

AMOBILISASI PEKTINASE DARI *Bacillus firmus* MENGGUNAKAN MATRIKS OPP (OXIDIZED POLYPROPYLENE)-KITOSAN

Ayunda Arum Sari, Anna Roosdiana* dan Diah Mardiana

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aroos@ub.ac.id

ABSTRAK

Pektinase adalah enzim yang dapat memecah senyawa pektin menghasilkan asam galakturonat. Untuk meningkatkan efisiensi pemakaian pektinase sehingga dapat dipakai berulang kali dapat dilakukan dengan teknik amobilisasi. Pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus* dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60% dan dilanjutkan dengan dialisis. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum pektinase yang diamobilisasi secara adsorpsi fisik pada matriks *oxidized polypropylene* (OPP) terlapis kitosan yang meliputi lama pengocokan dan konsentrasi enzim optimum. Kadar protein pektinase bebas yang digunakan untuk amobilisasi 1,367 mg/ml dengan aktivitas 241,1 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama pengocokan optimum dicapai pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi pektinase 1,094 mg/mL dengan jumlah pektinase teradsorpsi sebesar 53,98 mg/g dan aktivitas sebesar 220,2 unit.

Kata kunci: Aktivitas, *Bacillus firmus*, OPP (*Oxidized Polypropylene*) terlapis kitosan, pektinase.

ABSTRACT

A Pectinase is an enzyme that can hydrolyze pectin compounds into galacturonic acid. In order to enhance the pectinase efficiency, the enzyme can be immobilized in certain matrix. The pectinase was isolated from *Bacillus firmus*, and then purified with ammonium sulphate with 20-60% saturated level, followed by dialysis. The aims of the research were to determine the optimum conditions of immobilized pectinase by physical adsorption on oxidized polypropylene (OPP) coated chitosan, which included the shaking time and enzyme concentration. Initial protein used for immobilizing free pectinase was 1.367 mg/mL and the activity was 241.1 units. The results showed that the optimum condition of pectinase immobilization was achieved on shaking time of 3 hours and pectinase concentration of 1.094 mg/mL with amount of pectinase adsorbed at 53.98 mg/g within activity of 220.2 units.

Keywords: Activities, *Bacillus firmus*, OPP (*Oxidized Polypropylene*) coated chitosan, pectinase.

PENDAHULUAN

Enzim dapat berfungsi sebagai katalis dalam reaksi-reaksi biokimia. Enzim hanya bekerja mempercepat reaksi tanpa mengubah kesetimbangan suatu reaksi kimia [1]. Pektinase dapat menghidrolisis senyawa pektin menghasilkan asam galakturonat. Pektinase banyak terdapat pada bakteri, jamur, sel hewan dan sel tumbuhan [2].

Pektinase dapat diisolasi dari *Bacillus firmus*. Bakteri ini mempunyai aktivitas proteolitik, yaitu kemampuan untuk mendegradasi protein. Proses fermentasi dari *Bacillus*

firmus menghasilkan kondisi optimum pada pH 6, temperatur 37°C. Dengan adanya pH dan temperatur optimum akan dihasilkan produksi pektinase yang optimum [3].

Pektinase hanya dapat digunakan untuk satu kali reaksi, agar dapat dilakukan berulang maka dilakukan teknik amobilisasi [4]. Amobilisasi enzim dapat dilakukan melalui pengikatan enzim pada bahan pendukung, pengikatan silang intermolekuler sesama enzim serta menjebak enzim di dalam gel atau membran polimer [5]. Salah satu metode amobilisasi enzim yaitu metode adsorpsi. Metode ini berdasarkan adsorpsi protein secara fisik pada permukaan matriks yang tidak larut air. Metode ini tidak merubah konformasi dan sisi aktif enzim [6]. Amobilisasi enzim dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi enzim yang akan berpengaruh terhadap banyaknya enzim yang teradsorpsi dan aktivitas enzim [7].

Penggunaan OPP sebagai matriks memungkinkan pektinase teramobilkan secara adsorpsi fisik. Matriks OPP dapat dimodifikasi menggunakan kitosan, modifikasi ini diharapkan dapat memperkuat interaksi enzim dengan matriks dan mengurangi desorpsi pektinase dari matriks sehingga penggunaan ulang akan lebih baik. Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh lama pengocokan dan konsentrasi enzim terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dalam OPP yang terlapis kitosan dan aktivitas enzim amobil.

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Bacillus firmus* (Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Brawijaya). Bahan kimia kualitas *for microbiology* pektin (Merck), *bacto* agar (Merck), pepton (Oxoid), *yeast extract* (Difco), *oxidized polypropylene* (OPP), kasein (Merck) dan mempunyai derajat kemurnian pro analisis (Merck) CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, kristalin fenol, sodium sulfit, asam dinitrosalisilat (DNS), CuSO₄.5H₂O, NaKC₄O₆H₄, glukosa anhidrat, padatan BaCl₂, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, padatan NaOH, asam sitrat, etanol, metanol, toluen, kitosan, natrium tripolifosfat, HCl (37% w/w; bj 1,19 g/mL), OPP dan akuades.

Alat utama yang digunakan adalah inkubator (Heracus tipe B 50 Memmert), *autoclave* (Tipe LS-C35L), jarum ose, mortar, sentrifuse dingin (Denley), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), *magnetic stirrer*, pH meter (Schott Gerate CG 820), oven (Memmert), lemari pendingin, *spectronic* (Genesys 20), kuvet, kantong selofan, ayakan 80 mesh, dan kertas *Whatman* no. 40.

Prosedur preparasi pektinase

Inokulum *Bacillus firmus* ditumbuhkan dalam 100 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar dengan pengocokan 125 rpm selama 18 jam (awal fasa stasioner). Media hasil fermentasi ditambah dengan 12,5 mL buffer sitrat fosfat pH 6. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada temperatur 4 °C selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar pektinase. Ekstrak kasar dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–60% dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan.

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Larutan campuran selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kadar protein dapat diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu $y = 0,00004x$. Kurva baku dibuat dengan mengukur absorbansi kasein pada konsentrasi 1000–9000 ppm.

Penentuan aktivitas pektinase

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat pH 6, 1 mL enzim pektinase dan 1 mL akuades. Campuran diinkubasi pada 35 °C selama 50 menit, selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS. Larutan uji selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan hingga temperatur kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 480 nm. Nilai absorbansi dikonversikan pada persamaan kurva standar ($y = 0,006x$) sehingga dapat diketahui besarnya konsentrasi gula pereduksi hasil hidrolisis pektin yang dikatalis dengan pektinase. Kurva baku dibuat dari pengukuran absorbansi larutan glukosa dengan konsentrasi 20–100 ppm. Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas enzim amobil diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menit per g enzim amobil.

Preparasi matriks OPP

Plastik OPP dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 10 g lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi 300 mL toluena dan dipanaskan hingga plastik larut sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Larutan OPP dimasukkan secara perlahan ke dalam 600 mL metanol sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Campuran disaring

menggunakan kertas saring hingga terpisah antara endapan dan filtrat. Endapan dihaluskan dengan mortar kemudian butiran diayak dengan ayakan ukuran 80 mesh. Kemudian butiran OPP dipreaktifkan dengan menambahkan 2,5 mL etanol 96% pada serbuk OPP dan etanol dibiarkan menguap.

Amobilisasi pektinase dengan Ca-alginat-kitosan

Penentuan kondisi optimum lama pengocokan

Enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL, ditambah 3 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 6 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g OPP yang telah dipreaktifkan. Campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama (1, 2, 3, 4, dan 5) jam. Selanjutnya disaring dengan kertas saring *Whatman* no 40 sehingga diperoleh pektinase amobil. OPP selanjutnya disuspensikan dalam larutan kitosan 5% selanjutnya diteteskan ke dalam larutan natrium tripolifosfat 3%. OPP disimpan dalam larutan natrium tripolifosfat selama 90 menit kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no 40. Pektinase amobil diukur aktivitasnya, sedangkan filtrat diukur kadar protein yang tidak terjebak.

Penentuan konsentrasi pektinase optimum

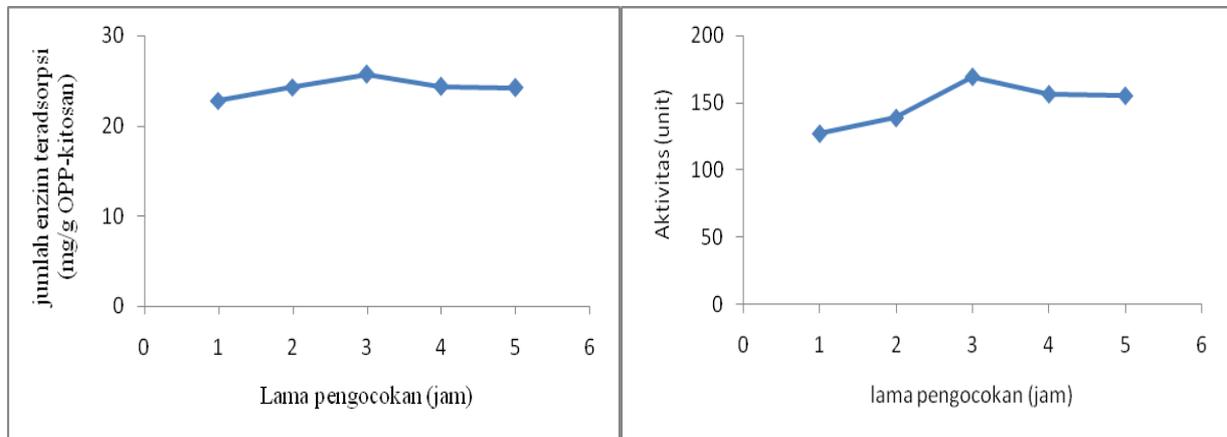
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi lama pengocokan. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang dipipet yaitu 1, 2, 3, 4 dan 5 mL sehingga konsentrasi enzim menjadi bervariasi dengan dilakukan penambahan buffer sitrat fosfat pH 6 yang bervariasi hingga volume total enzim menjadi 5 mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan lama pengocokan optimum

Massa pektinase yang teradsorpsi pada matriks OPP-kitosan dipengaruhi oleh lama pengocokan. Lama pengocokan merupakan waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berinteraksi dengan media pengadsorpsinya dalam proses amobilisasi. Dengan adanya pengocokan, maka laju difusi pektinase menuju OPP akan semakin cepat sehingga kesetimbangan adsorpsi akan cepat tercapai. Pektinase terbagi menjadi dua bagian yaitu hidrofilik (polar) dan hidrofobik (non polar). Bagian pektinase yang bersifat hidrofob akan teradsorpsi pada permukaan OPP yang bersifat non polar sehingga terjadi interaksi hidrofobik, tidak menutup kemungkinan bagian hidrofilik (polar) dari pektinase juga akan teradsorpsi pada bagian polar OPP melalui ikatan hidrogen. Lama pengocokan mempengaruhi jumlah

pektinase teradsorpsi yaitu semakin lama pengocokan maka semakin banyak pektinase teradsorpsi dan sampai batas waktu tertentu jumlah pektinase teradsorpsi akan mencapai kesetimbangan.



(a)

(b)

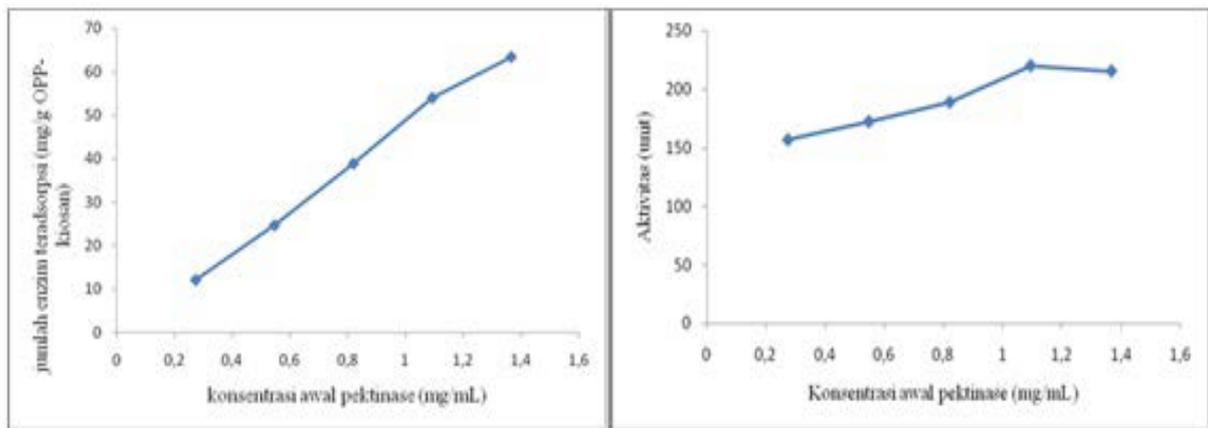
Gambar 1. (a) Hubungan antara lama pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi (b) Hubungan antara lama pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil.

Semakin lama pengocokan yang dilakukan akan menyebabkan probabilitas kontak antara pektinase dan OPP-kitosan semakin tinggi, sehingga massa pektinase yang teradsorpsi pada permukaan OPP-kitosan semakin banyak dan aktivitas semakin tinggi hingga mencapai fasa kesetimbangan (Gambar 1a dan 1b). Dengan demikian dapat diketahui lama pengocokan optimum terjadi pada 3 jam yang merupakan waktu optimum untuk menghasilkan jumlah enzim teradsorpsi sebesar 25,698 mg/g dan aktivitas enzim amobil sebesar 169,5 unit.

Penentuan konsentrasi pektinase optimum

Konsentrasi pektinase berpengaruh terhadap massa pektinase yang teradsorpsi pada OPP-kitosan. Semakin besar konsentrasi pektinase dapat meningkatkan massa pektinase yang teradsorpsi sampai pada jumlah tertentu. Adsorpsi akan konstan jika terjadi kesetimbangan karena laju adsorpsi dan laju desorpsi sama. Pada saat konsentrasi pektinase awal sebesar 0,273 mg/mL jumlah pektinase yang teradsorpsi meningkat secara signifikan hingga konsentrasi enzim 1,367 mg/mL (Gambar 2a). Peningkatan jumlah pektinase yang terjebak tidak diiringi dengan peningkatan aktivitas enzim amobil. Nilai aktivitas enzim amobil meningkat mulai konsentrasi enzim 0,273 mg/mL hingga konsentrasi enzim 1,094 mg/mL, sedangkan pada saat konsentrasi enzim 1,367 mg/mL aktivitas enzim menurun (Gambar 2b). Dari data yang didapat diketahui kondisi optimum terjadi pada saat konsentrasi enzim 1,094

mg/mL, dengan jumlah enzim teradsorpsi sebesar 53,98 mg/g dengan aktivitas sebesar 220,2 unit.



(a)

(b)

Gambar 2. (a) Hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi (b) Hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian yang dilakukan adalah Kondisi optimum amobilisasi pektinase pada matriks OPP- kitosan dicapai pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi pektinase 1,094 mg/mL menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi 53,98 mg/g dengan aktivitas pektinase sebesar 220,2 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Poedjiadi, A., dan Supriyanti F. M. T., 2006, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
2. Iriani, Evi., E. Gumbira Said, Ani Suryani, dan Setyadjit, 2005, *Pengaruh Konsentrasi Penambahan Pektinase dan Kondisi Inkubasi terhadap Rendemen dan Mutu jus Mangga Kuini (*Mangifera odorata* Griff)*, *J. Pascapanen* 2(1), 11-17, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
3. Reda, A. B., Hesham, M. Yassin, Mahmoud, A. Swelim, Ebstam, dan Z. Abdel-All, 2008, *Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Waste under Solid State Fermentation Conditions*, *Journal of Applied Sciences Research*, 4(12), 1708-1721.
4. Hartoto, L., 2008, *Imobilisasi Enzim*, IPB, Bogor.
5. Mikkelsen, S.R dan E. Corton, 2004, *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc, Canada .

6. Wong Fui Ling, 2008, *Enzyme Immobilization and Permselectivity Analysis of an Interference Free Peroxide Based Glucose Biosensor*, Thesis Faculty of Chemical and Natural Resource. Engineering University Technology, Malaysia.
7. Mufida, F., 2013, *Amobilisasi Pektinase dari Bacillus subtilis Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH*, Skripsi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.