

## OPTIMASI AMOBILISASI PEKTINASE DARI *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN BENTONIT

Novia Sintesa Dara Rosmanansari, Anna Roosdiana\*, Sutrisno

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 merupakan salah satu jenis enzim yang mampu memecah senyawa pektin menjadi asam galakturonat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* dengan menggunakan matriks bentonit. Penentuan kondisi optimum amobilisasi dilakukan pada variasi lama pengocokan 1–5 jam dan konsentrasi enzim pada variasi 943,4–4717 ppm menggunakan 0,1 g bentonit pada temperatur ruang, kemudian ditentukan protein yang teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil. Kadar protein sisa ditentukan dengan metode Biuret dan asam galakturonat yang dihasilkan ditentukan menggunakan reagen DNS (**asam dinitrosalisilat**). Aktivitas pektinase dihitung berdasarkan banyaknya galakturonat yang dihasilkan oleh kerja sejumlah enzim per menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi pektinase menggunakan matriks bentonit yang telah diaktivasi dengan HCl dicapai pada lama pengocokan 4 jam dengan konsentrasi awal pektinase 2830 ppm menghasilkan pektinase teradsorpsi sebesar 21,61 mg/g bentonit dan aktivitas 642,7  $\mu\text{gg}^{-1}\text{menit}^{-1}$ .

**Kata kunci:** aktivitas, amobilisasi, *Bacillus subtilis*, bentonit teraktivasi HCl, pektinase

### ABSTRACT

Pectinase is one type of enzyme that break down pectin compounds to galacturonic acid. The purpose of this research was to determine the optimum conditions of pectinase immobilization from *Bacillus subtilis* using bentonite matrix. Determination of optimum conditions of immobilization was carried out at various shaking time 1–5 hours and enzyme concentrations 943.4–4717 ppm using 0.1 g activated bentonite at room temperature, the number of adsorbed pectinase and pectinase activity were measured. Protein concentration was determined by using Biuret reagent, whereas the galacturonic acid used DNS (dinitrosalicylic acid) reagents. Pectinase activity was calculated by the number of galacturonic acid per min per enzyme. Result showed that the optimum condition of immobilized pectinase using HCl-activated bentonite matrix achieved on a shaking time 4 hours with initial pectinase concentration of 2830 ppm, resulting in 21.61 mg pectinase adsorbed/g bentonite and the activity is  $642.7 \mu\text{gg}^{-1}\text{minute}^{-1}$ .

**Keywords:** activity, immobilized, *Bacillus subtilis*, HCl activated bentonite, pectinase

### PENDAHULUAN

Pektinase merupakan enzim yang mampu memecah polisakarida pektin menjadi asam galakturonat [1]. Pemanfaatan enzim pektinase saat ini telah banyak dilakukan, misalnya pada pengolahan limbah cair, dan industri makanan [2] seperti pada industri penjernihan sari buah [3]. Secara umum enzim pektinase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* memiliki titik isoelektrik (pI) sebesar 9,85 [4].

Enzim bebas mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan, sehingga secara teknik perolehan kembali enzim yang sangat aktif dari campuran reaksi sulit dilakukan. Dengan demikian stabilitas enzim perlu ditingkatkan menggunakan teknik amobilisasi [5]. Metode amobilisasi secara fisik memiliki kelebihan yaitu aktivitas dari enzim tetap tinggi (tidak terjadi perubahan konformasi enzim) dan media dapat diregenerasi [6]. Pada penelitian ini digunakan metode adsorpsi fisik dengan bentonit sebagai matriksnya. Pada proses amobilisasi, jumlah enzim yang teradsorpsi dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi adsorbat (enzim) [7]. Lama pengocokan dan konsentrasi enzim akan mempengaruhi massa enzim yang teradsorpsi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut [8]. Bentonit digunakan sebagai matriks ini, karena bentonit mempunyai luas permukaan yang sangat besar, sehingga bentonit mempunyai kemampuan tinggi dalam mengadsorpsi dan mempunyai kapasitas penukar ion yang tinggi. Jenis Na-Bentonit dapat mengembang delapan kali lipat ukuran awalnya [9]. Bentonit terlebih dahulu diaktivasi menggunakan HCl, agar ion  $\text{Na}^+$  dapat ditukarkan dengan ion  $\text{H}^+$  dan pengotor-pengotor yang terdapat pada bentonit dapat dihilangkan [10].

## METODA PENELITIAN

### Bahan dan alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni bakteri *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis antara lain  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , kristalin fenol, sodium sulfit, asam dinitrosalisolat,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ , glukosa anhidrat,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , asam sitrat, bahan-bahan tersebut merupakan bahan Merk Merck, HCl (37%,w/w, bj = 1,19 gr/ml), dan Na-bentonit (Bratacco). Bahan untuk mikrobiologi antara lain pektin (Merck), *bacto* agar (Merck), pepton (Oxide), *yeast extract* (Difco), dan kasein (Merck).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus tipe B 50 Memmert), jarum ose, magnetik stirrer, pH meter (schott-gerate tipe CG-820), penangas air (Memmert W 200), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 1601 A double beam), oven (Memmert), autoklav (Tipe LS-C35L), *shaker* (Edmund Buhler SM 25 24B), sentrifugasi dingin (Denley), pemanas listrik (Janke-Kunkel), kapas steril, *spectronic-20*

(Bausch dan Lomb), kuvet, kantong selofan, kertas saring *Whatman* no. 42, *refrigerator*, aluminium foil, ayakan 60 dan 120 mesh, corong vakum Buchner dan pH universal.

### **Prosedur preparasi pektinase**

Inokulum *Bacillus subtilis* dimasukkan ke dalam media pertumbuhan pada temperatur kamar dengan pengocokan 125 rpm selama 24 jam (akhir fasa logaritma). Kemudian media hasil fermentasi ditambahkan dengan buffer sitrat fosfat pH 7. Kemudian disentrifugasi. Supernatan merupakan ekstrak kasar, selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan amonium sulfat dengan kejemuhan 20–60%, dilanjutkan proses dialisis.

### **Uji kadar protein**

Penentuan kadar 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 temperatur 50 °C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 559 nm. Kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu  $y = 4 \cdot 10^{-5} x$ . Kurva baku dibuat dari larutan kasein dengan konsentrasi 1000–9000 ppm.

### **Penentuan aktivitas pektinase**

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat pektin. Larutan uji terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat pH 7,0 dan 1 mL enzim pektinase yang telah dimurnikan serta 1 mL akuades. Campuran diinkubasi pada 35 °C selama 50 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml reagen DNS dan dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 15 menit, lalu didinginkan hingga temperatur kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kurva baku dibuat dari pengukuran absorbansi larutan glukosa pada konsentrasi 20–100 mg/L. Penentuan aktivitas pektinase amobil sama dengan penentuan aktivitas pektinase bebas, tetapi 1 ml enzim pektinase diganti dengan 0,1 gr enzim amobil. Satu unit aktivitas enzim (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per satu ml enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh, pada persamaan kurva standar  $y = 4,21 \cdot 10^{-3} x$  sehingga dapat diketahui beberapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis pektin yang dikatalisis enzim pektinase.

## **Preparasi matriks bentonit**

Serbuk bentonit diayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh, kemudian padatan berukuran 60 mesh diayak kembali dengan menggunakan ayakan berukuran 120 mesh. Sebanyak 4 g bentonit yang tertahan pada ayakan 120 mesh dikocok dengan 16 mL larutan HCl 2 M pada temperatur kamar dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 4 jam. Kemudian campuran disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no. 42 dan residunya (padatan) dicuci dengan akuades sampai pH 6,0 atau bisa diuji filtratnya menggunakan larutan HNO<sub>3</sub> dan AgNO<sub>3</sub>. Kemudian padatan dikeringkan pada temperatur 105 °C hingga diperoleh massa konstan.

## **Amobilisasi enzim pektinase**

### ***Penentuan waktu amobilisasi optimum***

Enzim sebanyak 2 mL ditambah buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g bentonit telah diaktivasi. Masing-masing campuran diinkubasi dalam *shaker* pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama 1, 2, 3, 4, dan 5 jam. Hasil preparasi disaring dengan corong gelas sehingga terpisah antara endapan bentonit dan filtrat. Endapan bentonit yang mengandung enzim diuji aktivitasnya dan filtrat diuji kadar protein sisanya dengan metode Biuret. Waktu amobilisasi optimum ditunjukkan dari aktivitas yang maksimum atau dari enzim teradsorpsi maksimum.

### ***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 0,9434; 1,8868; 2,8302; 3,7736 ; 4,717 mg/mL dan campuran diinkubasi selama 4 jam dalam *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Hasil preparasi disaring dengan corong gelas sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Endapan bentonit yang tersaring diuji aktivitasnya dengan reagen DNS sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya. Konsentrasi pektinase optimum ditunjukkan dari aktivitas yang maksimum atau dari enzim teradsorpsi maksimum.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

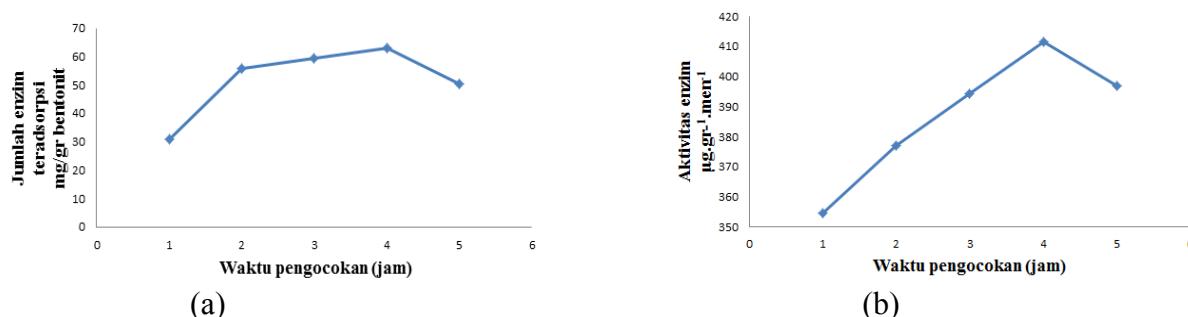
### **Amobilisasi enzim pektinase**

#### ***Penentuan waktu amobilisasi optimum***

Waktu pengocokan yaitu waktu yang dibutuhkan oleh enzim pektinase untuk berikatan dengan matriks bentonit. Peningkatan waktu amobilisasi akan meningkatkan massa pektinase

teradsorpsi hingga tercapai tingkat kejemuhan, dimana laju adsorpsi akan sama dengan laju desorpsi. Peningkatan ini dimungkinkan karena semakin meningkat waktu pengocokan maka probabilitas kontak antara bentonit dan pektinase semakin tinggi, sehingga pektinase dapat melekat pada permukaan bentonit. Na-bentonit yang digunakan pada metode ini diaktivasi menggunakan HCl, sehingga terjadi pertukaran kation antara  $H^+$  dengan  $Na^+$ . Proses ini terjadi karena adanya ikatan yang kuat antara  $H^+$  yang berasal dari HCl dengan atom O, jika dibandingkan dengan ikatan antara atom O dengan  $Na^+$ . Waktu 4 jam merupakan waktu optimum amobilisasi dengan jumlah pektinase teradsorpsi maksimum sebesar 63,10 mg/g bentonit (Gambar 1a). Pada waktu pengocokan 5 jam terjadi penurunan pektinase yang teradsorpsi namun tidak terlalu signifikan, penurunan tersebut kemungkinan oleh adanya desorpsi.

Aktivitas enzim menunjukkan kenaikan pada lama pengocokan 1 hingga 4 jam dan pektinase amobil menunjukkan aktivitas maksimum yaitu  $411,5 \text{ }\mu\text{gg}^{-1}\text{menit}^{-1}$  pada waktu 4 jam pengocokan (Gambar 1b). Kenaikan aktivitas enzim dapat dikaitkan dengan kenaikan massa pektinase teradsorpsi, karena banyaknya massa pektinase yang teradsorpsi akan menghasilkan substrat yang berikatan dengan sisi aktif pektinase semakin banyak. Sedangkan, pada lama pengocokan 5 jam, aktivitas enzim mengalami penurunan. Penurunan aktivitas tersebut kemungkinan diakibatkan karena terjadi desorpsi pada massa pektinase yang teradsorpsi. Adsorpsi pektinase yang terjadi pada bentonit kemungkinan termasuk adsorpsi fisik yang melibatkan pertukaran kation yaitu hidrogen dari bentonit dengan  $RNH_3^+$  yang berasal dari enzim dan terdapat juga gaya Van der Waals, sehingga interaksi yang terjadi antara bentonit dan pektinase ikatannya tidak kuat dan enzim mudah terlepas kembali atau mudah terdesorpsi.

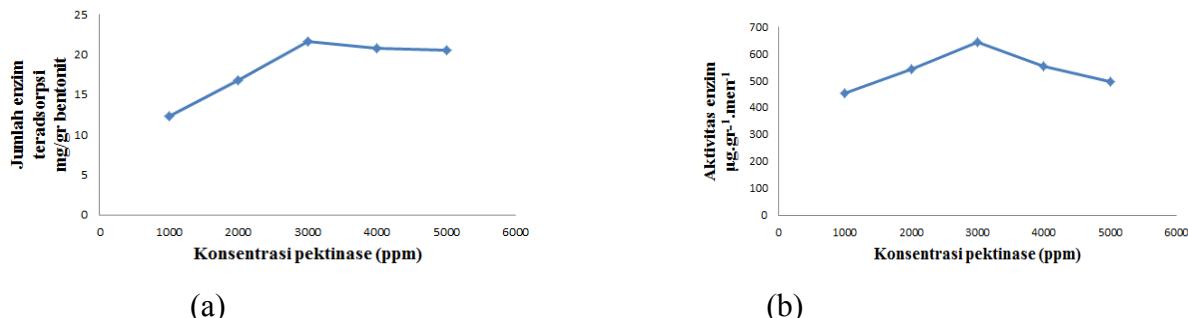


**Gambar 1.** (a) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap pektinase teradsorpsi pada bentonit. (b) Grafik hubungan antara waktu pengocokan terhadap aktivitas pektinase.

### **Penentuan konsentrasi pektinase optimum**

Penentuan konsentrasi enzim optimum, dilakukan pada 5 variasi konsentrasi enzim dengan waktu pengocokan 4 jam dan massa bentonit 0,1 gr. Berdasarkan hasil yang didapatkan, terjadi peningkatan jumlah pektinase yang teradsorpsi dari konsentrasi 943,4 ppm hingga 2830 ppm, dan mengalami sedikit penurunan pada konsentrasi 3773,6 ppm. Oleh karena itu, didapatkan konsentrasi optimum pada konsentrasi 2830 ppm dengan jumlah pektinase teradsorpsi sebesar 21,61 mg/g bentonit (Gambar 2a). Peningkatan yang terjadi pada konsentrasi 943,4 ppm hingga 2830 ppm disebabkan antara fasa ruah dengan permukaan bentonit terjadi perbedaan potensial kimia, sehingga laju difusi enzim tinggi mengakibatkan massa pektinase yang teradsorpsi akan meningkat. Sedangkan, pada konsentrasi 3773,6 ppm terjadi sedikit penurunan yang tidak signifikan, hal tersebut menandakan bahwa bentonit telah terpenuhi oleh pektinase, sehingga laju adsorpsinya semakin lambat.

Aktivitas enzim pada konsentrasi 943,4 ppm hingga 2830 ppm menghasilkan jumlah pektinase yang diadsorpsi meningkat begitu juga dengan aktivitasnya. Aktivitas enzim amobil pada konsentrasi 2830 ppm sebesar  $642,7 \text{ } \mu\text{gg}^{-1}\text{menit}^{-1}$  (Gambar 2b), sedangkan pada konsentrasi 3773,6 ppm terjadi penurunan aktivitas yang kemungkinan diakibatkan karena terjadi desorpsi pada massa pektinase yang teradsorpsi.



**Gambar 2.** (a) Grafik hubungan antara variasi konsentrasi pektinase terhadap pektinase teradsorpsi pada bentonit. (b) Grafik hubungan antara variasi konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase.

### **KESIMPULAN**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kondisi optimum amobilisasi pektinase pada Na-bentonit yang telah teraktivasi dicapai pada waktu pengocokan 4 jam, konsentrasi pektinase 2830 ppm menghasilkan pektinase teradsorpsi sebesar 21,61 mg/g dengan aktivitas pektinase sebesar  $642,7 \text{ } \mu\text{gg}^{-1}\text{menit}^{-1}$ .

## DAFTAR PUSTAKA

1. Pedrolli M., A. C., Gomes E., dan Carmona E. C., 2009, Pectin and Pectinases : Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes, *Op. Biotechnol. J.*, 3, pp. 9–18
2. Adi P.D., Richa R., Hanik H., Fransisca S., dan Ratna P.S., 2011, *Penggunaan Enzim dalam Industri Pangan*, Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang.
3. 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.
4. Bali R., 2003, *Isolation of Extracellular Fungal Pectinolytic Enzymes and Extarction of Pectin Using Kinnow Waste As Substrate*, Tesis, Department of Biotechnology & Env. Sciences Thapar Institute of Engineering and Technology (Deemed University) Patiala – 147 004, Punjab, India.
5. Sebayang F., 2006, Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nanas Serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan, *J. Sains Kimia*, 10, pp. 20–26.
6. Susanto H., Budiyono, Sumantri, dan Aryanti., 2003, *Amobilisasi Enzim dengan Menggunakan Membran Mikrofiltrasi*, Laporan Kegiatan, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
7. Sediawan W. B., 2000, *Berbagai Teknologi Proses Pemisahan*, Prosiding Presentasi Ilmiah Daur Ulang Bahan Bakar Nuklir V P2TBDU dan P2BGN, BATAN, Jakarta.
8. Ariesta R., 2009, *Amobilisasi Enzim Lipase dari Mucor meichei menggunakan Matriks Polietilen*, Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
9. Puslitbang Tekmira., 2005, *Bentonit Alam Terpilar Sebagai Material Katalis*, Direktorat Pembinaan Pengusahaan Mineral dan Batubara, Jakarta.
10. Fikri M. E., dan Kusumadewi R., 2011, *Regenerasi Bentonit Bekas Secara Kimia Fisika dengan Aktivator Asam Klorida dan Pemanasan pada Proses Pemucatan CPO*, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Lampung, Lampung.