

OPTIMASI AMOBILISASI PEKTINASE DARI *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN Ca-ALGINAT-KITOSAN

Chandra Ayu Siswanti, Anna Roosdiana* dan 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 bebas tidak dapat digunakan lebih dari satu kali pemakaian, sehingga perlu dilakukan teknik amobilisasi agar dapat digunakan secara berulang. Penelitian ini mempelajari tentang kondisi optimum proses amobilisasi pektinase pada matriks Ca-alginat-kitosan. Pektinase diisolasi dari *Bacillus subtilis* dengan metode pemurnian bertingkat menggunakan amonium sulfat fraksi 20–60% dan dilanjutkan dengan dialisis. Mikroenkapsulasi Ca-alginat-kitosan dibuat dengan mencampurkan pektinase pada variasi 0,943; 1,886; 2,83; 3,774; 4,717 mg/mL dengan Na-alginat pada variasi 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5% (w/v) dan meneteskannya pada larutan CaCl₂ 0,15 M. Manik Ca-alginat selanjutnya disuspensikan pada kitosan 1,5% dan ditetaskan pada larutan Na₅P₃O₁₀ 3%, sehingga terbentuk hibrid mikrokapsul Ca-alginat-kitosan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi optimum Na-alginat 3% (w/v) dan konsentrasi pektinase optimum 2,83 mg/mL dapat menjebak pektinase sebanyak 2,83 mg/gram Ca-alginat-kitosan dengan aktivitas sebesar 193,3 unit.

Kata kunci: aktivitas, *Bacillus subtilis*, Ca-alginat-kitosan, pektinase

ABSTRACT

Free pectinase is unable to be reused, therefore pectinase is needed to immobilize in certain matrix. This research studies about optimum conditions of pectinase immobilization in Ca-alginate-chitosan. Pectinase was isolated from *Bacillus subtilis* with fractional purification method using ammonium sulphate saturation of 20–60%, followed by dialysis. Microencapsulation Ca-alginate-chitosan was made by mixing pectinase in various concentration 0.943; 1.886; 2.83; 3.774; 4.717 mg/mL with Na-alginate solution 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5% (w/v) and dropped in 0.15 M CaCl₂ solution. Pectinase-Ca-alginate were suspended in 1.5% chitosan solution prior to dropwise in 3% Na₅P₃O₁₀ solution. The results showed that the condition optimum of pectinase immobilization in Ca-alginate-chitosan achieved at 3% (w/v) Na-alginate solution and 2.83 mg/mL pectinase concentration yielding in 2.83 mg of entrapped protein/gram Ca-alginate-chitosan within the activity of 193.3 units.

Keywords: activity, *Bacillus subtilis*, Ca-alginate-chitosan, pectinase

PENDAHULUAN

Pektinase merupakan enzim yang berfungsi mengkatalisis proses degradasi pektin melalui proses depolimerisasi (hidrolase dan liase) serta proses reaksi deesterifikasi (esterase) [1]. Pektinase dapat diisolasi dari *Aspergillus niger* [2], bakteri pektinolitik [3] serta berbagai macam mikroorganisme [1]. Pektinase jenis ekso poligalakturonase dihasilkan oleh *Bacillus sp.* [4].

Teknik amobilisasi enzim diperlukan agar enzim dapat digunakan beberapa kali. Amobilisasi galakturonase, salah satu macam enzim pektinase hasil isolasi dari *Aspergillus niger* [2] maupun dari *Aspergillus aculeatus* [5] telah berhasil dilakukan dengan menggunakan matriks yang berbeda-beda. Pektinase amobil tersebut memiliki stabilitas dan aktivitas enzim yang tinggi [2,5].

Matriks Ca-alginat-kitosan merupakan suatu metode mikroenkapsulasi yang bertujuan untuk meminimalisir proses difusi enzim dari manik Ca-alginat. Mikroenkapsulasi dalam manik Ca-alginat telah diaplikasikan untuk sel [6] ataupun untuk selulase [7]. Manik Ca-alginat dapat dilapisi kembali dengan larutan kitosan yang kemudian diikat silang dengan Natrium tripolifosfat [8]. Keefektifan metode amobilisasi dipengaruhi oleh kerapatan pori-pori gel yang meliputi konsentrasi larutan Na-alginat maupun kitosan [7]. Semakin tinggi konsentrasi Na-alginat maka porositas gel semakin rendah sehingga enzim sulit terlepas dari gel [9]. Konsentrasi enzim juga mempengaruhi aktivitas dari pektinase yang teramobil pada matriks Pectinex Ultra SP-L. Aktivitas pektinase amobil dipengaruhi oleh halangan sterik sehingga konsentrasi pektinase tertentu akan memberikan ruang yang cukup bagi substrat untuk berinteraksi dengan pektinase dan menghasilkan produk dalam jumlah yang banyak [5].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan yang meliputi konsentrasi larutan Na-alginat optimum dan konsentrasi enzim optimum.

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti *bacto* agar, pektin, pepton (Oxoid), *yeast extract* (Difco) dan kasein. Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain, Na₂HPO₄, Asam sitrat, KH₂PO₄, HCl (37% (w/w), $\rho = 1,19 \text{ g/cm}^3$), CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, BaCl₂, Glukosa, Asam Dinitrosalisilat, NaOH, Kristalin fenol, Natrium sulfit, CuSO₄, Natrium Tripolifosfat, Asam Asetat glasial ($\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$) (Merck); Na-alginat (Sigma Aldrich); dan kitosan.

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 (Mammert W 200), oven, autoklav (LS-C35L),

shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), *sentrifuse* dingin (Denley), kapas steril, *Spectronic-20* (Bausch & Lomb), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 160A *double beam*), lemari pendingin, kantong selofan, aluminium foil, kertas saring *Whatman* no. 40, *syringe*.

Prosedur preparasi pektinase

Inokulum yang mengandung *Bacillus subtilis* ditumbuhkan dalam 250 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar dengan kecepatan putar 125 rpm sampai awal fasa stasioner (24 jam). Media hasil fermentasi ditambah 12,5 mL buffer sitrat fosfat pH 7, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan putar 3000 rpm pada temperatur 4 °C selama 20 menit. Supernatan merupakan ekstrak kasar pektinase. Ekstrak kasar dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat 20–60% dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan.

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein 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 dapat diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu $y=0,00004x$. Kurva baku dibuat dengan mengukur absorbansi kasein pada konsentrasi 1000–9000 ppm.

Penentuan aktivitas pektinase

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer fosfat sitrat pH 7, 1 mL enzim pektinase dan 1 mL akuades. Campuran diinkubasi pada 35 °C selama 50 menit, selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS. Larutan uji selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan hingga temperatur kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi dikonversikan pada persamaan kurva standar ($y=0,0042x$) sehingga dapat diketahui besarnya konsentrasi gula pereduksi hasil hidrolisis pektin yang dikatalis dengan pektinase. Kurva baku dibuat dari pengukuran absorbansi larutan glukosa dengan konsentrasi 20–100 ppm.

Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas amobil diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menit per gram enzim amobil.

Amobilisasi pektinase dengan Ca-alginat-kitosan

Penentuan konsentrasi optimum larutan Na-Alginat pektinase amobil

Amobilisasi pektinase dengan Ca-alginat-kitosan dibuat dengan cara mencampurkan larutan Na-alginat berbagai konsentrasi 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5% (w/v) sebanyak 4 mL dengan larutan enzim pektinase sebanyak 1 mL dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Campuran enzim pektinase dan larutan Na-alginat diteteskan pada 7,5 mL larutan CaCl₂ sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Manik – manik dibiarkan terendam dalam larutan CaCl₂ 0,15 M selama satu jam, kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 40 sehingga diperoleh pektinase amobil. Manik – manik disuspensikan ke dalam larutan kitosan 1,5%, selanjutnya diteteskan ke dalam larutan Natrium tripolifosfat 3% dan dibiarkan selama 90 menit, kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 40. Pektinase amobil diukur aktivitasnya, sedangkan filtrat larutan CaCl₂ dan Natrium tripolifosfat diukur kadar protein yang tidak terjebak .

Penentuan konsentrasi enzim optimum pektinase amobil

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi larutan Na-alginat. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang dipipet yaitu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL sehingga konsentrasi enzim menjadi bervariasi dengan dilakukan penambahan buffer sitrat fosfat pH 7 yang bervariasi hingga volume total enzim menjadi 1 mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

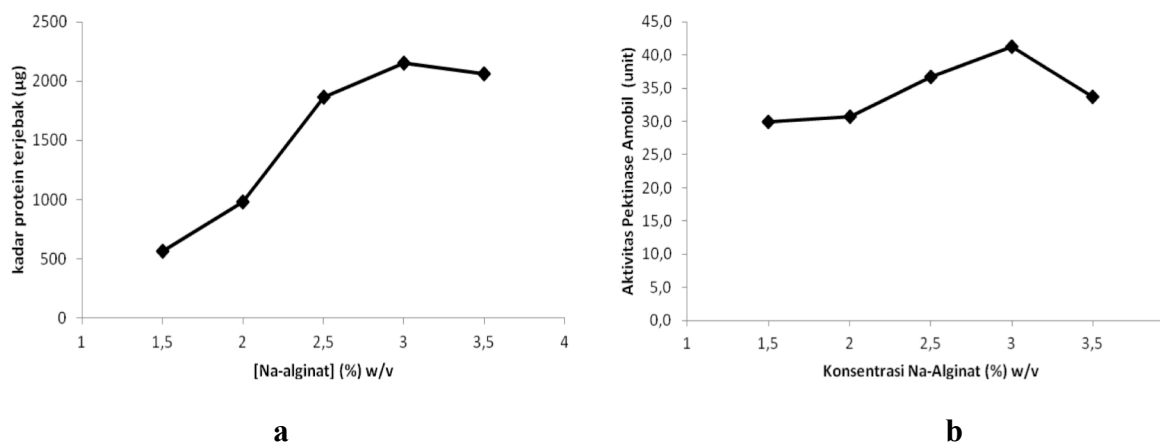
Penentuan konsentrasi Na-alginat optimum

Pektinase hasil isolasi dari *Bacillus subtilis* dimurnikan dengan metode pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–60% dan menghasilkan kadar protein 4,717 mg/mL. Aktivitas pektinase bebas didapatkan sebesar 109,8 unit.

Mikroenkapsulasi Ca-alginat-kitosan dibuat dari larutan campuran Na-alginat dan enzim yang diteteskan pada larutan CaCl₂, sehingga 2 ion Na⁺ pada alginat akan digantikan dengan 1 ion Ca²⁺ dan terbentuk manik Ca-alginat yang menjebak pektinase. Manik Ca-alginat kemudian disuspensikan dalam larutan kitosan, sehingga menjadi terselubungi secara seragam oleh kitosan. Manik tersebut selanjutnya diteteskan pada larutan Natrium tripolifosfat agar terbentuk ikatan silang antara kitosan dengan Natrium tripolifosfat yang merupakan sistem bilayer pada manik Ca-alginat. Larutan Natrium tripolifosfat bertindak

sebagai mediator ikatan antara alginat dan kitosan dengan cara mengkhelat ion kalsium pada manik Ca-alginat dan melunakkan inti alginat [8].

Semakin meningkatnya konsentrasi larutan Na-alginat yang digunakan, cenderung akan meningkatkan jumlah protein (pektinase) yang terjebak dalam manik Ca-alginat-kitosan (Gambar 1 (a)). Pada larutan Na-alginat 3% dapat menjebak pektinase lebih banyak dibandingkan konsentrasi yang lain. Aktivitas pektinase amobil dalam Ca-alginat-kitosan meningkat hingga konsentrasi larutan Na-alginat 3% (Gambar 1 (b)). Semakin banyak enzim yang terjebak maka proses degradasi pektin juga semakin meningkat.

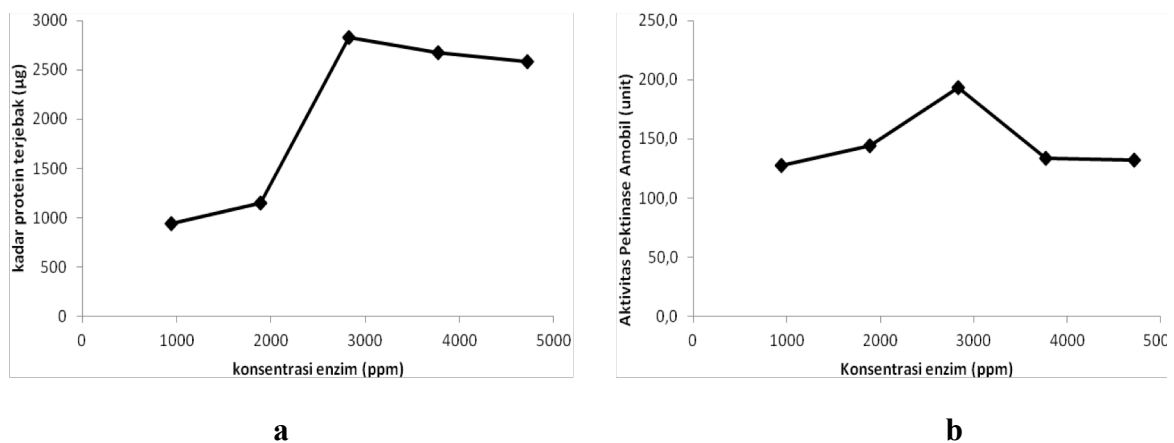


Gambar 1. (a) Pengaruh konsentrasi Na-alginat terhadap jumlah pektinase yang terjebak tiap 0,5 gram manik Ca-alginat-Kitosan (b) Pengaruh konsentrasi Na-alginat terhadap aktivitas pektinase amobil pada manik Ca-alginat-Kitosan

Pada saat pektinase diamobilkan dalam manik Ca-alginat, ada sebagian pektinase yang tidak terjebak dalam manik. Semakin besar konsentrasi Na-alginat maka pori yang terbentuk semakin rapat. Kerapatan pori yang semakin tinggi akan menyebabkan pektinase yang terjebak menjadi semakin tertahan pada manik Ca-alginat. Bukan hanya pektinase yang sulit berdifusi tetapi dimungkinkan pula pektin dengan ukuran molekul yang besar juga akan sulit melewati manik Ca-alginat sehingga pektin hanya sedikit yang dapat didegradasi oleh pektinase dalam manik Ca-alginat-kitosan. Hal ini terlihat pada Gambar 1 (a) dan (b), konsentrasi Na-alginat di atas 3% aktivitasnya menurun dikarenakan pori yang terbentuk semakin rapat, sehingga proses difusi substrat melewati manik Ca-alginat menjadi terhambat. Konsentrasi Na-alginat optimum didapatkan pada konsentrasi Na-alginat 3% dengan jumlah protein terjebak sebesar 2,152 mg/gram Ca-alginat-kitosan dan aktivitas sebesar 41,3 unit.

Penentuan konsentrasi enzim optimum

Amobilisasi dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, semakin tinggi konsentrasi enzim maka enzim yang terjebak akan semakin meningkat. Konsentrasi enzim dari 0,943 mg/mL hingga konsentrasi 2,83 mg/mL mengalami peningkatan secara signifikan pada jumlah enzim yang terjebak (Gambar 2 (a)). Pada konsentrasi 2,83 mg/mL hingga 4,717 mg/mL mengalami penurunan banyaknya pektinase yang terjebak, tetapi dalam jumlah yang sedikit. Konsentrasi enzim optimum yang dapat menjebak pektinase paling banyak adalah konsentrasi 2,83 mg/mL. Aktivitas pektinase amobil meningkat hingga konsentrasi enzim 2,83 mg/mL (Gambar 2 (b)). Konsentrasi enzim yang semakin meningkat menyebabkan reaksi degradasi pektin (aktivitas pektinase) semakin meningkat pula. Konsentrasi enzim yang paling optimum pada manik Ca-alginat-kitosan yaitu 2,83 mg/mL dengan jumlah protein terjebak sebesar 2,83 mg/gram Ca-alginat-kitosan dengan aktivitas sebesar 193,3 unit.



Gambar 2. (a) Pengaruh konsentrasi enzim terhadap jumlah pektinase yang terjebak tiap 0,5 gram manik Ca-alginat-kitosan (b) Pengaruh konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil pada manik Ca-alginat-kitosan

KESIMPULAN

Konsentrasi larutan Na-alginat dan konsentrasi enzim berpengaruh terhadap jumlah pektinase yang terjebak dan aktivitas enzim pektinase. Kondisi optimum amobilisasi pektinase didapat pada konsentrasi larutan Na-alginat 3% dan konsentrasi enzim 2,83 mg/mL dengan jumlah protein terjebak yaitu 2,83 mg/gram Ca-alginat-kitosan dan aktivitas sebesar 193,3 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pedrolli D. B., Monteiro 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. Buga M. L., Ibrahim S. dan Nok A. J., 2010, Physico-Chemical Characteristics of Immobilized Polygalacturonase From *Aspergillus niger* (SA6), *Afr. J. Biotechnol.*, 9, pp. 8934–8943.
3. Suneetha V. dan Khan Z. A., 2010, Screening, Characterisation and Optimization of Microbial Pectinase, *Soil Enzymology, Soil Biology-22*, G. Shukla and A.Varma (eds) Springer-Verlag BerlinHeidelberg 2011, pp. 3–337.
4. Mukeshkumar D. J., Saranya G. M., Suresh K., Andal P. D., Rajakumar R. dan Kalaichelvan P. T., 2012, Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste, *Asian J. Plant Sci. Res.*, 2, pp. 369–375.
5. Demir N., Acar J., Sarđoglu K. dan Mutlu M., 2001, The Use of Commercial Pectinase in Fruit Juice Industry. Part 3: Immobilized Pectinase for Mash Treatment, *J. Food Eng.*, 47, pp. 275–280.
6. Prasetyani D. F., 2007, *Pengaruh Lactobacillus bulgaris dalam Ca-Alginat-Kitosan*, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.
7. Trisna N. H., 2007, *Pengaruh Konsentrasi Kitosan dalam Amobilisasi Selulase Trichoderma viride Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan terhadap Aktivitas Selulase*, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.
8. Taqqiedin E., Carolin L. dan Mansoor A., 2002, Perm-Selective Chitosan Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology, *Off. J. ISPE*, 22, pp. 1–3.
9. Resminingsih E., 2005, *Amobilisasi Lipase Bacillus subtilis dalam Ca-alginat*, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.