

SEMIPURIFIKASI DAN UJIREAKSI TRANSGLUKOSILASI P-GLUKOSIDASE DARI *Aspergillus pulverulentus*

Transglycosylation Reaction of Partially Purified *Aspergillus pulverulentus* P-Glucosidase

Joko Sulisty¹, Yati Sudaryati Soeka¹ dan Purnama Dewi²

1. Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI

2. Jurusan Kimia, FMIPA-IPB

ABSTRACT

An extracellular p-glucosidase [EC 3.2.1.21] derived from Aspergillus pulverulentus were separated and partially purified by successive chromatographies and its some characterization and transglycosylation capacity were studied. The purification protocol included precipitation with ammonium sulphate, gel filtration, ion exchange chromatography and native polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme readily hydrolysed cellobiose to form transglycosylation products in the presence of primary alcohol acceptors. This p-glucosidase was stable at temperatures up to 70 °C and from pH 2.5 to 8.5, while its highest activity was in the pH 4.5 at 65 °C.

Kata kunci: Aspergillus pulverulentus, p-glucosidase, purifikasi, transglukosilasi, glukosida.

PENDAHULUAN

Enzim p-glukosidase adalah enzim yang dapat mengatalisis suatu reaksi hidrolisis dan reaksi transglukosilasi sekaligus. Reaksi transglukosilasi ini bermanfaat untuk mensintesis senyawa glukosida, yaitu senyawa yang stabil terhadap cahaya, pH dan suhu tinggi.

Senyawa glikosida telah banyak digunakan, terutama untuk industri pangan, obat-obatan, kosmetika dan bahan kimia laboratorium. Dodekilglukosida misalnya, adalah suatu deterjen non-ionik yang bermanfaat untuk mempelajari protein membran sel. Glikosida lainnya yang dalam satu dasawarsa ini banyak menarik perhatian para ilmuwan adalah arbutin (hidrokinon p-glukopiranosida). Senyawa ini telah digunakan sebagai bahan aditif pada sebuah produk kosmetik yang berfungsi untuk mencegah terjadinya proses hiperpigmentasi atau melanogenesis pada kulit manusia tanpa menimbulkan efek sampingan.

Saat ini, sintesis glikosida secara komersial baru dilakukan secara proses kimiawi. Akan tetapi cara ini memiliki keterbatasan, karena disamping rendemen hasilnya yang rendah, juga prosesnya melibatkan beberapa tahapan reaksi yang rumit dan limbahnya berbahaya bagi lingkungan hidup, sehingga

menyebabkan biaya produksi dan nilai pasar senyawa glikosida menjadi tinggi,

Alternatif lain adalah sintesis glikosida secara bioproses menggunakan enzim yang memiliki aktivitas transfer (transglukosilasi). Cara ini lebih menguntungkan karena hanya melibatkan satu tahapan reaksi yang sederhana akan tetapi dapat diterapkan untuk mensintesis senyawa yang sulit disintesis secara kimiawi.

Sintesis glikosida secara enzimatik, selain mudah dikerjakan substrat untuk proses produksinya dapat berupa limbah pertanian maupun limbah industri pangan, seperti serbuk gergaji, dedak padi, onggok atau limbah tahu dan tempe. Dengan demikian sintesis glikosida secara enzimatik, selain proses produksinya akrab lingkungan juga menguntungkan bagi proses industri.

Kendala penggunaan enzim untuk mensintesis glikosida adalah terbatasnya sumber enzim yang memiliki kapasitas hidrolisis dan transglukosilasi tinggi, sehingga perlu dilakukan upaya-upaya untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim melalui purifikasi, karakterisasi maupun rekayasa genetika. Penelitian ini bertujuan melakukan semipurifikasi enzim p-glukosidase dari *A. pulverulentus* yang

memiliki aktivitas transglukosilasi dengan ketersediaan donor dan akseptor. Enzim yang diperoleh diharapkan mampu mensintesis berbagai macam glukosida dengan sifat spesifik yang tinggi, yang pada akhirnya dapat dimanfaatkan untuk industri bioproses.

BAHAN DAN METODE

Sumber dan substrat enzim

Sumber enzim yang digunakan adalah Pectinase G dari *Aspergillus pulverulentus*, Lot. No. PNH 105226, Amano Pharmaceutical Co., Jepang. Biakan *Aspergillus flavus*, *A. awamori*, *Saccharomyces cerevisiae* *Trichoderma koningii*, *Penicillium expansum* dan *Candida guilliermondii* diperoleh dari Unit Koleksi Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi - LIPI. Substrat donor D-(+selobiosa dan substrat akseptor alkohol dan polifenol diperoleh dari Nakarai Co., Jepang.

Enzim p-glukosidase diproduksi dari kapang *Aspergillus pulverulentus* yang ditumbuhkan pada medium mengandung xilan 2%, pepton 1%, K_2HPO_4 0.4%, $(NH_4)_2HPO_4$ 1%, ekstrak khamir 0.3%, pada 50 mM larutan penyangga (bufer) asetat pH 4.5.

Larutan standar untuk analisis dengan TLC mengandung masing-masing 1% glukosa, selobiosa, metil α -glukosida dan arbutin dalam 50 mM larutan bufer asetat pH 4.5.

Produksi dan pengukuran aktivitas p-glukosidase

Suspensi inokulan dibuat dengan menambahkan akuades steril sebanyak 5 ml kedalam masing-masing biakan yang telah berumur 7 hari ditumbuhkan dalam media PDA pada suhu 27BC. Selanjutnya suspensi inokulan diinokulasikan kedalam medium produksi dan diinkubasikan selama 4-5 hari diatas alat penggoyang (shaker).

Aktivitas enzim p-glukosidase ditentukan secara kolorimetri dengan mengukur jumlah p-nitrofenol yang dilepaskan oleh kerja enzim pada substrat yang diinkubasikan (Graver *et al.* 1977). Campuran reaksi mengandung 0.5 ml substrat p-nitrofenol p-glukopiranosida (PNPG) 5 mM diinkubasikan dengan 0.5 ml larutan enzim pada suhu 40BC selama 15 menit, pada pH 4.5. Reaksi dihentikan dengan penambahan 5 ml larutan $NajCO_3$ 0.55 M. Setelah campuran reaksi dibiarkan selama 30 menit, sampel diukur absorbansinya pada 400 nm. Nilai absorbansi p-nitrofenol yang dilepaskan adalah nilai

absorbansi sampel setelah dikurangi nilai absorbansi kontrol dan blanko. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 mmol p-nitrofenol per menit.

Penentuan kualitatif aktivitas transglukosilasi

Campuran reaksi mengandung substrat 5% selobiosa dan 10% akseptor alkohol atau 3.0% akseptor polifenol, diinkubasikan dengan larutan enzim yang telah diencerkan sebanyak 5 kali dalam 50 mM bufer asetat pH 4.5 pada suhu 40BC, selama 3, 6, dan 24 jam. Produk reaksi yang terbentuk dianalisis secara kualitatif menggunakan plat-plat TLC yang dikembangkan dengan larutan n.-propanol / akuades (85 : 15, v/v). Plat-plat TLC yang telah ditetesi sampel dari masing-masing campuran reaksi, selanjutnya disemprot dengan larutan H_2SO_4 20% dalam metanol, setelah plat-plat TLC dikeringkan pada suhu 120BC selama 1 jam.

Penentuan kadar protein

Kadar protein enzim ditentukan berdasarkan metode Lowry *et al.* (1951), menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar. Setelah larutan enzim diberi perlakuan dengan menambahkan pereaksi Lowry, larutan dibaca absorbansinya pada 660 nm.

Penentuan optimum dan stabilitas enzim terhadap pH dan suhu

Penentuan pH optimum enzim dilakukan dalam berbagai macam larutan bufer pada kisaran pH antara 3.0 sampai 9.0 yang diinkubasikan dengan substrat PNPG 10 mM. Masing-masing adalah bufer sitrat (pH 3.03.5), bufer asetat (pH 4.0-5.5), bufer fosfat (pH 6.0-7.5) dan bufer borak-fosfat (pH 8.0-9.0). Suhu optimum ditentukan pada berbagai kisaran suhu mulai 25 sampai 75BC. Aktivitas tersisa diukur menggunakan substrat PNPG 10 mM.

Stabilitas enzim terhadap pH dan suhu dilakukan dengan cara menginkubasikan enzim pada berbagai kisaran suhu dan pH selama 30 menit, Aktivitas tersisa diukur menggunakan substrat PNPG 10 mM.

Purifikasi enzim

Setelah larutan enzim kasar disentrifugasi pada kecepatan 800 xg selama 10 menit, supernatan yang terbentuk diberi penambahan amonium sulfat hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Setelah

diendapkan satu malam pada suhu rendah, larutan selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 1000 xg selama 10 menit. Endapan yang terbentuk selanjutnya dilarutkan dengan sedikit bufer asetat 50 mM pH 4.5.

Suspensi yang terbentuk selanjutnya dipekatkan dengan alat pengering beku. Untuk menghilangkan sisa amonium sulfat, larutan enzim dicuci dengan larutan bufer yang sama dengan menggunakan kolom pemisah mengandung matriks Sephadex G 25 (2.0 x 30 Cm), pada kecepatan alir 18 ml/jam. Fraksi fraksi yang menunjukkan aktivitas P glukosidase tinggi dikumpulkan dan dipekatkan kembali dengan prosedur yang sama. Larutan enzim yang telah dipekatkan selanjutnya dikromatografi dengan kolom penukar ion QAE Sephadex A 50 (2 x 40 Cm) dan dielusi dengan 500 ml bufer yang sama, dilanjutkan dengan gradient linear NaCl (0 B 0.4 M) dengan kecepatan alir 18 ml/jam. Fraksi fraksi yang menunjukkan aktivitas p glukosidase tinggi dikumpulkan dan dipekatkan kembali dengan prosedur yang sama. Prosedur pemisahan protein selanjutnya dilakukan secara kromatografi menggunakan kolom Biogel P 100 (2.0 x 36 Cm) dan dielusi dengan bufer yang sama pada kecepatan alir 5.6 ml/ jam. Fraksi yang menunjukkan aktivitas glukosidase tinggi

selanjutnya dikumpulkan dan dipekatkan kembali untuk diuji secara elektroforesis.

Elektroforesis

Prosedur analisis secara elektroforesis dilakukan menurut metode Ornstein & Davis (dalam Garfin, 1990), pada konsentrasi akrilamida 12.5%, dengan tegangan konstan 200 V, selama 2 jam. Selanjutnya gel gel yang telah dialiri listrik diwarnai dengan pewarna Coomasie Brilliant Blue (CBB) R 250 selama beberapa menit. Selanjutnya gel dicuci dengan larutan 25% metanol dan 75% asam asetat.

HASIL

Aktivitas hidrolitik sumber enzim

Hasil pengujian aktivitas hidrolisis enzimatik yang dianalisis menggunakan substrat PNPg sebagaimana dijelaskan pada Bahan dan Metode, disajikan pada Tabel 1. Pada tabel ini terlihat bahwa aktivitas hidrolitik tertinggi ditunjukkan oleh enzim komersial yang diproduksi menggunakan biak *Aspergillus pulverulentus*, yaitu 2.8 U/ml. Besaran nilai tersebut memberi indikasi bahwa enzim komersial memiliki kapasitas glukosidik 50 kali lipat lebih tinggi dari pada enzim dari biakan lainnya tidak menunjukkan aktivitas hidrolitik yang optimal.

Tabel 1. Uji aktivitas p glukosidase pada berbagai sumber enzim.

Sumber enzim	Aktivitas β-glukosidase (U / ml)
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	2.8
<i>Aspergillus awamori</i>	5.0 x 10 ⁻²
<i>Aspergillus flavus</i>	7.4 x 10 ⁻⁵
<i>Trichoderma koningii</i>	4.3 x 10 ⁻³
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.8 x 10 ⁻³
<i>Penicillium expansum</i>	9.0 x 10 ⁻⁴
<i>Candida guilliermondii</i>	7.9 x 10 ⁻⁴

Tabel 2. Aktivitas transglukosilasi beberapa p glukosidase pada berbagai akseptor.

Sumber β-glukosidase	Aksesor reaksi transfer						
	Meth	Eth	n-Proh	Hq	Pc	Rs	Con
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	++	++	++	-	-	-	+
<i>Aspergillus awamori</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	-	-	-	-	+

*) Meth, metanol; Eth, etanol; n Proh, n pronol; Hq, hidrokinon; Pc, pirokatekol; Rs, resorsinol; Con, kondensasi. (++) , spot besar; (+), spot kecil; (), tidak ada spot.

Tabel 3. Beberapa sifat fisiologis enzim p-glukosidase dari *A. pulverulentus*.

Sumber enzim	Aktivitas p-glukosidase (U / ml)
Suhu optimum	65B°C
Stabilitas terhadap suhu	~ 70B°C
PH optimum	4,5
Stabilitas terhadap pH	-8.5

Aktivitas transglukosilasi dan kondensasi sumber enzim

Hasil pengujian aktivitas transglukosilasi (transfer) enzim p-glukosidase dari berbagai sumber enzim, disajikan pada Tabel 2. Untuk meningkatkan aktivitas hidrolitiknya, enzim kasaryang diperoleh dari berbagai sumber enzim konsentrasinya dipekatkan 10 kali lipat, sehingga diperoleh tingkat kepekatan yang diperlukan dalam pengujian aktivitas transfer. Hasil pengujian menunjukkan bahwa enzim p-glukosidase dari biak *A. pulverulentus* memiliki kapasitas reaksi transfer yang memadai dalam memindahkan gugus glukosil pada berbagai substrat-akseptor terdiri dari metanol, etanol dan n-propanol, Sebaliknya enzim P-glukosidase yang diekstraksi dari keempat biakan *Aspergillus*, masing-masing *A. awamori*, *A. flavus* dan *T. koningii*, tidak memiliki baik kapasitas reaksi transfer maupun reaksi kondensasi, sehingga tidak mampu membentuk senyawa glukosida maupun oligosakarida dari substrat selobiosa dan akseptor alkohol primer secara reaksi transfer dan kondensasi. Dilain fihak, pengujian aktivitas transfer enzimatik menggunakan berbagai akseptor turunan fenol, yaitu hidrokinon, resorsinol dan pirokatekol, memberikan hasil yang negatif (tidak terbentuk produk transfer).

Semi karakterisasi p-glukosidase dari *A. pulverulentus*

Hasil analisis baik aktivitas hidrolitik maupun transglukolitik sumber-sumber enzim yang diuji, menunjukkan bahwa enzim p-glukosidase dari *A. pulverulentus* merupakan sumber enzim yang paling berpotensi dalam mensintesis senyawa glikosida, sebagai target produk transfer yang ingin dicapai dalam hal pemanfaatan sumber enzim p-glukosidase, sehingga enzim p-glukosidase dari *A. pulverulentus* perlu ditingkatkan kemurniannya melalui prosedur purifikasi secara bertahap. Hasil pengujian stabilitas dan kondisi optimum enzim ditunjukkan pada Tabel 3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim

p-glukosidase dari *A. pulverulentus* memiliki kestabilan yang tinggi baik terhadap suhu (25BO70BC) maupun terhadap pH (2.5 - 9.5). Penentuan aktivitas hidrolisis yang dilakukan pada kondisi optimum (suhu 65BC dan pH 4.5) memberikan hasil sebesar 19 Unit / ml enzim.

Semi purifikasi p-glukosidase dari *A. pulverulentus*

Tahap awal pemurnian dilakukan dengan mengendapkan protein dengan cara menambahkan amonium sulfat hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa endapan yang terbentuk mengandung protein sebesar 7,94 mg/ml, dengan aktivitas p-glukosidase sebesar 27,90 U/ml, sedangkan aktivitas p-glukosidase pada supernatannya hanya 0,73 U/ml. Hasil ini mengindikasikan bahwa sekalipun dalam supernatan masih mengandung protein, akan tetapi hampir seluruh enzim p—glukosidase berhasil diendapkan dengan penambahan amonium sulfat.

Residu amonium sulfat dihilangkan dengan metode permeasi gel menggunakan matriks Sephadex G-25. Gel ini mampu memisahkan protein dengan berat molekul 1.000 sampai 5.000. Partikel amonium sulfat yang sangat kecil tertahan dalam matriks, sedangkan protein berukuran besar terelusi dalam fraksHfraksi awal hasil pembilasan kolom dengan larutan penyangga (Gambar 1).

Penghilangan garam dari protein dilakukan sebelum kromatografi penukar ion dilakukan, karena ion-ion garam dapat berkompetisi dengan protein dalam berikatan dengan matriks. Selain itu, molekul garam yang terikat dengan protein dapat menyebabkan perubahan interaksi antara molekul enzim dengan matriks, sehingga protein yang terikat lebih kuat pada matriks menjadi sukar terbilas. Hasil fraksinasi enzim dengan kromatografi penukar ion, disajikan pada Gambar 2. Enzim dengan aktivitas yang cukup besar terdapat padafraksi nomor 60 B 66, yaitu pada saat konsentrasi NaCl pada larutan pembilas

Tabel 4. Tahapan pemurnian enzim glukosidase dari *A. pulverulentus*

Prosedur	Vol (ml)	Aktivitas (U/ml)	Total Aktivitas (U)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Rendemen (%)	Tingkat Pemurnian (Kali)
Enzim kasar	43.0	18.9	811.8	8.7	372.4	2.2	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ ~80%	23.0	27.9	641.7	7.9	182.6	3.5	79	1.6
Sephadex G-25	23.0	26.2	601.5	7.3	167.9	3.6	74	1.6
QAE Sephadex								
A-50	36.4	3.4	121.9	0.1	4.9	25.0	18	11.5
Biogel P-100	8.6	8.1	69.7	0.1	0.8	93.1	9	42.7

Uji aktivitas transglukosilasi enzim glukosidase

Enzim P glukosidase yang telah dimurnikan sampai tahapan tertentu (semipurifikasi) selanjutnya diuji kemampuan reaksi transglukosilasinya terhadap beberapa akseptor dan dianalisis menggunakan khromatografi lapis tipis (TLC). Hasil pengujian aktivitas transfer enzim p glukosidase kasar dan yang telah disempurnifikasi disajikan dalam bentuk khromatogram TLC pada Gambar 4 dan 5.

Gambar 4.a, menunjukkan bahwa enzim kasar p glukosidase dari *A. pulverulentus* mampu mengkatalisis reaksi transglukosilasi dengan mensintesis produk transfer dari substrat selobiosa serta akseptor metanol, etanol dan n propanol dalam bentuk senyawa glukosida, masing masing sebagai metil p glukosida (Rf 0.6), etil p glukosida (Rf 0.7) dan n propil p glukosida (Rf 0.8). Semakin panjang gugus alkil pada glukosida semakin nonpolar sifatnya, sehingga nilai Rf nya semakin meningkat.

Gambar 4.b, menunjukkan bahwa enzim glukosidase dari *A. pulverulentus* yang telah disempurnifikasi tetap memiliki aktivitas transglukosilasi dengan mensintesis produk transfer dari substrat selobiosa serta akseptor metanol, n propanol dan etilenglikol dalam bentuk senyawa glukosida, masing masing sebagai metil p glukosida, n propil p glukosida dan etilenglikol p glukosida. Produk transfer dari etilenglikol memiliki nilai Rf lebih kecil daripada metil P glukosida yaitu Rf 0,5,

Enzim p glukosidase dari *A. pulverulentus* tidak menunjukkan aktivitas transfer secara signifikan melalui indikasi pemindahan gugus glukosil pada kondisi derivat polifenol yang berperan sebagai akseptor, sehingga senyawa polifenol dianggap tidak efektif digunakan sebagai akseptor reaksi transfer

karena berpotensi menghambat aktivitas transglukosilasi.

PEMBAHASAN

Enzim komersial dari *A. pulverulentus*, selain mengandung enzim p glukosidase juga mengandung enzim pektinase dan p xilosidase pada tingkat konsentrasi yang tinggi, sehingga menunjukkan aktivitas hidrolitik yang sangat tinggi jika dibandingkan enzim p glukosidase lainnya yang diekstraksi dan beberapa biakan koleksi Balaibang Mikrobiologi.

Tingginya aktivitas enzim komersial antara lain disebabkan oleh perbedaan bahan penginduksi yang digunakan dalam pembuatan enzim komersial Pektin dan campuran sakharida yang digunakan sebagai bahan penginduksi enzim pektinase dari *A. pulverulentus*, ternyata juga menginduksi enzim glukosidase. Menurut Sandhu dalam Berka *et al.* 1992 bahwa salah satu penginduksi yang potensial dalam memproduksi enzim glukosidase adalah pektin karena kondisi inkubasi yang dikehendaki oleh enzim pektinase juga sangat sesuai dengan kondisi yang dibutuhkan dalam memproduksi enzim p glukosidase Selain itu tingkat pemekatan pada enzim komersial juga sangat menentukan tingginya aktivitas enzim.

Untuk memisahkan enzim glukosidase yang terkandung dalam enzim komersial dari beberapa komponen protein lainnya, diperlukan suatu tahapan pemurnian menggunakan beberapa jenis matriks kolom khromatografi untuk filtrasi gel dan kolom penukar ion.

Koefisien partisi enzim dalam kolom filtrasi gel dapat ditentukan dengan rumus $Kav = (Ve Vo)/(Vt - Vo)$, Vo adalah volume antar partikel gel dalam kolom yang ditentukan dengan Blue Dextran 2000. Senyawa ini memiliki berat molekul 2 juta, sehingga dapat

segera terelusi keluar dari kolom tanpa tertahan matriks. V_e , yaitu volume pada saat enzim keluar dari kolom, sedangkan V_t adalah volume total matriks dihitung dengan rumus, $V_t = r \times h$ (jari jari x tinggi kolom). Nilai K_{av} enzim glukosidase adalah sebesar 0.062. Nilai ini menunjukkan bahwa enzim p glukosidase hampir tidak tertahan dalam matriks gel, dengan demikian enzim ini memiliki berat molekul lebih besar dari 5,000. Sedangkan dengan kolom matriks Biogel P 100, nilai K_{av} enzim p glukosidase adalah 0.041, dengan V_o 17 ml, V_e 20 ml dan V_t 114.1 ml, memberi hasil bahwa enzim p glukosidase memiliki berat molekul lebih besar dari 100.000.

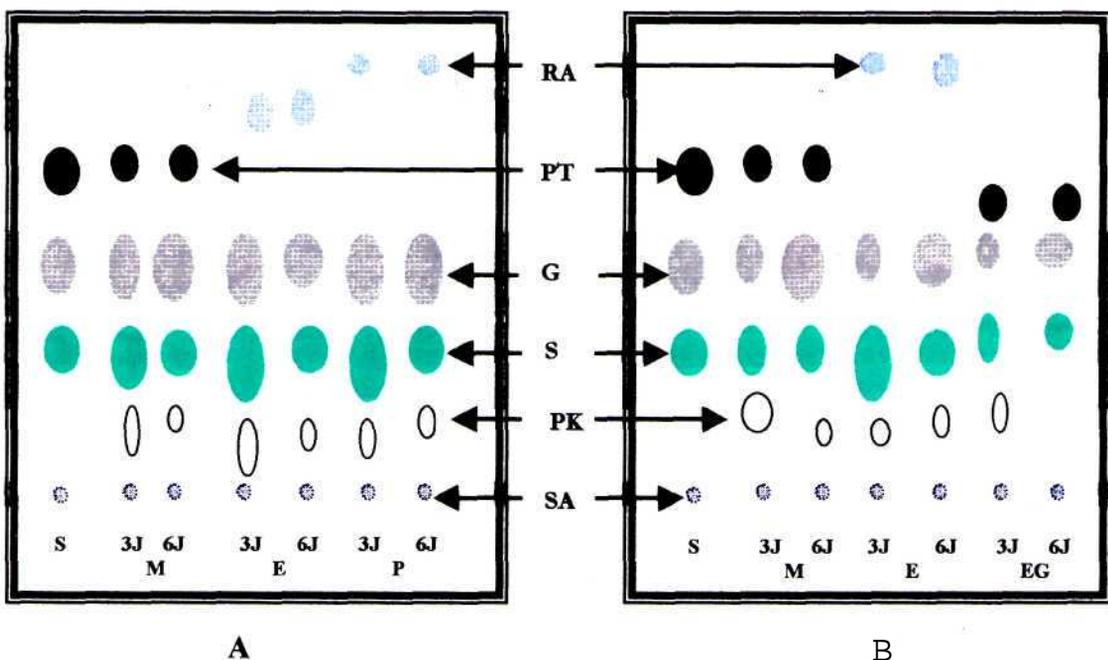
Selain menunjukkan aktivitas hidrolitik yang sangat tinggi, enzim p glukosidase dari *A. pulverulentus* juga memperlihatkan aktivitas transglukosilasi yang cukup tinggi dan sangat spesifik pada substrat selobiosa dan beberapa akseptor alkohol primer. Reaksi transglukosilasi dapat dirumuskan sebagai berikut,



(G O G, selobiosa; EH, enzim; GE, kompleks glukosil enzim; G O H, glukosa; R'OH, akseptor alkohol; G O R', glukosida)

Senyawa glukosida sebagai produk transfer dianalisis menggunakan fase diam dalam KLT (TLC) dari gel silikayang bersifat relatif polar, sedangkan fase geraknya adalah larutan pengembang. Senyawa nonpolarakan terbawa oleh fase gerak sehingga nilai R_f nya lebih besar, sedangkan senyawa polar akan tertahan dengan nilai R_f lebih rendah. Dengan demikian urutan nilai R_f adalah glukosida (R_f 0.6), glukosa (R_f 0.5), selobiosa (R_f 0.3) dan oligosakarida (R_f 0.2).

Senyawa oligosakarida terbentuk karena aktivitas kondensasi sebagai konsekuensi dari lemahnya aktivitas transglukosilasi pada kondisi reaksi yang kurang optimal. Akan tetapi tingginya aktivitas hidrolitik yang dimiliki juga menyebabkan cepatnya proses terhidrolisis kembali senyawa hasil reaksi kondensasi tersebut, sehingga memberi indikasi bahwa enzim glukosidase dari *A. pulverulentus* tetap aktif melakukan aktivitas selama 24 jam inkubasi.



Gambar 4. Kromatogram TLC produk transglukosilasi p glukosidase dari *A. pulverulentus*.

(A), enzim kasar p glukosidase dan (B), enzim semimurni p glukosidase.

S, Standar (S, selobiosa; G, Glukosa; PT, arbutin); RA, residu akseptor; PT, produk transfer;

PK, produk kondensasi; SA, spot awal J, jam; M, metanol; E, etanol; P, n propanol; EG, etilenglikol.

KESIMPULAN

Enzim p-glukosidase dari *A. pulverulentus* memiliki aktivitas hidrolitik dan aktivitas transglukosilasi yang tinggi dan spesifik. Kondisi optimum untuk aktivitas hidrolitik adalah pada suhu 65°C dan pH 4.5. Enzim p-glukosidase stabil sampai pada suhu 70°C dan pada kisaran pH 2.5 sampai 8.5.

Pemurnian enzim secara parsial dilakukan melalui prosedur pemurnian bertahap yaitu pengendapan protein dengan amonium sulfat, filtrasi gel dengan matriks Sephadex G-25, kolom penukar anion dengan matriks QAE Sephadex A-50, dan gel filtrasi dengan matriks Biogel P-100. Hasil purifikasi menunjukkan bahwa tingkat kemurnian enzim p-glukosidase mengalami peningkatan sebesar 42.7 kali, dengan aktivitas spesifik 93.10 unit/mg protein.

Hasil pengujian menggunakan elektroforesis menunjukkan bahwa fraksi kromatografi dari kolom Biogel P-100 masih mengandung 4 jenis protein (4 pita protein), sehingga belum mencapai tingkat homogenitas. Fraksi terakhir menunjukkan bahwa enzim ini memiliki p_i dibawah 4.5 dengan estimasi berat molekul lebih besar dari 100.000. Hasil pengujian selanjutnya menunjukkan bahwa enzim yang telah disempurnifikasi ini masih memiliki aktivitas transglukosilasi pada kehadiran substrat-donor selobiosa dan substrat-akseptor metanol, n-propanol dan etilenglikol, akan tetapi negatif pada akseptor turunan polifenol.

DAFTAR PUSTAKA

- Berka RM, Dunn-Coleman N and Ward M. 1992.** Industrial enzymes from *Aspergillus* Species. In Bennet JW and Klich MA, *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan* AL and Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-270.
- Garfin DE. 1990.** One-Dimensional Gel Electrophoresis. In Deutscher MP, *Guide to Protein Purification*. Academic Press Inc., San Diego. P425-441.
- Grover AK, Macmurchie DD and Cusley RJ. 1977.** Studies on almond emulsin p-D-glucosidase : Isolation and characterization of bifunctional isoenzyme. *Biochemical and Biophysics Ada*. 482, 98-108,
- Pridham JB. 1960.** Hydrolytic enzymes. *Biochemistry Journal*. 76, 13-17.
- Reese ET, Maguire, AH and Parrish FW. 1968.** Glucosidases and exoglucanases. *Canadian Journal of Biochemistry*. 46, 25-34,
- Sakama N and Tadasa K. 1995.** Variation of inhibition modes by n-alcohols in arbutin (Hydroquinone-O-P-D-glucopyranoside) hydrolysis by P-glucosidase. *Bioscience Biotechnology Bioengineering*. 59, 1352-1354,
- Shinoyama H, Kamiyama Y and Yasui T. 1988.** Enzymatic synthesis of p-xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger* p-xylosidase. *Agriculture Biological Chemistry*. 52, 2197-2202.
- Sulistyo J, Kamiyama Y, Ito H and Yasui T. 1994.** Enzymatic synthesis of hydroquinone p-xyloside from xylooligosaccharides. *Bioscience Biotechnology Bioengineering*. 7,1311-1313.
- Sulistyo J, Kamiyama Y and Yasui T. 1995.** Purification and some properties of *Aspergillus pulverulentus* p-xylosidase with transxylosylation capacity. *Journal Fermentation Technology and Bioengineering*. 1, 17-22.
- Sulistyo J. 1996.** Screening for p-xylosidases possessing transfer activity and identification of Transfer products. *Jurnal Mikrobiologi Tropika*. 1 (1), 7-12.
- Sulistyo J. 1996.** Formation of alkyl p-xylosides by enzymic transxylosylation. *Jurnal Biologi Indonesia*. 1, 12-18.
- Sulistyo J. 1997.** Production of partially purified a-xylosidase of *Aspergillus pulverulentus*. *Jurnal Mikrobiologi Tropika*. 1 (2), 76-83.