

ISOLASI DAN KARAKTERISASI DEKSTRANSUKRASE DARI ISOLAT BAKTERI BATANG TEBU

Isolation and Characterization of Dextransucrase from Bacterial Isolate Sugar Cane

A.E. Zainal Hasan¹, Laksmi Ambarsari, Hasim, Aisyah Girindra

Jurusan Kimia FMIPA-IPB

ABSTRACT

Dextransucrase is a glucosyltransferase that catalyzes the transfer of an alpha-D-glucopyranosyl group from sucrose to dextran and releasing the fructose. Enzyme activity was determined by measuring the initial reaction rate of fructose released from sucrose. A standard unit (U) is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of D-fructose per mg of protein per minute. Dextransucrase was produced by fed-bath cultures of isolate bacterial from sugar cane in a mixture containing sucrose (10 % b/v) in the medium fermentation.

Extracellular dextransucrase was obtained from bacterial isolate from sugar cane. Final culture dextransucrase activity was 0,2776 U/mg of protein. Dextransucrase purified by ethanol 80 % showed activity of 4,2077 U/mg of protein or activity increase 1515,75 %. Temperature optimum was 40 °C and pH optimum was 7.6. All of the metal increased the activity, except $HgCl_2$. Dextransucrase kinetics constants, K_m is 3,00 mM and V_{maks} is 3,5559 unit/mg of protein/min. Molecular weight is 95.155 kDa.

Kata kunci : Enzim, Dekstran, Dekstransukrase, Polisakarida

PENDAHULUAN

Enzim adalah protein yang diproduksi oleh sel hidup dan digunakan oleh sel tersebut sebagai katalisator reaksi biokimia yang khas. Pertama kali enzim diproduksi secara industri di Amerika Serikat (AS) pada tahun 1894 yaitu amilase takadiastase yang digunakan pada bidang kedokteran.

Pada tahun 1926, Sumner mengisolasi urease dari kacang-kacangan (Anderson, 1953). Karena peranannya sebagai biokatalisator dalam berbagai bidang, terutama industri, maka perkembangan penggunaan enzim sangat pesat. Hal ini terbukti dengan laju penjualan enzim yang terus meningkat. Pada tahun 1977 laju penjualan sebanyak 150 juta dolar AS kemudian pada tahun 1993 mencapai 700 - 750 juta dolar AS dengan laju perkembangan jumlah produksi enzim sebanyak 1200 ton per tahun (Crueger dan Crueger, 1984; Katchalski-katsir, 1993 dalam Miswar, 1998). Menurut laporan Biro Pusat

Statistika (1997), Indonesia telah mengimpor enzim pada bulan Januari sampai dengan Agustus 1997 sebanyak 1.674.802 kg seharga 7.975.140 dolar AS.

Dekstransukrase (EC 2.4.1.5) tergolong dalam enzim transferase (glukosiltransferase) dan diperjualbelikan dengan harga yang cukup mahal yaitu \$ 83,50 / 10 unit. Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* sebagai penghasil enzim diperoleh dari nira *root beer* dari Peoria, Illinois, AS.

Dekstransukrase maupun dekstran belum dapat diproduksi di Indonesia. Akan tetapi telah lama diketahui bahwa adanya dekstran dengan kadar yang tinggi dalam nira dapat mengganggu produksi gula tebu di pabrik gula Indonesia. Gangguan dekstran pada pabrik gula adalah adanya peningkatan viskositas nira dan masakan, penghambatan proses pembentukan dan pengendapan kristal serta pembentukan kristal yang memanjang. Walaupun dekstran mengganggu produksi gula, di pihak lain dekstran dapat

¹ Yang dihubungi untuk korespondensi, Telp: 62-251-323166, 322196, e-mail : halalmui@indo.net.id

dimanfaatkan untuk berbagai tujuan, diantaranya adalah berfungsi untuk memperbesar volume plasma darah dalam transfusi darah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dekstransukrase dari media fermentasi yang telah diberi bakteri batang tebu PSIB 92001 serta menentukan karakter enzim hasil isolasi dari media fermentasi tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri batang tebu (kode PSIB 92001) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P₃GI) Pasuruan, *Yeast extract*, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CaCl_2$, $NaCl$, $FeSO_4 \cdot H_2O$, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $CuSO_4$, $CoCl$, Na_2CO_3 , $MgSO_4$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $NaOH$, *Bovin Serum Albumin* (BSA), Amonium Persulfat, N'N'N' Tetramethylethylene diamine (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 2-Mercaptoethanol, Trichloroacetic acid (Tris), Glisin, Kit standar protein dari *Sigma Chemical Co.*, Akuades, Asam Sitrat, Sukrosa, Pereaksi Dinitro salisilat (DNS), Etanol, Na/K tartrat, Glukosa dan Fruktosa.

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas, otoklaf, pH-meter, *shaker*, spektrofotometer, mikro pipet (*Soccorex*), sentrifuse, *water bath* dan peralatan elektroforesis.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih strain EPY yang sehat yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA-IPB. Kisaran bobot badan 16-29 gram, berjenis kelamin betina, dan berumur 8-10 minggu. Bahan kimia yang digunakan adalah kloroform, metanol, etil asetat, H_2SO_4 2M, NH_4OH , Pereaksi Dragendorf, Mayer, Wagner, Liebermann-Bouchard, HCl 2N, NH_3 pekat, Na_2SO_4 anhidrat, $FeCl_3$ 1%, asam asetat, asam sulfat pekat, akuades, dan silika gel 60GF254. Alat yang digunakan adalah rotary evaporator, sentrifugasi, indikator pH, pH meter, neraca analitik, kolom kromatografi, lempeng kromatografi, dan alat-alat gelas lainnya.

Metode

Medium Fermentasi.

Media Fermentasi (Kim dan Robyt, 1995) yang terdiri dari glukosa 1 %, sukrosa 5 % dan sukrosa 10 %, 20 g *yeast extract*, 0,01 g $FeSO_4 \cdot H_2O$, 20 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,02 g $CaCl_2$, 0,01 g $NaCl$ dan buffer fosfat pH 6.9. Media disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Media fermentasi digunakan untuk memproduksi dekstransukrase yang akan digunakan dalam karakterisasi enzim.

Isolasi Enzim.

Isolasi enzim dilakukan dengan cara memisahkan biomassa dari media tumbuh pada suhu dingin. Hasil pemisahan berupa cairan (supernatan) yang merupakan ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*). Pemurnian lebih lanjut dilakukan dengan menambahkan alkohol dengan kejenuhan 80 %.

Penentuan aktivitas dan sifat enzim serta yang mempengaruhinya

Sukrosa yang diberi sejumlah dekstransukrase akan membentuk dekstran dengan membebaskan fruktosa. Fruktosa yang dibebaskan akan bereaksi dengan asam-3,5-dinitrosalisilat membentuk asam-3-amino-5-nitrosalisilat yang dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Kim dan Robyt, 1995).

Pengaruh pH, suhu dan garam logam terhadap aktivitas dekstransukrase merupakan sifat yang dipelajari. Penentuan K_m dan V_{maks} metode *Lineweaver-Burk* dan *Edie-Hopfste* yaitu dengan cara mengukur aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat (sukrosa) yang bervariasi yaitu antara 0.0146 M sampai dengan 0.292 M. Penentuan bobot molekul dilakukan berdasarkan atas ukuran molekul yang melewati suatu gel. Gel yang digunakan terbentuk dari kompleks akrilamid. Untuk menentukan bobot molekul dilakukan dengan menggunakan metoda SDS-PAGE elektroforesis.

Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metoda Lowry. Warna yang timbul disebabkan oleh warna hasil reaksi biuret disamping warna yang disebabkan oleh reduksi fosfomolibdat-fosfowolframat oleh tirosin yang ada dalam protein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Dekstransukrase.

Aktivitas dekstransukrase telah diukur dari hasil isolasi enzim pada media fermentasi, yang diinokulasi bakteri PSIB 92001. Media ini merupakan media semi-sintesis yaitu media yang tersusun oleh campuran bahan-bahan alami dan bahan-bahan sintesis (Suriawiria, 1988). Tujuan penanaman bakteri PSIB 92001 pada media fermentasi adalah diharapkan pertumbuhan bakteri mencapai optimal dan dapat memproduksi enzim dengan keaktifan yang lebih besar.

Hasil penelitian aktivitas dekstransukrase pada media fermentasi dengan kadar sukrosa 5 % dan 10 % yang diinkubasi selama 7 jam adalah 0,2118 dan 0,2776 unit/mg protein. Rekapitulasi hasil penelitian isolasi dekstransukrase pada media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 % dapat dilihat pada Tabel 1.

Bila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kim dan Robyt (1995) yang menggunakan media fermentasi yang hampir sama terlihat bahwa aktivitas enzim bakteri PSIB 92001 lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri PSIB 92001 mempunyai potensi yang besar dibandingkan dengan *L.mesenteroides B-742* yang digunakan Kim dan Robyt (1995).

Pemurnian Enzim

Enzim yang dimurnikan pada penelitian ini adalah enzim hasil isolasi dari media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 %. Teknik pemurnian yang digunakan adalah menggunakan alkohol dengan kejenuhan 80 %. Pemakaian alkohol sebagai bahan untuk memurnikan enzim sesuai dengan pernyataan

Scopes (1982) bahwa alkohol dapat memurnikan protein dengan kepekaan yang tinggi.

Hasil penelitian tentang aktivitas dekstransukrase sebelum dimurnikan dan sesudah dimurnikan adalah 0,2776 dan 4,2077 unit/mg protein dan dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 tampak adanya perubahan aktivitas spesifik yang nyata antara sebelum dan sesudah dimurnikan, yaitu dari 0,2776 unit/mg protein menjadi 4,2079 unit/mg protein (15 kali). Penelitian yang dilakukan oleh Paul (1985) pada *L. mesenteroides* dengan pemurnian menggunakan PEG menghasilkan aktivitas sebesar 175 unit/mg protein. Hal ini mungkin karena selain strain juga teknik pemurniannya. Walaupun demikian nilai aktivitas spesifik enzim dari bakteri PSIB 92001 tersebut masih lebih besar bila dibandingkan dengan dekstransukrase yang dihasilkan oleh *Sigma Chemicals Co.* pada tahun 1991.

Karakterisasi Dekstransukrase

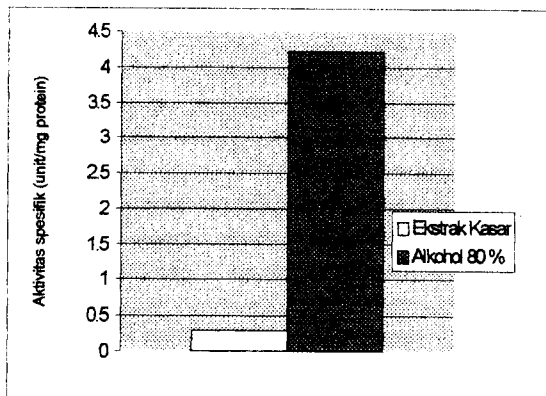
Dekstransukrase hasil pemurnian telah dilakukan uji karakterisasi yang meliputi : pengaruh suhu, pengaruh pH, penambahan garam logam, penentuan kinetika dan bobot molekul enzim.

Pengaruh Suhu

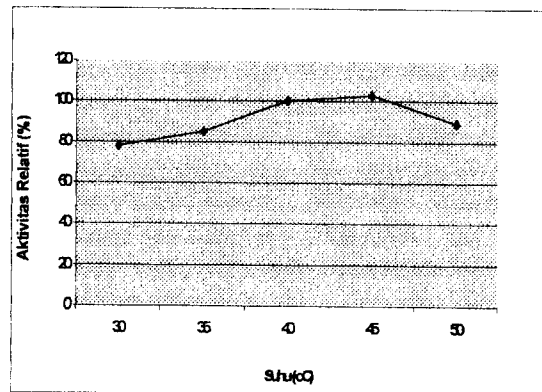
Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas dekstransukrase telah diukur dengan cara memberikan perbedaan suhu inkubasi (30, 35, 40, 45, dan 50 °C). Pada suhu inkubasi tersebut diharapkan terdapat suhu optimum. Hasil penelitian pengaruh suhu terhadap aktivitas dekstransukrase dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Rekapitulasi hasil penelitian isolasi dekstransukrase pada media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 %

| Perlakuan | Volume (ml) | Protein (mg/ml) | Total Protein (mg) | Aktivitas (Unit/ml) | Total Aktivitas (Unit) | Aktivitas Spesifik (Unit/mg) | Kemurnian (kali) | Hasil Enzim (%) |
|---------------|-------------|-----------------|--------------------|---------------------|------------------------|------------------------------|------------------|-----------------|
| Ekstrak kasar | 94,5 | 3,2646 | 308,50 | 0,9062 | 85,636 | 0,2776 | 1 | 100 |
| Alkohol 80 % | 50 | 0,1987 | 9,935 | 0,8361 | 41,805 | 4,2079 | 15 | 49 |



Gambar 1. Perbandingan antara aktivitas spesifik dekstransukrase (unit/mg protein) sebelum dan sesudah dimurnikan menggunakan alkohol dengan kejenuhan 80 %



Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dekstransukrase hasil isolasi dari media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 %

Pada Gambar 2 terlihat bahwa pada suhu 45 °C dekstransukrase hasil isolasi dari media fermentasi yang diberi bakteri PSIB 92001 menunjukkan aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan perlakuan suhu lainnya, sesuai dengan penelitian Kim dan Robyt (1995).

Pengaruh pH

Uji pengaruh pH terhadap aktivitas dekstransukrase telah diukur pada perbedaan pH bufer saat inkubasi enzim. pH bufer yang dilakukan adalah antara pH 5,0 sampai 6,8 dengan selang 0,2. Pada perbedaan pH tersebut diharapkan terdapat pH optimum. Hasil penelitian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dekstransukrase dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 terlihat bahwa pada pH 6,4 menunjukkan aktivitas spesifik yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan pH lainnya. Crueger dan Crueger (1984) menyatakan bahwa pH optimum untuk dekstransukrase adalah 5,0-5,2, menurut Robyt dan Eklund (1991) pH optimum adalah pH 5,3, dan menurut Paul (1985) pH 6,7 merupakan pH optimum. Sedangkan Landon dan Webb (1990) menemukan pH optimum aktivitas dekstransukrase pada pH 7,1. Hal ini mungkin menunjukkan bahwa perbedaan aktivitas dekstransukrase disebabkan oleh perbedaan strain bakteri sebagai penghasil enzim.

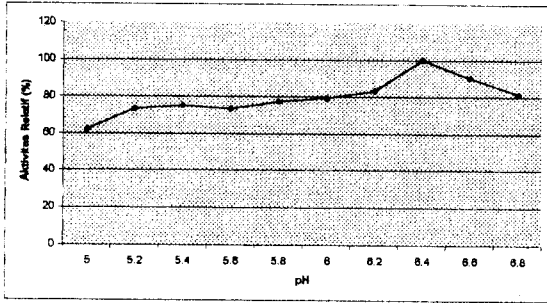
Pengaruh Garam Logam

Uji pengaruh garam logam terhadap aktivitas dekstransukrase telah diukur pada perbedaan larutan garam logam saat inkubasi enzim. Garam logam yang digunakan sebagai pengganti larutan bufer saat inkubasi adalah NaCl, Na₂CO₃, CuSO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeCl₃, CoCl₂, AgNO₃ dan HgCl₂ (Miswar, 1998). Enzim yang digunakan adalah enzim hasil pemurnian dengan tidak melakukan pembebasan dari semua jenis logam.

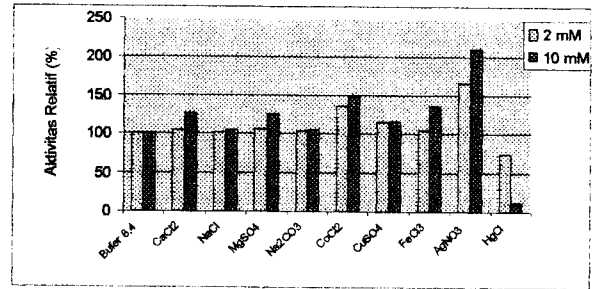
Hasil penelitian pengaruh garam logam terhadap aktivitas spesifik dekstransukrase dapat dilihat pada Gambar 4.

Pada Gambar 4 terlihat bahwa hampir semua logam dapat meningkatkan aktivitas enzim dekstransukrase, kecuali garam Hg. Kenaikan aktivitas dekstransukrase karena pengaruh logam yang nyata adalah CuSO₄, CoCl₂ dan AgNO₃ pada konsentrasi 2 mM dan pada konsentrasi 10 mM adalah CuSO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeCl₃, CoCl₂ dan AgNO₃. Pada konsentrasi HgCl₂ 2 dan 10 mM dapat menyebabkan aktivitas dekstransukrase turun dari 74,22 % menjadi 13,26 %.

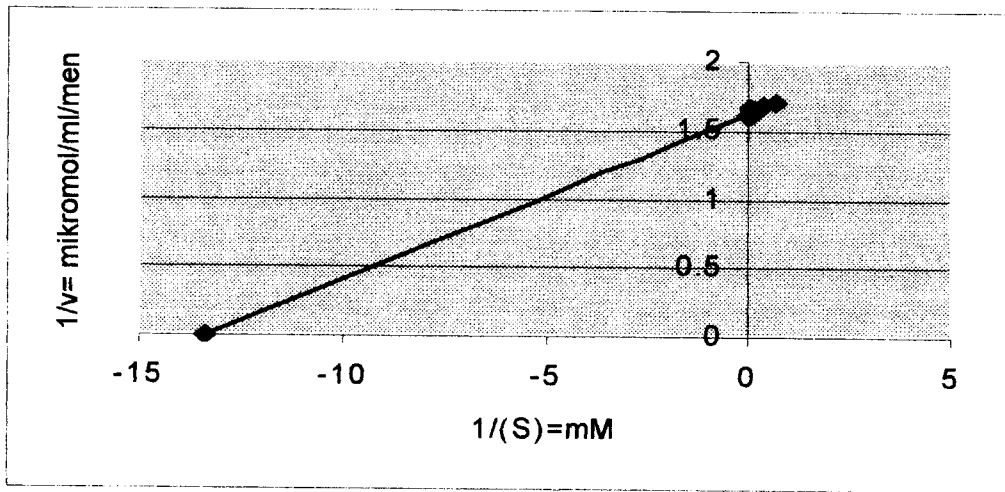
Peningkatan keaktifan karena penambahan logam menunjukkan bahwa adanya proses pembentukan kompleks antara sebagian dari protein enzim dengan logam yang tidak sampai menyebabkan adanya denaturasi enzim sehingga mengakibatkan kenaikan aktivitas, terutama AgNO₃ dan CoCl₂.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas dekstranukrase hasil isolasi dari media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 %



Gambar 4. Pengaruh garam logam terhadap aktivitas dekstranukrase hasil isolasi dari media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 %



Gambar 5. Kurva Lineweaver-Burk dengan persamaan garis : $Y = 0,1214 X + 1,6206$, $r = 0,8266$

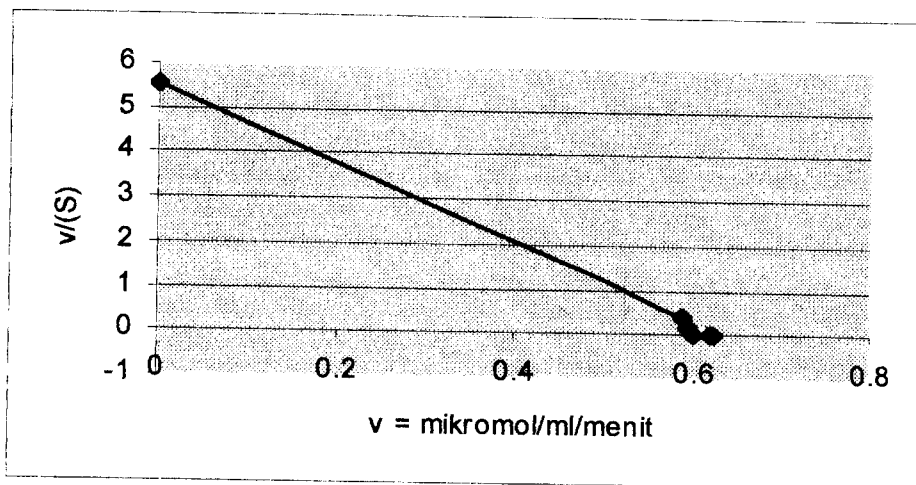
Sedangkan pada penurunan aktivitas tersebut disebabkan adanya denaturasi protein yang tidak dapat balik karena adanya proses *chelating* logam berat oleh protein, seperti $HgCl_2$ (Williams dalam Boyer, Lardy dan Myrback, 1959). Dengan demikian logam berat dapat menurunkan aktivitas enzim bahkan sampai tidak aktif sama sekali.

Kinetika Enzim

Pengukuran aktivitas dekstranukrase dengan perbedaan konsentrasi substrat (sukrosa) telah dilakukan. Dari hasil pengukuran aktivitas enzim tersebut dibuat persamaan kesetimbangan Michaelis-Menten. Untuk menghasilkan K_M dan V_{maks} maka dilakukan transformasi terhadap persamaan Michaelis-Menten dengan cara membalikkan persamaan maka diperoleh persamaan Lineweaver-Burk dan Kurva Lineweaver-Burk

disajikan pada Gambar 5. Hasil perhitungan persamaan Lineweaver-Burk dan Edie-Hofstee diperoleh konstanta K_M dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,0749 mM dan 0,617 mikromol/ml/menit serta 0,011 mM dan 0,622 mikromol/ml/menit. Grafik persamaan Edie-Hofstee dapat dilihat pada Gambar 6.

Nilai K_M dekstranukrase yang diperoleh lebih kecil dari pada nilai K_M enzim dekstranukrase yang berasal dari *L. mesenteroides* hasil penelitian Miller, Eklund dan Robyt (1985) yaitu sebesar 12 – 16 mM. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan media fermentasi dan strain bakteri yang digunakan.



Gambar 6. Grafik persamaan Edie-Hofstee dengan persamaan garis : $Y = -8,90429 X + 5,5404$, $r = 0,82$

Bobot Molekul Enzim

Bobot molekul dekstransukrase telah ditentukan menggunakan teknik elektroforesis gel poliakrilamida dengan menggunakan lima standar enzim, sedangkan cara penentuan metoda koefisien sedimentasi (van Holde dalam Mathews dan van Holde, 1991) tidak dikerjakan.

Dari hasil perhitungan perbandingan Rf diperoleh bobot molekul dekstransukrase adalah sekitar 95.155 Dalton..

Menurut penelitian Kobayashi dan Matsuda (dalam Robyt, 1995) bobot molekul dekstransukrase sekitar 64 000 Da. Menurut Miller et al dan Fu and Robyt (dalam Robyt, 1995) bobot molekul dekstransukrase dari isolasi *L. mesenteroides* B-512FM adalah 177 000 Da dan 158.000 Da. Menurut Grahame dan Mayer (dalam Robyt, 1995) bobot molekul enzim dari isolasi mutan *L. mesenteroides* sebesar 185 000 Da, 63 000 Da dan 59 000 Da. Hal ini menunjukkan bahwa bobot molekul dekstransukrase hasil penelitian mempunyai ukuran yang berbeda mungkin disebabkan oleh perbedaan strain bakteri yang dipakai dan adanya pengaruh penyimpanan (Miller, Eklund dan Robyt, 1985).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :Bakteri PSIB 92001 dapat tumbuh pada media media fermentasi. Dekstransukrase yang diisolasi

dari media fermentasi dengan kadar sukrosa 5 % mempunyai aktivitas sebesar 0,2118 unit/mg protein. Pada media fermentasi dengan kadar sukrosa 10 % aktivitas spesifik enzimnya sebesar 0,2776 unit/mg protein, tetapi setelah dimurnikan menggunakan alkohol dengan kejenuhan 80 % keaktifannya menjadi naik sekitar 15 kali. Enzim hasil penelitian mempunyai suhu dan pH optimum pada 45 °C dan 6,4 dengan $K_M = 0,0749$ mM dan $V_{maks} = 0,617$ mikromol/ml/menit. Aktivitas spesifik enzim mengalami kenaikan dengan penambahan garam logam, kecuali garam $HgCl_2$. Bobot molekul dekstransukrase pada penelitian ini adalah 95 155 Dalton.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A.K. 1953. Essentials of Physiological Chemistry. John and Wiley & Sons, Inc. New York.
- Crueger, W. dan A. Crueger. 1984. Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology. Translation of : Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Science Tech, Inc. Madison, WI.
- Kim, D dan J. F. Robyt. 1995. Production, selection, and characteristics of mutants of *Leconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextransucrases. *Enzyme and Microbial Technology*. 17 ; 689-695.

- Landon, R.S. dan C. Webb.** 1990. Separating enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. *Process Biochemistry*. 1990, 25: 1, 19-23.
- Lawford, G.G., A. Kligerman dan T. Williams.** 1979. Dextranbiosynthesis of dextransucrase production by continous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 1121-1131.
- Mathews, C. K dan K. E. van Holde.** 1991. Biochemistry. The Benyamin / Cumming Publishing Company, Inc., California.
- Miswar.** 1998. Karakterisasi Enzim dan Studi Pendahuluan Kloning Gen Dekstranase dari *Streptococcus sp.* B1. Thesis. Program Pascasarjana, IPB. Bogor.
- Miller, A. W, S. H. Eklund dan John F. Robyt.** 1985. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Elsevier Science Publisher. New York.
- Paul, F, E, Oriol, D. Auriol dan P. Monsan.** 1985. *Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides, Application to the synthesis of conrolled-molecular-weight dextrans.* Elsevier Science Publisher B. V. New York.
- Robyt, J. F.** 1995. *Mechamisms in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose.* Academic Press, Inc. Iowa.
- Scopes, R. K.** 1982. Protein Purification : Principles and Practice. Spinger-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- Suriawiria, U.** 1988. Mikrobiologi Lingkungan (Dasar-dasar Mikrobiologi). Pusat Antar Universitas Bioteknologi, ITB. Bandung.