

OPTIMASI AMOBILISASI PEKTINASE DARI *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN KITOSAN-NATRIUM TRIPOLIFOSFAT

Vanessa Rachmani Tantowidjojo, Anna Roosdiana^{*}, Sasangka Prasetyawan

*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 sangat potensial dalam industri pangan, sehingga perlu diamobilisasi agar dapat digunakan berulang dan mudah untuk dipisahkan dari produknya. Pektinase yang telah diisolasi dari *Bacillus subtilis* dimurnikan dengan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejemuhan 20–60%. Pektinase diamobilisasi dengan metode penjabakan menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat. Pada penelitian ini ditentukan konsentrasi kitosan dan konsentrasi enzim optimum amobilisasi pektinase. Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 1; 1,5; 2; 2,5; dan 3% (w/v) dan konsentrasi enzim sebesar 0,943; 1,887; 2,830; 3,774; dan 4,717 mg/mL. Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Biuret dan aktivitas enzim ditentukan dengan menghitung asam galakturonat yang dihasilkan dari hidrolisis pektin oleh sejumlah enzim per menit. Kadar protein pektinase bebas diperoleh sebesar 4,717 mg/mL dengan aktivitas sebesar 109,8 unit. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum berada pada konsentrasi 2,5% sedangkan konsentrasi enzim optimum pada 1,887 mg/mL dengan aktivitas tertinggi sebesar 145,6 unit.

Kata kunci: aktivitas, amobilisasi, *Bacillus subtilis*, kitosan-natrium tripolifosfat, pektinase

ABSTRACT

Pectinase is a potential enzyme in food industry, so that needs to be immobilized in order to be reused and easy to be separated from the product. Pectinase isolated from *Bacillus subtilis* was purified by using ammonium sulphate at 20–60% saturation level. Pectinase was immobilized by entrapping method in a matrix of chitosan-sodium tripolyphosphate. The aim of this research was to determine optimum concentration of chitosan and enzyme concentration pectinase immobilization. Chitosan concentrations used in the range of 1; 1.5, 2, 2.5, and 3% (w/v) and the concentration of enzyme 0.943; 1.887; 2.830; 3.774; and 4.717 mg/mL. Protein content was determined by Biuret method and enzyme activity was determined by calculating galacturonic acid that resulted from hydrolyzed pectin by a number of enzyme per minute. Initial protein content was 4.717 mg/mL and free enzyme activity was 109.8 units. The result showed that the optimum concentration of chitosan was 2.5% while the optimum enzyme concentration was 1.887 mg/mL with the highest activity of 145.6 units.

Keywords: activity, immobilized, *Bacillus subtilis*, chitosan-sodium tripolyphosphate, pectinase

PENDAHULUAN

Enzim pektinase dalam perkembangannya banyak dimanfaatkan dalam bidang industri seperti industri jus, pengolahan limbah cair, pemutihan kertas maupun pada industri minuman beralkohol. Dalam industri sari buah, pektinase biasanya dimanfaatkan untuk menjernihkan sari buah [1]. Pektinase dapat dihasilkan dari bakteria, jamur dan tanaman. Enzim pektinase ini salah satunya dapat diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* [2].

Penggunaan enzim bebas sebagai biokatalis biasanya hanya dapat dipakai untuk satu kali reaksi. Selain itu, enzim bebas memiliki kelemahan seperti bersifat tidak stabil dan enzim sulit dipisahkan dari substrat dan produknya [3]. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan amobilisasi enzim. Enzim amobil mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan enzim bebasnya, seperti dapat digunakan berkali-kali, enzim mudah dipisahkan dari produknya dan dapat meningkatkan stabilitas enzim itu sendiri [4].

Salah satu matriks yang dapat digunakan untuk amobilisasi adalah kitosan. Kitosan dapat digunakan sebagai matriks karena mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino (-NH₂) dan hidroksil (-OH). Kitosan sebagai media amobilisasi enzim dapat diubah strukturnya oleh adanya senyawa pengikat silang [5]. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat [6]. Penambahan natrium tripolifosfat dapat menyebabkan ukuran pori dan porositas kitosan berubah [7], sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matriks.

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi kitosan dan konsentrasi pektinase terhadap amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* dan ditentukan konsentrasi kitosan optimum dan konsentrasi pektinase optimum .

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bacillus subtilis diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas *for microbiology* antara lain, *bacto agar* (Merck), pektin (Merck), pepton (Oxoide), kasein (Merck), *yeast extract* (Difco) dan kualitas pro analisis yang berstandar Merck antara lain Na₂HPO₄, asam sitrat, KH₂PO₄, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, BaCl₂, glukosa, asam dinitrosalisolat, NaOH, kristalin fenol, natrium sulfit, CuSO₄, kitosan, natrium tripolifosfat, HCl (37% w/w; bj=1,19 g/cm³) dan asam asetat glasial (bj=1,05 g/ cm³).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), oven, autoklav (Tipe LS-C35L), *shaker* (Edmund Buhler SM 25 24B), *centrifuse* dingin (Denley), kapas steril, Spectronic-20 (Bausch & Lomb), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 160A *double beam*), *refrigerator*, kantong selofan, aluminium foil, kertas saring *Whatman* No. 40, *syringe*.

Prosedur preparasi pektinase

Inokulum *Bacillus subtilis* dimasukkan ke dalam 250 mL media pertumbuhan diinkubasi pada suhu kamar dengan kecepatan pengocokan 125 rpm sampai awal fasa stasioner (24 jam). Media pertumbuhan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar, dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat dengan tingkat kejemuhan 20–60% dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan.

Uji kadar protein

Penentuan kadar pektinase (protein) awal dilakukan dengan metode 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 suhu 50 °C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 559 nm. Nilai absorbansi dikonversikan menjadi kadar protein dengan menggunakan persamaan regresi kurva standar kasein yaitu $y=0,00004x$. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi kasein 1000–9000 ppm.

Penentuan aktivitas pektinase

Larutan uji terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat pH 7, 1 mL pektinase yang telah dimurnikan serta 1 mL akuades. Larutan campuran diinkubasi pada 35 °C selama 50 menit, selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan hingga suhu kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Penentuan aktivitas pektinase amobil dilakukan seperti pada penentuan aktivitas pektinase bebas namun 1 mL enzim bebas digantikan dengan 0,5 gram enzim amobil. Nilai absorbansi dikonversikan menggunakan persamaan kurva standar $y=0,0042x$ sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis pektin yang dikatalis oleh pektinase. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi gula pereduksi 20–100 ppm. Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Satu unit aktivitas enzim amobil (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap g enzim.

Amobilisasi pektinase dengan kitosan-natrium tripolifosfat

Penentuan konsentrasi kitosan optimum amobilisasi pektinase

Larutan kitosan sebanyak 4 mL dengan konsentrasi 1; 1,5; 2; 2,5; dan 3% (w/v) dalam larutan asam asetat 3% (w/v) masing-masing ditambah 1 mL enzim hasil pemurnian. Larutan

campuran masing-masing diteteskan ke dalam 10 mL larutan natrium tripolifosfat 3% (w/v). Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam selama 75 menit. Enzim amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan pektinase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

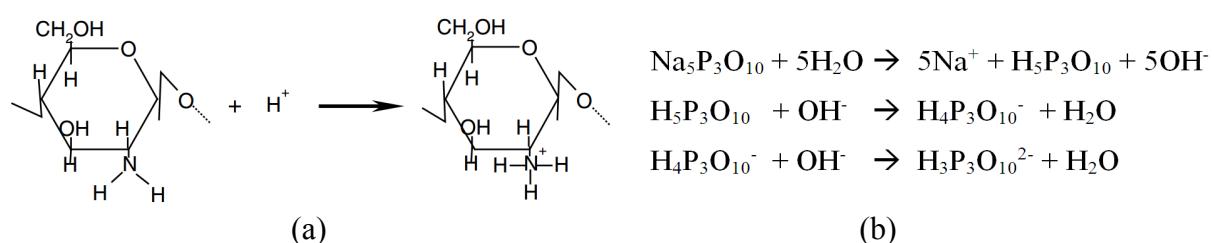
Penentuan konsentrasi enzim optimum amobilisasi pektinase

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi kitosan optimum yang hasilnya didapatkan dari tahapan sebelumnya. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang dipipet yaitu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL dan ditambahkan larutan buffer sitrat fosfat hingga volume total menjadi 1 mL, sehingga konsentrasi enzim menjadi bervariasi 0,943; 1,887; 2,830; 3,774; dan 4,717 mg/mL. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan pektinase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

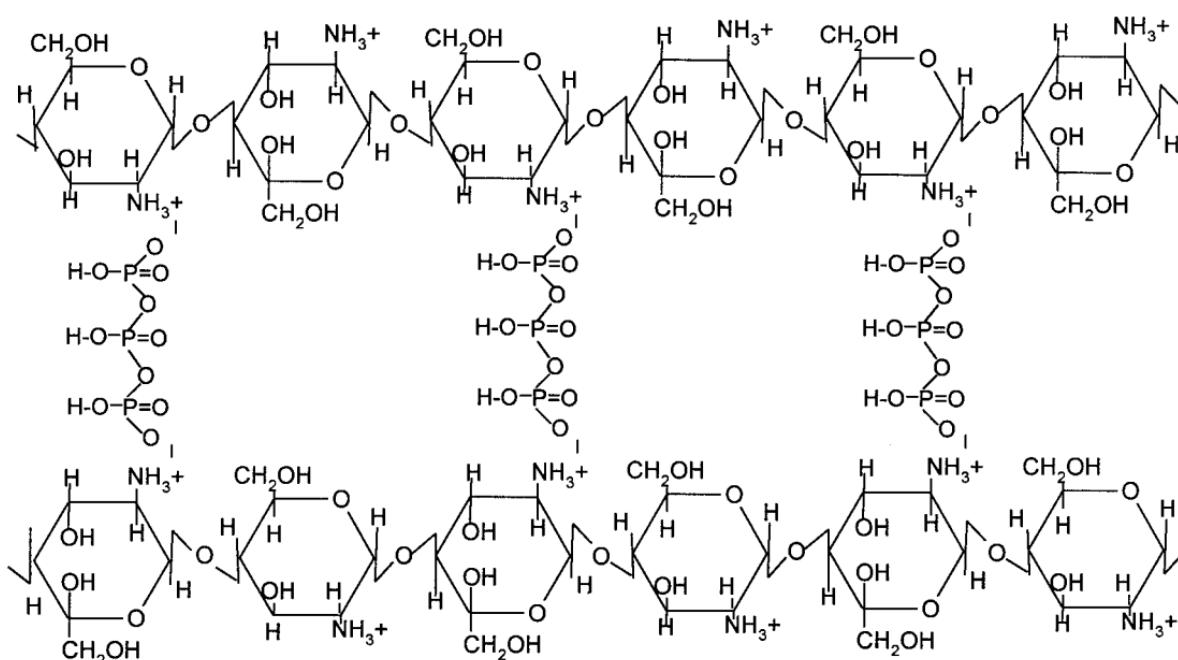
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi kitosan optimum amobilisasi pektinase

Pada penelitian ini, pektinase diamobilkan pada berbagai konsentrasi kitosan. Pektinase yang diamobilkan akan terjebak dalam kitosan yang berikatan silang dengan natrium tripolifosfat. Kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat akan mengalami protonasi pada gugus aminanya menjadi -NH_3^+ (Skema 1a). Larutan natrium tripolifosfat dalam akuades akan mengalami disosiasi menjadi $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$ (Skema 1b). Ikatan silang ini terbentuk karena adanya reaksi antara muatan positif pada kitosan (-NH_3^+) dengan muatan negatif pada natrium tripolifosfat ($\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$) (Skema 2).

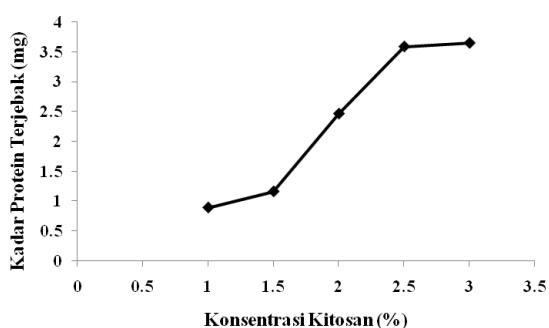


Skema 1. Reaksi (a) protonasi kitosan dalam asam asetat (b) disosiasi natrium tripolifosfat

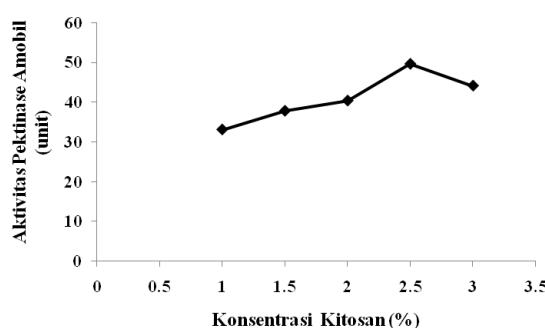


Skema 2. Ikatan silang antara kitosan dan natrium tripolifosfat

Peningkatan konsentrasi kitosan yang digunakan untuk amobilisasi pektinase akan meningkatkan kadar pektinase terjebak (Gambar 1a). Pada konsentrasi kitosan 3%, kadar pektinase yang terjebak paling banyak yaitu sebesar 3,652 mg/mL. Semakin besar konsentrasi kitosan maka ikatan silang yang terbentuk juga semakin banyak, akibatnya pori yang dihasilkan juga semakin rapat. Kerapatan pori ini akan mencegah pektinase yang terjebak untuk lepas kembali selama proses amobilisasi, selain itu kerapatan pori mempengaruhi kemampuan sisi aktif pektinase untuk bergerak bebas dan berikatan dengan substrat.



(a)



(b)

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

Peningkatan kadar pektinase terjebak ini tidak diiringi dengan peningkatan nilai aktivitas pektinase amobil. Nilai aktivitas pektinase amobil semakin meningkat sampai pada

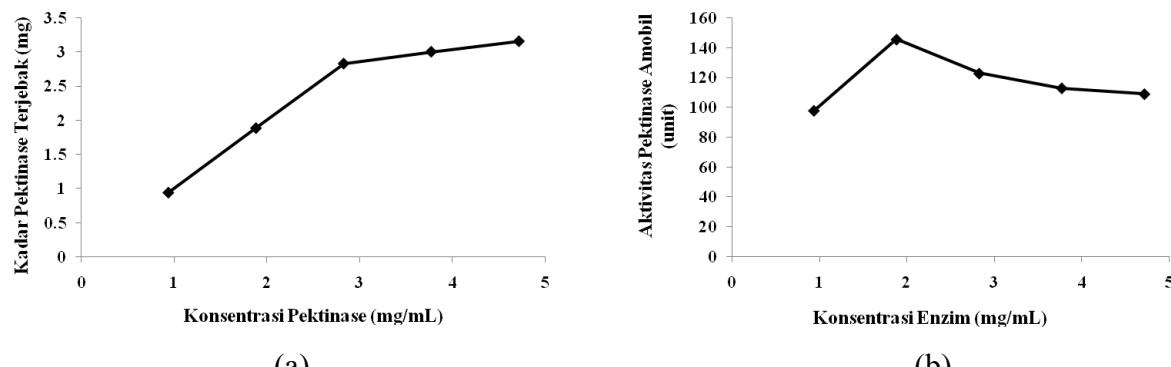
konsentrasi kitosan 2,5%, sedangkan pada konsentrasi kitosan 3%, nilai aktivitas mengalami penurunan (Gambar 1b). Hal ini disebabkan pada konsentrasi kitosan 3%, pektinase yang terjebak berada pada kondisi yang paling banyak. Semakin banyak pektinase terjebak, akan menyebabkan sisi aktif dari pektinase tidak dapat bergerak secara bebas dan membuat substrat susah untuk berikatan dengan sisi aktif dari pektinase.

Konsentrasi kitosan optimum berada pada saat aktivitas pektinase amobil yang dihasilkan maksimum. Pada variasi konsentrasi matriks kitosan, kondisi optimum berada pada konsentrasi kitosan 2,5% dengan nilai aktivitas sebesar 49,6 unit.

Penentuan konsentrasi enzim optimum amobilisasi pektinase

Peningkatan konsentrasi enzim awal akan meningkatkan kadar pektinase terjebak (Gambar 2a). Pada konsentrasi enzim 4,717 mg/mL, kadar pektinase yang terjebak paling banyak yaitu sebesar 3,157 mg/mL.

Peningkatan kadar pektinase terjebak ini tidak diiringi dengan peningkatan nilai aktivitas pektinase amobil. Nilai aktivitas pektinase amobil semakin meningkat sampai pada konsentrasi enzim 1,887 mg/mL, sedangkan dari konsentrasi enzim 2,830 mg/mL sampai 4,717 mg/mL nilai aktivitas mengalami penurunan (Gambar 2b).



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

Konsentrasi enzim optimum berada pada saat aktivitas pektinase amobil yang dihasilkan maksimum. Pada variasi konsentrasi enzim pada matriks kitosan, kondisi optimum berada pada konsentrasi enzim 1,887 mg/mL dengan nilai aktivitas yang dihasilkan sebesar 145,6 unit.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu kondisi optimum amobilisasi pektinase pada matriks kitosan berada pada konsentrasi kitosan 2,5% dan konsentrasi enzim 1,887 mg/mL dengan nilai aktivitas sebesar 145,6 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Iriani, E. S., Said E. G., Suryani A. dan Setyadjit, 2005, Pengaruh Konsentrasi Penambahan Pektinase dan Kondisi Inkubasi terhadap Rendemen dan Mutu Jus Mangga Kuini (*Mangifera odorata* Griff), *J. Pascapanen*, 2, pp. 11–17.
2. Ahlawat, S., Battan B., Dhiman S. S., Sharma J. dan Mandhan R. P., 2007, Production of Thermostable Pectinase and Xylanase for Their Potential Application in Bleaching of Kraft Pulp, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, pp. 736–770.
3. Amalia, A. dan Nawfa R., 2009, *Amobilisasi Bromelin dengan Menggunakan Kitosan sebagai Matriks Pendukung*, Prosiding Kimia FMIPA, Surabaya.
4. Esawy, M. A., Mahmoud D. A. R. dan Fattah A. F. A., 2008, Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a Levansucrase and Some Studies on Its Properties, *Braz. J. Chem. Eng.*, 25, pp. 237–246.
5. Krajewska, B., 2004, Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations : A Review, *Enzyme and Microb. Tech.*, 35, pp.126–139.
6. Aral, C. dan Akugba J., 1998, Alternative Approach to The Preparation of Chitosan Beads, *Int. J. Pharm.*, 168, pp. 9–15.
7. Fwu, L. M., Shin S. S., Chin T. C. dan Juin Y. L., 2002, Adsorption of Indomethacin onto Chemically Modified Chitosan Beads, *Polymer*, 43, pp. 757–765.