

AMOBILISASI PEKTINASE HASIL ISOLASI DARI *Aspergillus niger* MENGUNAKAN MATRIKS KARAGENAN

Elvanila Tanjung, Anna Roosdiana*, 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 hasil isolasi dari *Aspergillus niger* diamobilisasi dengan metode penjebakan menggunakan matriks karagenan. Tujuan penelitian ini adalah menentukan konsentrasi karagenan dan konsentrasi enzim optimum. Konsentrasi karagenan yang digunakan adalah (0,017; 0,033; 0,050; 0,067; 0,083) g/mL sedangkan konsentrasi enzim adalah (0,632; 1,263; 1,895; 2,526; 3,158) mg/mL. Penentuan kadar enzim (protein) menggunakan reagen Biuret dan aktivitas enzim ditentukan dari jumlah gula pereduksi hasil hidrolisis pektin per menitnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi karagenan optimum pada 0,050 g/mL dengan konsentrasi enzim optimum 1,263 mg/mL menghasilkan jumlah enzim yang terjebak sebanyak 3,048 mg/g karagenan dan aktivitas pektinase amobil sebesar 348,5 unit.

Kata kunci: aktivitas, *Aspergillus niger*, karagenan, pektinase.

ABSTRACT

Pectinase isolated from *Aspergillus niger* was immobilized by entrapping method in a matrix of carrageenan. The aim of this research was to determine the optimum concentration of carrageenan and enzyme. Carrageenan concentration varied (0.017; 0.033; 0.050; 0.067; 0.083) g/mL, while the concentration of enzyme varied (0.632; 1.263; 1.895; 2.526; 3.158) mg/mL. Protein content was determined by Biuret reagent and enzyme activity was determined from the number of reduced sugar as a result of hydrolyzed pectin per minute. The results showed that optimum concentration of carrageenan was 0.050 g/mL and the optimum enzyme concentration was 1.263 mg/mL with the amount of entrapping enzyme was 3.048 mg/g carrageenan and maximum activity of 348.5 units.

Key words: activity, *Aspergillus niger*, carrageenan, pectinase.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis yang dapat berasal dari hewan, tumbuhan, dan mikroba [1]. Pektinase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis senyawa pectin [2]. Pektinase ini dapat diisolasi dari beberapa mikroba, salah satunya adalah *Aspergillus niger* [3]. Sifat pektinase bebas adalah tidak stabil dan sulit untuk digunakan secara berulang, sedangkan pektinase yang amobil memiliki stabilitas lebih tinggi serta dapat digunakan secara berulang dan berkesinambungan [4].

Amobilisasi enzim merupakan proses dimana pergerakan molekul enzim ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisisnya [5]. Salah satu teknik

amobilisasi enzim adalah metode penjebakan (*entrapping*) yaitu enzim ditempatkan pada suatu kisi dari polimer membran ataupun pada suatu matriks salah satunya adalah karagenan [6].

Karagenan merupakan kelompok polisakarida galaktosa yang diekstraksi dari rumput laut. Sebagian besar karagenan mengandung natrium, magnesium, dan kalsium yang dapat terikat pada gugus ester sulfat dari galaktosa dan kopolimer 3,6-anhidro-galaktosa [7]. Karagenan memiliki kemampuan untuk membentuk gel secara *thermoreversible* yaitu meleleh jika dipanaskan dan membentuk gel kembali jika didinginkan [8]. Proses pemanasan dengan temperatur yang lebih tinggi dari temperatur pembentukan gel akan mengakibatkan polimer karagenan dalam larutan menjadi *random coil* (acak). Bila temperatur diturunkan, maka polimer akan membentuk struktur *double helix* (pilinan ganda) dan apabila temperatur terus dilanjutkan, polimer-polimer ini akan terikat silang secara kuat dan gel yang terbentuk semakin kuat. Oleh karena itu, karagenan dapat digunakan sebagai matriks untuk mengamobilisasi enzim dengan menggunakan metode penjebakan [9].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi karagenan dan konsentrasi enzim terhadap jumlah pektinase yang terjebak dalam karagenan dan aktivitas enzim pektinase amobil.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni *Aspergillus niger* (Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Brawijaya).

Bahan-bahan kimia mempunyai kualitas *for microbiology*, karagenan (SAP Kemika) sebagai matriks amobilisasi enzim, pektin (Merck), tepung agar, pepton (Oxoid), urea dan dextrosa. Derajat kemurnian pro analisis (Merck) CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, DNS, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , KH_2PO_4 , NaOH, asam asetat, HCl (37% w/w; bj 1,19 g/mL) dan akuades.

Alat utama yang digunakan adalah inkubator (Heraeus tipe B 50 Memmert), *autoclave* (Tipe LS-C35L), sentrifuse dingin (Denley), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), *magnetic stirrer*, pH meter (Schott Gerate CG 820), *spectronic* (Genesys 20), kuvet, dan kantong selofan.

Prosedur

Preparasi pektinase

Pektinase diisolasi dari *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan diinkubasi pada temperatur kamar sampai fasa awal stasioner (96 jam) menggunakan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Media hasil fermentasi ditambah 15 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 30 menit, sehingga diperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar pektinase. Supernatan dimurnikan dengan metode pengendapan bertingkat melalui penambahan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–60%, yang dilanjutkan dengan proses dialisis. Kemudian enzim hasil pemurnian diuji kadar protein awal dan aktivitas enzim bebas.

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode spektrofotometri dengan pereaksi 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. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 545 nm. Kadar protein diketahui dengan mengkonversikan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein $y = 0,00004x$. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi kasein 1000–9000 ppm.

Penentuan aktivitas pektinase

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mengukur jumlah gula pereduksi yang dibebaskan dari substrat pektin. Campuran gula pereduksi terdiri dari 1 mL substrat pektin 1% (b/v), 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL enzim pektinase hasil pemurnian dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran ini diinkubasi pada 35°C selama 50 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL reagen DNS, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan regresi kurva standar glukosa $y = 0,008x$. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi gula pereduksi 20–100 ppm.

Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Satu unit aktivitas enzim amobil diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap g pektinase amobil.

Penentuan konsentrasi karagenan optimum

Amobilisasi pektinase dilakukan dengan variasi konsentrasi karagenan (0,017; 0,033; 0,050; 0,067; 0,083) g/mL. Larutan dibuat dengan cara melarutkan (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25) g karagenan dengan 15 mL NaCl fisiologis kemudian dipanaskan dan diaduk dengan pengaduk magnetik pada temperatur 70°C lalu didinginkan menjadi 40°C. Selanjutnya ditambahkan larutan enzim hasil pemurnian sebanyak 1 mL pada masing-masing larutan karagenan sehingga konsentrasi enzim menjadi 1,263 mg/mL. Kemudian campuran larutan enzim dan karagenan dimasukkan ke dalam pipet plastik. Selanjutnya diteteskan ke dalam larutan CaCl₂ 0,15 M selama satu jam agar manik-manik menjadi keras. Lalu disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan akuades steril dan ditimbang. Sedangkan filtrat ditampung, kemudian dilakukan pengukuran jumlah enzim yang tidak terjebak dengan reagen Biuret dan dilakukan uji aktivitas terhadap pektinase amobil.

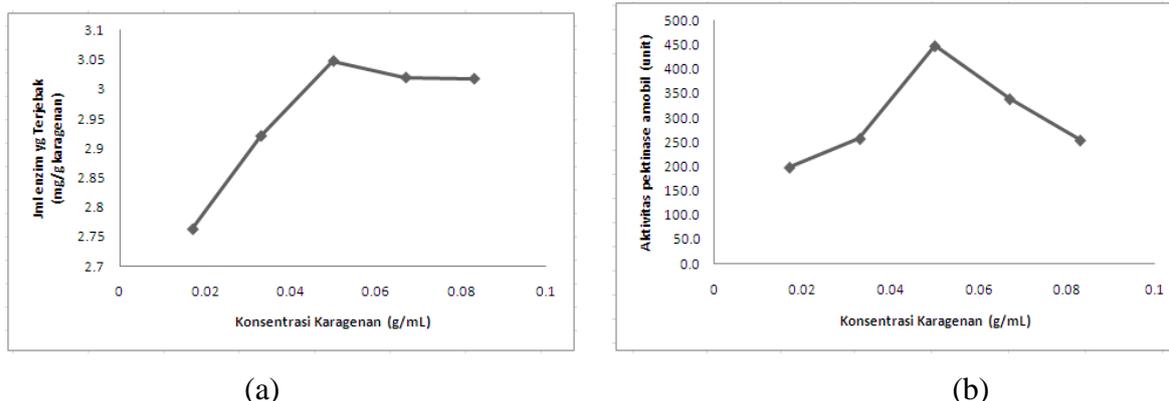
Penentuan konsentrasi pektinase optimum

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi karagenan dengan konsentrasi karagenan optimum yaitu 0,050 g/mL. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang digunakan yaitu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0) mL dan ditambahkan buffer asetat pH 5 masing-masing (0,8; 0,6; 0,4; 0,2; dan 0) mL sehingga konsentrasi enzim bervariasi. Kemudian hasil preparasi disaring dengan kertas saring. Endapan pektinase amobil yang tersaring ditentukan aktivitasnya, sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi karagenan optimum

Pektinase diamobilkan pada berbagai variasi konsentrasi karagenan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi karagenan terhadap jumlah pektinase amobil dan aktivitas pektinase amobil dalam mendegradasi pektin. Adanya interaksi gugus sulfat dan hidroksil pada karagenan dimana gugus hidroksil dari karagenan akan berikatan dengan gugus hidroksil (-OH) atau amina (NH₂) pada enzim pektinase akan membentuk ikatan hidrogen. Hasil yang diperoleh terdapat pada Gambar 1.



(a)

(b)

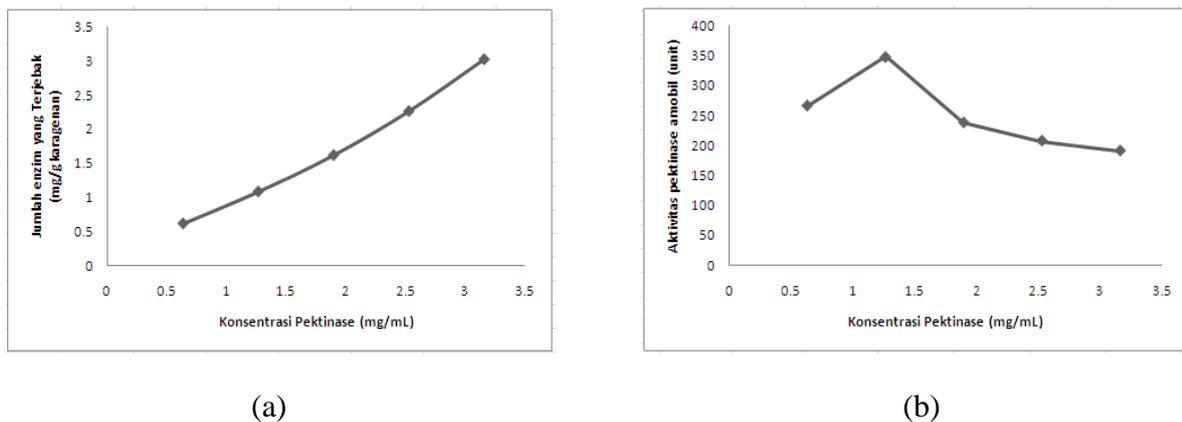
Gambar 1. Grafik hubungan antara konsentrasi karagenan terhadap (a) jumlah pektinase terjebak (b) aktivitas pektinase amobil.

Jumlah pektinase yang terjebak dan aktivitas pektinase amobil meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan konsentrasi karagenan pada 0,017 hingga 0,050 g/mL dan selanjutnya menunjukkan konstan pada 0,067 dan 0,083 g/mL sehingga pada konsentrasi karagenan 0,050 g/mL telah tercapai kesetimbangan pektinase yang terjebak (Gambar 1a). Hal ini dipengaruhi oleh kerapatan pori karagenan dimana semakin tinggi konsentrasi karagenan maka kerapatan pori karagenan juga semakin tinggi sehingga jumlah enzim yang terjebak semakin banyak. Sedangkan untuk aktivitas pektinase amobil memiliki kecenderungan yang berbeda. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa konsentrasi karagenan 0,050 g/mL merupakan konsentrasi karagenan optimum untuk menghasilkan jumlah pektinase yang terjebak yaitu sebesar 3,048 mg/g karagenan dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 447,8 unit.

Penentuan konsentrasi pektinase optimum

Peningkatan jumlah konsentrasi enzim pektinase menyebabkan peningkatan jumlah enzim pektinase yang terjebak dalam karagenan semakin banyak. Pada saat konsentrasi awal pektinase 0,632 mg/mL hingga 3,158 mg/mL, jumlah pektinase yang terjebak mengalami peningkatan secara linier (Gambar 2a). Oleh karena itu, belum dapat ditentukan konsentrasi enzim optimumnya. Peningkatan jumlah pektinase terjebak ini tidak diiringi dengan peningkatan nilai aktivitas pektinase amobil (Gambar 2b). Nilai aktivitas pektinase amobil semakin meningkat pada konsentrasi enzim 0,623 mg/mL dan 1,263 mg/mL, namun mengalami penurunan pada konsentrasi 1,895 hingga 3,158 mg/mL. Hal ini dikarenakan enzim pektinase yang terjebak sudah memenuhi pori-porinya sehingga menyulitkan interaksi antara enzim dengan substrat. Apabila semakin banyak enzim yang terjebak dalam karagenan,

maka dimungkinkan sisi aktif dari pektinase tidak dapat bergerak secara bebas dan substrat akan sulit berikatan dengan sisi aktif pektinase. Akibatnya, jumlah pektinase yang ada semakin sedikit untuk berikatan dengan substrat. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa konsentrasi pektinase optimum adalah 1,263 mg/mL dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 348,5 unit.



Gambar 2. Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap (a) jumlah pektinase terjebak (b) aktivitas pektinase amobil.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kondisi optimum amobilisasi pektinase dicapai pada konsentrasi karagenan 0,050 g/mL dan konsentrasi pektinase 1,263 mg/mL menghasilkan jumlah pektinase terjebak sebanyak 3,048 mg/g karagenan dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 348,5 unit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dali S., Abd. Rauf P., M. Noor J., dan Pirman A.P., 2009, Pengaruh Substrat dan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopra Berjamur, *J. Farmasi dan Farmakologi*, 13 (3), pp. 77-80.
2. Pedrolli, D. B., Monteiro A. C., Gomes E. dan Carmona E. C., 2009, Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes, *J. Open Biotechnol*, 3, pp. 9–18.

3. Mrudula S. dan Anitharaj R., 2011, Pectinase Production in Solid State Fermentation by *Aspergillus niger* Using Orange Peel as Substrate, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6 (2), pp. 64-71.
4. Pereira E.B., de Castro H.F., de Moraes F.F., dan Zanin G.M., 2002, Esterification Activity and Stability of *Candida rugosa* Lipase Immobilized into Chitosan, *J. Applied Biochemistry Biotechnology*, 20, pp. 977-986.
5. Minovska, Vilma, Winkelhausen, Eleonora, dan Kuzmanova, S., 2005, Lipase Immobilized by Different Tehchiques in Various Support Material Applied in Oil Hydrolysis, *J. Serb.Chem.Soc.*, 70(4), pp. 609-624.
6. Wuryanti, 2006, Amobilisasi Enzim Bromelin Dari Bonggol Nanas Dengan Bahan Pendukung (*Support*) Karagenan Dari Rumpun Laut (*Euchema cottonii*), *J. Kimia Sains dan Aplikasi*, 9 (3), pp. 83-87.
7. Imeson A.P., 2010, *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*, Inggris, Blackwell Publishing, pp. 73-88.
8. Compo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr D.B., dan Carvaospho I., 2009, Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis, *J. Carbohydrate Polymers*, 77(2), pp. 167-180.
9. Glicksman M., 1969, *Gum Techonology in The Food Industry*, New York, Academic Press, pp. 214-224.