

PENGARUH ION KALSIUM (Ca^{2+}) TERHADAP AKTIVITAS PEKTINASE HASIL ISOLASI DARI *Bacillus firmus*

Satriana, 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 merupakan enzim hidrolase yang mampu memecah ikatan α -1,4 glikosidik pada poligalakturonat menjadi asam galakturonat. Pektinase dapat diproduksi dari berbagai macam mikroorganisme seperti *Aspergillus niger* dan *Bacillus firmus*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan ion Ca^{2+} terhadap aktivitas pektinase dari *Bacillus firmus* dan menentukan parameter kinetika. Pektinase yang digunakan berupa ekstrak kasar. Pengukuran kadar protein pektinase dilakukan menggunakan reagen Biuret dan asam galakturonat menggunakan reagen DNS secara spektrofotometer. Aktivitas pektinase diperoleh dari asam galakturonat yang terbentuk oleh pektinase setiap 1 mL per menit. Pengaruh ion Ca^{2+} ditentukan pada konsentrasi ion Ca^{2+} 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM, sedangkan parameter kinetika ditentukan pada variasi konsentrasi substrat 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 % (b/v). Kadar protein pektinase bebas diperoleh sebesar 1,200 mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ion Ca^{2+} bertindak sebagai aktivator. Konsentrasi ion Ca^{2+} 10 mM dapat meningkatkan aktivitas pektinase dari 0,636 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ menjadi 7,608 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Parameter kinetika pektinase dengan penambahan Ca^{2+} 10 mM mempunyai V_{maks} sebesar 29,41 U dan $K_M = 1,91$ %.

Kata Kunci : *Bacillus firmus*, Ca^{2+} , DNS, pektinase

ABSTRACT

Pectinase is hydrolytic enzyme that can break down α -1,4 glycosidic bond of polygalacturonic to galacturonic acid. Pectinase can be produced from various kinds of microorganisms such as *Aspergillus niger* and *Bacillus firmus*. This research aim was to investigate the influence of the addition of Ca^{2+} ion towards the pectinase activity from *Bacillus firmus* and to determine the kinetic parameters. Pectinase was in the form of a crude extract. Protein of pectinase was reacted with Biuret reagent while the galacturonic acid was reacted with DNS, and measured this concentration using spectrophotometry. Enzyme activity was obtained from the galacturonic acid pectinase formed in by 1 mL of pectinase per minute. The influence of Ca^{2+} ion to pectinase activity observed at various concentration of Ca^{2+} ion 0, 2, 4, 6, 8, and 10 mM. While the kinetic parameter determined by substrate concentration variations 1.5; 1; 1.5; 2; and 2.5 % (w/v). The free pectinase was 1.200 mg/mL. The results showed that the Ca^{2+} ions act as an activator. The concentration of Ca^{2+} ion 10 mM can increase the pectinase activity from 0.636 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$ to 7.608 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$. In addition, the kinetic parameters of pectinase with Ca^{2+} ion 10 mM was V_{maks} of 29.41 U and $K_M = 1.91$ %.

Keywords : *Bacillus firmus*, Ca^{2+} , DNS, pectinase

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis [1], dimana keaktifan enzim dapat ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif yaitu melalui reaksi kimia antara substrat dengan enzim. Enzim bekerja dengan mempercepat reaksi tetapi tidak mengubah kesetimbangan reaksi kimia [2].

Pektinase merupakan enzim yang dapat mendegradasi rantai panjang polimer karbohidrat yang disebut pektin [3]. Enzim pektinase disebut juga enzim hidrolase. Pemecahan pektin terjadi pada ikatan α -1,4-glikosida. Produk yang dihasilkan berupa asam galakturonat [4]. Salah satu aplikasi pektinase dalam industri sebagai penjernihan sari buah [3]. Buah-buahan biasanya mengandung mineral.

Sumber penghasil pektinase adalah mikroba, seperti *Aspergillus niger* dan *Bacillus Sp.* [5]. Isolasi pektinase dari *Bacillus firmus* yang berasal dari susu sapi Blitar Jawa Timur memiliki kondisi optimum pada pH 7, temperatur 40-50 °C, dan waktu fermentasi 18 jam. Enzim yang dihasilkan menunjukkan adanya aktivitas pektinase [6].

Pektin dapat ditemukan pada jaringan tanaman, terutama sayuran dan buah-buahan [2]. Pektin terletak pada lamella tengah dinding sel, pada mulanya berupa proto pektin yang tidak larut dalam air. Apabila sudah dewasa berubah menjadi pektin yang dapat larut dalam air. Sifat pektin seperti gel yang dapat mengokohkan tanaman. Komponen utama penyusun pektin adalah ramnogalakturonat (RG) dan homogalakturonat (HG) [7].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ion Ca^{2+} terhadap aktivitas pektinase.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni Bakteri *Bacillus firmus* yang diperoleh dari Laboratorium Kimia-FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan *for microbiology* adalah pektin (Merck), kasein (Merck) dan bahan proanalisis *merk* Merck antara lain asam sitrat, natrium sitrat, reagen asam dinitrosalisilat (DNS), dan aquadest.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (Erlenmeyer, gelas kimia, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, corong gelas, gelas arloji, spatula), neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), pH meter (Schott Gerate CG 820), pH Universal (Merck), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), bunsen, oven (Mettler), *autoclave* (Tipe LS-C35L), inkubator, *refrigerator*, kuvet, *Spectronic 20* (Genesys 20), pemanas air (Janke-Kunkel), aluminium foil, kapas, dan kertas saring.

Isolasi Ekstrak Kasar Pektinase

Media cair steril sebanyak 100 mL dalam erlenmeyer 250 mL ditambahkan dengan 10 mL larutan inokulum secara aseptis dan diinkubasi di atas shaker pada temperatur kamar

selama 18 jam pada kecepatan 125 rpm. Kemudian ditambahkan 12,5 mL buffer sitrat fosfat pH 7. Langkah selanjutnya disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit. Sehingga dihasilkan supernatant yang merupakan ekstrak kasar pektinase.

Uji Kadar Protein

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar protein adalah spektrofotometer dengan menggunakan reagen Biuret. Dipipet sebanyak 2 mL ekstrak kasar pektinase, ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer, kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu $y = 4E-05x$. Larutan blanko terdiri dari 4 mL aquadest dan 8 mL reagen biuret

Penentuan Aktivitas Pektinase

Prosedur uji aktivitas pektinase adalah membuat larutan uji dengan komposisi 1 mL pektin 1% (b/v), 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL ekstrak kasar pektinase, dan 1 mL aquades. Diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 50 °C. Selanjutnya ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 mL, kemudian dipanaskan selama 15 menit pada temperatur 100 °C. Larutan didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Langkah selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 495 nm menggunakan *Spectronic 20*. Nilai absorbansi dikonversikan pada persamaan kurva standar $y = 0.018x$, untuk mendapatkan pektin. Satu unit aktivitas pektinase merupakan jumlah asam galakturonat yang terbentuk oleh setiap 1 mL pektinase per menit.

Penentuan Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Ion Ca^{2+}

Prosedur uji aktivitas pektinase dengan penambahan ion Ca^{2+} sama seperti penentuan aktivitas enzim pektinase tanpa menggunakan Ca^{2+} . Perbedaannya adalah sebelum diinkubasi selama 55 menit, ditambahkan larutan $CaCl_2$ pada masing-masing tabung dengan konsentrasi (0, 2, 4, 6, 8, dan 10) mM sebanyak 1 mL. Pada tabung 1 ditambahkan 2 mL aquades agar volume semua larutan sama.

Penentuan V_{maks} dan K_M

Penentuan V_{maks} dan K_M dilakukan dengan menguji aktivitas pektinase pada konsentrasi substrat pektin 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 (b/v). Dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Langkah selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL ekstrak kasar pektinase, dan 2 mL aquadest. Kemudian larutan diinkubasi dalam

penangas air selama 55 menit pada temperatur 50 °C. Langkah selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan hingga mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquadest hingga tanda batas. Dikocok hingga homogen, selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan *Spectronic 20* pada panjang gelombang 495 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi ekstrak kasar pektinase berupa filtrat berwarna coklat kekuningan dan dihasilkan aktivitas pektinase sebesar $0,636 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$.

Pektinase merupakan enzim ekstraseluler. Mempunyai sisi aktif berupa asam aspartat dan histidin. Sisi aktif digunakan untuk pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Pektinase mampu mengkatalisis pektin menjadi asam galakturonat pada ikatan glikosidik rantai panjang karbon. Reaksi hidrolisis pemecahan substrat pektin menghasilkan asam galakturonat. Ion H^+ dari sisi aktif pektinase yaitu asam aspartat nomor 180 dan 202 dan histidin nomor 223 ditarik oleh elektron bebas dari atom oksigen pada ikatan glikosidik [8]. Hal ini menyebabkan C1 substrat memiliki muatan elektro positif. Sedangkan pada atom oksigen asam aspartat yang mengalami pemutusan bersifat elektro negatif. Kemudian atom C1 pada substrat diserang oleh atom oksigen dari H_2O . Hasil dari reaksi ini adalah asam galakturonat. Pektinase hasil isolasi diuji aktivitas bebasnya. Berdasarkan sifat pektinase yang dapat menghidrolisis pektin menjadi gula pereduksi (asam galakturonat), maka digunakan reagen DNS (Asam dinitrosalisilat). Aktivitas pektinase ditentukan berdasarkan jumlah gula pereduksi yang terbentuk dari 1 mL enzim per menit. Gula pereduksi yang dihasilkan akan mereduksi DNS sehingga dapat membentuk asam 3-amino-5-dinitrosalisilat. Reaksi ini ditunjukkan dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah kecoklatan.

Pengaruh Penambahan Ion Ca^{2+} terhadap Aktivita Pektinase

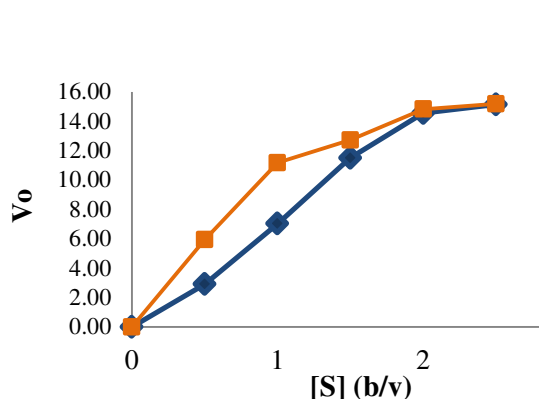
Ion Ca^{2+} pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mM dapat meningkatkan aktivitas pektinase. Aktivitas pektinase tertinggi pada konsentrasi ion Ca^{2+} 10 mM, yaitu $7,608 \mu\text{g mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Ion Ca^{2+} sebagai katalisator saat terbentuk kompleks enzim-substrat (ES), sehingga reaksi cenderung menuju produk. Hal ini mengakibatkan semakin banyak produk yang terbentuk dari pada kompleks enzim-substrat yang terurai kembali menjadi enzim dan reaktan. Ion Ca^{2+} merupakan alkali tanah yang berperan sebagai asam lewis. Ion Ca^{2+} akan terikat pada dua sisi enzim dari rantai samping asam aspartat. Pasangan elektron bebas atom O diterima oleh ion

Ca^{2+} , kemudian ikatan glikosidik pektin terputus menjadi asam galakturonat akibat dari hidrolisis oleh H_2O . Mekanisme reaksi pada pengikatan ion Ca^{2+} dengan pektinase sulit ditunjukkan dengan nyata. Dampak dari reaksi enzim dengan ion Ca^{2+} ini dapat memantapkan struktur enzim, sehingga enzim dapat bekerja optimal dan produk asam galakturonat juga maksimum.

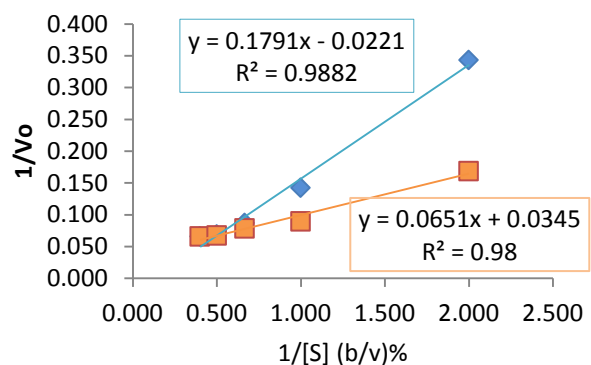
Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas pektinase adalah konsentrasi substrat (Gambar 1). Konstanta kinetika enzimatis (V_{maks} dan K_M) dapat ditentukan. Berdasarkan kurva Lineweaver-Berk, yaitu kurva hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_o$ (Gambar 2). Penelitian ini menggunakan konsentrasi substrat (pektin) yaitu 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5%. Faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzimatis adalah adanya aktivator atau inhibitor. Pada percobaan ini dilakukan penentuan parameter kinetika pektinase dengan penambahan ion Ca^{2+} 10 mM.

Hasil penelitian ini diperoleh nilai V_m sebesar 29,41 U dan $K_M = 1,91\% \text{ (b/v)}$. Sedangkan parameter kinetika dengan penambahan ion Ca^{2+} sebesar $V_m = 45,45$ U dan $K_M 8,14\%$. Dari parameter kinetika terlihat bahwa ion Ca^{2+} bertindak sebagai aktivator.



Gambar 1: Grafik hubungan antara V_o dengan $[S]$ —♦— tanpa Ion Ca^{2+}
—■— penambahan ion Ca^{2+}



Gambar 2: Grafik hubungan antara $1/V_o$ dengan $1/[S]$ —♦— tanpa Ion Ca^{2+}
—■— penambahan ion Ca^{2+} 10 mM

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa aktivitas pektinase dapat meningkat apabila ditambahkan ion Ca^{2+} dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mM. Ion Ca^{2+} merupakan aktivator. Ion Ca^{2+} dapat berikatan pada sisi aktif enzim sehingga membuat konformasi enzim

lebih tepat dan menyebabkan sifat katalitik enzim lebih besar. Kinetika reaksi penambahan ion Ca^{2+} adalah $V_m = 29,41$ U dan $K_M = 1,91\%$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cabeza M. S., Baca F. L., Puentes E. M., Loto F., and Baigori M. D., 2011, Selection of Psychrotolerant Microorganism Producing Cold-Active Pectinases for Biotechnological Process at Low Temperature, *Journal of Food Technology and Biotechnology*, 49.2, pp 187–195.
2. Cipolati E. P., Jose M. A. S., Klein M., Feddern V., Manuella M. C. F., Vladimir J. O., Ninow J. L., and Oliveira D., 2014, Current Status and Trends in Enzymatic Nanoimmobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, pp 56–67.
3. Winarno, 2010, *Enzim Pangan*, M. Bio press, Bogor.
4. Rehman H. U., Aman A., Rahmat R. Z., and Ali S. U. Q., 2014, Immobilization of Pectin Degrading Enzyme from *Bacillus Licheniformis* KIBGE IB-21 using Agar-agar as A Support, Pakistan, *Carbohydrate Polymers*, 102, pp 622-626.
5. Wu R., He B., Zhao G., Qian L., and Li X., 2013, Immobilization of Pectinase Oxidized Pulp Fiber and Its Application in White Water Treatment, South China University of Technology, Guangzhou, China, *Carbohydrate Polymers*, pp 523-529.
6. Roosdiana A., Prasetyawan S., Mahdi C., and Sutrisno, 2013, Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase, *J. Pure App. Chem. Res.* 2, 1, pp 35–41.
7. Wang B., Cheng F., Lu Y., Ge W., Zhang M., and Yue B., 2013, Immobilization of Pectinase from *Penicillium oxalic* F68 Onto Magnetic Carboxymethyl Microspheres : Characterization and Application in Juice Production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97, pp 137–143.
8. Voregen A. G. J., Fons F., Hank S., and Richard V., 2003, *Advances in Pectinase*, Neetherlands, Kluwer Akademik Publisher.