

Pengaruh 1 ppm Ion Fe^{2+} dan Variasi pH terhadap Aktivitas *Alkana hidroksilase* Jamur *Aspergillus terreus*

N. Syamsi, N. D. Kuswytasari, dan M. Shovitri
Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
e-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

Abstrak—Polietilen sulit didegradasi karena tersusun atas monomer alkana yang memiliki ikatan C-C dan C-R yang bersifat stabil. Jamur *Aspergillus terreus* diketahui menghasilkan *Alkana hidroksilase* (AH), salah satu enzim yang terlibat dalam degradasi polietilen. Enzim AH membutuhkan kofaktor berupa ion Fe^{2+} . Tujuan dari penelitian ini, untuk mengetahui pengaruh 1 ppm ion Fe^{2+} dan variasi pH terhadap aktivitas enzim AH jamur *A. terreus* dalam mendegradasi plastik. Penelitian ini menggunakan medium MSM dengan 1 ppm ion Fe^{2+} dan variasi pH. Parameter yang diamati adalah aktivitas enzim AH dengan menggunakan metode spektrofotometri. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan 1 ppm ion Fe^{2+} dan variasi pH berpengaruh terhadap aktivitas AH. Hasil tertinggi aktivitas AH dicapai pada konsentrasi ion Fe^{2+} 1 ppm dan pH 7, yaitu sebesar 10,6909 U/mL.

Kata Kunci—*Alkana hidroksilase*, *Aspergillus terreus*, Kofaktor, Polietilen, Spektrofotometri.

I. PENDAHULUAN

PENGUNAAN plastik untuk kebutuhan sehari-hari semakin meningkat seiring dengan perkembangan zaman dan meningkatnya jumlah penduduk. Peningkatan penggunaan plastik yang terjadi tiap tahunnya mengakibatkan limbah yang dihasilkan juga semakin meningkat, sehingga menyebabkan permasalahan lingkungan [1]. Salah satu jenis plastik yang banyak di produksi adalah jenis polietilen.

Polietilen (PE) merupakan polimer termoplastik yang tersusun atas rantai hidrokarbon yang panjang [2], berwarna putih yang mempunyai titik leleh bervariasi antara 110° - 137°C dan umumnya polietilen tahan terhadap zat kimia [3]. Polietilen sulit didegradasi karena tersusun atas monomer alkana yang memiliki ikatan C-C atau C-R yang bersifat stabil [4]. Berbagai metode yang digunakan dalam proses pengolahan limbah sampah plastik polietilen antara lain pembakaran, daur ulang, dan biodegradasi [2]. Biodegradasi merupakan proses pemecahan polimer, baik polimer alami maupun sintetik oleh agen biologis seperti jamur dan bakteri [5]. Biodegradasi dianggap sebagai strategi yang ramah lingkungan untuk pengelolaan limbah plastik dan dapat mengurangi polusi yang dihasilkan dari metode degradasi plastik secara konvensional [6].

Penelitian yang dilakukan oleh Kurniawati [7] menunjukkan bahwa, jamur hasil isolasi dari tanah mangrove Wonorejo memiliki kemampuan untuk mendegradasi plastik, salah satunya adalah *A. terreus*. Jamur *A. terreus* tumbuh pada suhu 30° - 37°C dan rentang pH 4-8 [8][9]. Jamur ini diketahui menghasilkan enzim *Alkana hidroksilase* (AH). AH merupakan salah satu enzim yang terlibat dalam degradasi polietilen. Enzim ini mengkatalis pengenalan satu

atom oksigen yang berasal dari molekul oksigen ke dalam molekul substrat alkana [10].

AH dalam mendegradasi polimer alkana dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH medium dan kebutuhan logam Fe yang merupakan kofaktor enzim [11]. Kofaktor merupakan senyawa non-protein yang digunakan untuk aktivasi enzim, yang pada umumnya terletak pada sisi aktif dari enzim. Selain itu Fe juga dapat berperan sebagai elektron donor atau elektron aseptor. Fe di lingkungan pada prinsipnya sebagai unsur yang berada dalam dua kondisi bilangan oksidasi yaitu *ferrous* (Fe^{2+}) yang dapat berfungsi sebagai elektron donor dan *ferric* (Fe^{3+}) sebagai elektron aseptor [12]. Diketahui bahwa ion Fe^{2+} merupakan mikronutrien. Beberapa penelitian tentang degradasi plastik menggunakan ion Fe^{2+} sebesar 1 ppm dalam medium degradasi, seperti penelitian yang dilakukan oleh Rohmah [13]. Selain itu ada faktor lain yang dapat mempengaruhi proses degradasi alkana adalah pH medium. Menurut Singh [14], AH memiliki pH optimum dalam mendegradasi alkana pada rentang 7-8. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dan variasi pH terhadap aktivitas AH jamur *A. terreus*.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2019 di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini antara lain medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang digunakan sebagai subkultur jamur *Aspergillus terreus*, *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang digunakan sebagai kultur starter, dan *Minimal Salt Medium* (MSM) yang digunakan sebagai medium degradasi plastik. Pada pembuatan medium PDA, pertama-tama ditimbang PDA bubuk sebanyak 39 gr dan dilarutkan ke dalam 1000 mL aquades. Selanjutnya dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* selama 10 menit, dan diautoklaf pada suhu 121°C tekanan 1.5 atm selama 15 menit [15]. Kemudian medium PDA ditambahkan *chloramphenicol* sebanyak 100 mg/L. *Chloramphenicol* merupakan antibiotik yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri pada medium kultur [16]. Medium PDA selanjutnya dituang ke dalam tabung reaksi dan didinginkan dalam keadaan miring (*slant agar*). Pada pembuatan medium PDB, ditimbang kentang sebanyak 200 gram dan direbus dalam 1000 ml aquades selama 1 jam, lalu disaring ekstraknya. Ekstrak

kentang ditambah dengan 20 gram dextosa dan dihomogenkan dengan *hot plate magnetic stirrer*. Medium PDB diautoklaf pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit [17]. Medium PDB selanjutnya dituang ke dalam Erlenmeyer sebanyak 4,5 mL. Medium MSM dibuat dengan melarutkan 3 gr Na₂HPO₄·7H₂O ; 3 gr KH₂PO₄ ; 0,5 gr NaCl ; 1 gr NH₄Cl ; 0,5 gr MgSO₄·7H₂O ; 1 mg CaCl₂ ; 0,007% (w/v) yeast extract ; 0,003% (w/v) Bacto-peptone ; dan 1 mg FeSO₄·7H₂O [18] ke dalam 1000 mL aquades. Selanjutnya medium dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*, dan di autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Medium MSM selanjutnya dituang ke dalam botol berukuran 200 mL sebanyak 45 mL.

C. Pembuatan Starter

Isolat yang akan di subkultur adalah LM 1021 (*Aspergillus terreus*) yang merupakan stok koleksi Laboratorium Mikrobiologi & Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Spora dari isolat LM 1021 diambil menggunakan jarum tanam tajam, dan di subkulturkan pada medium *slant* agar (PDA). Kultur di inkubasi selama 7 hari pada suhu ruang dan dalam kondisi aerob [19]. Kemudian pembuatan kultur starter dimulai dengan perhitungan jumlah spora. Kultur Isolat jamur yang berusia 7 hari ditambahkan aquades steril sebanyak 5 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Perhitungan spora jamur dilakukan dengan menggunakan metode *haemocytometer* dengan perbesaran 400x. Kepadatan kultur harus mencapai 10⁶ spora/mL, yang dihitung menggunakan persamaan 1 [20].

$$\text{kepadatan spora} = \frac{n \times fp}{\frac{1}{400} \times 80 \times 0.1} \times \frac{1000 \text{ mm}^2}{1 \text{ mL}} \quad (1)$$

Keterangan:

- n : Jumlah sel yang dihitung
- fp : faktor pengenceran
- 1/400 : luas kotak kecil
- 80 : jumlah kotak yang dihitung
- 0.1 : tinggi/kedalaman *haemocytometer*

Apabila jumlah spora dalam suspensi memiliki kepadatan lebih dari 10⁶ spora/mL, maka dilakukan pengenceran melalui persamaan 2 [21].

$$M_1 V_1 = M_2 V_2 \quad (2)$$

Keterangan:

- M₁ : Konsentrasi suspensi spora > 10⁶ spora/mL
- V₁ : Volume suspensi spora > 10⁶ spora/mL
- M₂ : Konsentrasi suspensi spora = 10⁶ spora/mL
- V₂ : Volume suspensi spora = 10⁶ spora/mL

Suspensi jamur dengan kepadatan 10⁶ spora/mL diambil sebanyak 0.5 mL dan dimasukkan ke dalam 4.5 mL medium PDB sehingga total volume menjadi 5 mL. Kultur diinkubasi selama 3 hari, yang merupakan fase ½ log sesuai dengan kurva pertumbuhan [13].

D. Persiapan Sampel Uji

Plastik uji yang digunakan adalah plastik dari jenis *High Density Polyethylene* (HDPE). Plastik uji dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm sebanyak 20 lembar. Potongan plastik selanjutnya disterilkan menggunakan etanol 70% [22]. Sterilisasi menggunakan etanol 70% dilakukan dengan merendam potongan plastik selama kurang lebih 30 menit dan dikering anginkan sekaligus dengan di UV pada LAF selama kurang lebih 30 menit [23].

E. Biodegradasi Plastik

Biodegradasi plastik dilakukan dengan dua perlakuan, yaitu konsentrasi FeSO₄·7H₂O 1 ppm dan pH (6, 7, 8). Pengaturan perlakuan pH dapat dilakukan dengan HCl 0.1 M [24] dan NaOH 0.1M. Medium MSM dimasukkan ke dalam botol gelas yang berukuran 200 mL sebanyak 45 mL. Kemudian di sterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1.5 atm, 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, dilakukan pengaturan variasi pH 6, 7, 8 dengan HCL 0.1M dan NaOH 0.1M. Kemudian medium MSM ditambahkan 5 mL kultur starter, serta ditambahkan dengan plastik uji sebanyak 20 lembar (1 x 1 cm) dengan dua kali ulangan. Kemudian diinkubasi selama 30 hari dalam keadaan statis. Setelah 30 hari akan dilakukan pengukuran aktivitas enzim *Alkana hidroksilase*.

F. Aktivitas Enzim Alkana hidroksilase

Pengukuran aktivitas *Alkana hidroksilase* dilakukan dalam 2 seri, yaitu dengan penambahan NADH dan tanpa NADH. Pengukuran aktivitas *Alkana hidroksilase* dengan penambahan NADH dilakukan berdasarkan metode Mishra & Singh [14]. Campuran reaksi terlihat pada Tabel 1. Reaksi dimulai dengan ditamahnya heksadekan sebanyak 10 µL ke dalam campuran reaksi dan diinkubasi selama 15 menit.

Sedangkan aktivitas *Alkana hidroksilase* tanpa NADH dilakukan dengan membuat campuran reaksi yang sama seperti pada Tabel 1 namun tanpa NADH, dimana total campuran reaksi 1 mL dengan penambahan aquabides. Aktivitas enzim diukur berdasarkan penurunan absorbansi NADH pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm [25][26].

Penurunan absorbansi NADH didapat dari selisih NADH awal (Campuran reaksi Tabel 1. yang diinkubasi selama 0 menit) dengan NADH akhir (Campuran reaksi Tabel 1. yang diinkubasi selama 15 menit). Satu unit aktivitas *Alkana hidroksilase* merupakan jumlah enzim dalam mengoksidasi 1 µmol NADH per menit [27]. Besarnya aktivitas enzim sama dengan U/mL enzim.

Tabel 1.

Campuran reaksi aktivitas <i>Alkana hidroksilase</i>		
No	Bahan	Volume
1	Buffer Tris-HCl 20 mM	905µL
2	Buffer CHAPS 0.15% pH 7.8	1,5µL
3	NADH 0.1 mM	33,5µL
4	Crude enzim	50µL
5	Larutan heksadekan 1%	10µL
Total Volume Larutan		1mL

Blanko untuk spektrofotometer adalah: Campuran reaksi Tabel 1 menggunakan *crude* enzim yang berasal dari kultur yang mengandung FeSO₄·7H₂O 0 ppm ditambahkan aquades dan diinkubasi selama 0 menit

G. Analisa Data dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 1 variabel yaitu pH. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak dua kali. Analisa data aktivitas *Alkana hidroksilase* dilakukan dengan metode deskriptif kuantitatif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Aktivitas Enzim Alkana hidroksilase

Penelitian ini menggunakan 2 metode pengukuran aktivitas *Alkana hidroksilase* (AH) yaitu, dengan dan tanpa penambahan NADH. Hal ini bertujuan untuk mengetahui fungsi dari ion Fe²⁺ sebagai kofaktor atau elektron donor.

Hasil uji aktivitas AH dengan penambahan NADH dan tanpa penambahan NADH dapat dilihat pada Tabel 2. Dari hasil aktivitas AH dengan penambahan NADH, terlihat bahwa nilai tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dan pH 7 sebesar 10,6909 U/mL, sedangkan tanpa penambahan NADH hasil tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dan pH 8 sebesar 4,9737 U/mL (Tabel 2.).

Tabel 2.

Perbandingan Aktivitas AH pada konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dengan pH yang berbeda.

No	Konsentrasi ion Fe^{2+}	pH	Aktivitas AH (U/mL)	
			NADH	Tanpa NADH
1	1 ppm	6	7,1152	3,9030
2		7	10,6909	3,5394
3		8	4,8929	4,9737

Berdasarkan Tabel 2, aktivitas AH mengalami penurunan pada penambahan NADH, tetapi masih lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas AH tanpa NADH. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan pH yang lebih asam atau basa dapat mempengaruhi aktivitas AH dan ion Fe^{2+} digunakan sebagai kofaktor, didukung dengan nilai aktivitas AH tanpa penambahan NADH yang tidak berbeda jauh. Meskipun Madigan [12] menyatakan bahwa ion Fe^{2+} merupakan elektron donor, namun pada hasil aktivitas AH menunjukkan bahwa ion Fe^{2+} tidak digunakan sebagai elektron donor, melainkan sebagai kofaktor. Diketahui bahwa ion Fe^{2+} digunakan sebagai elektron donor pada mikroorganisme yang dapat mengoksidasi ion Fe^{2+} , dengan ini dapat diindikasikan bahwa jamur *A. terreus* tidak dapat mengoksidasi ion Fe^{2+} . Selain itu, ion Fe^{2+} merupakan mikronutrien yang biasanya bertindak sebagai kofaktor dengan konsentrasi tertentu. Ketika konsentrasi ion Fe^{2+} mencapai tingkat tertentu atau berlebihan akan bersifat racun [28]. Menurut Singh [14], dalam proses degradasi plastik dipengaruhi oleh pH, diketahui bahwa pH optimum untuk degradasi plastik oleh enzim AH adalah pH 7-8. Setiap enzim memiliki rentang pH optimum masing-masing, ketika adanya perubahan pH akan mempengaruhi konformasi dari sisi aktif enzim dan mengakibatkan laju reaksi enzim menjadi menurun [29]. Interaksi antara ion Fe^{2+} dan pH diketahui bahwa ion Fe^{2+} akan stabil pada keadaan pH asam, dan pada pH netral ion Fe^{2+} akan teroksidasi secara spontan pada keadaan *oxic* [12].

IV. KESIMPULAN

Konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dan variasi pH dalam *minimal salt medium* (MSM) berpengaruh terhadap aktivitas *Alkana hidrosilase* (AH) yang dilakukan oleh jamur *A. terreus* dalam mendegradasi plastik HDPE. Hasil tertinggi aktivitas AH dengan penambahan NADH dicapai pada konsentrasi 1 ppm ion Fe^{2+} dan pH 7, yaitu sebesar 10,6909 U/mL. Perubahan pH yang lebih asam atau basa, aktivitas AH semakin menurun.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan Beasiswa Bidik Misi kepada penulis selama 4 tahun dan terima kasih kepada Bapak atau Ibu pengurus beasiswa YBAI 2017/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] T. Octavianda, Asri, and L. Lisdiana, "Potensi Isolat Bakteri Pendegradasi Kenis Plastik Polietilen Oxo-Degradable dari Tanah TPA Benowo Surabaya," *Lentera Bio*, vol. 5, no. 1, pp. 32–35, 2016.
- [2] M. Pangestu, A. Budiharjo, and M. I. Rukmi, "Isolasi Identifikasi 16S sRNA dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Pendegradasi Plastik Polietilen (PE)," *J. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 24–29, 2016.
- [3] A. Rahmawati, "Pengaruh Penggunaan Plastik Polyethylene (PE) dan High Density Polyethylene (HDPE) pada Campuran Lataston-WC Terhadap Karakteristik Marshall," *J. Ilm. Semesta Tek.*, vol. 18, no. 2, pp. 147–159, 2015.
- [4] K. Leja and G. Lewandowicz, "Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers," *Polish J. Environ. Study*, vol. 19, no. 2, pp. 255–266, 2010.
- [5] H. Bhardwaj, R. Gupta, and A. Tiwari, "Microbial Population Associated With Plastic Degradation. Open Access Scientific Reports," *Open Access Sci. Reports*, vol. 1, no. 5, 2012.
- [6] M. El-Morsy, M. Hassan, and E. Ahmed, "Biodegradative Activities of Fungal Isolates from Plastic Contaminated Soils," *Mycosphere*, vol. 8, no. 8, pp. 1071–1087, 2017.
- [7] R. Kurniawati, "Kapang Tanah Mangrove Wonorejo Pendegradasi Plastik," Institut Teknologi Sepuluh Nopember, 2018.
- [8] E. Coppin, D. Robert, A. Sylvine, and P. Marguerite, "Mating Types and Sexual Development in Filamentous Ascomysetes," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 61, no. 4, pp. 411–428, 1997.
- [9] S. Pogger, M. Nowrousian, and U. Kock, *The Mycota I Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [10] E. Aliakbari, H. Tebyanian, M. Hassanshahian, and A. Kariminik, "Degradation of Alkanes in contaminated sites," *IJABBR*, vol. 2, no. 5, pp. 1620–1637, 2014.
- [11] S. Efendi, "Deteksi Gen serta Uji Aktivitas Enzim Katabolik pada *Bacillus subtilis* 3KP pada Substrat Hidrokarbon," Universitas Airlangga, 2016.
- [12] T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, 10th ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall International Inc, 2002.
- [13] M. Rohmah, "Degradasi Plastik oleh Isolat Jamur Wonorejo pada pH 5 dan 6; serta Suhu 250C dan 350C," Surabaya, 2018.
- [14] N. Singh, B. Kumari, and S. Mirsha, "Microbial Degradation of Alkanes," *Environ. Sci. Eng.*, 2012.
- [15] Difco and BBL Team, *Manual of Microbiological Culture Media*, 2nd ed. New York: Becton, Dickinson and Company, 2009.
- [16] S. Kumala and A. Pratiwi, "Efek Antimikroba dari Kapang Endofit Ranting Tanaman Biduri," *J. Farm. Indones.*, vol. 7, no. 2, pp. 111–120, 2014.
- [17] H. Ahmad and A. O. Eti, "Pengaruh pH, Penggoyangan Media, dan Penambahan Serbuk Gergaji Terhadap Pertumbuhan Jamur *Xylaria* sp.," *J. Silvikultur Trop.*, vol. 4, no. 2, pp. 57–61, 2013.
- [18] R. Maddala, L. Schalvenzi, M. Perez, C. Montero, and J. M. Gooty, "Efficiency of Indigenous Filamentous fungi For Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2015.
- [19] M. Maharani, I. R. Nuniek, and P. Slamet, "Penggunaan Beberapa Medium Semisintetik Untuk Produksi Miselium jamur *Maitake* (*Grifola frondosa* (Dickson:Fr.) S.F. Gray) Isolat Cianjur dan Ekstrak Kasarnya," *Scr. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 20–25, 2014.
- [20] J. Chenoweth and S. P. Lorton, *Animal Andrology: Theories and Applications*. India: CAB International, 2014.
- [21] R. Chang, *General Chemistry: The Essential Concept*. New York: The McGraw-Hill Companies, 2008.
- [22] S. Devi, R. Kannan, D. Nivas, K. Kannan, S. Chandru, and A. R. Antony, "Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 96, pp. 32–40, 2015.
- [23] L. Badriyah and M. Shovitri, "Biodegradasi Plastik Putih dalam Kolom Winogradsky," *J. Sains dan Seni ITS*, vol. 4, no. 2, pp. E50–E54, 2015.
- [24] H. Kheiralla, M. S. E. Said, and A. Douaa, "Optimization Of Cultural Conditions For Lignin Peroxidase Production By *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus*," *Acad. J. Biotechnol.*, vol. 1, no. 6, pp. 087–095, 2013.
- [25] S. Mishra and S. N. Singh, "Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes," *Bioresour Technol.*, vol. 111, pp. 148–154, 2012.
- [26] N. Jauhari, S. Mishra, B. Kumari, and S. H. Singh., "Bacteria-mediated aerobic degradation of hexacosane in vitro conditions," *Bioresour Technol.*, vol. 170, pp. 62–68, 2014.

- [27] T. Kadri *et al.*, "Production and Characterization of Novel Hydrocarbon Degrading Enzymes from *Alcanivorax borkumensis*," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 112, pp. 230–240, 2018.
- [28] T. Purbonegoro, "Pengaruh logam berat kadmium (Cd) terhadap metabolime dan fotosintesis di laut," *Oseana*, vol. 33, no. 1, pp. 25–31, 2008.
- [29] A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer, 2008.