

Kinetika Enzim Nitrilase Dari Sel Utuh *Rhodococcus* spp Pada Biotransformasi Mandelonitril

R. Haryo Bimo Setiarto

Peneliti Bidang Biokimia Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI
Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong Science Center.
Telephone: 081327025330, Email: haryobimo42@yahoo.com

Diterima Desember 2010 disetujui untuk diterbitkan Mei 2011

Abstract

Rhodococcus spp can be used as mandelonitrile substrate for carbon and nitrogen source in life cycle of metabolism. They have potential of activity biotransformation for produced (R/S)-mandelic acid from mandelonitrile. (R/S)-mandelic acid is an important biotransformation product for production of pharmaceuticals such as semisynthetic penicillins, cephalosporins, antitumor agents, antiobesity agents and antiinflammation agents. This research was conducted to determine the enzyme kinetics (K_m and V_{max}) of nitrilase from *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 (induction acetonitrile 1000 mM - mandelonitrile 100 mM) with fluorometric methods, spectrophotometer analysis ($\lambda = 413$ nm). This research was carried out by assaying nitrilase enzyme activities in various concentration of mandelonitrile substrates which were between 10 mM – 100 mM with 10 mM interval. The result showed that the enzyme kinetics of nitrilase from *Rhodococcus* TPIK (K_m was 72.303 mM and V_{max} was 2.075 mM/ml cell/minute), *Rhodococcus* LP3 (K_m was 47.048 mM and V_{max} was 1.942 mM/ml cell/minute), *Rhodococcus* GLB5 (K_m was 34.375 mM and V_{max} was 2.083 mM/ml cell/minute). Nitrilase enzyme from *Rhodococcus* GLB5 have smallest K_m value. So we can interpretationed, this enzyme have good complexity Enzyme-Substrate, high affinity with substrate, and high speed reaction for forms product mandelic acid.

Keywords: enzyme kinetics (K_m , V_{max}), nitrilase enzyme, *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5

Abstrak

Rhodococcus spp dapat digunakan sebagai substrat mandelonitrile dan sumber karbon dan nitrogen dalam siklus hidup metabolisme. Bakteri ini memiliki potensi biotransformasi aktivitas untuk diproduksi (R / S)-asam dari mandelic mandelonitrile. (R / S)-asam mandelic adalah produk biotransformasi penting untuk produksi obat-obatan seperti penisilin semisintetik, sefalosporin, agen antitumor, agen antiobesity dan agen antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kinetika enzim (K_m dan V_{maks}) dari nitrilase dari *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 (induksi asetoneitril 1000 mM - mandelonitrile 100 mM) dengan metode fluorometric, analisis spektrofotometer ($\lambda = 413$ nm). Penelitian ini dilakukan dengan pengujian aktivitas enzim nitrilase dalam berbagai konsentrasi substrates mandelonitrile yang berusia antara 10 mM - 100 mM dengan selang 10 mM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kinetika enzim nitrilase dari *Rhodococcus* TPIK (K_m adalah 72,303 mM dan V_{maks} adalah 2,075 mM / ml sel / menit), *Rhodococcus* LP3 (K_m adalah 47,048 mM dan V_{maks} adalah 1,942 mM / ml sel / menit), *Rhodococcus* GLB5 (K_m adalah 34,375 mM dan V_{maks} adalah 2,083 mM / ml sel / menit). Enzim Nitrilase dari *Rhodococcus* GLB5 memiliki nilai terkecil K_m . Jadi kita bisa interpretationed, enzim ini memiliki kompleksitas baik Enzim-Substrat, afinitas tinggi dengan substrat, dan reaksi kecepatan tinggi untuk asam produk bentuk mandelic.

Kata kunci: kinetika enzim (K_m , V_{max}), nitrilase enzim, *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5

Pendahuluan

Rhodococcus spp. mampu memanfaatkan senyawa sianida dengan toksisitas tinggi seperti mandelonitril sebagai sumber C dan N pada proses metabolismenya. Beard dan Page (1998), melaporkan bahwa *Rhodococcus* spp mampu memproduksi enzim nitrilase yang dapat mengkonversi substrat mandelonitril menjadi asam mandelat. Hasil penelitian lain oleh Martinkova dan Klempier (1998) menunjukkan bahwa *Rhodococcus* spp mampu melakukan biotransformasi senyawa nitril dengan menghasilkan enzim

nitril hidratase dan amidase. Dari hasil penelitian terbaru diketahui bahwa ada beberapa jalur metabolisme enzimatis lain yang dapat digunakan untuk memproduksi asam mandelat diantaranya adalah memanfaatkan enzim reduktase, lipase, rasemase, dan esterase (Guo *et al.*, 2009, Jiao *et al.*, 2008, Ju *et al.*, 2010). Produk hasil biotransformasi senyawa mandelonitril yaitu asam mandelat termasuk dalam golongan utama metabolit styrena yang sangat bermanfaat untuk berbagai industri kimia, biokimia maupun industri farmasi (Utkin *et al.*, 1991, Jiao *et al.*, 2008).

Asam mandelat merupakan asam karboksilat yang secara stereoisometrik memiliki gugus pusat kiral yang saling berinteraksi dengan kelompok gugus hidroksil dan karbonil dari enantiopure di-tartarat (Jiao *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2008), Karena bersifat kiral maka senyawa ini memiliki dua konformasi stereoisometrik yaitu (S)-asam mandelat (stereoisomer) dan (R)-asam mandelat (enantiomer) (He *et al.*, 2008). (R)-asam mandelat bermanfaat sebagai antitumor, prekursor semisintetik penisilin, cephalosporin dan obat antiobesitas (Yamamoto *et al.*, 1991, Kaul *et al.*, 2004). (S)-asam mandelat digunakan untuk sintesis alternatif cyclopentenon dan senyawa nonsteroidal pada obat antiinflamasi seperti celecoxib dan deracoxib (Mateo *et al.*, 2006). Ada beberapa metode enzimatik yang dapat dilakukan untuk memproduksi enan-tiomer murni dari asam mandelat maupun produk turunannya. Hal tersebut diantaranya melakukan hidroksilasi asimetris dari senyawa 2 - fenil asetat (Chen *et al.*, 2007, Ju *et al.* 2010), degradasi enantioselektif senyawa rasemat dari asam mandelat dan memanfaatkan klorin untuk menggantikan produk turunannya (Huang *et al.*, 2006, Ju *et al.*, 2010), reduksi asimetris dari senyawa asam benzoil format (Yang *et al.*, 2006), dan hidrolisis enantioselektif dari senyawa mandelonitril maupun senyawa ester asam mandelat (He *et al.*, 2007, Ju *et al.*, 2010). Dapat dilaporkan pula bahwa hidrolisis secara enzimatik ester asam mandelat dan produk turunan yang digantikan oleh klorin dapat diperoleh pada fase organik (Wang *et al.*, 2008, Ju *et al.*, 2010).

Salah satu alternatif untuk mengoptimasi enzim nitrilase adalah menentukan kinetika enzim nitrilase yaitu dengan menentukan Km dan Vmaks dari sel *Rhodococcus spp* tersebut. Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisasi yang disebut *velocity* (V). Harga V dari suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga V hampir linier dengan [S]. Pada kondisi V tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya [S] disebut kecepatan maksimum (Vmaks). Vmaks merupakan

salah satu parameter kinetika enzim (Wiseman, 1989). Parameter kinetika enzim yang lain adalah konstanta *Michaelis-Menten*, yang lebih dikenal dengan Km. Km merupakan konsentrasi substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi apabila kecepatan reaksi enzim telah mencapai $\frac{1}{2}$ Vmaks (Wiseman, 1989). Menurut Whitaker (1996), nilai Km dapat digunakan untuk menentukan ukuran afinitas enzim-substrat (E-S) yang merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks E-S. Selain digunakan sebagai ukuran afinitas E-S (enzim-substrat), nilai Km juga berhubungan dengan tetapan keseimbangan disosiasi kompleks E-S menjadi E dan S. Apabila nilai Km kecil berarti kompleks E-S mantap dan afinitas enzim terhadap substrat tinggi, sedangkan bila nilai Km besar afinitasnya menjadi rendah. Harga Km enzim sangat bervariasi tergantung dari jenis substrat, lingkungan dan kekuatan ion.

Penelitian ini bertujuan menentukan kinetika enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 melalui nilai Km dan Vmaks selama proses biotransformasi mandelonitril. Dengan diketahuinya Km dan Vmaks dapat dilakukan optimasi untuk meningkatkan jumlah produk asam mandelat melalui peningkatan Vmaks dan penurunan Km. Metode yang digunakan untuk menentukan Km dan Vmaks dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 adalah metode fluorometer berbasis spektrofotometri dengan perlakuan peningkatan konsentrasi mandelonitril secara bertahap (Roth 1971, Benson *et al.*, 1975). Metode ini digunakan untuk menganalisis secara tidak langsung jumlah produk (R/S)-asam mandelat yang terbentuk selama proses biotransformasi dengan mengukur pembentukan senyawa ammonia (NH₃) sebagai produk sampingan. Hipotesis penelitian ini adalah apabila nilai Km enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 kecil berarti kompleks E-S mantap, afinitas enzim tinggi terhadap substrat, laju reaksi pembentukan produk asam mandelat tinggi sedangkan bila Km besar berlaku kebalikannya.

Materi dan metode

Materi yang digunakan antara lain media mineral (komposisi 0.4475 gram Na₂HPO₄·2H₂O, 0.1 gram KH₂PO₄, 0.1 gram MgSO₄·7H₂O, 0.01 gram CaCl₂·7H₂O, 0.001

gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 gram ekstrak khamir, 1 ml mikroelement dan 1 liter akuades), mikroelement (komposisi 0.1 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 gram $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 gram H_3BO_3 , 0.2 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 gram $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gram $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.90 gram $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 gram Na_2SeO_3 dan 1 liter akades), asetonitril Aldrich, mandelonitril Aldrich, buffer fosfat 50 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.2, buffer fosfat 0.2 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.4, NH_4Cl Merck, sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 (koleksi laboratorium Biokimia Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI).
Kultivasi dan Pemanenan Biomassa Sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5

Proses kultivasi *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 dilakukan pada media mineral yang diinduksi dengan asetonitril 1000 mM - mandelonitril 100 mM. Inokulasi dilakukan secara aseptik pada laminar air flow dengan OD awal 0.5. Kultivasi dilakukan pada suhu ruang (27°C) dan diagitasi dengan shaker orbital kecepatan 120 rpm/menit selama 144 jam. Kekeruhan (optical density) sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 diukur setiap hari (tiap 24 jam) dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 600$ nm untuk mengamati laju dan fase pertumbuhan sel. Setelah *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 berhasil ditumbuhkan dalam media mineral yang diinduksi dengan asetonitril 1000 mM – mandelonitril 100 mM. Tahap selanjutnya adalah melakukan peremajaan sehingga sel dapat tumbuh dengan stabil dan diharapkan memiliki aktivitas biotransformasi yang tinggi.

Pemanenan sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 dilakukan dengan metode sentrifugasi menggunakan High Speed Refrigerated Sentrifuge Kubota 6500 dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C . Pellet berisi biomassa sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi lalu dicuci dengan buffer fosfat 50 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.2 sebanyak tiga kali menggunakan prosedur sentrifugasi yang sama. Biomassa sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 diencerkan menggunakan buffer fosfat 50 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.2 hingga diperoleh suspensi sel konsentrasi 10 % (b/v). Setelah dilakukan pengenceran, suspensi sel divortex hingga homogen dan disimpan pada suhu -20°C .

Preparasi Sampel Untuk Penentuan

Kinetika Enzim Nitrilase dari Sel Utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 Pada Biotransformasi Mandelonitril

Langkah awal yang harus dirancang dalam penentuan K_m dan V_{maks} enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 adalah memberikan perlakuan variasi konsentrasi mandelonitril berturut-turut dari 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM dan 100 mM. Seluruh variasi konsentrasi tersebut selanjutnya diujikan pada sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 yang telah diinduksi dengan asetonitril 1000 mM-mandelonitril 100 mM.

Preparasi kontrol (mandelonitril 0 mM) dilakukan dengan mencampurkan 100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 900 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2 hingga diperoleh volume akhir sebesar 1 ml ke dalam tube eppendorf ukuran 2 ml. Preparasi untuk perlakuan mandelonitril 10 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 1.2 μl substrat mandelonitril + 898.8 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 20 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 2.4 μl substrat mandelonitril + 897.6 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 30 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 3.6 μl substrat mandelonitril + 896.4 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 40 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 4.8 μl substrat mandelonitril + 895.2 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 50 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 6.0 μl substrat mandelonitril + 894 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 60 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 7.2 μl substrat mandelonitril + 892.8 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 70 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 8.4 μl substrat mandelonitril + 891.6 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 80 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 9.6 μl substrat mandelonitril + 890.4 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), mandelonitril 90 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 10.8 μl substrat mandelonitril + 889.2 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2), dan mandelonitril 100 mM (100 μl suspensi sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 + 12 μl substrat mandelonitril + 888 μl buffer fosfat 50 mM pH 7.2).

Seluruh campuran reaksi tersebut divorteks, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang (27° C), dan dishaker dengan kecepatan 120 rpm/menit. Tahap berikutnya adalah menghentikan reaksi enzimatik dengan menambahkan HCl 4 N sebanyak 1 ml, lalu divorteks. Untuk menetralkan pH dilakukan penambahan NaOH 4 N sebanyak 1 ml. Untuk menentukan Km dan Vmaks enzim nitrilase yang berasal dari aktivitas sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 dilakukan sentrifugasi pada campuran reaksi tersebut menggunakan centrifuge high speed Mini Spin Eppendorf dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatannya diambil untuk melakukan analisis selanjutnya.

Analisis Km dan Vmaks Enzim Nitrilase dari Sel Utuh Rhodococcus TPIK, LP3, GLB5 Pada Biotransformasi Mandelonitril dengan Metode Fluorometer

Reagent kimia yang digunakan untuk uji aktivitas biotransformasi *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 pada mandelonitril dengan metode fluorometer dibuat dengan mencampurkan 91 ml buffer fosfat 0.2 M (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄) pH 7.4, 4.5 ml reagent pertama (o-phthalaldehyde (75 mM) Aldrich sebanyak 50 mg yang dilarutkan pada 5 ml ethanol absolut) dan 4.5 ml reagent kedua (2-mercaptoethanol (72 mM) Aldrich sebanyak 25 µl yang dilarutkan dalam 5 ml ethanol absolut) hingga diperoleh volume akhir 100 ml. Seluruh senyawa tersebut selanjutnya diaduk dengan magnetic stirer sampai diperoleh reagent yang homogen.

Analisis produk NH₃ menggunakan metode fluorometer dilakukan dengan terlebih dahulu membuat campuran reaksi 1500 µl reagent o-phthalaldehyde mercaptoethanol dalam buffer fosfat dan 50 µl sampel supernatan sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 yang telah diinkubasi selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan preparasi standar NH₃ untuk analisis spektrofotometer dengan komposisi campuran reaksi 1500 µl reagent o-phthalaldehyde mercaptoethanol dalam buffer fosfat dan 50 µl standar ammonia (NH₃) konsentrasi 0 mM, 1 mM, 2mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 15 mM, 18 mM dan 20 mM. Kontrol substrat mandelonitril, kontrol sel *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 dianalisis dengan membuat campuran reaksi 1500 µl reagent

o-phthalaldehyde mercaptoethanol dalam buffer fosfat dan 50 µl kontrol supernatan substrat mandelonitril, sel *Rhodococcus* TPIK, GLB5 dan LP3. Setelah seluruh campuran reaksi baik standar NH₃, sampel maupun kontrol dibuat selanjutnya divorteks hingga homogen dan dilakukan inkubasi selama 20 menit. Keberadaan NH₃ pada campuran reaksi dengan metode fluorometer secara empiris ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning berfluoresensi hijau. Setelah itu dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 413 nm.

Nilai absorbansi dikonversi menjadi konsentrasi NH₃ yang terbentuk selama biotransformasi mandelonitril menjadi asam mandelat. Sebagaimana diketahui berdasarkan stoikiometri bahwa selama proses biotransformasi mandelonitril menjadi asam mandelat, jumlah NH₃ (ammonia) yang terbentuk sebanding dengan jumlah produk asam mandelat. Sehingga konsentrasi NH₃ yang terbentuk dapat dianalogikan menjadi konsentrasi produk asam mandelat. Penentuan kinetika enzim nitrilase (Km dan Vmaks) didasarkan atas plot grafik hubungan antara konsentrasi substrat [S] yang dinyatakan dalam satuan mM dan aktivitas total enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus spp* (V) yang dinyatakan dalam satuan mM/ml sel.menit. Selanjutnya dibuat tabel [V] dan [S] dan dikonversi menjadi 1/[V] dan 1/[S] serta dibuat plot grafik hubungan antara 1/[V] dan 1/[S]. Lalu ditentukan nilai Vmaks dan Km yang didasarkan atas persamaan kurva *Lineweaver-Burk* (Whitaker, 1996). Hal tersebut dilakukan dengan persamaan Michaelis-Menten: $1/[V] = 1/V_{maks} + K_m/V_{maks} \cdot (1/[S])$, bila $1/[V] = Y$ dan $1/[S] = X$, maka rumusnya dapat ditulis menjadi $Y = a + bX$, sehingga konstanta $a = 1/V_{maks}$ dan konstanta $b = K_m/V_{maks}$. Dengan demikian, bila harga $1/V_{maks}$ diketahui maka nilai Vmaks didapat, begitu pula nilai Km akan juga didapat dari persamaan $b = K_m/V_{maks}$.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat (tabel

1,2,3). Peningkatan aktivitas enzim nitrilase masih terus berlangsung hingga perlakuan konsentrasi mandelonitril 100 mM. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim nitrilase

dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 belum mencapai V_{maks} (laju reaksi maksimumnya) atau dapat pula dikatakan bahwa enzim tersebut belum jenuh.

Tabel 1 Aktivitas biotransformasi enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK.

Table 1. Biotransformation activity of nitrilase enzyme of intact cells of *Rhodococcus* TPIK.

No	Konsentrasi substrat mandelonitril (mM) [S]	Aktivitas total biotransformasi (mM/ml sel.menit) [V]	1/[S]	1/[V]
1	0	0	0	0
2	10	0.2597	0.100	3.850
3	20	0.4883	0.050	2.048
4	30	0.5272	0.033	1.897
5	40	0.6163	0.025	1.622
6	50	0.7480	0.020	1.337
7	60	0.8488	0.016	1.178
8	70	0.9341	0.014	1.071
9	80	1.1822	0.012	0.846
10	90	1.2093	0.011	0.827
11	100	1.3023	0.010	0.768

Tabel 2 Aktivitas biotransformasi enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* LP3.

Table 2. Biotransformation activity of nitrilase enzyme of intact cells of *Rhodococcus* LP3.

No	Konsentrasi substrat mandelonitril (mM) [S]	Aktivitas total biotransformasi (mM/ml sel.menit) [V]	1/[S]	1/[V]
1	0	0	0	0
2	10	0.376	0.100	2.659
3	20	0.485	0.050	2.062
4	30	0.698	0.033	1.433
5	40	0.783	0.025	1.277
6	50	0.934	0.020	1.071
7	60	0.988	0.016	1.012
8	70	1.097	0.014	0.911
9	80	1.248	0.012	0.801
10	90	1.291	0.011	0.775
11	100	1.388	0.010	0.720

Tabel 3 Aktivitas biotransformasi enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* GLB5.

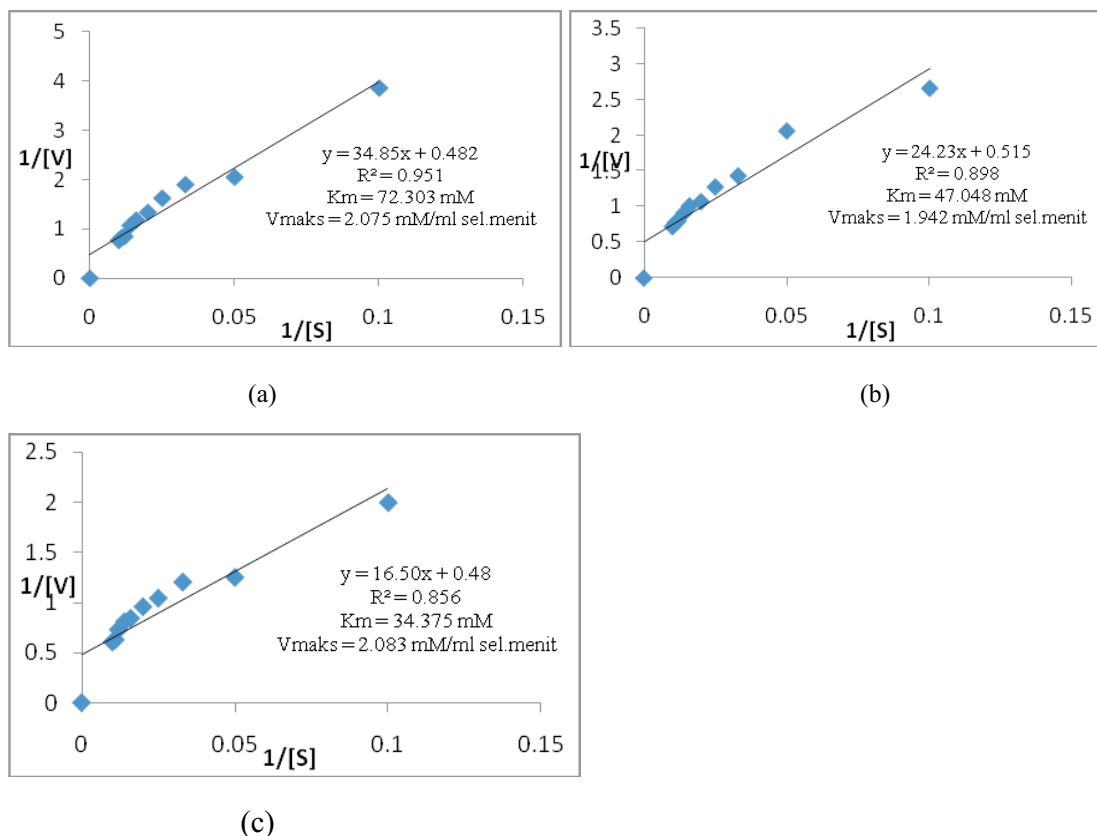
Table 3. Biotransformation activity of nitrilase enzyme of intact cells of *Rhodococcus* GLB5

No	Konsentrasi substrat mandelonitril (mM) [S]	Aktivitas total biotransformasi (mM/ml sel.menit) [V]	1/[S]	1/[V]
1	0	0	0	0
2	10	0.500	0.100	2.000
3	20	0.798	0.050	1.253
4	30	0.829	0.033	1.206
5	40	0.957	0.025	1.045
6	50	1.043	0.020	0.959
7	60	1.186	0.016	0.843

No	Konsentrasi substrat mandelonitril (mM) [S]	Aktivitas total biotransformasi (mM/ml sel.menit) [V]	1/[S]	1/[V]
8	70	1.236	0.014	0.809
9	80	1.368	0.012	0.731
10	90	1.589	0.011	0.629
11	100	1.647	0.010	0.607

Penentuan K_m dan V_{maks} enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* TPIK didasarkan atas persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/[V]$ (Tabel 1), seperti disajikan pada Gambar (a). Selanjutnya dari persamaan regresi $Y = 0.482 + 34.85 X$, maka diperoleh: $0.482 = 1/V_{maks}$ sehingga $V_{maks} = 2.075$ mM/ml sel.menit dan $34.85 = K_m/V_{maks}$ sehingga $K_m = 72.303$ mM. Nilai K_m dan V_{maks} enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* LP3 didasarkan atas persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/[V]$ (Tabel 2), seperti disajikan pada Gambar (b).

Selanjutnya dari persamaan regresi $Y = 0.515 + 24.23 X$, maka diperoleh: $0.515 = 1/V_{maks}$ sehingga $V_{maks} = 1.942$ mM/ml sel.menit dan $24.23 = K_m/V_{maks}$ sehingga $K_m = 47.048$ mM. Penentuan K_m dan V_{maks} enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* GLB5 didasarkan atas persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/[V]$ (Tabel 3), seperti disajikan pada Gambar (c). Selanjutnya dari persamaan regresi $Y = 0.480 + 16.50 X$, maka diperoleh: $0.48 = 1/V_{maks}$ sehingga $V_{maks} = 2.083$ mM/ml sel.menit dan $16.50 = K_m/V_{maks}$ sehingga $K_m = 34.375$ mM.



Gambar 1 Grafik Line Weaver Burk persamaan Michaelis-Menten untuk kinetika laju reaksi enzim nitrilase pada sel utuh (a) *Rhodococcus* TPIK, (b) *Rhodococcus* LP3, (c) *Rhodococcus* GLB5

Figure 1. Line Weaver Burk graph of Michaelis-Menten similarity for the kinetics of reaction rate of nitrilase enzyme on intact cells of (a) *Rhodococcus* TPIK, (b) *Rhodococcus* LP3, (c) *Rhodococcus* GLB5

Berdasarkan eksperimen ini dapat dilaporkan bahwa enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* GLB5 memiliki nilai K_m terkecil jika dibandingkan dengan enzim nitrilase pada sel *Rhodococcus* sp. lainnya (TPIK dan LP3). Hal ini dikarenakan sel utuh *Rhodococcus* GLB5 mampu membentuk produk asam mandelat dan mencapai setengah dari V_{maks} meskipun hanya menggunakan konsentrasi substrat mandelonitril yang relatif rendah (34.375 mM). Apabila dibandingkan dengan sel *Rhodococcus* LP3 yang memerlukan konsentrasi substrat mandelonitril yang lebih tinggi yaitu 47.048 mM maupun sel *Rhodococcus* TPIK yang memerlukan konsentrasi 72.303 mM untuk mencapai setengah dari V_{maks} . Dapat diketahui bahwa dengan nilai K_m terkecil berdasarkan teori kinetika kimia, maka sel *Rhodococcus* GLB5 mampu melakukan proses biotransformasi mandelonitril menjadi asam mandelat dengan lebih efektif dan efisien. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa sel *Rhodococcus* GLB5 mampu menghasilkan enzim nitrilase dengan afinitas tinggi terhadap substrat mandelonitril, mampu membentuk kompleks E-S yang mantap dan memiliki laju reaksi pembentukan produk asam mandelat yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel *Rhodococcus* yang lain. Perbedaan nilai V_{maks} dan K_m seperti di laporkan oleh eksperimen tersebut, berhubungan dengan tingkat kemurnian enzim nitrilase. Enzim nitrilase yang murni memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga akan meningkatkan aktivitas biotransformasinya yang berdampak pada penurunan nilai K_m . Selain itu enzim nitrilase yang diekstraksi dari sel yang berbeda akan memiliki sifat-sifat berbeda, terutama responnya terhadap kondisi lingkungan seperti: suhu, pH dan konsentrasi NaCl optimum untuk aktivitasnya. Perlu dilakukan lagi riset lebih lanjut untuk lebih mengoptimalkan aktivitas biotransformasi dan memurnikan enzim nitrilase tersebut.

Kesimpulan

Kinetika enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* TPIK, LP3, GLB5 pada proses biotransformasi mandelonitril menjadi asam mandelat ditunjukkan dengan nilai K_m dan V_{maks} . Enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* TPIK memiliki K_m 72.303 mM dan V_{maks} 2.075 mM/ml sel.menit, enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* LP3

memiliki K_m 47.048 mM dan nilai V_{maks} 1.942 mM/ml sel.menit, enzim nitrilase dari sel utuh *Rhodococcus* GLB5 memiliki K_m 34.375 mM dan V_{maks} 2.083 mM/ml sel.menit. Enzim nitrilase dalam sel utuh *Rhodococcus* GLB5 memiliki afinitas tinggi terhadap substrat mandelonitril, mampu membentuk kompleks E-S yang mantap dan memiliki laju reaksi pembentukan produk asam mandelat yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel *Rhodococcus* yang lain.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada seluruh staf peneliti dan teknisi di Laboratorium Biokimia Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong atas bantuan, masukan dan kerja samanya sehingga kegiatan penelitian ini berjalan sukses.

Daftar Pustaka

- Beard, T.M. and Page, M.I., 1998. Enantioselective biotransformations using *Rhodococci*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 99–106.
- Benson, J. R. and Hare, P.E., 1975. O-phthalaldehyde: Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72: 619-622.
- Chen, Y.Z., Xu, J.Z., Xu, X.Y., Xia, Y., Lin, H., Xia, S.W., and Wang, L.X., 2007. Enantiocomplementary preparation of (S)- and (R)-mandelic acid derivatives via α -hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and reduction of α -ketoester using microbial whole cells. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18: 2537–2540.
- Guo, J.L., Mu, X.Q., and Xu, Y., 2009. Integration of newly isolated biocatalyst and resin-based in situ product removal technique for the asymmetric synthesis of (R)-methyl mandelate. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 10: 449-456.
- He, Y.C., Xu, J.H., Xu, Y., Ouyang, L.M., and Pan, J., 2007. Biocatalytic synthesis of (R)-(-)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by a newly isolated nitrilase-producer *Alcaligenes* sp. ECU0401. *Chin. Chem. Lett.*, 18: 677–680.
- He, Y.C., Xu, J.H., Pan, J., Ouyang, L.M., and

- Xu, Y., 2008. Preparation of R-mandelic acid and its derivatives from racemates by enantioselective degradation with a newly isolated bacterial strain *Alcaligenes* sp. ECU0401. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 31:445–451.
- Huang, H.R., and Xu, J.H., 2006. Preparation of (S)-mandelic acid from racemate using growing cells of *Pseudomonas putida* ECU1009 with (R)-mandelate degradation activity. *Biochem. Eng. J.*, 30: 11–15.
- Jiao, F.P., Chen, X.Q., Yang, L., and Hu, Y.H., 2008. Enantioselective extraction of mandelic acid enantiomer using ester alcohol *L*- tartarate as chiral selector. *Latin American Applied Research*, 38: 249-252.
- Ju, X., Yu, H.L., Pan, J., Wei, D.Z., and Xu, J.H., 2010. Bioproduction of chiral mandelate by enantioselective deacylation of α acetoxyphenylacetic acid using whole cells of newly isolated *Pseudomonas* sp. ECU1011. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86: 83–91.
- Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., and Banerjee, U.C., 2004. Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R) - mandelic acid by new bacterial isolates. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15: 207–211.
- Martinkova, L., Klempier, N., and Prepechlova, I., 1998. Chemo-selective biotransformation of nitriles by *Rhodococcus equi* A4. *Biotechnology Letters*, 20 (10): 909–912.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., Van Rantwijk, F., Stolz, A., and Sheldon, R.A., 2006. Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase–nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17: 320–323.
- Roth, H., 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.*, 43: 880-882.
- Utkin, I.B., Yakimov, M.M., Matveeva, L.N., Kozlyak, E.I., Rogozhin, I.S., Solomon, Z.G., Bezborodov, A.M., 1991. Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77: 237–241.
- Wang, P.Y., Tsai, S.W., Chen, T.L., 2008. Improvements of enzyme activity and enantioselectivity via combined substrate engineering and covalent immobilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 101: 460–469.
- Whitaker, J.R., 1996. Enzymes. In O. R. Fennema (Ed.). *Food Chemistry*. 3rd Edition. Marcel Dekker Inc., New York.
- Wiseman, A., 1989. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. 2nd. Edition. Ellis Howard, New York.
- Yamamoto, K. and Oishi, K., 1991. Production of (R) - Mandelic Acid from Mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (10): 3028-3032.