endo-1,4-β-glucanase* was 23.068 U/mL at third day incubation with 124.565 mg/L of sugar reduction at pH 7.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: pH, *Bacillus* sp. AR 009, *endo-1,4-β-glucanase*.

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan polimer rantai lurus glukosa yang tersusun atas unit-unit *anhydro-1,4-glucose* yang dihubungkan oleh ikatan *1,4-D-glycosidic*. Enzim selulase mendegradasi selulosa dengan memecah ikatan ini. Proses degradasi selulosa pada prinsipnya melibatkan 3 jenis enzim yang bekerja secara sinergis, yaitu *endo-* dan *exo-1,4-β-glucanase* serta *β-glucosidase*. (i) Endoglukanase, *1,4-β-D-glucan glucanohydrolase*, dan *CMC-ase* secara acak menghidrolisis bagian dalam *1,4-D-glycosidic* dari glukosa. Hasil dari reaksi ini adalah memendeknya polimer glukosa secara cepat yang diikuti dengan meningkatnya gula reduksi secara perlahan-lahan; (ii) Eksoglukanase, *1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase*, dan *avicelase* menghidrolisis rantai ujung selulosa yang tidak tereduksi dengan selobiosa sebagai struktur primer; (iii) *β-glucosidase* dan *cellobiase* menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Robson dan Chambliss, 1989). Pada umumnya, semua aktivitas enzim khususnya endoglukanase dipengaruhi oleh pH (Pometto III dan Crawford, 1986). Penyimpangan-penyimpangan dari nilai pH optimum pada suatu aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba akan menurunkan aktivitas enzim tersebut (Pelczar dan Chan, 1986).

Genus *Bacillus* merupakan salah satu kelompok bakteri yang mampu mendegradasi selulosa (Sudiana, 2002; Lynd *et al.*, 2002). Dalam penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas *endo-1,4-β-glucanase* dari *Bacillus* sp. AR 009 pada berbagai kondisi pH. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh data kondisi pH yang sesuai bagi tercapainya aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase* dari *Bacillus* sp. AR 009 secara maksimal.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus* sp. AR 009 yang diisolasi dari tanah gambut di Tanjung Puting, Kalimantan Tengah.

Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media *cytophage* dengan komposisi $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $FeCl_3$ 1 g, *yeast extract* 1 g, glukosa 0,1 g, *carboxymethylcellulosa* (CMC) 10 g, dan akuades 1000 ml. Kemudian pH media diatur menjadi pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9.

Propagasi *Bacillus* AR 009. Sebanyak 5 ml media *cytophage* yang telah diberi isolat *Bacillus* sp. AR 009, diinkubasikan pada suhu ruang selama 2 hari. Setelah itu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 150 ml media *cytophage* kemudian di *shaker* pada kecepatan 120 rpm. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel dari media tersebut untuk analisis enzim *endo-1,4-β-glucanase*.

Pengukuran aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase*. Aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase* diukur setiap 24 jam. Pengukuran aktivitas *endo-1,4-β-glucanase* ditentukan berdasarkan metode DNS (Miller, 1959). Diambil sebanyak 2 ml sampel, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm (*SORVALL® RC 5C PLUS*, rotor *Swinging Bucket SM-24* dengan kode rotor 09) selama 10 menit. Setelah itu diambil 1 ml supernatan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml substrat CMC 1% dengan masing-masing pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 (disesuaikan dengan pH media), 1 ml $NaNO_3$ (*Sodium Azide*) 1 N dan 1 ml DNS, selanjutnya dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu didinginkan pada air mengalir, setelah cukup dingin dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer (Thermospectronic Genesis 20) pada panjang gelombang 540 nm (A_{540} awal).

Sebanyak 1 ml dari sisa supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml substrat CMC 1% dengan masing-masing pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam.

* Alamat korespondensi:
Jl. Ir. H. Juanda 18 Bogor 16002
Tel. +62-251-324006. Fax.: +62-251-325854
e-mail: hidayatiman@yahoo.com

Setelah inkubasi, ditambahkan 1 ml NaN_3 1 N dan 1 ml DNS, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu didinginkan pada air mengalir lalu diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (A_{540} akhir). Aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase* dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = [A_{540} \text{ awal} - A_{540} \text{ akhir}] \cdot V_1 \cdot 10^3 \mu\text{mol/BM} \cdot V_2 \cdot T$$

A_{540} awal : nilai absorbansi kadar glukosa sebelum inkubasi (mg/L),

A_{540} akhir : nilai absorbansi kadar glukosa setelah inkubasi (mg/L),

BM : berat molekul glukosa,

V_1 : volume larutan (ml),

V_2 : volume enzim (ml)

T : waktu inkubasi (menit).

1 unit aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase* didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dilepaskan per menit.

Pengukuran pH Sampel. Diambil sebanyak 10 ml sampel kemudian dilakukan pengukuran pH dengan menggunakan pH meter (Horiba F-23).

Pengukuran biomassa bakteri berdasarkan nilai Optical Density (OD). Sebanyak 10 ml sampel diambil untuk mengetahui jumlah biomassa dari *Bacillus sp.* AR 009. Pengukuran jumlah biomassa ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Rancangan percobaan dan analisis data. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor perlakuan yaitu pH. Perlakuan yang digunakan yaitu pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9. Desain percobaan menggunakan desain *completely randomized* dengan 3 replikasi. Setiap pengambilan sampel menggunakan *systematic sampling*. Uji-t digunakan untuk menguji perbedaan antar perlakuan.

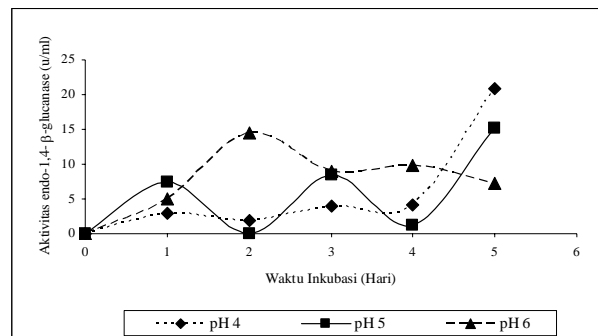
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim *Endo-1,4-β-glucanase*

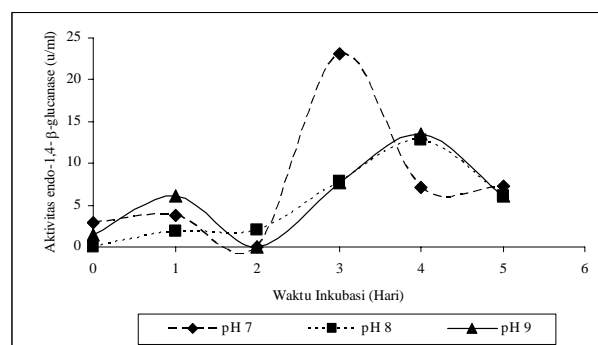
Carboxymethylcellulose (CMC) adalah substrat yang digunakan dalam deteksi awal untuk *screening* enzim selulase khususnya endoglukanase. Enzim selulase merupakan kelompok enzim glikosil hidrolase yang menghidrolisis oligosakarida dan polisakarida (Henrissat, 1991). Aktivitas tertinggi enzim *endo-1,4-β-glucanase* dari *Bacillus sp.* AR 009 terjadi pada media dengan nilai pH 7 yaitu sebesar 23,068 U/mL, diikuti oleh aktivitas enzim pada pH 4 sebesar 20,893 U/mL, pH 5 sebesar 15,258 U/mL, pH 6 sebesar 14,452 U/mL, pH 9 sebesar 13,486 U/mL, dan pH 8 sebesar 12,762 U/mL (Gambar 1). Besar kecilnya nilai aktivitas enzim mempengaruhi kadar gula reduksi yang dihasilkan selama aktivitas enzim berlangsung. Pada pH 7 didapatkan konsentrasi gula reduksi sebesar 124,565 mg/L, sementara itu pada pH 4, 5, 6, 8, dan 9 secara berturut-turut didapatkan konsentrasi gula reduksi sebesar 112,826 mg/L; 82,391 mg/L; 78,043 mg/L; 68,913 mg/L dan 72,826 mg/L. Sehingga dengan demikian dapat dikatakan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin tinggi pula gula reduksi yang dihasilkan.

Tingkat keasaman media sangat mempengaruhi aktivitas enzim. Gambar 1. menunjukkan bahwa aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase Bacillus sp.* AR 009 memiliki karakter yang berlainan pada setiap media dengan nilai pH yang berbeda. Aktivitas tertinggi diperlihatkan pada pH 7.

Hal penting yang diperoleh dari penelitian ini adalah *Bacillus sp.* AR 009 secara aktif mendegradasi CMC pada kisaran pH netral sampai dengan asam (pH 7 sampai dengan pH 4). Hal ini mungkin disebabkan kemampuan adaptasi bakteri, yakni *Bacillus sp.* AR 009 selain mampu tumbuh pada pH netral juga mampu beradaptasi dengan cepat pada kondisi asam karena berasal dari lingkungan yang asam yaitu tanah gambut dengan nilai pH 4,5. Hasil penelitian ini mendukung pernyataan Pometto III dan Crawford (1986) yang menyatakan bahwa mineralisasi substrat selulosa secara dominan terjadi pada kondisi pH asam.



A



B

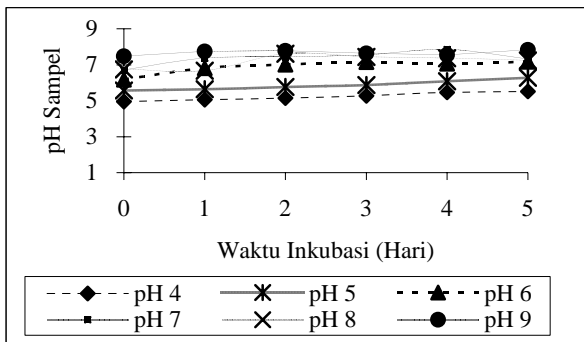
Gambar 1. Pengaruh variasi pH media terhadap aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase Bacillus sp.* AR 009 (A. pH 4, 5, dan 6; B. pH 7, 8, dan 9).

Lama waktu inkubasi hingga tercapainya aktivitas maksimum enzim, menunjukkan hasil yang berlainan pada setiap perlakuan. Pada media dengan nilai pH 4 dan 5 aktivitas tertinggi enzim dicapai pada hari ke-5, pH 6 pada hari ke-2, pH 7 pada hari ke-3, pH 8 dan 9 aktivitas tertingginya berlangsung pada hari ke-4.

Perubahan nilai pH

Adanya aktivitas dari enzim *endo-1,4-β-glucanase* dapat menyebabkan terjadinya perubahan pH dalam lingkungan media (Pometto III dan Crawford, 1986). Selama proses inkubasi *Bacillus sp.* AR 009, pH media cenderung berubah menjadi basa (Gambar 2). Hal ini kemungkinan disebabkan karena akumulasi produk yang berupa gula reduksi sederhana yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa secara acak pada ikatan *1,4-D-glycosidic*. Terjadinya perubahan nilai pH selama proses inkubasi sangat mempengaruhi kerja enzim karena perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut sangat mudah dipengaruhi oleh pH (Pelczar

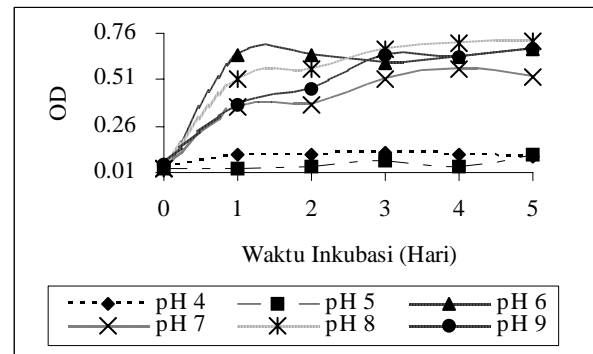
dan Chan, 1986). Selain itu, perubahan pH dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga dapat menimbulkan hilangnya fungsi katalitik enzim (Dick *et al.*, 2000). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang memiliki potensi untuk mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat, dan ikatan enzim-substrat. (Pelczar dan Chan, 1986). Hal ini pula yang menyebabkan terjadinya perubahan kerja enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. AR 009 selama waktu inkubasi berlangsung.



Gambar 2. Fluktuasi nilai pH selama berlangsungnya aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase*

Biomassa

Selama 5 hari masa inkubasi terjadi perubahan nilai biomassa dari *Bacillus* sp. AR 009. Pada pH 4 terjadi peningkatan jumlah biomassa secara optimum pada hari ke-3 yaitu sebesar 0,114. Pada media dengan pH 5, jumlah biomassa tertinggi terjadi pada hari ke-5 yaitu sebesar 0,109. Media dengan pH 6 mengalami kenaikan jumlah biomassa pada hari ke-4 yaitu sebesar 0,629 seiring dengan naiknya nilai aktivitas enzim. Kenaikan jumlah biomassa secara maksimum pada media dengan pH 7 dan 8 terjadi pada hari ke-4 yaitu sebesar 0,570 dan 0,707. Begitupun halnya dengan pH 9, nilai OD maksimum terjadi pada hari ke-5 yaitu sebesar 0,676. Selama aktivitas enzim berlangsung, terjadi pula perubahan jumlah biomassa bakteri (Gambar 3). Tetapi hubungan antara perubahan nilai biomassa yang diukur berdasarkan nilai OD tidak signifikan dengan perubahan aktivitas enzim. Selama proses degradasi selulosa berlangsung, terjadi peningkatan jumlah biomassa, meskipun demikian terjadinya perubahan tersebut tidak memperlihatkan suatu perbandingan yang lurus pada media dengan pH 4. Hal ini terlihat pada hari ke-5 yakni telah terjadi penurunan jumlah biomassa, dan sementara itu pada kondisi yang sama terjadi peningkatan aktivitas enzim *endo-1,4-β-glucanase*. Terjadinya kenaikan aktivitas enzim pada pH media 4 dipengaruhi oleh perubahan nilai pH dan bukan oleh perubahan jumlah biomassa bakteri karena pada hari ke-5 tersebut terjadi kenaikan nilai pH. Hasil yang sama juga terjadi pada perlakuan yang lain.



Gambar 3. Profil perubahan jumlah biomassa bakteri berdasarkan nilai *Optical Density* (OD) yang berlangsung pada pH media 4, 5, 6, 7, 8, dan 9.

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa nilai aktivitas maksimum enzim *endo-1,4-β-glucanase* dari *Bacillus* sp. AR 009 adalah 23,068 U/mL yang dicapai pada hari ke-3 dari waktu inkubasi pada media dengan pH 7 dan kondisi temperatur 37°C. Gula reduksi yang dihasilkan pada kondisi tersebut adalah 124,565 mg/L. Selama aktivitas enzim berlangsung, tingkat keasaman media cenderung berubah menjadi lebih basa dari kondisi awal. Tidak ada hubungan yang signifikan antara nilai aktivitas enzim dengan biomassa bakteri yang diukur dengan menggunakan nilai kerapatan optis (*optical density*).

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan *Bacillus* sp. AR 009 dalam menghasilkan *exo-1,4-β-glucanase* serta *β-glucosidase*.

DAFTAR PUSTAKA

- Dick, W.A., L. Cheng and P. Wang. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Journal of Soil Biology and Biochemistry* 32: 1915-1919.
- Henrissat, B. 1991. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Journal of Biochemistry* 280: 309-316.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl, and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 506-577.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analisis of Chemistry* 31 (2): 426-428.
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: Hadi, R.S. Jakarta: UI Press.
- Pomotto III, A.L. and D. L. Crawford. 1986. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 52 (2): 246-250.
- Robson, L.M. and G.H. Chambliss. 1989. *Enzymes Microbial Technology*. 11: 626-644.
- Sudiana, I.M. 2002. Characteristic of CMC-ase of *Bacillus* sp. Isolated From Gunung Halimun National Park. *Berita Biologi* 6 (1): 131-136.