

PEMURNIAN DAN KARAKTERISTIK DEXTRANASE *BACTEROIDES* *RUMINICOLA* SUBSP *BREVIS*

Tami Idiyanti
Puslitbang Kimia Terapan LIPI
Kawasan PUSPIPTEK, Serpong 15310

INTISARI

Kemampuan dextranase dari *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* hasil isolasi dari rumen sapi dalam memecah ikatan cabang D-(1,6) α -glukopironosa cukup menonjol pada substrat dextran. Untuk itu telah dilakukan pemurnian ekstrak kasar enzim dextranase ini dengan menggunakan kromatografi kolom penukar ion dan elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid. Dengan metoda pemurnian sampai pada tahap kromatografi penukar ion menggunakan kolom mikrokristal selulosa diperoleh enzim dengan aktivitas 400 kali ekstrak kasar enzim. Dari penentuan sifat-sifat enzimologi terlihat pH dan suhu optimum untuk aktifitas dextranase ini adalah 5,5 dan 40-45°C. Kehadiran ion logam Cu^{++} , Fe^{++} dan Hg^{++} dalam larutan enzim menunjukkan penghambatan aktivitas enzim. Hasil awal hidrolisa dextranase pada substrat dextran yang ditentukan dengan menggunakan kromatografi kertas menunjukkan bahwa enzim ini merupakan salah satu endo enzim.

ABSTRACT

The dextranase of *B. ruminicola* subsp. *brevis* from bovine rumen has high ability to degrade the D - (1,6) α -glucosidic linkages of dextran substrate. Purification of crude dextranase was done by using ion-exchange chromatography and electrophoresis. It was observed that the purification until ion exchange step by microcrystal cellulose column increased the activity of dextranase by 400 fold. The purified dextranase was most active at pH 5.5 and 40°C-45°C. The enzyme was strongly inhibited by metal ions such as Cu^{++} , Fe^{++} and Hg^{++} . The major product in early stage of dextran hydrolysis which were analyzed by paper chromatography showed dextranase of *B. ruminicola* to be an endotype enzyme.

PENDAHULUAN

Dextranase (E.C 3.2 1.11) merupakan enzim hidrolisa yang memecah ikatan D 1-6 α -glukopironosa. Sehubungan dengan ditemukannya beberapa strain *Streptococcus* yang

menyebabkan terjadinya karang gigi (*dental carries*) dan ditemukan dextran yang diproduksi oleh *Leuconostoc* pada kilang gula sehingga mengganggu pembentukan kristalnya (3) maka dicari sumber dan jenis-jenis pemecah dextran yang lain, diantaranya ditemukan pada rumen sapi.

Pada rumen sapi normal ditemukan sejumlah bakteri pemecah dextran dan jumlah ini menurun sekali pada rumen sapi yang sedang sakit sehingga terjadi akumulasi dextran pada rumen yang mengakibatkan perut sapi menjadi kembung (1). Berkaitan dengan ini maka telah diisolasi bakteri pemecah dextran dari rumen yakni *B. ruminicola* subsp. *brevis* (2). Hal ini sangat berguna untuk memperoleh berbagai jenis dextranase yang setiap jenisnya mempunyai karakteristik tersendiri sehingga dapat disesuaikan dengan penggunaan yang lebih spesifik. Selanjutnya dilakukan penelitian ini yang bertujuan memurnikan enzim yang diproduksi oleh *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* B-3 dan karakteristiknya secara umum.

MATERI DAN METODA

Organisme

Organisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* B-3 yang berasal dari Tokyo University of Agriculture.

Media Penumbuh

Media yang digunakan untuk pertumbuhan mengandung 1% dextran, sedang untuk produksi enzim dextranase dengan skala yang lebih besar digunakan 2% dextran dalam media polipepton seperti tercantum pada Tabel 1. Selanjutnya media disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C. Media yang telah disterilisasi bila tidak segera dipakai, disimpan dalam lemari pembeku untuk menghindari kontaminasi.

Tabel-1 Komposisi media dextran - polipepton per 1.000 ml.

Dextran	2000 mg
Pepton	500 mg
CH ₃ COONa	200 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mg
NaHCO ₃	300 mg
Sistein-HCl	50 mg
Metionin	50 mg
Larutan 1,5% K ₂ HPO ₄	15 ml
Larutan mineral *	15 ml
Hemin	1 ml
Larutan VFA**	1 ml
larutan Vitamin***	0.1 ml

* : 1,5% KH₂PO₄, 0,6% NaCl, 0,06% CaCl₂, 0,06% MgSO₄

** : 0,2% asam n-butirat, 0,2% asam n-valerat, 0,2% asam DL-2-metil-butirat, 0,2% asam iso-valerat

*** : 0,1% B1-HCl, 0,1% B2, 0,1% B6-HCl, 0,1% Niasin, 1% Ca-dl-pantotenat, 0,02% asam p-aminobenzoat, 0,001% biotin, 0,001% asam folik

Produksi enzim

Produksi enzim dextranase oleh *B.rumicola* subsp. *brevis* pada medium fermentasi seperti pada Tabel-1 sebanyak volume 3 liter pada labu erlemeyer 5 liter. Selama proses fermentasi berlangsung, kedalam medium dialirkan CO₂ dan dilakukan penambahan NaHCO₃ untuk menetralkan pH. Pengerjaan diatas dilakukan pada suhu 40°C dan dilakukan secara aseptis.

Setelah fermentasi 24 jam, biomasa dipisahkan dari medium menggunakan sentrifuga dengan putaran 12.000 rpm. pada suhu 4°C selama 20 menit. Filtrat dikumpulkan dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk selanjutnya dilakukan pekerjaan pemurnian.

Aktifitas Enzim

1 ml larutan enzim ditambahkan pada 4 ml larutan 0,625 dextran T-2000 dalam 0,05 M buffer acetat pH 5,5. Diinkubasikan pada 40°C selama 1 jam dan hasil gula tereduksi yang terbentuk diukur dengan metoda Nelson-Somogyi (5 & 6).

Satu unit aktifitas dextranase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat membebaskan 1 mikro mol D-glukosa per menit pada kondisi diatas.

Penentuan Kadar Protein

Protein yang terkandung dalam enzim dextranase ditentukan menggunakan metoda Lowry dengan serum albumin sebagai standar. Pola protein enzim pada kromatografi kolom diikuti dengan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (8).

Aktivasi Gel Kromatografi

Gel-gel yang akan digunakan dibersihkan dan diaktifkan dengan jalan dekantasi dan disaring dengan saringan gelas. Untuk gel affinitas Toyopearl HW65C diaktifkan dengan 0,1 N NaOH dan gel penukar ion DEAE Toyopearl 650S dengan 0,5 N NaOH, kemudian dibilas dengan buffer fosfat.

Uji Kemurnian

Kemurnian dextranase pada setiap tahap pemurnian dilihat dari pola pemisahan pita-pita proteinnya dengan menggunakan elektroforesis mini slab gel poliakrilamid. Elektroforegram pola protein dilihat berdasarkan perbandingan harga R_m yakni jarak migrasi relatif suatu jenis protein terhadap standar (7).

Penentuan Berat Molekul

Berat molekul enzim dextranase hasil pemurnian dilakukan dengan metoda elektroforesis menggunakan Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid mengikuti metoda Weber dan Osborn (10). Molekul protein standar yang digunakan adalah polipeptida Combitek Boehringer Mannheim Biochemica dengan berat molekul antara 20.000 sampai dengan 340.000.

Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas dan Stabilitas Enzim

Pada pengujian pH untuk aktivitas dextranase, enzim dalam larutan buffer Mc.Ilvain masing-masing pada pH 4 sampai 8 direaksikan dengan larutan dextran T-2000 dengan konsentrasi akhir 0,5%, diinkubasikan pada suhu 40°C dan aktivitasnya diukur setelah 1 jam. Untuk uji stabilitasnya enzim pada berbagai suasana pH didiamkan pada suhu 4°C selama 24 jam dan sisa aktivitas enzim diukur.

Pada pengujian suhu untuk aktivitas dextranase, enzim dalam larutan buffer Mc.Ilvain pH 5,5 direaksikan pada dengan larutan dextran T-2000 dengan konsentrasi akhir 0,5%, diinkubasikan dan aktivitasnya diukur setelah 1 jam. Untuk uji stabilitasnya enzim pada berbagai suhu didiamkan selama 1 jam dan sisa aktivitas enzim diukur.

Pengaruh Ion - Ion logam

Pada percobaan ini larutan enzim ditambahkan larutan logam, konsentrasi akhir logam 1 mM. Kemudian didiamkan selama 5 menit, lalu ditambahkan substrat dextran. Sisa aktifitas enzim dextranase dihitung seperti pada penentuan diatas.

Deteksi Hasil Hidrolisa Dextranase

Hasil hidrolisa dextranase pada substrat dextran dideteksi dengan kromatografi kertas pada kertas saring Toyo No.50. Elusi dilakukan sebanyak tiga kali pada suhu 60°C dengan sistim larutan terdiri dari n-butanol : piridin : aquadest : asam asetat dengan perbandingan 6 : 4 : 3 : 0,3. Noda hasil elusi dideteksi dengan larutan perak nitrat (9).

HASIL

Produksi dan Pemurnian Dextranase

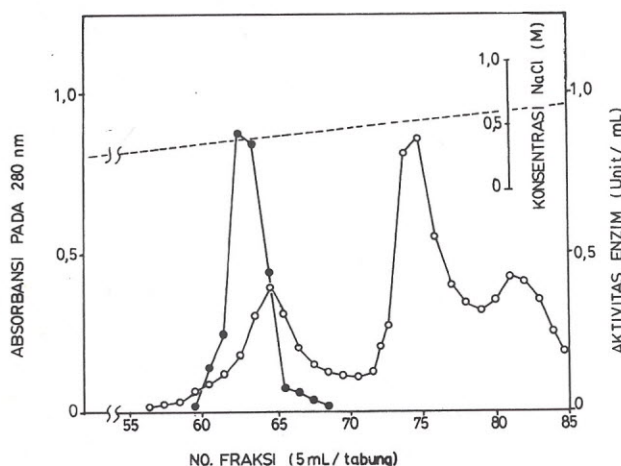
Selama produksi dextranase *B.ruminicola* pH medium harus dipertahankan pada pH 6,0 - 6,5, aktivitas enzim ini akan berkurang cepat sekali ketika pH medium mencapai 5,0. Aktivitas enzim mencapai nilai maximum setelah 10 jam inokulasi. Filtrat enzim yang telah dipisahkan dari biomasanya digunakan pada pekerjaan pemurnian ini. Semua pengerjaan dilakukan pada suhu 4°C.

Tahap I

Filtrat enzim yang diambil dari tempat penyimpanan diatas ditambahkan amonium sulfat sampai konsentrasi 40%, kemudian dialirkan pada gel kolom (20 X 2,5 cm) kromatografi hidrofobik affinitas Toyopearl HW 65C yang telah diberi amonium sulfat dengan konsentrasi yang sama. Kolom kromatografi yang telah mengabsorpsi enzim dilas dengan 40% amonium sulfat sebanyak dua kali isi kolom dan dielusi dengan buffer fosfat pH 6,0. Fraksi yang aktif dikumpulkan dan didialisa dalam buffer fosfat pH 6,0. Pada tahap ini enzim yang didapat mencapai 99% dan aktivitas enzim dapat ditingkatkan dari 0,075 unit menjadi 1,01 unit.

Tahap II

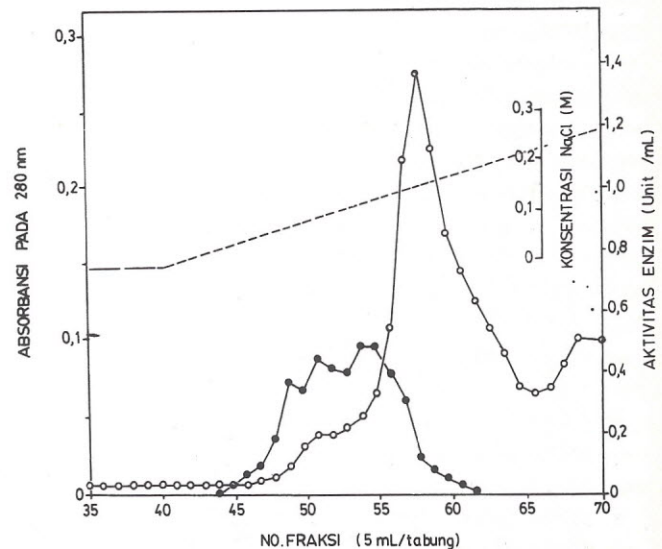
Hasil dialisa pada tahap I dipekatkan menggunakan ultrafiltrasi dan dialiri pada kolom kromatografi penukar ion yang sebelumnya gel dalam kolom kromatografi disetimbangkan konsentrasinya dengan buffer fosfat pH 6,0. Enzim yang terabsorpsi pada gel dielusi dengan NaCl secara bertahap dari 0 - 1,0 M dalam buffer fosfat dengan konsentrasi yang sama. Fraksi yang mempunyai aktivitas dikumpulkan dan kembali dialisa. Pada hasil pemisahan ini protein non dextranase terpisah dari protein dextranase dan enzim yang diperoleh kembali berkisar 50% (Gambar 1).



Gambar 1. Pola elusi dari enzim dextranase pada kolom penukar ion DEAE Toyoperal 650 S.
(o) absorbansi pada 280 nm
(●) aktivitas enzim
(—) konsentrasi NaCl

Tahap III

Dialisat yang telah dipekatkan dari tahap sebelumnya dipisahkan kembali dengan menggunakan kolom kromatografi penukar ion Sephacel, dielusi dengan NaCl secara bertahap dari 0 - 0,3 M dalam buffer fosfat. Pada tahap ini sisa protein non enzim tampak muncul dan sebahagian terpisah dari protein enzim (Gambar 2).



Gambar 2. Pola elusi dari enzim dextranase pada kolom penukar ion DEAE Sephacel.
(o) absorbansi pada 280 nm
(●) aktivitas enzim
(—) konsentrasi NaCl

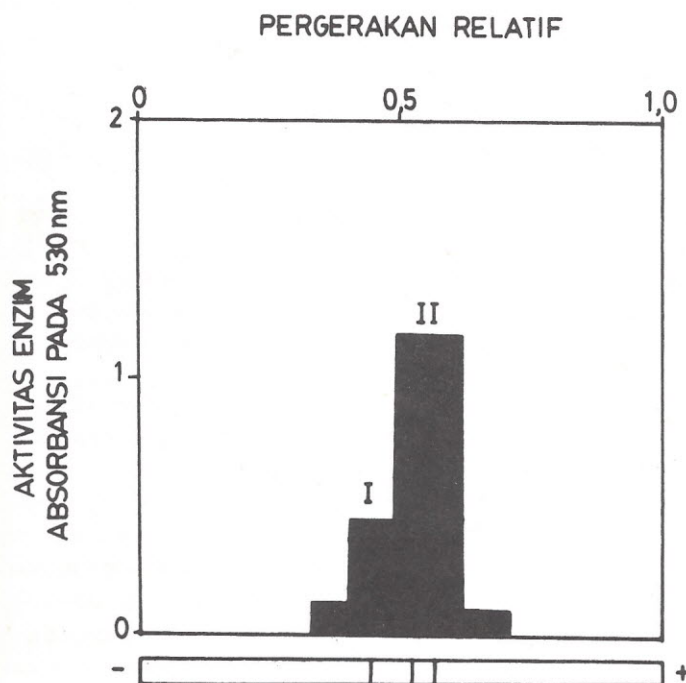
Hasil ringkasan dari proses pemurnian ini dapat dilihat pada Tabel 2. Aktivitas spesifik tampak naik bertahap sampai mencapai 400 kali dengan jumlah perolehan enzim mencapai 30%.

Tabel 2 Hasil ringkasan pemurnian dextranase *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis*

Tahap	Total aktivitas enzim	Total protein (mg)	Aktivitas spesifik unit / mg protein	Hasil (%)	Kemurnian
Filtrat Biakan	173	1311	0,13	100	-
Toyopearl HW65C	172	212,5	0,8	99	6
Ultra filtrasi UK-10	130	170	0,76	76	5,8
DEAE Toyopearl 650S	84,5	18,72	4,48	49	34,5
Ultra filtrasi UK-10	65	16,4	4	38	30
DEAE Sephacel	55,12	2,28	24,23	30	186
Ultra filtrasi UK-10	51,05	0,95	53	30	408

Hasil Elektroforesis

Pola pita protein dari uji kemurnian menggunakan elektroforesis pada gel poliakrilamid menunjukkan tiga pita protein dan dua diantara sangat berdekatan dan tidak begitu tajam terpisah. Semua pita protein memberikan aktivitas dextranase, ketika masing-masing potongan pita protein pada gel poliakrilamid diisolasi kira-kira 5 mm dan didektesi aktivitasnya. Perbandingan aktivitas dua pita protein yang tidak tajam terpisah (II) dan yang lainnya (I) adalah 3:7 (Gambar 3).



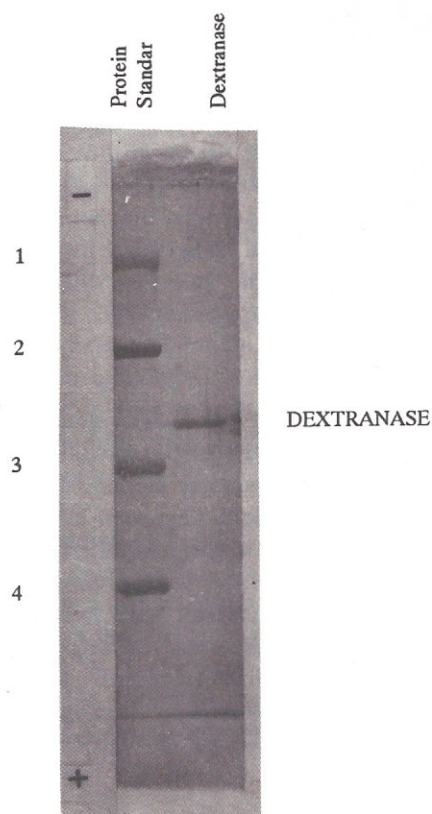
Gambar 3. Diagram aktivitas dextranase pada gel poliakrilamid.

Karakteristik Dextranase

Untuk mempelajari karakteristik enzim dextranase hasil pemurnian digunakan salah satu enzim dextranase hasil pemisahan dari gel poliakrilamid dengan cara elektroforesis.

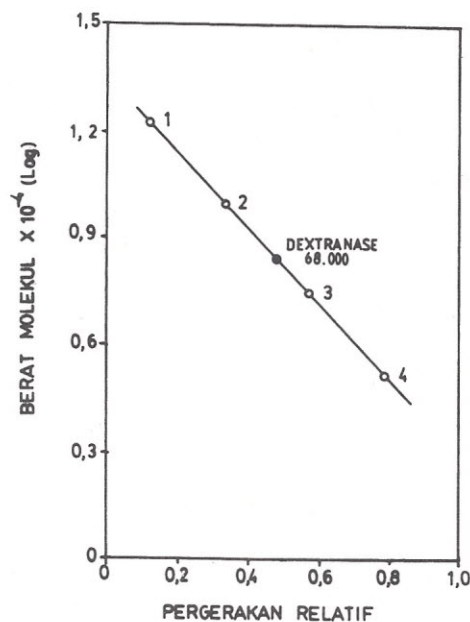
Enzim hasil pemisahan diatas dipekatkan kemudian dilakukan pengujian kembali pada gel poliakrilamid dan memberikan satu pita protein (Gambar 4a). Hasil enzim dextranase murni ini mempunyai berat molekul berkisar 68.000 ketika diukur menggunakan elektroforesis pada gel poliakrilamid 10% (Gambar 4b).

Aktivitas enzim dextranase mencapai maximum pada pH 5,5 dan aktivitas terhenti pada pH 4,0 dan pH 8,0 dan mempunyai kestabilan pH antara 5 sampai 6 (Gambar 5). Suhu optimum untuk aktivitas enzim dextranase ditemukan antara 40°C - 50°C dan tidak ada aktivitas sama sekali pada suhu 60°C. Kestabilan enzim ini dapat mencapai 45°C dan turun drastis setelah suhu 50°C (Gambar 6).



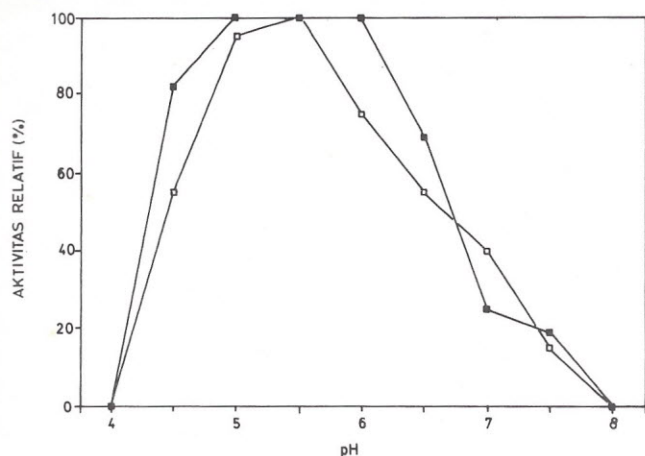
Gambar 4.a. Uji kemurnian dextranase pada gel poliakrilamid elektroforesis.

Keterangan: Protein standar 1. α -2 makroglobulin BM= 17×10^4 ; 2. fosforilase b. BM= $9,74 \times 10^4$; 3. glutamat dehidrogenase BM = $5,54 \times 10^4$; 4. laktat dehidrogenase BM= $3,65 \times 10^4$

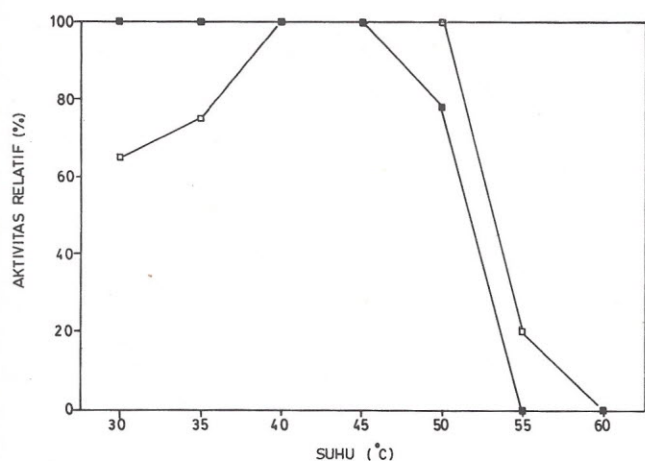


Gambar 4.b. Determinasi berat molekul dextranase menggunakan gel poliakrilamid elektroforesis.

Keterangan: Protein standar 1. α -2 makroglobulin BM= 17×10^4 ; 2. fosforilase b. BM= $9,74 \times 10^4$; 3. glutamat dehidrogenase BM= $5,54 \times 10^4$; 4. laktat dehidrogenase BM= $3,65 \times 10^4$



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas (□) dan kestabilan (■) enzim dextranase *B.ruminicola* subsp. *brevis*.



Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas (□) dan kestabilan (■) enzim dextranase *B.ruminicola* subsp. *brevis*.

Pengaruh ion-ion logam pada enzim sangat spesifik, oleh karena itu pengujian ion-ion logam pada enzim dextranase dilakukan dan seperti terlihat pada Tabel 3, enzim dextranase terhambat aktivitasnya dengan kehadiran ion logam-logam Cu^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} dan Hg^{++} .

Tabel 3. Pengaruh ion-ion logam terhadap enzim dextranase

Komponen 1 mM	Aktivitas relatif (%)
Tanpa ion logam	100
CuSO_4	0
FeSO_4	5
MgCl_2	80
CaCl_2	100
HgCl_2	0
EDTA	70

Untuk membedakan cara enzim dextranase memotong rantai panjang dextran telah dilakukan inkubasi enzim ini pada substrat dextran dalam waktu panjang (98 jam), dan hasil hidrolisa telah dideteksi pada kromatogram berupa rangkaian glukosa. Pada awal hidrolisa tidak dihasilkan glukosa.

PEMBAHASAN

Usaha pemurnian enzim dextranase dari *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* dengan menggunakan hidrofobik affinitas Toyopearl 65C dan penukar ion DEAE Toyopearl 650S telah dilakukan, namun tahap ini hanya efektif sebagai tahap awal dari pemurnian enzim ini, karena beberapa pita protein enzim ini masih tampak hadir ketika dideteksi pada gel poliakrilamid. Tampaknya di sini hidrofobik affinitas Toyopearl 65C berfungsi sebagai tahap pemekatan dari enzim, dimana aktivitas enzim menjadi bertambah setiap mililiternya dan penukar ion DEAE Toyopearl 650S hanya efektif untuk menghilangkan kontaminan protein utama yang berwarna kuning dari enzim ini. Oleh karena itu telah dilakukan pula pemurnian dengan menggunakan beberapa gel filtrasi tetapi hasil tidak berbeda. Selanjutnya telah dicoba pula dengan menggunakan penukar ion Sephacel dan hasil pemurnian tahap ini memberikan tiga pita protein pada gel poliakrilamid, dan mampu menghilangkan sisa-sisa kontaminan protein. Keseluruhan pita protein pada gel poliakrilamid memberikan aktivitas enzim dan tampak dua diantara pita protein bergabung dengan polisakarida seperti yang ditemukan pada enzim dextranase dari *Flavobacterium* sp. yang juga beberapa pita proteinnya memberikan aktivitas enzim dextranase (4).

Untuk mengetahui karakterisasi enzim diperlukan enzim murni oleh karenanya usaha mendapatkan enzim murni telah dilakukan dengan ekstraksi langsung dari gel poliakrilamid menggunakan elektroforesis dari pita protein yang terpisah baik dari kedua pita lainnya yang relatif berdekatan. Selanjutnya enzim dengan pita protein tunggal yang telah diuji ulang ini merupakan salah satu dari enzim dextranase yang digunakan untuk mempelajari lebih lanjut. Karakteristik enzim dextranase ini hampir sama dengan enzim dextranase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus bifidus* yang juga diisolasi dari rumen (1), perbedaannya hanya pada hasil hidrolisanya pada substrat dextran, dimana tidak dihasilkan glukosa dan isomaltosa, sedangkan pada enzim dextranase dari *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* dihasilkan.

Melihat produk awal hidrolisa salah satu jenis enzim dextranase *B.ruminicola* subsp.*brevis* pada substrat dextran adalah rangkaian glukosa lebih dari satu maka tampaknya enzim ini merupakan salah satu tipe endoenzim, yakni enzim yang memotong rantai panjang tidak dari ujung-ujungnya.