

DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/Pros.Semnas.TPV-2019-p.642-649>

Kestabilan Enzim BS4 Imobil dalam Penyimpanan pada Suhu dan Kemasan Berbeda

(Immobilized BS4 Enzyme Stability in Storage at Different Temperatures and Packaging)

Haryati T¹, Sinurat AP¹, Purwadaria T², Miraya N¹¹Balai Penelitian Ternak, P.O. Box 221, Bogor 16720²Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta
purringcats2001@yahoo.com.au

ABSTRACT

The mannanase enzyme produced by *Eupenicillium javanicum* BS4 can improve the digestibility of chicken feed containing 20% of palm kernel cake. In the application of mannanase as a feed supplement, the activity and stability of enzymes are important to be maintained through various of preservation techniques. This experiment was carried out to evaluate the stability of immobilized BS4 enzymes in pollard matrix in storage with different temperatures and packaging. The immobilized BS4 enzyme is packed in plastic bottles, glass bottles and aluminium bags, they are stored at room temperature and refrigerator. Moisture content, mannanase activity and saccharification activity were evaluated after storage 1;2;3;4;5;6;11;12;13 and 14 months. The moisture content of all packages up to 6 months of storage is consistent less than 10%. The saccharification activity fluctuated but remained stable until 6 months of storage. Mannanase activity are also stable until 6 months storage. It can be concluded that temperature and packaging did not affect the stability of the immobilized enzyme during 6 months storage, so it can be stored at room temperature, but for longer period it is recommended to store in refrigerator temperature.

Key words: Stability, enzyme, temperatures, packaging

ABSTRAK

Enzim mannanase diproduksi oleh *Eupenicillium javanicum* BS4 dapat meningkatkan pencernaan pakan ayam yang mengandung 20% bungkil inti sawit. Dalam penerapan mannanase sebagai suplemen pakan, aktivitas dan stabilitas enzim menjadi penting untuk dipertahankan melalui berbagai teknik pengawetan. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan enzim BS4 imobil pada matrik *pollard* dalam penyimpanan dengan suhu dan kemasan yang berbeda. Enzim BS4 imobil kering dikemas pada botol plastik, botol kaca dan kantong aluminium, kemudian disimpan pada suhu ruang dan kulkas. dievaluasi kadar air, aktivitas mannanase serta aktivitas sakarifikasinya setelah penyimpanan 1,2,3,4,5,6,11,12,13 dan 14 bulan. Kadar air pada semua kemasan sampai penyimpanan 6 bulan masih lebih kecil dari 10%. Aktivitas relatif sakarifikasi berfluktuasi tetapi masih stabil sampai pada penyimpanan 6 bulan. Aktifitas mannanase juga masih stabil sampai penyimpanan 6 bulan. Dapat disimpulkan suhu dan kemasan tidak mempengaruhi stabilitas enzim imobil selama 6 bulan penyimpanan, untuk itu penyimpanan dapat dilakukan pada temperatur ruangan, akan tetapi penyimpanan dalam jangka waktu lebih lama disarankan pada suhu dingin.

Kata kunci: Kestabilan, enzim, suhu, kemasan

PENDAHULUAN

Perkembangan industri peternakan tidak lepas dari pemilihan bahan pakan yang menghabiskan biaya sebesar 65-70% dari total biaya produksi peternakan. Pada saat ini, pemanfaatan limbah pertanian dan perkebunan dapat menjadi solusi kebutuhan bahan pakan yang semakin meningkat (Amata 2014).

Banyaknya industri perkebunan kelapa sawit di Indonesia menjadikan limbah bungkil inti sawit (BIS) berpotensi menggantikan bahan pakan impor. Akan tetapi, tingginya kadar serat BIS seperti manan, dapat menurunkan efisiensi metabolisme pada pencernaan ternak monogastrik.

Oleh sebab itu, suplementasi enzim mananase diperlukan untuk memecah molekul manan menjadi lebih sederhana dan dapat diserap (Purnawan et al. 2010). Akibatnya, perlakuan penambahan enzim meningkatkan efisiensi penyerapan energi metabolisme.

Pada aplikasi di lapangan, teknik preservasi mananase dibutuhkan untuk menjaga aktivitas dan stabilitas enzim selama masa simpan. Salah satu metode preservasi enzim adalah imobilisasi dengan berbagai macam matriks seperti alginat, polard, ataupun kalsium karbonat (CaCO_3). Masa simpan enzim imobil dapat bertahan hingga 2 tahun. Pemilihan matriks yang tepat menentukan hasil preservasi yang optimum (Elias 1984; Datta et al. 2012).

Metode preservasi enzim dalam bentuk kering dipilih untuk penyimpanan jangka panjang karena kadar air yang sangat rendah mampu mencegah pertumbuhan bakteri yang kemungkinan besar akan merusak enzim.

Imobilisasi enzim merupakan teknik memperangkap enzim pada suatu matriks yang bukan substrat ataupun produknya, umumnya matriks tersebut berupa polimer inert dan bahan anorganik. Karakteristik yang harus diperhatikan dalam pemilihan matriks yang tepat, meliputi sifat inertnya, kekuatan fisik, stabilitas, regenerabilitas, adsorbs non-spesifik, kontaminasi mikrob, dan kemampuannya meningkatkan spesifitas atau aktivitas enzim dan menekan inhibisi produk. Beberapa teknik imobilisasi antara lain, adsorbsi, *covalent binding*, imobilisasi afinitas, *entrapment* atau pemerangkapan (Datta et al. 2012).

Bahan pembentuk matriks imobil dapat berasal dari polimer alami dan anorganik. Polimer alami yang umumnya digunakan, antara lain alginat, kitosan dan kitin, kolagen, karagenan, gelatin, selulosa, tepung, pektin, *sepharose*. Selain itu, bahan-bahan anorganik yang umumnya digunakan adalah zeolite, keramik, *celite*, silica, kaca, karbon aktif, dan arang (Datta et al. 2012).

Pollard atau dedak gandum, merupakan hasil samping industri pengolahan tepung terigu. Terdapat dua jenis polard, yaitu *wheat pollard* yang berasal dari kulit ari gandum dan *wheat bran* yang berasal dari kulit luar gandum. Imobilisasi dengan polard bersifat adsorbsi dan terikat pada molekul karbohidratnya. Haryati et al. (2010) telah melaporkan imobilisasi enzim xilanase pada polard dengan penambahan kation mampu mempertahankan stabilitas enzim.

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan enzim BS4 imobil pada matrik pollard dalam penyimpanan dengan suhu dan kemasan yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan yang digunakan enzim BS4 cair hasil ekstraksi dan pemekatan produk fermentasi bungkil kelapa menggunakan kapang *Eupenicillium javanicum* yang diinkubasi selama 7 hari pada ruang fermentor. *Pollard* yang digunakan sebagai bahan matrik terlebih dahulu digiling agar bentuknya lebih halus untuk memperbesar luas permukaan.

Metode

Enzim pekat cair dicampurkan kedalam matrik polar gandum yang sudah dihaluskan dengan perbandingan 1:1(v/b), diaduk sampai rata lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C sampai kering. Enzim imobil kering lalu di tempatkan dalam 3 kemasan (botol kaca, botol plastik dan kantong aluminium), disimpan dalam suhu ruangan dan 4°C / refrigerator. Evaluasi kadar air, aktivitas mananase dan aktivitas sakarifikasi terhadap BIS, dilakukan setiap bulan selama 6 bulan penyimpanan, kemudian evaluasi dilakukan kembali pada bulan ke 11, 12, 13 dan 14.

Kadar air

Evaluasi kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri dengan pemanasan pada oven 105°C.

Analisis aktivitas mananase

Pada pengujian aktivitas mananase, enzim imobil diekstrak dengan bufer Na-asetat 0,1 M pH 5,8, lalu 0,5 mL ekstrak dimasukkan masing-masing ke dalam tabung reaksi sampel dan kontrol. Tabung reaksi sampel terlebih dahulu diinkubasi pada *waterbath* bersuhu 40°C bersama dengan substrat *gum locust bean* (GLB) 0,5% b/v secara terpisah selama 5 menit. Setelah itu, 0,5 mL substrat GLB 0,5% b/v dimasukkan ke dalam tabung sampel, diinkubasi kembali selama 30 menit. DNS sebanyak 1,5 mL ditambahkan untuk inaktivasi reaksi enzim. Pada tabung reaksi kontrol yang berisi 0,5 mL enzim, 1,5 mL DNS ditambahkan terlebih dahulu untuk inaktivasi enzim, kemudian ditambahkan dengan substrat GLB 0,5% b/v. Larutan blanko tersusun atas 0,5 mL bufer Na-asetat, 0,5 mL substrat dan 1,5 mL DNS. Seluruh tabung dipanaskan pada air mendidih selama 10-15 menit.

Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kadar gula pereduksi pada sampel dan kontrol dapat dihitung berdasarkan persamaan kurva standar manosa. Aktivitas enzim dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas mananase (U/g sampel)} = \frac{(\text{Sampel} - \text{Kontrol}) \mu\text{g/mL} \times \text{faktor pengenceran}}{(\text{Mr manosa}) \mu\text{g}/\mu\text{mol} \times (\text{waktu inkubasi}) \text{ menit}}$$

Unit aktivitas enzim menandakan banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol produk dalam 1 menit pada kondisi reaksi. Aktivitas spesifik mananase ditentukan pada semua perlakuan dalam U/mg protein terlarut.

Analisis sakarifikasi. Setelah diekstrak dengan bufer Na-asetat 0,1 M pH 5,8, 2 mL ekstrak enzim dimasukkan ke dalam tabung kontrol dan sampel. Tabung sampel

ditambahkan 2 mL substrat BIS 2%, lalu diinkubasi pada *orbital shaker* 40°C selama 2 jam. Setelah itu, tabung sampel dipanaskan selama 10 menit pada air mendidih untuk inaktivasi enzim. Tabung ulir kontrol yang telah berisi enzim dipanaskan selama 5 menit untuk inaktivasi enzim, dilanjutkan dengan penambahan 2 mL substrat BIS 2%, lalu kembali dipanaskan selama 10 menit. Kontrol dan sampel disentrifugasi 2000 rpm selama 10 menit.

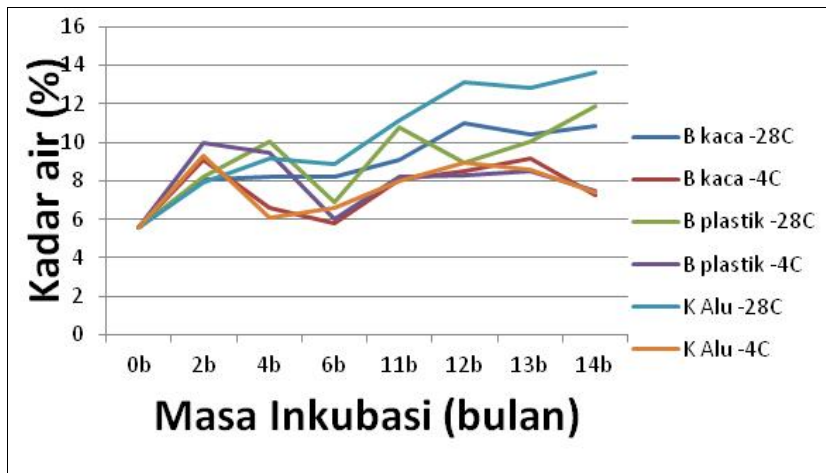
Sebanyak 0,5 mL filtrat sampel/kontrol dicampurkan dengan 0,5 mL akuades dan 1,5 mL DNS. Pada blanko, bufer asetat menggantikan sampel dan kontrol. Pemanasan dilakukan selama 10-15 menit, lalu absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kadar gula total yang tereduksi pada sampel dan kontrol dapat dihitung berdasarkan persamaan kurva standar glukosa. Analisis aktivitas sakarifikasi enzim terhadap substrat BIS ditentukan melalui rumus berikut:

$$\text{Aktivitas sakarifikasi (U/g sampel)} = \frac{(\text{Sampel} - \text{Kontrol}) \mu\text{g/mL} \times \text{faktor pengenceran} \times 2}{(\text{Mr glukosa}) \mu\text{g}/\mu\text{mol} \times (\text{waktu inkubasi}) \text{ menit}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar air

Kadar air 0 hari pada enzim kering sebelum dibagi pada masing-masing kemasan yaitu sekitar 5,59%, cukup kering sehingga memperkecil kemungkinan kontaminasi atau tumbuhnya mikroorganisme selama penyimpanan.



Gambar 1.Perubahan aktivitas relatif sakarifikasi (%) enzim imobilselama masa inkubasi pada berbagai kemasan

Selama penyimpanan 6 bulan stabilitas enzim masih terjaga dengan baik, kandungan air masih dibawah 10%, meskipun ada pola perubahan kandungan air yang tidak jelas karena adanya penurunan kandungan air. Hal ini bisa terjadi karena enzim awal sebelum dikemas yang kurang homogen.

Pada saat pengamatan stabilitas bulanan sampai pada penyimpanan bulan ke 6, contoh enzim diambil dari kemasan yang baru dan belum dibuka, sehingga kadar air masih terjaga dengan baik, akan tetapi pengamatan pada penyimpanan selanjutnya

digunakan pada kemasan yang sudah dibuka jadi kemungkinan sudah terjadi kontak dengan udara luar yang memungkinkan terjadinya peningkatan kadar air ataupun kontaminasi.

Aktifitas sakarifikasi

Analisis aktivitas sakarifikasi dilakukan untuk mengetahui kerja enzim keseluruhan dalam menghidrolisis polisakarida pada substrat BIS. Jackson (2010) melaporkan bahwa BIS memiliki kandungan β -manan sekitar 300 hingga 350 g/kg. Di dalam saluran pencernaan unggas, senyawa manan tidak terdegradasi karena kurangnya enzim endogenus pemecah manan.

Aktivitas sakarifikasi relatif stabil sampai pada penyimpanan 6 bulan, pada penyimpanan 11 sampai 14 bulan rata-rata sudah terjadi penurunan aktivitas (Tabel 1). Kantong aluminium terlihat lebih mampu mempertahankan ketahanan aktifitas sakarifikasi. Pada penerapan penggunaan enzim untuk pakan ternak, aktifitas sakarifikasi digunakan sebagai ukuran aktivitas karena nilainya mencerminkan kemampuan enzim untuk menghidrolisis bahan pakan.

Penelitian Skripsianti (1996), beberapa jenis kation yang dikandung dalam matriks dengan konsentrasi tertentu mampu mempertahankan kestabilan enzim mananase, misalnya Ca^{2+} , Cu^{2+} , dan Mn^{2+} . Polard yang digunakan kemungkinan mengandung kation yang mampu menjaga stabilitas enzim seperti polard pada penelitian Haryati et al. (2010). Matrik polard yang mengandung kation Ca^{2+} dapat membantu enzim mempertahankan stabilitasnya.

Aktivitas mananase enzim imobil pada matrik polard selama penyimpanan menunjukkan fluktuasi aktivitas, penurunan aktivitas terjadi pada penyimpanan 11 dan 12 bulan, akan tetapi aktivitas enzim naik kembali setelah penyimpanan 13 juga 14 bulan. Terjadinya fluktuasi aktivitas selama masa penyimpanan dikarenakan pengadukan kurang optimum akibat volume pembuatan enzim imobil dalam skala yang kecil sehingga ikatan enzim pada matriks tidak merata, walaupun penghancuran dan pengadukan contoh sudah dilakukan (Amid et al. 2014).

Peningkatan aktivitas setelah penyimpanan 12 bulan, hal tersebut sulit dimengerti, kemungkinan dimulai pada bulan ke 11 seiring terjadi peningkatan kadar air maka terjadi pula kontaminasi atau tumbuhnya mikroorganisme yang dapat meningkatkan aktivitas mananase.

Jenis imobilisasi pada matrik polard yaitu adsorpsi. Interaksi nonspesifik yang terjadi pada proses adsorpsi antara protein enzim dengan matriks dapat menyebabkan sisi aktif enzim berubah atau rusak sehingga aktivitas enzim lebih rendah. Namun, teknik adsorpsi mampu mencegah enzim mengalami agregasi, proteolisis, dan interaksi dengan lapisan hidrofobik sehingga aktivitas enzim tetap stabil (Datta et al. 2012).

Metode lain preservasi enzim seperti presipitasi dan kering beku dapat menjaga stabilitas enzim lebih lama. Imobilisasi enzim juga termasuk metode preservasi yang mampu mempertahankan efisiensi dan meningkatkan reproduktivitas enzim. Imobilisasi dapat diterapkan, baik pada enzim maupun pada seluruh sel mikroorganisme penghasil enzim (Datta et al. 2012).

Tabel 1. Aktivitas sakarifikasi selama 14 bulan penyimpanan

Kemasan	Suhu	Aktivitas sakarifikasi (U/g)										
		0	1	2	3	4	5	6	11	12	13	14
Awal		26,23										
Botol kaca	Kamar		25,26	22,29	20,37	17,46	16,21	26,25	17,75	12,72	19,61	13,23
	Kulkas		19,44	27,19	23,28	16,40	21,17	24,54	22,17	18,41	21,35	17,65
Botol plastik	Kamar		22,22	22,83	22,29	22,42	23,55	23,81	19,89	19,50	22,17	20,91
	Kulkas		21,82	27,11	20,64	21,17	22,16	24,67	17,37	15,09	20,90	17,45
Kantong Al	Kamar		26,79	24,83	20,11	21,10	26,72	24,21	12,72	18,14	16,37	19,39
	Kulkas		22,09	25,79	19,71	16,79	29,17	24,23	21,71	18,74	21,73	25,59

Tabel 2. Perubahan aktivitas mananase selama penyimpanan

Kemasan	Suhu	Aktivitas mananase (U/g)										
		0	1	2	3	4	5	6	11	12	13	14
Awal		22,69	25,58	23,87	12,08	12,08	19,60	8,18	9,91	37,8	30,89	25,58
Botol kaca	Kamar	19,75	25,14	23,32	12,29	12,29	26,99	17,06	28,37	29,79	37,68	25,14
	Kulkas	18,61	24,81	21,03	10,89	10,87	23,81	7,79	10,07	36,08	33,65	24,81
Botol plastik	Kamar	20,07	28,03	27,89	12,19	12,19	26,63	16,67	27,99	36,46	40,27	28,03
	Kulkas	19,25	24,90	24,11	13,13	13,13	26,13	8,27	9,58	41,65	28,29	24,90
Kantong Al	Kamar	19,25	25,90	25,87	13,43	13,43	28,43	17,28	28,68	30,49	35,26	25,90
	Kulkas	19,21	25,58	23,87	12,08	12,08	19,60	8,18	9,91	37,8	30,89	25,58

KESIMPULAN

Evaluasi kadar air, aktivitas mananase maupun aktivitas sakarifikasi selama penyimpanan sampai 6 bulan memberikan hasil yang relatif stabil meskipun sedikit fluktuatif, hal ini menunjukkan penyimpanan dalam ketiga kemasan dan pada suhu kamar maupun suhu dingin/kulkas relatif aman. Enzim imobil secara praktis aman disimpan dalam kemasan pada suhu ruang, tetapi untuk penyimpanan jangka waktu lama disarankan disimpan pada suhu refrigerator. Kemasan menggunakan kantong aluminium lebih praktis digunakan dan lebih mudah penanganannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amid M, Manap Y, Zohdi NK. 2014. Microencapsulation of purified amylase enzyme from pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel in arabic gum-chitosan using freeze drying. *Molecules*. 19:3731-3743.
- Amata IA. 2014. The use of non-conventional feed resources (NCFR) for livestock feeding in the tropics: a review. *J Glob Biosci*. 3:604-613.
- Bisswanger H. 2011. *Practical enzymology*. Weinheim (Jerman): Wiley-VCH Verlag & Co.
- Brena BM, Batista-Viera F. 2006. Immobilization of enzymes. Dalam: Guisan J, editor. *Immobilization of enzymes and cells*. New Jersey (USA): Humana Press. hlm. 15-30.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. 2012. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *Biotechnology*. 3:1-9.
- Daud M, Jarvis M. 1992. Mannan of oil palm kernel. *Phytochemical*. 31:463-464.
- D'Souza D, Bourne S, Sacranie A, Kocher A. 2007. Global feed issues affecting the Asian poultry industry. *Proceeding International Conference on Poultry in the 21st Century Avian Influenza and Beyond*. Bangkok (Thailand). p. 1-4.
- Elias H. 1984. *Macromolecules: Synthetis, materials, and technology*. New York (USA): Plenum.
- Haryati T, Marbun P, Purwadaria T. 2010. Preservasi xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan teknik imobilisasi pada pollard dan penambahan kation. *JITV*. 15:63-71.
- Jackson ME. Mannanase, alpha-galactosidase and pectinase. In: Bedford MR, Partridge GG, editors. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd ed. Wallingford, Oxfordshire (UK): CABI Publishing. p. 54-84.
- Maximilian P. 2017. Produksi mananase dengan fermentasi substrat menggunakan *Eupenicillium javanicum* BS4 pada bioreaktor baki dengan berbagai ketebalan substrat [Skripsi]. [Jakarta (Indonesia)]: Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya.
- Prasetyo R. 2010. Aplikasi bubuk enzim *Eupenicillium javanicum* BS4 dalam pakan bugkil inti sawit pada ayam petelur [Skripsi]. [Jakarta (Indonesia)]: Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya.
- Purnawan A, Yopi, Irawadi TT. 2010. Production of manooligomannan from palm kernel cake by mannanase produced from *Streptomyces cyaeus*. *Biosaintifika*. 9:73-80.
- Purwadaria T, Haryati T, Frederick E, Tangendjaja B. 2003. Optimization of β -mannanase production on submerged culture of *Eupenicillium javanicum* as well as pH and temperature enzyme characterizations. *JITV*. 8:46-54.

- Radva D, Spanyol J, Kosáry J. 2011. Testing of the effect of reaction parameters on the enzyme immobilization by adsorption and cross-linking processes with kinetic desorption method. *Food Technol Biotechnol.* 49:257-262.
- Rashid SA, Ibrahim D, Omar IC. 2012. Mannanase production by *Aspergillus niger* USM F4 via solid substrate fermentation in a shallow tray using palm kernel cake as a substrate. *Mal J Microbiol.* 8:273-279.