

AMOBILISASI PEKTINASE DARI *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN MATRIKS PASIR LAUT YANG DIAKTIVASI NaOH

Fadillah Mufida, 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 hasil isolasi dari *Bacillus subtilis* mempunyai sifat termofilik. Pektinase perlu diamobilisasi agar dapat digunakan secara berulang. Amobilisasi pektinase dilakukan dengan metode adsorpsi fisik pada matriks pasir laut yang diaktivasi NaOH 0,0720 M. Pada penelitian ini ditentukan lama pengocokan dan konsentrasi pektinase optimum amobilisasi pektinase. Lama pengocokan yang digunakan berkisar antara 1, 2, 3, 4 dan 5 jam dan konsentrasi enzim sebesar 0,943; 1,887; 2,830; 3,774 dan 4,717 mg/mL. Kadar protein diuji dengan metode Biuret dan aktivitas enzim ditentukan dari banyaknya asam galakturonat yang dihasilkan dari hidrolisis pektin oleh pektinase per menit. Kadar protein pektinase bebas diperoleh sebesar 4,717 mg/mL dengan aktivitas 109,8 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum pektinase amobil pada pasir dicapai pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dengan aktivitas 1007,7 unit dan jumlah enzim teradsorpsi pada pasir sebesar 111,6 mg/g pasir.

Kata kunci: aktivitas, amobilisasi, *Bacillus subtilis*, pasir laut, pektinase.

ABSTRACT

Pectinase is isolated from *Bacillus subtilis*, that is included in thermophilic enzyme. Pectinase immobilization is carried out to be repeatable usage of enzyme. Pectinase was immobilized by physical adsorption method using a matrix of sea sand, which is activated by 0.0720 M NaOH solution. This research determined the optimum shaking time and enzyme concentration. Shaking time used in the range from 1, 2, 3, 4 and 5 hour and the concentration of enzyme 0.943; 1.887; 2.830; 3.774 and 4.717 mg/mL. Protein content was determined by Biuret method and enzyme activity was determined by calculating galactouronic acid that resulted from hydrolyzed pectin by pectinase per minute. Initial protein content of free enzyme was 4.717 mg/mL and the activity was 109.8 units. The results showed that the optimum conditions for pectinase immobilization obtained on a shaking time of 3 hours and concentration of pectinase 3.774 mg/mL with 1007.7 units of immobilized pectinase activity and the amount of enzyme adsorbed on the sand at 111.6 mg/g.

Keywords: activity, immobilized, *Bacillus subtilis*, sea sand, pectinase

PENDAHULUAN

Enzim berfungsi sebagai katalis biologis yang dapat mengendalikan berbagai reaksi biokimia yang terdapat di dalam jaringan hidup [1]. Pektinase dapat mengkatalisis proses degradasi senyawa pektin melalui reaksi de-polimerisasi dan de-esterifikasi [2]. Beberapa jenis mikroorganisme yang mampu menghasilkan pektinase yaitu *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* dan *Botrytis cinerea* [3]. Pektinase juga dapat dihasilkan dari *Bacillus subtilis* [4]. Sifat pektinase bebas adalah tidak stabil dan sulit untuk digunakan secara

berulang, sedangkan sifat pektinase yang teramobil adalah meningkatkan stabilitas enzim serta enzim dapat digunakan secara berulang dan berkesinambungan [5].

Teknik amobilisasi enzim yang sering digunakan adalah metode adsorpsi fisik, karena enzim tidak mengalami perubahan konformasi atau destruksi pada pusat aktif enzim [6]. Amobilisasi enzim dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi enzim. Pada lama pengocokan dan konsentrasi enzim optimum, maka akan dihasilkan jumlah enzim yang teradsorpsi dan aktivitas enzim amobil yang maksimum [7].

Pasir laut dapat digunakan sebagai matriks karena memiliki kandungan silika yang dapat berfungsi sebagai adsorben. Pasir laut merupakan pasir yang memiliki kandungan silika > 50% [8]. Zat ini memiliki ruang pengunci (*interlocking cavities*) yang memberikan media dengan luas permukaan yang besar. Struktur inilah yang memberikan kemampuan silika sebagai media pengadsorb [9]. Pengaktifan dapat dilakukan melalui proses fisika dan kimia yaitu aktivasi pemanasan dan aktivasi dengan zat kimia. Pengaktifan dengan cara pemanasan pada adsorben dapat menguapkan molekul-molekul air sehingga bersifat mudah menyerap. Aktivasi penggunaan zat kimia dapat dilakukan dengan penambahan larutan asam maupun basa [10].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh lama pengocokan dan konsentrasi enzim terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dalam pasir laut yang telah diaktivasi NaOH dan aktivitas enzim amobil .

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni bakteri *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan pasir laut yang diperoleh dari pantai Tanjung Aan Lombok.

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas *for microbiology* antara lain, pektin (Merck), *bacto* agar (Merck), pepton (Oxoid), *yeast extract* (Difco), kasein (Merck) dan mempunyai derajat kemurnian pro analisis yang didapat dari produsen Merck antara lain, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, kristalin fenol, sodium sulfit, asam dinitrosalisilat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, glukosa anhidrat, padatan BaCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , padatan NaOH, asam sitrat, HCl (37% w/w; bj 1,19 g/mL) dan akuades.

Alat yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, inkubator (Heracus tipe B 50 Memmert), *autoclave* (Tipe LS-C35L), jarum ose, mortar, cawan porselen, sentrifuse dingin (Denley), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), oven (Mettler), neraca analitik (Mettler Todelo AL 204), lemari pendingin, *spectronic 20* (Bausch dan Lomb), kuvet, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 160A *double beam*), kantong selofan, ayakan 120 dan 150 mesh, kertas *Whatman* no. 40, aluminium foil, kapas steril, pH universal, tanur (Nabertherm), corong vakum buchner dan penangas listrik (Janke-Kunkel).

Prosedur preparasi pektinase

Pektinase diisolasi dari *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan diinkubasi pada temperatur kamar sampai fasa awal stasioner (24 jam) menggunakan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Media hasil fermentasi ditambah 12,5 mL buffer sitrat fosfat pH 7 dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit, sehingga diperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar pektinase. Supernatan dimurnikan dengan metode pengendapan bertingkat melalui penambahan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–60%, yang dilanjutkan dengan proses dialisis. Enzim hasil pemurnian diuji kadar protein awal dan aktivitas enzim bebas.

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 maksimum kasein ($\lambda_{\max} = 559 \text{ nm}$). Kadar protein diketahui dengan mengkonversikan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein $y = 0,00004x$. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi kasein 1000–9000 ppm.

Penentuan aktivitas pektinase

Campuran uji terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat pH 7, 1 mL enzim pektinase murni dan 1 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 35 °C selama 50 menit dan ditambahkan 2 mL reagen DNS, kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan regresi kurva standar glukosa $y = 0,00421x$. Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi gula pereduksi 20–100 ppm.

Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 μg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Satu unit aktivitas enzim amobil diartikan sebagai 1 μg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap g pektinase amobil.

Preparasi pasir sebagai matriks

Pasir laut ditumbuk dan diayak menggunakan ayakan berukuran 120 mesh, padatan yang lolos kemudian diayak dengan ayakan 150 mesh. Setelah itu, padatan yang tidak lolos dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada temperatur 105 °C. Pasir laut hasil preparasi ditimbang 10 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 100 mL NaOH 0,0720 M dan dikocok dengan *shaker* selama tiga jam dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian dicuci dengan akuades sampai pH filtrat netral dan dikeringkan pada temperatur 105 °C. Pasir laut yang telah diaktivasi dipanaskan dalam tanur dengan temperatur 500 °C selama empat jam.

Penentuan lama pengocokan optimum

Enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL, kemudian buffer sitrat fosfat pH 7 ditambahkan ke dalamnya hingga volume 5 mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g pasir yang telah diaktivasi. Campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama 1, 2, 3, 4, dan 5 jam. Hasil preparasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40. Endapan pektinase amobil yang tersaring ditentukan aktivitasnya, sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya.

Penentuan konsentrasi pektinase optimum

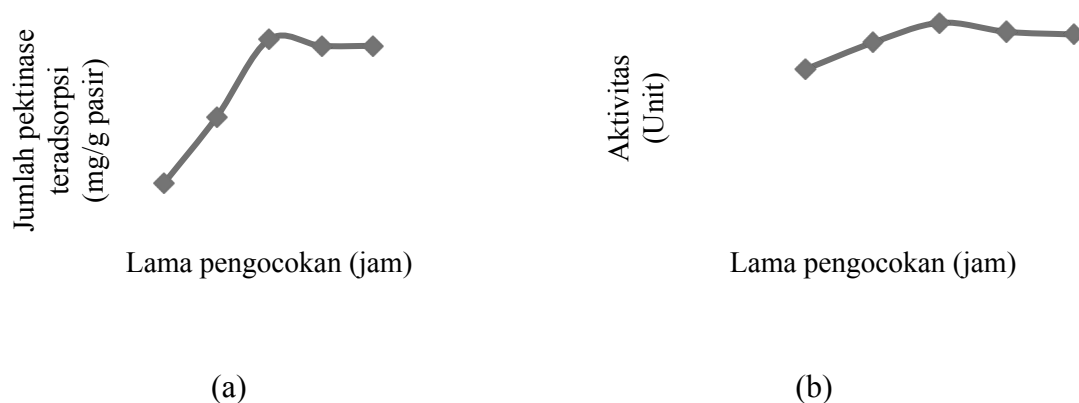
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi lama pengocokan. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang digunakan yaitu 1, 2, 3, 4 dan 5 mL dan selanjutnya campuran diinkubasi selama waktu pengocokan optimum dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm. Hasil preparasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40. Endapan pektinase amobil yang tersaring ditentukan aktivitasnya, sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan lama pengocokan optimum

Kondisi optimum amobilisasi pektinase ditentukan pada variasi lama pengocokan sehingga diketahui waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berinteraksi dengan pasir dalam proses amobilisasi. Pasir yang diaktivasi dengan NaOH akan memiliki permukaan yang lebih luas dan daya adsorpsinya semakin besar karena kation-kation dalam struktur pasir tertukar

oleh ion Na^+ . Ukuran Na^+ lebih kecil dari kation-kation logam pada pasir seperti Mg^{2+} , K^+ dan Ca^{2+} sehingga mobilitas dari ion Na^+ lebih besar dan pengotor-pengotor yang berupa logam yang terdapat dalam pasir akan keluar. Gugus SiO_2 pada pasir akan berikatan hidrogen dengan atom H dari gugus $-\text{NH}_2$ dan $-\text{COOH}$ pada enzim. Adanya ikatan hidrogen mengakibatkan terjadinya interaksi elektrostatik antara muatan positif pada enzim ($-\text{NH}_2$) dengan atom oksigen yang bermuatan negatif pada gugus $\text{Si}-\text{O}(\text{H})-\text{Si}$ [11].



Gambar 1. Grafik hubungan antara lama pengocokan terhadap (a) jumlah pektinase teradsorpsi (b) aktivitas pektinase amobil.

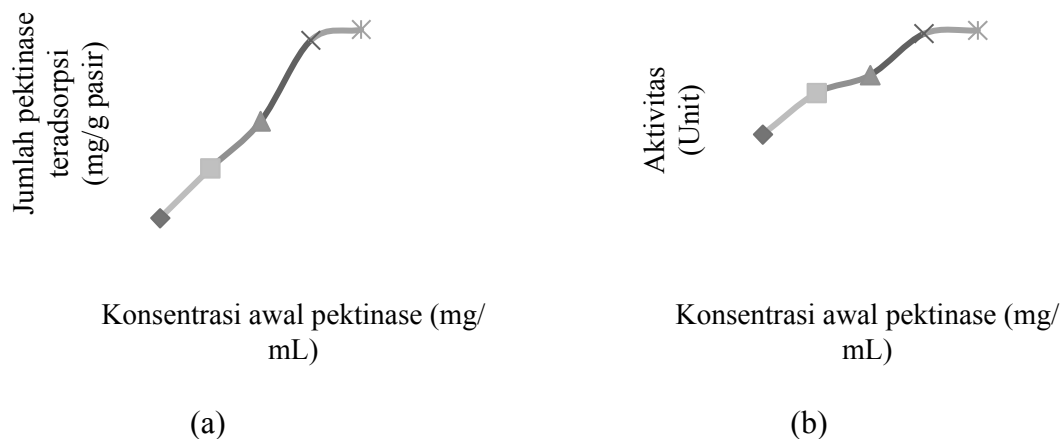
Proses pengocokan menyebabkan laju difusi pektinase menuju pasir akan semakin cepat sehingga kesetimbangan adsorpsi akan semakin cepat tercapai. Probabilitas kontak antara pektinase dan pasir berbanding lurus dengan peningkatan lama pengocokan sehingga semakin lama waktu pengocokan maka pektinase teradsorpsi semakin banyak dan aktivitas semakin tinggi hingga mencapai fasa kesetimbangan (Gambar 1a dan 1b).

Jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan lama pengocokan pada 1 hingga 3 jam dan selanjutnya menunjukkan fasa kesetimbangan pada 3, 4 dan 5 jam sehingga pada lama pengocokan 3 jam telah tercapai kesetimbangan adsorpsi dan aktivitas pektinase amobil. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa waktu 3 jam merupakan lama pengocokan optimum untuk menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 54,9 mg/g pasir dengan aktivitas 551,7 unit.

Penentuan konsentrasi pektinase optimum

Peningkatan jumlah konsentrasi enzim menyebabkan peningkatan jumlah enzim yang diadsorpsi sampai batas optimumnya. Pada saat konsentrasi awal pektinase 0,943 mg/mL

hingga 3,774 mg/mL, jumlah pektinase yang teradsorpsi mengalami peningkatan cukup signifikan dikarenakan semakin tinggi perbedaan potensial antara keduanya maka laju difusi pektinase untuk teradsorpsi ke permukaan pasir akan semakin tinggi sehingga menyebabkan semakin banyak pektinase yang teradsorpsi (Gambar 2a). Hal ini seiring dengan peningkatan aktivitas pektinase amobil (Gambar 2b).



Gambar 2. Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap (a) jumlah pektinase teradsorpsi (b) aktivitas pektinase amobil.

Jumlah pektinase teradsorpsi berbanding lurus dengan aktivitas pektinase amobil. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa 3,774 mg/mL merupakan konsentrasi optimum yaitu jumlah pektinase teradsorpsi sebesar 111,6 mg/g pasir dengan aktivitas 1007,7 unit.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kondisi optimum dicapai pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi pektinase 3773,6 $\mu\text{g/mL}$ dengan aktivitas pektinase amobil 1007,7 unit dan jumlah enzim teradsorpsi pada pasir sebesar 111,6 mg/g pasir.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dharani dan Aiyer, 2004, Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by *Bacillus Licheniformis* SPT 27, *African. J. Biotech*, Vol. 3 (10), pp. 519–522.
2. Pedrolli, Danielle B., Alexandre C. M., Eleni G., dan Eleonora C. C., 2009, Isolated Pectinase from Fruit Industrial Waste, *Open Biotechnol. J.*, Vol. 3, pp. 9–18.
3. Lang C. dan Dorenberg H., 2000, Perspective in The Biological Function and The Technological Applications of Polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol. J.*, Vol 53, pp. 366–375.

4. Mukesh, Kumar D. J., Saranya G., Suresh K., Andal P. D., dan Rajakumar R. K. P. T., 2012, Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste, *Asian. J. Plant Science and Research*, 2012, Vol 2 (3), pp. 369–375.
5. Buga M. L., Ibrahim S., dan Nok A. J., 2010, Physico-chemical Characteristics of Immobilized Polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), *African. J. Biotech*, Vol. 9 (52), pp. 8934–8943.
6. Kennedy J. dan Melo E. H. M., 1999, *Immobilized Enzyme and Cells*, United Kingdom, University of Birmingham.
7. Agustiawan H., 2010, *Amobilisasi Lipase dari Mucor Miehei menggunakan Matriks Oxidized Polypropylene (OPP)*, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.
8. Hadi S., Munasir, dan Triwikantoro., 2011, Sintesis Silika Berbasis Pasir Alam Bancar menggunakan Metode Kopresipitasi, *Physic Student. J. ITS*, Vol 1, pp. 1–5.
9. Jal P. K., Patel S., dan Mishra B. K., 2004, Chemical Modification of Silica Surface by Immobilization of Functional Groups for Extractive Concentration of Metal Ions, *J. Talanta. Elsevier*, Vol 62, pp. 1005–1028.
10. Henri J., 1998, Pengaktifan Zeolit Lampung dengan Berbagai Perlakuan, *J. Sains dan Teknologi*, Vol. 4 (2), pp. 173–180.
11. Hindryawati N., 2010, Stabilitas Enzim Dehidrogenase Laktat yang Teramobilisasi dalam Silika Gel dari Abu Sekam Padi, *Mulawarman Scient. J.*, Vol 9 (1), pp. 170–175.