

EFEKTIVITAS KITOSAN SEBAGAI MATRIKS AMOBIL DALAM MEMERANGKAP ENZIM β -GALAKTOSIDASE

Pipih Suptijah

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB

ABSTRAK

Kitosan adalah selulosa alami yang tersusun dari gugus-gugus glukosa beramin. Mempunyai bentuk kristal yang unik, dengan muatan-muatan ionnya yang reaktif, mirip dengan struktur matriks amobil. Penelitian ini bertujuan mengaplikasikan kitosan sebagai matriks amobil yang dalam hal ini adalah enzim galaktosidase yang diproduksi oleh bakteri *E. coli*. Enzim galaktosidase diproduksi melalui tahapan-tahapan kultur *E. coli* dalam medium lactos broth. Ekstraksi enzim galaktosidase dari biomass yang dihasilkan, dilanjutkan dengan pemurnian, dialisis serta perangkapan (penjeratan) enzim oleh kitosan selama 15 menit. Efektivitas kitosan dalam memerangkap enzim ditunjukkan melalui uji aktivitas enzim dalam matriks dengan ONPG. Hasil uji aktivitas enzim menunjukkan bahwa perlakuan jumlah kitosan sebagai matriks amobil tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap daya perangkapan enzim dalam waktu yang sama yakni 15 menit. Masing-masing perlakuan kitosan 1%, 2%, 3% mampu memerangkap enzim rata-rata 70%, berarti waktu perangkapan (aging) sangat mempengaruhi jumlah yang terperangkap. Kegiatan pada saat pengadukan cukup berarti. Dapat disimpulkan bahwa yang paling efektif memerangkap enzim adalah kitosan 1%, dimana 1 gram kitosan mampu memerangkap (mengabsorpsi) enzim sebesar 0,275 gram (1 gram kitosan ~ 0,275 gram enzim)

Kata kunci: kitosan, matriks amobil, enzim galaktosidase

I. PENDAHULUAN

Kitosan adalah suatu selulosa alam yang tersusun dari gugus glukosa beramin (Muzzarelli 1997), yang mempunyai muatan yang berlawanan dengan selulosa yaitu bermuatan positif, mempunyai struktur kristal, amorfis dengan pori-porinya yang bervariasi dalam ukuran, sehingga berbentuk seperti matriks yang kompak, berpotensi digunakan sebagai matriks amobil untuk merangkap (menjerat) enzim atau bakteri.

Proses amobilisasi oleh kitosan berhubungan erat dengan kemampuannya mengabsorpsi dan menahan komponen-komponen tertentu didalamnya. Hal ini berkaitan dengan adanya gugus-gugus ionik dalam kitosan (Knorr 1982), sehingga kitosan dapat berfungsi sebagai matriks amobil.

Amobilisasi enzim banyak dimanfaatkan secara besar-besaran dalam proses fermentasi. Kelebihan penggunaan metode ini adalah bahwa enzim dalam matriks mampu melakukan aktivitasnya membuat produk tanpa harus keluar dari matriks tersebut, sehingga produk tidak terkontaminasi oleh enzim, bahkan kitosan pun setelah diangkat dari fermentasi masih dapat digunakan kembali berulang-ulang.

Melalui uji kemampuan kitosan sebagai matriks amobil maka akan menambah luas kegunaan kitosan untuk preparasi serta metoda penjeratannya lebih sederhana.

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji kemampuan (keefektivitasan) kitosan sebagai matriks amobil dalam memerangkap atau menjerat enzim, yang dalam hal ini adalah enzim β -galaktosidase.

II. METODOLOGI

Bahan

Escherichia coli, medium Laktose Broth (induktif), BSA (*Brain Serum Albumin*), ONPG, Na_2CO_3 , $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ Reagen Nessler, kitosan, Buffer Phosfat (PBS).

Alat

Alat gelas, *shaker*, inkubator, *centrifuge*, *autoclave*, ultrasonikator, micropipet, selofar bag, dialisator.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yang meliputi tahap kultur *E. coli*, tahap ekstraksi enzim, β -galaktosidase dari biomass *E.coli*, tahap pemurnian enzim, dan tahap uji aktivitas enzim.

Tahap Kultur *E. coli*

E. coli yang sudah disegarkan dan yang sudah siap digunakan dimasukkan dalam medium induktif dalam erlenmeyer 250ml ditempatkan pada *shaker* selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam dituangkan ke dalam tabung *centrifuge* 500ml, dilakukan *centrifuge* pada kecepatan 5000 rpm dengan temperatur 2-4°C selama 15 menit. Sel/biomass yang diperoleh, dicuci dengan H₂O dingin untuk menghilangkan sisa medium dan dilakukan kembali sentrifuge sampai diperoleh sel *E. coli* yang bersih dari media.

Tahap Ekstraksi Enzim β -galaktosidase

E. coli disuspensikan dalam 8 ml buffer phosfat pH 7,7, ekstraksi dilakukan dengan cara suspensi dipecah dengan sonikator pada suhu 15°C dalam waktu 2 jam. Pemisahan enzim dengan *centrifuge* pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 5°C, selama 5 menit, diperoleh ekstrak enzim dalam bentuk supernatan.

Tahap Kemurnian Enzim

Supernatan yang diperoleh ± 5 ml diuji pendahuluan aktivitasnya. Pemurnian dengan fraksinasi dilakukan variasi kejenuhan dengan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4%, 0,6% pada suhu 0-2°C, penambahan sedikit demi sedikit sambil diaduk dan kemudian didiamkan selama 30 menit. Endapan yang diperoleh disuspensikan dalam 5 ml buffer fosfat.

Tahap Dialisis

Garam-garam yang terkandung dalam suspensi ekstrak dapat dihilangkan melalui dialisis sebagai berikut:

- Suspensi enzim dimasukkan ke dalam selofar bag, lalu diikat
- Kemudian direndam dalam larutan buffer yang sama selama 10 jam dengan suhu 20°C, setiap 2 jam buffer diganti sampai garamnya habis dengan pengujian Nessler.

Tahap Amobilisasi Enzim

Kedalam suspensi enzim ditambahkan kitosan dengan perlakuan 0,01; 0,03; 0,05 gram dan tanpa kitosan. Campuran diaduk agar kitosan homogen. Kemudian didiamkan selama 15 menit. Setelah 15 menit kitosan diangkat (dipisahkan) kemudian dicuci dengan buffer 3x. kitosan siap digunakan atau diuji.

Tahap Uji Aktivitas Enzim

Enzim hasil isolasi diuji dengan ONPG sebagai substrat dalam suasana alkali. Hasil penguraian ONPG oleh enzim β -galaktosidase akan membentuk warna kuning yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah ONPG yang direaksikan dalam μmol atau milimol per mililiter enzim per menit pada kondisi optimum.

Tabel 1. Uji aktivitas enzim teramobilisasi

Tabung sampel	ONPG 2,5 mol	Buffer PBS	Enzim teramobil dalam kitosan	Abs
1	0,5 mol	4 ml	0,1	
2	0,5 mol	4 ml	0,3	
3	0,5 mol	4 ml	0,5	
4	0,5 mol	4 ml	0,0	

- o Campuran diaduk agar homogen
- o Inkubasi pada 37°C selama 5 menit.
- o Untuk menghentikan reaksi enzim pada campuran ditambahkan 1,5 ml Na_2CO_3 2 mol. Selanjutnya kitosan dipisahkan dari campuran dan diuji absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Pengujian dilakukan pada kontrol, cucian dan supernatan $\rightarrow k = c + s$

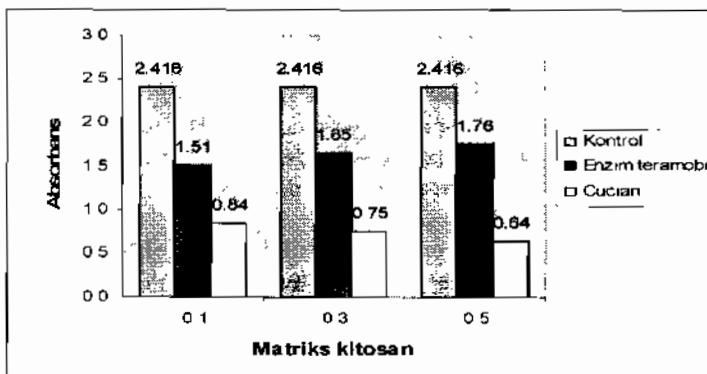
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh pada tahap kultur *E. coli* adalah biomass *E. coli* berupa endapan tidak didasar tabung *centrifuge* dengan berat ± 2 gr. Untuk memperoleh enzim yang berada didalam sel *E. Coli*, maka hasil tahap ekstraksi enzim adalah ekstrak kasar dalam bentuk supernatan. Untuk memperoleh enzim β -galaktosidase yang murni, maka pada tahap ketiga dilakukan pemurnian enzim melalui fraksinasi dengan penambahan $(NH)_2SO_4$ dengan kejenuhan 0,40% dan 0,60%. Kemudian enzim murni dalam bentuk endapan dilarutkan dalam buffer PBS dan didialisis untuk menghilangkan garam-garam yang terkandung dalam enzim tersebut sampai diperoleh sekitar 5ml larutan enzim β -galaktosidase. Enzim murni diuji aktivitasnya dan diamobilisasi kedalam kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (lihat Tabel 2).

Tabel 2. Hasil aktivitas enzim β -galaktosidase teramobil dalam kitosan

Kitosan	Absorban cucian	Absorbans teramobil	% teramobil
0,1	0,84	1,505	65%
0,3	0,750	1,650	70%
0,5	0,637	1,760	75%
0,0 (Kontrol)		2,416	

- o Kitosan ONPG = 0,5 mol dengan Absorbans (A) = 2,416
- o Absorbans larutan pencucian (Ac) = 0,84 \rightarrow aktivitas 0,174 mol/ml/15 menit
- o Absorbans teramobil (Aa) = 1,505 \rightarrow aktivitas 0,311 mol/ml/15 menit
- o Penggunaan 0,1gr kitosan mengamobil enzim β -galaktosidase 0,0267 mol/mnt
- o Jadi 1gr kitosan efektif mengamobil enzim β -galaktosidase 0,267 mol/menit
- o Atau 1gr kitosan efektif mengamobil rata-rata 0,3 mol enzim β -galaktosidase



PROSIDING

Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan Indonesia I
Kampus FPIK – IPB Dramaga, 17-18 Juli 2007

Gambar 1. Diagram aktivitas enzim teramobil dan cuciannya

IV. KESIMPULAN

- Kitosan dapat memrangkap enzim dengan baik.
- Kemampuan kitosan memerangkap enzim rata-rata 70% dalam waktu 15 menit.
- Efektivitas kitosan memerangkap enzim 1 gram kitosan mengamobil rata-rata 0,267 mol/menit atau dapat berarti 1 gram kitosan mampu mengamobilisasi $\pm 0,3$ gram enzim β -galaktosidase.
- Waktu akan mempengaruhi pemerangkapan. Jadi, untuk mendapatkan pemerangkapan optimum, waktu penjeratan perlu diperpanjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Backerstaff G F. 1997. Immobilization of rnyzyme and cels. Editor Hamana press Totowa New Jersey USA.
- Dalwoo.2002. Chitin Chitosan and Chitosan Oligomer. A Natural Product from the Sea. <http://www.dalwoo.com/chitosan/col/compare.htm>
- Johana M & Dautzenberg H. 1997. Immobilization of Sel in Polyelectrolyte Complexes in Chemistry and Biochemistry of Marine Food Product. AVI Publishing Co. Westport conecticut USA.
- Knorr D. 1982. Function properties of chitin and chitosan. *J.food Sci* 47:36.
- Muzzarelli RAA.1997. Depolymerization of chitin and chitosan with hemicellulosa, lysozyme, papain and linnases. Di dalam RAA Muzzarelli dan MG Peter (Ed). Chittin Handbook. European Chittin Soc, Grottamare.
- Richardson T & Hyslop DB.1985. Immobilize enzyme. In food Chemistry.
- Wirawan B. 1987. Immobilisasi papain (EC.34.28.c) pada kitin kulit udang dan penggunaannya sebagai pencegah haze pada bir. Skripsi. Bogor. Fakultas Teknologi Pertanian IPB.