

OPTIMASI AMOBILISASI UREASE DARI *Schizosaccharomyces pombe* MENGUNAKAN MATRIK Ca-ALGINAT

Laras Dwi Maharani, Sasangka Prasetyawan^{*}, Chanif Mahdi

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: sasangka@ub.ac.id

ABSTRAK

Imobilisasi urease perlu dilakukan agar dapat dipakai secara berulang. Enzim ini menghidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida. Urease yang digunakan, diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* dan dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 30-45% dilanjutkan dengan dialisis. Urease diamobilisasi menggunakan metode penjebakan dalam matriks Ca-alginat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi Na-alginat optimum dan konsentrasi enzim optimum. Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi Na-alginat (1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5) % (w/v) dan variasi konsentrasi urease (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg/mL. Kadar protein enzim ditentukan dengan reagen Biuret dan aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah mikromol ammonia yang dihasilkan per menit dimana kadar ammonia ditentukan dengan metode Nessler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi urease dicapai pada konsentrasi Na-alginat 3% dan konsentrasi urease 2,52 mg/mL dapat menjebak urease sebanyak 2,52 mg/gram manik Ca-alginat dan aktivitas sebesar 0,55 Unit.

Kata kunci: aktivitas, Ca-alginat, *Schizosaccharomyces pombe*, urease.

ABSTRACT

Urease immobilization is required to be used in repetition The enzyme hydrolize urea to be ammonia and carbondioxide. Urease was isolated from *Schizosaccharomyces pombe* and was purified through precipitation by using ammonium sulphate at 30-45% saturation level, followed by dialysis. Urease was immobilized by entrapment method in a matrix of Ca-alginate. The study aimed to determine optimum concentration of Na-alginate and enzym concentration. In this research, Na-alginate concentration (1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5) % (w/v) and variation of urease concentration (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg/mL. Protein content was determined by Biuret reagen and enzyme activity was determined as the amount of mikromol amonia per minute, and resulted amonia was analyzed by Nessler method. The results showed that the optimum condition of immobilization urease is achieved on 3% Na-alginate solution and 2,52 mg/ml urease yielding in 2,52 mg of entrapped enzyme/gram Ca-alginate and the activity of 0,55 Units.

Key words: activity, Ca-alginate, *Schizosaccharomyces pombe*, urease.

PENDAHULUAN

Enzim berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia yang bersifat efisien karena dapat menurunkan energi aktivasi dari reaksi kimia [1]. Urease merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis urea untuk membentuk ammonia dan karbondioksida dan dapat ditemukan pada bakteri, jamur dan tanaman yang berperan penting dalam sirkulasi nitrogen di alam [2]. Salah satunya urease dapat diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* [3]. Urease

amobil mempunyai aplikasi pada biomedis, analisa klinis dan untuk mendeteksi urea dalam sampel [3,4].

Enzim dalam keadaan bebas hanya dapat digunakan satu kali reaksi. Teknik amobilisasi bertujuan untuk meningkatkan stabilitas dan produktivitas enzim tersebut sehingga dapat digunakan kembali [5]. Amobilisasi urease hasil isolasi dari *jack bean* telah berhasil dilakukan dengan menggunakan matriks yang berbeda-beda. Urease amobil memiliki stabilitas yang tinggi dan dapat digunakan berulang serta dapat mempertahankan aktivitasnya [4].

Metode amobilisasi urease dapat menggunakan metode penjebakan dengan matriks berupa Ca- alginat. Kelebihan metode penjebakan yaitu struktur enzim pada sisi aktifnya tidak mengalami perubahan [6]. Keuntungan amobilisasi menggunakan Ca-alginat yaitu dapat membentuk gel yang kokoh, tidak beracun, murah serta metode yang dapat digunakan untuk amobilisasi sel [7]. Keefektifan metode amobilisasi dipengaruhi oleh kerapatan pori dari Na-alginat. Dengan semakin tinggi konsentrasi dari Na-alginat maka porositas gel akan semakin rendah sehingga enzim semakin tertahan di dalam gel [8]. Tingkat porositas dari metode amobilisasi enzim juga dipengaruhi oleh ion logam perangkap dan konsentrasi enzim itu sendiri.

Pada penelitian ini akan dipelajari lebih lanjut mengenai kondisi optimum amobilisasi enzim urease menggunakan matrik Ca-alginat yang meliputi pengaruh konsentrasi alginat dan konsentrasi urease.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni ragi/yeast/yeast *Schizosaccharomyces pombe* yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology* antara lain CH_3COOH , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HCl (37 % w/w); $\rho = 1,19 \text{ g/cm}^3$, BaCl_2 , NaCl , NaOH , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, EDTA , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, CCL_3COOH , reagen Nessler, Na-alginat, CaCl_2 , urea, agar, kentang, dekstroza, pepton, *yeast extract*, dan kasein.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer berukuran 250 mL, pipet ukur (1 mL dan 10 mL), pengaduk gelas, tabung reaksi, beaker gelas (50 mL, 100

mL, 250 mL, dan 500 mL), labu ukur (25 mL, 50 mL dan 100 mL), neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), pH meter (schott-gerate tipe CG-820), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetik stirrer*, spektronik 20 (Genesys), kuvet, oven (Memmert), autoklaf (Tipe LS-C35L), pemanas listrik (Jankle-Kunkel), *shaker* (Edmund Buhler SM 2524B), motor rotary (Ikamag RH), *sentrifuse* dingin (Denley), kertas saring halus, alumunium foil, kapas steril, kantong selofan, bunsen, dan pH universal.

Prosedur

Preparasi urease

Inokulum yang mengandung *Schizzosaccharomyces pombe* dimasukkan ke dalam 150 mL media cair, diinkubasi dengan shaker dengan kecepatan putar 150 rpm pada temperatur ruang sampai akhir fase logaritmik (48 jam). Selanjutnya ditambah 15 mL buffer asetat 0,2 M pH 5,5 dan disentrifugasi dingin selama 15 menit dengan kecepatan putar 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar urease. Ekstak kasar urease dimurnikan dengan menggunakan metode pengendapan amonium sulfat 30-45% kemudian dilanjutkan dialisis menggunakan kantong selofan. Urease hasil pemurnian diuji kadar protein dan aktivitasnya.

Uji kadar protein

Larutan enzim sebanyak 2 mL ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm. Kemudian campuran dikocok dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 30 menit. Selanjutnya absorbansi larutan campuran diukur pada panjang gelombang maksimum kasein (540 nm). Kadar protein diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi linear kurva baku kasein yaitu $y=0,00004x$. Kurva baku kasein dibuat dari hasil pengukuran absorbansi kasein pada konsentrasi 1000-9000 ppm.

Penentuan aktivitas urease

Penentuan aktivitas urease dengan cara mereaksikan larutan urea 0,2 M sebanyak 5 mL, 1 mL enzim, 1 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7 di dalam tabung reaksi lalu diinkubasi pada temperatur 45 °C selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan trikloroasetat (TCA) 8% sebanyak 10 mL lalu disentrifugasi selama 15 menit. Dipipet supernatan sebanyak 10 mL dan diencerkan dalam labu ukur 25 mL. Larutan dipipet 10 mL dan ditambah 0,2 mL reagen Nessler lalu dikocok hingga homogen. Absorbansinya diukur menggunakan spektronik Genesys 20 pada panjang gelombang ammonia (400 nm) dan diplotkan pada persamaan

regresi kurva baku amonia ($y=0,1569x$). Kurva baku amonia dibuat dengan cara mengukur absorbansi larutan amonia pada konsentrasi 1-4 ppm.

Satu unit aktivitas enzim (U) diartikan sebagai 1 μ mol amonia yang dihasilkan dari hidrolisis urea oleh per mL enzim selama satu menit, sedangkan untuk aktivitas urease amobil diartikan sebagai 1 μ mol amonia yang dihasilkan dari hidrolisis urea oleh per gram enzim selama satu menit.

Amobilisasi urease dengan Ca-alginat

Penentuan konsentrasi Na-alginat optimum saat amobilisasi

Amobilisasi urease dengan Ca-alginat dengan mencampurkan 4 mL larutan Na-alginat dengan variasi konsentrasi 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 % (w/v) dengan 1 mL larutan enzim urease dan diaduk dengan magnetik stirer. Campuran enzim urease dan larutan Na-alginat diteteskan pada 7,5 mL larutan CaCl_2 0,15 M sambil diaduk dengan *magnetik stirer*. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama 1 jam lalu disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no 40. Urease amobil diukur aktivitasnya sedangkan filtratnya dikur kadar protein sisanya.

Penentuan konsentrasi enzim optimum saat amobilisasi

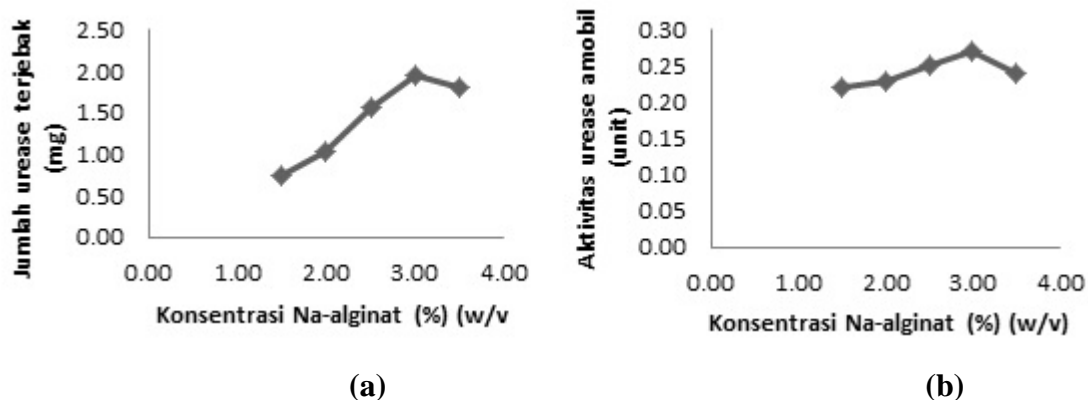
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi Na-alginat. Perbedaannya terletak pada variasi jumlah enzim hasil pemurnian yang dipipet yaitu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1) mL sehingga konsentrasi enzim menjadi bervariasi dimana dilakukan penambahan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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi Na-alginat optimum amobilisasi urease

Urease yang digunakan diperoleh dari hasil isolasi *Schizosaccharomyces pombe* dengan menggunakan pengendapan bertingkat amonium sulfat fraksi 30-45%. Diperoleh kadar protein awal sebesar 4,200 mg/mL dan aktivitas urease bebas sebesar 0,37 Unit. Amobilisasi dilakukan dengan pencampuran larutan Na-alginat dengan enzim yang kemudian diteteskan ke dalam larutan CaCl_2 sehingga membentuk manik Ca-alginat yang di dalamnya akan terjebak enzim. Pori pada manik alginat terbentuk dari reaksi silang antara gugus karboksil dari asam guluronat pada alginat dengan dengan CaCl_2 .

Metode amobilisasi menggunakan Ca-alginat dipengaruhi oleh kerapatan pori dari gel alginat. Dimana semakin besar konsentrasi larutan Na-alginat maka ikatan silang yang terbentuk juga semakin banyak sehingga pori yang dihasilkan juga semakin rapat. Kerapatan pori ini dapat mencegah urease yang sudah terjebak untuk terlepas kembali sehingga meningkatkan jumlah enzim yang terjebak dalam manik Ca-alginat (Gambar 1 (a)). Pada konsentrasi Na-alginat 3% dapat menjebak urease dengan jumlah lebih banyak di bandingkan pada konsentrasi larutan Na-alginat yang lain. Nilai aktivitas urease amobil dalam Ca-alginat meningkat sampai konsentrasi larutan Na-alginat 3% dan pada konsentrasi Na-alginat 3,5% aktivitasnya menurun (Gambar 1 (b)). Ini dikarenakan pori yang terbentuk semakin rapat sehingga proses difusi substrat melewati Ca-alginat menjadi terhambat sehingga produk yang semakin sulit terbentuk menyebabkan aktivitasnya menurun. Konsentrasi Na-alginat optimum diperoleh pada konsentrasi Na-alginat 3% dengan jumlah enzim terjebak sebesar 1,960 mg/gram manik Ca-alginat dan aktivitas sebesar 0,27 Unit.

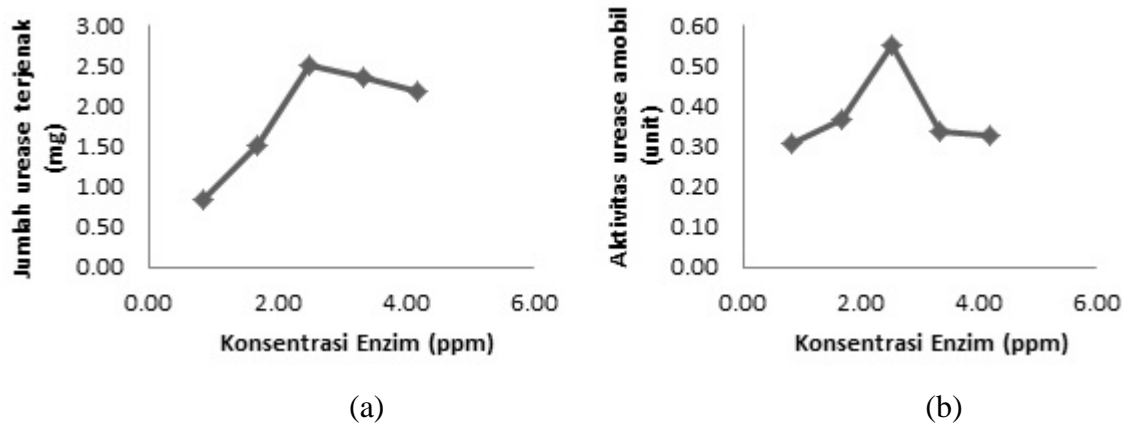


Gambar 1. (a) Kurva hubungan antara konsentrasi Na-alginat terhadap jumlah urease terjebak pada manik Ca alginat (b) Kurva hubungan antara konsentrasi Na-alginat terhadap aktivitas urease amobil pada manik Ca-alginat.

Penentuan konsentrasi enzim optimum amobilisasi urease

Konsentrasi enzim dapat berpengaruh terhadap amobilisasi, karena semakin tinggi konsentrasi enzim maka dapat meningkatkan jumlah enzim yang terjebak. Jumlah enzim urease yang terjebak mengalami peningkatan yang signifikan pada konsentrasi enzim dari 0,840 mg/mL sampai konsentrasi 2,520 mg/mL. Pada konsentrasi 2,520 mg/mL sampai konsentrasi 4,200 mg/mL jumlah urease yang terjebak mengalami penurunan, tetapi tidak begitu berbeda (Gambar 2 (a)). Konsentrasi enzim amobil optimum terjadi pada konsentrasi 2,520 mg/mL dengan jumlah enzim urease yang terjebak yaitu sebanyak 2,520 mg/gram

manik Ca-alginat. Konsentrasi enzim yang semakin meningkat menyebabkan aktivitas urease semakin meningkat pula. Dari variasi konsentrasi urease 0,840 sampai 2,520 mg/mL terjadi peningkatan aktivitas urease amobil (Gambar 2 (b)). Konsentrasi urease optimum berada pada saat aktivitas urease amobil yang dihasilkan optimum. Pada variasi konsentrasi enzim urease optimum, kondisi optimum berada pada konsentrasi urease 2,520 mg/mL dengan jumlah urease yang terjebak sebesar 2,520 mg/gram manik Ca-alginat dan aktivitas sebesar 0,55 Unit.



Gambar 2. (a) Kurva hubungan antara konsentrasi urease terhadap jumlah urease terjebak pada manik Ca-alginat (b) Kurva hubungan antara konsentrasi urease terhadap aktivitas urease amobil pada manik Ca-alginat.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa konsentrasi Na-alginat dan konsentrasi enzim dapat mempengaruhi jumlah urease yang terjebak dan aktivitas urease. Kondisi optimum amobilisasi urease menggunakan Ca-alginat diperoleh pada konsentrasi larutan Na-alginat 3% dan konsentrasi urease 2,520 mg/mL yang menghasilkan jumlah urease terjebak sebanyak 2,520 mg/gram Ca-alginat dan aktivitasnya sebesar 0,55 Unit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada bapak Dr. Sasangka Prasetyawan, MS dan Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing I dan II, orang tua, teman-teman serta semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Poedjadi A., dan Supriyanti F. M. T., 2006, *Dasar-Dasar Biokimia*, Jakarta, UI-Press.

2. Panpae K., Wiyok N. dan Kanthiwivorn N., 2012, Development of Urease Immobilization Using Poly(acrylonitrile)/Chitosan Composite Materials, *J. Chem. Chem. Eng.*, 6, pp. 726-731.
3. Mulyasuryani A., Roosdiana A. dan Srihardyastutie A., 2010, The Potentiometric Urea Biosensors Using Chitosan Membrane, *Indo. J. Chem*, 10(2), pp. 162-166.
4. Selvamurugan C., Lavanya A. dan Sivasankar B., 2007, A Comparative Study on Immobilization of Urease on Different Matrices, *Journal of scientific & Industrial Research*, 66, pp. 655-659.
5. Cao L., 2005, *Carrier-Bound Immobilization Enzymes*, Jerman, Weinherm: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
6. Gülay S., 2009, *Immobilization of Thermophilic Recombinant Esterase Enzyme by Entrapment in Coated Ca-Alginate Beads*, Thesis, Izmir Institute of Technology, Izmir.
7. Anwar A., Qader S. A. U., Raiz A., Iqbal S. dan Azhar A., 2009, Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS, *World Applied Science Journal*, 7, pp. 1281-1286.
8. Resminingsih E., 2005, *Amobilisasi Lipase Bacillus subtilis dalam Ca-alginat*, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.