

## **Biolitik Enzim Bekicot (*Achatina fulica*) Sebagai Agen Fusi Protoplas *Pichia manshurica* Intraspesifik**

### **Biolytic Enzyme Snail (*Achatina fulica*) as Agent Protoplast Fusion *Pichia manshurica* Intraspesific**

**Wijanarka <sup>1</sup>, Endang Sutariningsih Soetarto <sup>2</sup>, Kumala Dewi <sup>3</sup>, Ari Indrianto <sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Lab. Mikrobiologi\_FSM (MIPA) Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia

<sup>2</sup> Lab. Mikrobiologi \_ F Biologi UGM, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup> Lab. Fisiologi Tumbuhan \_ F Biologi UGM, Yogyakarta, Indonesia

<sup>4</sup> Lab. Bioteknologi \_ F Biologi UGM, Yogyakarta, Indonesia

wikasmara@yahoo.co.id

**Abstract:** Enzymes were an important role both in the food or beverage industry, but there is also an enzyme that acts as a breaker of the organism or cell wall of microorganisms. The enzyme known as biolytic enzyme. Extraction enzyme taken from the snail (*Achatina fulica*), especially in the abdomen, as in this section contains compounds glukoronidase  $\beta$ , and beta-glucanase and endo arylsulphatase (Ezeronye and Okerentugba, 2001). This enzyme was an important role before the fusion process takes place, namely for protoplast isolation. Furthermore, the enzyme used to break down the cell wall of the yeast *Pichia manshurica*. The yeasts are indigenus located around dahlia tubers and has the ability to produce inulinase (EC 3.2.1.7). Protoplast fusion is one way to improve the strain, so hopefully we will get a new strain and superior compared to its parent. The purpose of this research was using enzymes from snail to break the cell walls of yeast (protoplast isolation) and to obtain new fusan. Protoplast isolation performed enzymatically by using enzyme biolytic of snail. Fusion process was done by mixing the two parental pellets in solution osmotic stabilizer sorbitol solution of 1.0 mol / L containing 30% PEG 6000 (polyethylene glycol) and 10 mM CaCl<sub>2</sub> for 20 minutes. The results showed that the concentration of biolytic 100% can be utilized as an agent biolytic enzyme and capable of producing protoplasts of  $8.1 \times 10^9$  and it has been found that 3 fusan namely were Fusan D F1, F4 and F7 D.

**Keywords:** Biolytic enzyme, snail, *Pichia manshurica*

## **1. PENDAHULUAN**

Salah satu teknik perbaikan strain adalah fusi protoplas, disamping rekayasa genetik dan DNA rekombinan. Beberapa keuntungan fusi protoplas adalah tidak memerlukan sifat *competence cell*, faktor sex ataupun vektor (Matsushima and Balt, 1986), memungkinkan transformasi dan rekombinasi genetik diantara strain-strain mikrobia yang secara filogenetik jauh hubungannya (Santiago, 1982). Fusi protoplas dapat dilakukan secara intraspesifik (dalam satu species), interspesifik (antar species dalam satu genus) ataupun intergenus (antar genus).

Tahap awal dan penting yang perlu diperhatikan pada proses fusi protoplas adalah pelepasan dinding mikrobia (sel bakteri atau khamir) dengan bantuan enzim dan membentuk suatu bangunan yang disebut protoplas. Protoplas merupakan struktur sel lengkap tanpa dinding sel, mengandung membran sel dan seluruh komponen

intra sel serta mempunyai aktivitas kehidupan. Sebelum melakukan proses fusi, salah satu tahapan yang sangat penting dilakukan adalah isolasi protoplas. Untuk mendapat protoplas suatu mikroba, maka harus dilakukan pemecahan dinding sel. Pemecahan dinding sel dapat dilakukan secara mekanik ataupun secara enzimatik. Pemecahan dinding sel secara mekanik mempunyai beberapa kelemahan diantaranya: 1) hasil kurang baik, 2) kasar 3) keberhasilannya rendah, 3) pekerjaannya yang membutuhkan tenaga banyak, 4) viabilitas protoplasma rendah dan 5) kurang efektif (Breddam and Beenfeldt, 1990). Sedangkan Isolasi protoplas yang biasanya menggunakan enzim-enzim komersial (buatan pabrik) harganya sangat mahal dan harus datang dari luar negeri ( secara import) sehingga membutuhkan waktu yang lama.

Berdasarkan hal tersebut diatas maka perlu adanya sumber enzim litik alternatif (biolitik) yang lebih murah, mudah di peroleh dan dapat bekerja

secara efektif. Salah satu sumber enzim litik tersebut dapat diperoleh dari bekicot (*Achatina fulica*). Bekicot merupakan golongan dari Moluska, mengeluarkan lendir dan didalam usus bekicot mengandung senyawa aktif yaitu  $\beta$  glukorononidase, endo dan beta glukranase dan arylsulphatase. (Ezeronye and Okerentugba, 2001). Senyawa aktif ini sangat berperan dalam proses pemecahan dinding sel.

Selanjutnya proses fusi dilakukan dengan penambahan senyawa kimia tertentu misal *Polyethylene glycol* (PEG) yang akan merangsang penggabungan protoplas sel. Proses penggabungan ini dapat berasal dari sel yang sama ataupun berbeda species, sehingga akan membentuk suatu fusan yang baru dengan gen yang baru pula (Ahuja, 1982).

*Pichia mansurica* adalah salah satu jenis khamir yang mampu menghasilkan enzim inulinase dan secara indigenous berada di sekitar umbi dahlia/ perakaran umbi dahlia. Enzim inulinase ini bersifat doctoring agent dan produk olahannya bersifat GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Guo et al., 2009)

Tujuan penelitian ini adalah ini adalah memanfaatkan enzim dari bekicot dan konsentrasi yang optimum untuk memecahkan dinding sel khamir (isolasi protoplas) serta untuk mendapatkan fusan baru.

## 2. METODE

### 2.1. Mikroba

Mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah *P. mashurica*, koleksi Lab. Mikrobiologi Fakultas Sains dan Matematika (MIPA) Universitas Diponegoro Semarang. Isolat khamir tersebut disimpan pada media termodifikasi (Erthan, 2003) (gr/ 100 ml): (3) inulin; (0.23)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; (0.37)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; (0.1)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; (0.05)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; (0.15) yeast ekstrak dan pH 5. Selanjutnya di simpan pada media inulin miring sebagai *stock* kultur.

### 2.2. Bahan dan alat

Beberapa bekicot (*Achatina fulica*), Inulin murni (Sigma), umbi dahlia, bekicot, PEG 6000, mercaptoethanol, sukrosa, Sorbitol, Carbazol,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , yeast ekstrak, DNS, KCl, MEA, PDA,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Ethanol, Sistein, Tip kuning ukuran 1 ml, KNa-tatrat dan fenol, membran Celulose 0.45 mikron.

### 2.3. Ekstraksi enzim bekicot

Enzim litik dari bekicot diekstraksi menurut metode Agogbua et al.(1978). Seekor bekicot yang berukuran rata-rata (120 g) dilarutkan dengan 50 ml larutan penstabil osmotik sorbitol dalam bufer sodium pospat pH 5.8. Kemudian di blender, supernatan yang diperoleh selanjutnya disaring dengan membran filter. Filtrat yang diperoleh selanjutnya di simpan di kulkas.

### 2.4. Isolasi protoplas

Protoplas diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Chun (1992). Sel khamir dengan kepadatan  $10^{10}$  (*mid log*) direndam dalam larutan buffer sodium suksinat (pH 4,5); 0,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,6 M KCl dan 0,1 M 2-mercaptoethanol. Protoplas diperoleh dengan menambahkan 0%, 50%, dan 100% enzim litik bekicot selama 2-3 jam.

### 2.5. Fusi

Protoplas kedua sel khamir difusikan dengan cara dicampur dalam larutan buffer fosfat (pH 6) yang mengandung 35% polyethylene glycol 0.1  $\text{CaCl}_2$  selanjutnya diinkubasi selama 45 menit. Setelah inkubasi, suspensi disentrifugasi 700 x g selama 5 menit untuk menghilangkan PEG, selanjutnya dilakukan pencucian dan resuspensi dua kali dengan larutan penyangga buffer pospat. Pelet protoplas yang terbentuk selanjutnya dilarutkan kembali dalam larutan penyangga yang sama, kemudian diinokulasikan secara *pour plate* pada medium PDA dan cawan petri disimpan sampai tumbuh fusan pada suhu  $28^\circ\text{C}$ .

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Ekstraksi enzim

Bekicot yang dipakai dalam penelitian ini merupakan jenis bekicot yang diambil dari Cibeber, kota Cilegon Propinsi Banten (Gambar 1). Hal ini disebabkan karena di daerah tersebut curah hujan masih tinggi (sekitar bulan Agustus) sehingga mudah ditemukan. Di daerah lain untuk memperoleh bekicot pada musim kemarau sangat sulit.



Gambar 1. *Achatina fulica*

Menurut Prasad, *et al.* (2004) bekicot dapat ditemukan di areal persawahan, kebun, pantai, hutan alami, hutan buatan, dan tempat lain yang lembab. Hewan ini termasuk hewan nokturnal, aktif pada malam hari dan berlindung di bawah tanah atau sersah dedaunan saat siang hari. Bekicot termasuk herbivora, namun tidak menutup kemungkinan untuk memakan segala yang dapat dimakan terutama sersah, bebatuan kecil, sisa tulang untuk membangun cangkangnya. Bekicot termasuk hewan hermaprodit, dimana satu individu memiliki ovarium dan testis. Setelah cangkang dari bekicot dipecah, maka akan terdapat bagian dari bekicot yang lunak. Bagian yang lunak ini selanjutnya diblender. Ekstrak yang di dapat selanjutnya disaring dengan menggunakan membran Celullose 0.45 mikron secara aseptis (Gambar 2).

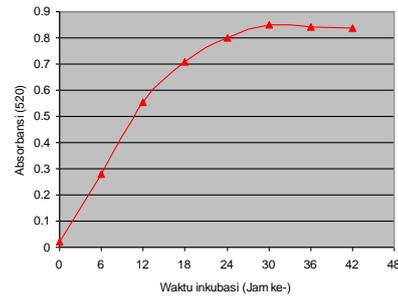


Gambar 2. Biolitik enzim bekicot

Filtrat yang diperoleh merupakan enzim yang akan digunakan untuk isolasi protoplas. Adanya enzim  $\beta$  glukoronidase, endo dan  $\beta$  glukanasase serta arylsulphatase pada usus di saluran pencernaan dapat digunakan untuk isolasi protoplas (Ezeronye and Okerentugba, 2001).

### 3.2. Pertumbuhan *P. manshurica*

Khamir *P. manshurica* tersebut diatas ditumbuhkan pada media YPD. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan pola pertumbuhan khamir tersebut. Hal ini bertujuan untuk melihat tren pertumbuhan dari khamir tersebut (Gambar 3).

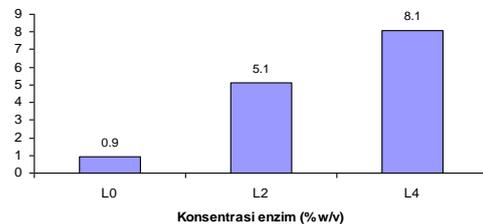


Gambar 3. Profil pertumbuhan *P. manshurica*

Pada gambar tersebut diatas terlihat jelas bahwa *P. manshurica m* tersebut telah memasuki fase logaritmik akhir pada umur 24 jam tanpa adanya fase lag, hal ini dapat terjadi karena adanya pemberian starter. Penambahan starter ini berfungsi untuk meniadakan fase lag. Hal ini sesuai dengan pendapat Alexander and Jeffries (1990) bahwa starter berfungsi untuk mengurangi fase lag dan diharapkan cepat mencapai fase log. Adanya pola pertumbuhan tersebut maka pemanenan sel untuk isolasi protoplas dapat dilakukan pada saat pertumbuhan *P. manshurica* memasuki tahap log akhir (24 jam), hal ini berkaitan karena sel-sel khamir lagi aktif-aktifnya melakukan metabolisme untuk pembelahan sel. Selanjutnya pola pertumbuhan ini akan digunakan sebagai dasar untuk pemanenan protoplas (isolasi protoplas).

### 3.3. Isolasi protoplas

Dalam penelitian ini digunakan enzim litik yang berasal dari usus saluran pencernaan bekicot. Konsentrasi enzim litik yang digunakan dalam penelitian ini sangat bervariasi yaitu 0% (L0), 50% (L2) dan 100% (L4), hal ini dilakukan untuk mencari konsentrasi yang optimum dalam proses isolasi protoplas.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi biolitik bekicot terhadap protoplas

Keterangan :

- L0 : biolitik bekicot 0%
- L2 : biolitik bekicot 50%
- L4 : biolitik bekicot 100%

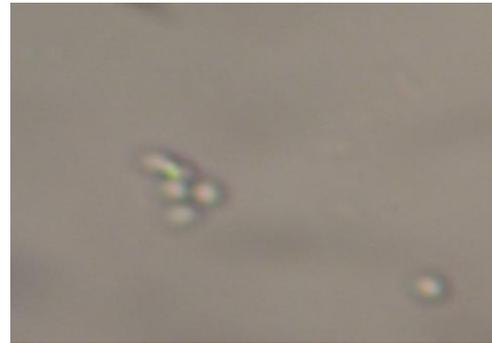
Dalam penelitian ini digunakan enzim litik yang berasal dari bekicot dengan tingkat konsentrasi yang berbeda-beda yaitu L0 (0%), L2 (50%) dan L4 (100), hal ini dilakukan untuk mencari konsentrasi yang optimum dalam proses isolasi protoplas. Pada konsentrasi biolitik bekicot 0% (L0) menghasilkan protoplas sekitar  $0.9 \times 10^9$ , konsentrasi 50% (L2) menghasilkan protoplast  $5.1 \times 10^9$ , sedangkan pada konsentrasi 100% (L4)  $8.1 \times 10^9$ . Pada Gambar 4 terlihat jelas, bahwa makin tinggi konsentrasi enzim biolitik yang diberikan, maka makin banyak protoplas yang dihasilkan. Pada konsentrasi biolitik L4 menghasilkan protoplas yang lebih banyak dibanding dengan L2 dan L0, hal ini diduga karena pada L4 jumlah enzim biolitiknya lebih banyak, sehingga enzim tersebut mempunyai kemampuan untuk memecah dinding sel khamir *P. manshurica*. Menurut Ezeronye and Okerentugba (2001) bahwa di saluran pencernaan bekicot mengandung enzim  $\beta$  glukuronidase, endo dan  $\beta$  glukukanase serta arylsulphatase yang berperan penting untuk isolasi protoplas. Oleh karena itu, enzim litik tersebut dapat dipergunakan untuk memecah komponen dinding sel, sehingga akan menghasilkan protoplas. Perlakuan pretreatment dilakukan dengan menggunakan merchaptoethanol 0.1% selama 20 menit, hal ini bertujuan untuk membantu proses pelisisan dinding sel. Menurut Ezeronye and Okerentugba (2001) agar protoplasting dapat berjalan lebih baik dan membuat dinding sel khamir lemah sehingga enzim litik dapat bekerja secara maksimal.

Isolasi protoplas tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh berbagai faktor, diantaranya umur kultur dan jenis enzim litik yang dipergunakan. Fase pertumbuhan mikrobia pada saat dilakukan isolasi protoplas sangat mempengaruhi keberhasilan pada langkah berikutnya. Peberdy (1980) dan Santiago (1982) mengatkan bahwa kultur mikrobia pada fase eksponensial akan menghasilkan jumlah protoplas yang baik, sedangkan menurut Santopeitro *et al.* (1997) pada saat memasuki fase log, tepatnya pada fase mid log.

Enzim litik yang dipergunakan dalam isolasi protoplas juga sangat memegang peranan penting tergantung pada komponen penyusun dinding sel mikrobia dalam hal ini khamir. Pada golongan Ascomycetes dinding sel tersusun atas kitin dan glukukan (Bartnicki – Garcia, 1968). Menurut Pelczar and Chan (1986), bahwa penyusun dinding sel kapang kitin, selulosa dan glukukan. Sedangkan menurut Jutono dkk. (1980), bahwa dinding sel khamir terdiri dari atas kitin.

### 3. 4. Fusi protoplas

Pada penelitian ini menggunakan fusogen PEG 6000 dengan konsentrasi 30%. Pada PEG 6000 konsentrasi 30% lebih baik dari pada konsentrasi 35%, karena pada konsentrasi 30% terbentuk agregat 2-3 sedangkan pada konsentrasi 35% lebih dari 3 agregat. Hal ini sesuai dengan pendapat Constabel (1980) menyatakan bahwa konsentrasi PEG yang paling baik pada konsentrasi antara 25% sampai 33%. Sedangkan menurut Kao and Michayluk (1975) bahwa konsentrasi PEG yang terlalu tinggi akan bersifat toksit terhadap protoplas. Proses fusi protoplas dengan menggunakan PEG akan mengakibatkan terjadinya proses aktivasi membran sehingga akan menyebabkan perlekatan antara sel satu dengan sel yang lainnya. Adanya perlekatan ini mengakibatkan terbentuknya agregat (Gambar 4). Hasil isolasi telah ditemukan 3 fusan yaitu Fusan F1 D, F4 D dan 7 D.



Gambar 4. Sel khamir yang teragregat

## 4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi biolitik bekicot 100% mampu dimanfaatkan sebagai agen biolitik enzim dan mampu menghasilkan protoplas sebesar  $8.1 \times 10^9$  serta telah ditemukan 3 fusan yaitu Fusan F1 D, F4 D dan F7 D.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Ditlitabmas Dikti) Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Tahun Anggaran 2013 yang telah membiayai Penelitian BOPTN Hibah Doktor, melalui Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Universitas Diponegoro Nomor DIPA-023.04.2.189815/2013 tanggal 05 Desember 2012.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, M.R. (1982). *Isolation, Culture and Fusion of Protoplast: Problems and Prospects*. Silvae Genetica 31.
- Constabel, F., Koblitiz, H., Kirkpatrick, J.W., & Rambold, S. (1980). Fusion of Cell Sap Vacuoles Subsequent to Protoplast Fusion. *Can. J. Bot.*, 58, 1032-1034
- Ertan, F., Aktac, T., Kaboglu, A. C., Ekinici, F., & Bakar, E. (2003). Determination of Optimum Cultivation Condition on The Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pak. J. Bi.l. Sci.* 6(16), 1386-1388.
- Ezeronye, O.U. & Okerentugba, P.O. (2001). Optimum Conditions for Yeast Protoplast Release and Regeneration in *S. cerevisiae* and *C. tropicalis* Using Gut Enzyme of The Giant African Snail *Achatina achatina*. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 190-193.
- Guo, N., Gong, F., Chi, Z., Sheng, J., & Li, J., (2009). Enhanced Inulinase Production in Solid State Fermentation by a Mutant of The Marine Yeast *Pichia guilliermondii* Using Surface Response Methodology and Inulin Hydrolysis. *J. Ind Microbiol biotechnol*, 36, 499-507.
- Kao, K.N. & Michayluk. (1975). Nutrition Requirement for Growth of *Vicia hajastana* Cell and Protoplast at a Very Low Population Density Inliquid Media. *Planta*, 125, 105-110.
- Matsushima, R. & Baltz, R.H. 1986. *Protoplast Fusion didalam Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Peberdy, J.F. (1980). Protoplast Fusion A Tool for Genetic Manipulation and Breeding in Industrial Microorganism. *Enzyme Microb. Technol*, 2: 23-29.
- Pelczar. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta, Indonesia: UI press.
- Santiago, C.M. (1982). Protoplast Fusion A New Technique for Genetic Manipulation and Breeding of Industrial Microorganism. *I.C. Biotech.* 5: 435-440.
- Santopietro, L.M.D., Spencer, JFT., Spencer, D.M., & Sineriz. (1997). Characterization of intergeneric hybrids obtained by protoplast fusion between *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus laurentii* and *S. cerevisiae*. *Biotechnology technique*, 11(10), 769-771.