

PENGARUH DERAJAD DEASETILASI KITOSAN DAN pH PELARUTAN ENZIM TERHADAP KEMAMPUAN IMOBILISASI LIPASE PADA KITOSAN SERBUK

Fandhi Adi Wardoyo

Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
email: fandhiadi@yahoo.co.id

ABSTRACT

Immobilization of lipase on chitosan powder was performed. The aim of this research is to determine the optimum conditions for the immobilization process. Chitosan was prepared from crab shell through continuous deacetylation, and crosslinked with glutaraldehyde. Immobilization of lipase on chitosan powder was studied under the optimum conditions e.i. pH optimum of lipase solubility and deacetylation degree of chitosan. Immobilized lipase on chitosan powder was tested for the activity through the hydrolysis reaction of palm oil. Continuous deacetylation produced chitosans A, B and C with deacetylation degrees of 81.34% , 90.23%, and 92.80%, respectively. The optimum pH for enzyme dissolution was obtained at pH 6. Optimum efficiency of immobilization on chitosans A, B, and C, were 47.67; 40.74 and 38.76%, respectively. Specific activity of free lipase, immobilized lipase on chitosan A, immobilized lipase on chitosan B and immobilized lipase on chitosan C were 23.94; 0.0435; 0.0178; and 0.0175 U/g, respectively.

Keywords: lipase, immobilization, chitosan, cross linking

PENDAHULUAN

Seiring dengan kemajuan bidang bioteknologi dan industri, berbagai upaya dilakukan untuk memanfaatkan proses-proses enzimatik. Enzim (dalam hal ini enzim lipase) mempunyai sifat yang potensial untuk dimanfaatkan, antara lain daya katalitiknya yang besar dan spesifitasnya terhadap substrat dari reaksi yang dikatalisisnya (Lehninger, 1999). Dibalik semua kelebihan yang dimiliki enzim, terdapat beberapa kelemahan dalam penggunaannya di bidang industri, yaitu harganya yang mahal, membutuhkan kondisi optimum agar dapat bekerja maksimal, mudah terpengaruh kondisi lingkungan, hanya larut pada pelarut tertentu dan cenderung sulit dipisahkan di akhir reaksi sehingga tidak bisa digunakan kembali (Krajewska, 2004).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, salah satu solusi yang dapat dilakukan adalah dengan cara imobilisasi enzim lipase. Dengan melekatkan lipase pada padatan pendukung, diharapkan enzim menjadi lebih kuat, tahan terhadap perubahan kondisi reaksi sehingga dapat digunakan berulang dan dapat meningkatkan hasil reaksi (Balcao *et al.*, 1996).

Kitosan menarik untuk digunakan sebagai padatan pendukung karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun, tidak berbahaya serta mempunyai gugus fungsi yang memungkinkan untuk berikatan silang dengan enzim. Metode imobilisasi yang akan digunakan adalah metode taut silang (*cross linking*). Metode ini memiliki kelebihan yaitu ikatan antara enzim dan padatan pendukung stabil sehingga enzim tidak mudah terlepas dan substrat dapat berinteraksi maksimal karena enzim berada di permukaan padatan pendukung (Brena *et al.*, 2006).

Berdasarkan hal yang telah diuraikan tersebut, menarik untuk mempelajari mengenai imobilisasi enzim lipase pada padatan pendukung kitosan dengan metode taut silang, sehingga dapat meningkatkan efisiensi imobilisasi enzim lipase. Efektivitas imobilisasi diamati dengan reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit.

METODE

Alat

Seperangkat alat gelas (Pyrex), botol Falcon 50 mL, alat *grinding*, *magnetic stirrer*, seperangkat alat refluks, ayakan 250 *mesh*, penyaring Buchner, *hot plate* (Ishtar Hitzstir), corong gelas, buret, mikropipet (10-200 μ L), timbangan digital (Shimadzu Libror EB-330), oven (WTB Binder), pH meter, almari es (*freezer*), desikator, Fourier Transform Infrared

Spectofotometer (FTIR Prestige-21), Elisa reader, mikroplate, *Shaker Inkubator* (Seiwa RikoCo, Ltd, EFM-60).

Bahan

Minyak kelapa sawit (Bimoli spesial), cangkang kepiting, enzim lipase pankreas babi (Merck), kertas saing *Whatman* 41, kertas indikator pH, akuades, bahan dari Merck berkualitas p.a yaitu: BF₃ dalam metanol, n-heksana, etanol. Asam klorida (HCl), natrium monohidrogen fosfat (Na₂HPO₄·2H₂O), natrium dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄·H₂O), natrium hidroksida (NaOH), tembaga II sulfat (CuSO₄·5H₂O), kalium natrium tartrat (KNaC₄H₄O₆·4H₂O), indikator phenolphthalein, bovin serum albumin (BSA), dan glutaraldehida.

Metode

Isolasi kitin dan kitosan

Isolasi kitin dilakukan melalui tahap deproteinasi dan demineralisasi. Proses deproteinasi dilakukan dengan cara merefluks 50 gram serbuk cangkang kepiting dengan 500 mL NaOH 4% (b/v) selama 2 jam pada suhu 65 °C. Hasil dari refluks lalu disaring dan dicuci dengan akuades sampai pH pencucian netral dan dikeringkan dengan oven. Setelah proses deproteinasi dilanjutkan dengan proses demineralisasi yaitu residu ditambah HCl 1M dengan perbandingan 1:15 diaduk pada suhu kamar selama 3 jam. Selanjutnya campuran disaring dan dicuci dengan akuades sampai pH pencucian netral. Residu pencucian lalu dioven, dan selanjutnya disebut dengan kitin.

Pembuatan kitosan dilakukan melalui proses deasetilasi. Sebanyak 50 gram kitin direfluks dengan NaOH 50% (b/v) dengan perbandingan 1:10 pada suhu 100 °C selama 1 jam. Hasil refluks didinginkan dan disaring hingga pH pencucian netral. Residu lalu dioven dan diperoleh kitosan yang selanjutnya akan dikarakterisasi. Proses deasetilasi dilakukan tiga kali untuk mendapatkan kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda.

Pengukuran konsentrasi protein

Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan Bovin Serum Albumin (BSA) dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing variasi konsentrasi larutan diambil 100 µL dan ditambah dengan 160 µL biuret lalu dibaca absorbansinya pada λ 550 nm menggunakan elisa reader. Sebagai blangko digunakan campuran 100 µL akuades ditambah 160 µL biuret. Hasil absorbansi larutan standar digunakan untuk membuat kurva baku (absorbansi vs konsentrasi).

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan cara 100 µL larutan protein ditambah 160 µL reagen biuret kemudian dianalisis dengan elisa reader. Konsentrasi protein sampel didapatkan dengan memasukkan data absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar.

Uji aktivitas enzim lipase

Sebanyak 1 gram minyak kelapa sawit dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 10 µL akuades lalu ditambah n-heksan hingga tanda batas. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam botol falcon 50 mL dan ditambahkan 150 mg enzim lipase bebas. Larutan diaduk dalam shaker inkubator selama 5 jam pada suhu 37 °C. Untuk kontrol reaksi digunakan minyak kelapa sawit tanpa ditambah enzim lipase dengan prosedur yang sama. Hasil reaksi disaring lalu filtrat ditambah 10 mL etanol dan 2-3 tetes indikator pp. Aktivitas enzim lipase diukur melalui penentuan asam lemak bebas yang terbentuk menggunakan larutan NaOH 0,05 M. Perhitungan unit aktivitas dan aktivitas spesifik menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ FFA} = \frac{\text{EM minyak} \times \text{M NaOH} \times \text{volume NaOH}}{\text{berat minyak}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Unit Aktivitas (U)} = \frac{\text{volume NaOH} \times \text{M NaOH}}{\text{waktu reaksi}} \quad (2)$$

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{unit aktivitas}}{\text{berat enzim}} \quad (3)$$

Imobilisasi enzim lipase

Prosedur imobilisasi secara umum adalah dengan cara sebanyak satu gram kitosan serbuk dimasukkan dalam botol falcon 50 mL lalu ditambah dengan larutan glutaraldehida 0,75%. Campuran didiamkan selama 10 menit kemudian disaring.

Kitosan ini lalu ditambah dengan larutan enzim lipase 1% dan didiamkan selama satu jam, kemudian disaring dan didapatkanlah enzim terimobilisasi pada kitosan serbuk serta sisa

larutan enzim. Filtrat yang dihasilkan diukur kadar proteinnya dengan elisa reader. jumlah enzim lipase terimobilisasi merupakan hasil pengurangan jumlah enzim awal dikurangi jumlah enzim sisa.

$$\% \text{ enzim terimobilisasi} = \frac{\text{jumlah enzim terimobilisasi (mg)}}{\text{jumlah enzim awal (mg)}} \times 100\% \quad (4)$$

Dalam imobilisasi dilakukan variasi pH terhadap kelarutan enzim dan jumlah enzim terimobilisasi. Enzim lipase bebas terlebih dahulu dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH antara lain 5, 6, 7, 8 dan 9

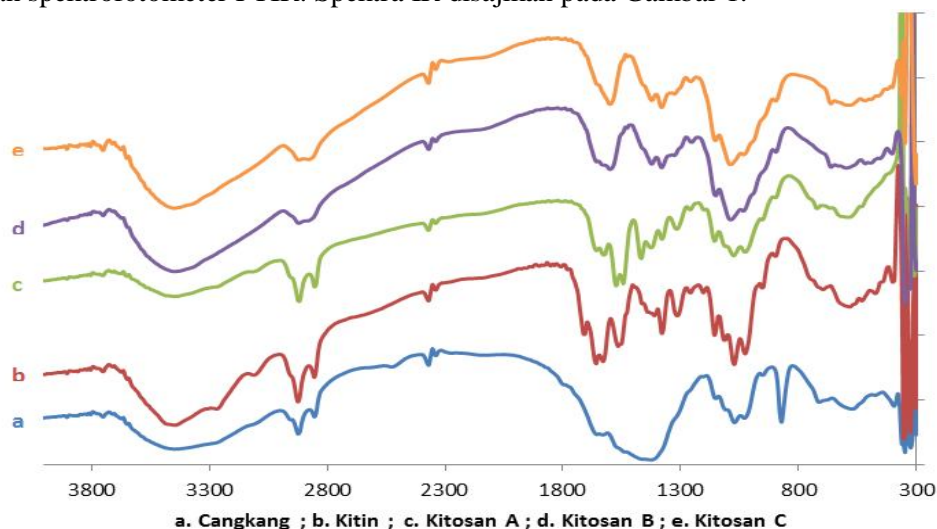
Uji aktivitas enzim lipase terimobilisasi

Uji aktivitas enzim lipase yang telah terimobilisasi dilakukan melalui reaksi hidrolisis. Metode yang digunakan sama dengan metode uji aktivitas enzim lipase bebas. Namun enzim lipase bebas diganti dengan enzim lipase yang telah terimobilisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Kitosan

Proses pembuatan kitosan dilakukan melalui tiga tahap, yaitu deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi. Proses deproteinasi menggunakan basa kuat (NaOH) untuk memutuskan ikatan kovalen antara kitin dengan protein. Proses demineralisasi menggunakan asam kuat (HCl) untuk melarutkan mineral-mineral yang terdapat dalam kitin. Proses deasetilasi dilakukan dengan cara merefluks kitin dengan NaOH 50% selama 1 jam pada suhu 100 °C, dan didapatkanlah kitosan. Kitosan yang didapat lalu dilakukan deasetilasi ulang sebanyak 2 kali, sehingga didapatkanlah kitosan A, B dan C. Untuk menganalisis gugus fungsi dari cangkang kepiting, kitin dan kitosan digunakan spektrofotometer FTIR. Spektra IR disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektra IR cangkang kepiting, kitin dan kitosan

Berdasarkan spektra IR tersebut terdapat perbedaan antara spektra serbuk cangkang kepiting dengan kitin, dilihat dari puncak serapan yang muncul pada masing-masing spektra sebagai berikut:

1. Hilangnya serapan pada bilangan gelombang 871 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur Si-C yang menunjukkan hilangnya mineral silika akibat perlakuan basa NaOH (Sanjaya dan Yuanita, 2007).
2. Hilangnya serapan pada bilangan gelombang 1427 cm^{-1} sebagai akibat dari larutnya logam yang terikat pada gugus peptida (Cahyaningrum, 2009).
3. Munculnya serapan pada bilangan gelombang 1566 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi tekuk -N-H pada amida (Puspawati dan Simpen, 2010). Serapan pada bilangan gelombang ini juga merupakan ciri khas dari kitin yaitu adanya gugus -NH dalam -NH-CO (Sugiyo *et al.*, 2001)
4. Munculnya serapan pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O pada amida (Azhar *et al.*, 2010)

Pada spektra FTIR kitosan, baik kitosan A, kitosan B maupun kitosan C, pita serapan yang muncul hampir sama dengan spektra FTIR pada kitin, hanya intensitasnya yang berbeda, terutama pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} kitosan yang intensitasnya lebih sedikit dibandingkan kitin. Hal ini dikarenakan sudah banyak gugus karbonil yang hilang akibat deasetilasi.

Hasil dari spektra IR digunakan untuk menghitung derajat deasetilasi kitosan. Menurut perhitungan menggunakan baseline B, derajat deasetilasi yang didapatkan untuk kitosan A, B dan C berturut-turut sebesar 81,34; 90,23 dan 92,8%. Semakin banyak proses deasetilasi, maka derajat deasetilasi kitosan juga semakin meningkat, karena semakin banyak gugus asetil yang dapat dihilangkan.

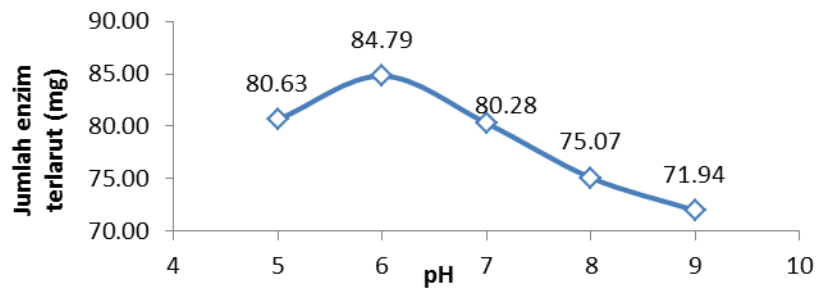
Aktivitas hidrolisis enzim lipase bebas

Enzim lipase bebas terlebih dahulu diuji aktivitasnya melalui reaksi hidrolisis. Hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah enzim lipase bebas yang akan dipakai masih mempunyai aktivitas hidrolisis atau tidak. Hidrolisis minyak dengan enzim lipase bebas menghasilkan FFA sebanyak 85,41%, sedangkan hidrolisis minyak tanpa menggunakan enzim lipase menghasilkan FFA sebanyak 1,38%

Dari reaksi hidrolisis terlihat bahwa enzim lipase yang digunakan masih mempunyai aktivitas katalitik. Asam lemak bebas yang terbentuk dari reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit menggunakan enzim lipase bebas jauh lebih banyak daripada hasil hidrolisis minyak kelapa sawit tanpa menggunakan enzim lipase. Dari hasil hidrolisis tersebut dapat dihitung aktivitas spesifik enzim lipase bebas, yaitu sebesar 23,94 U/g.

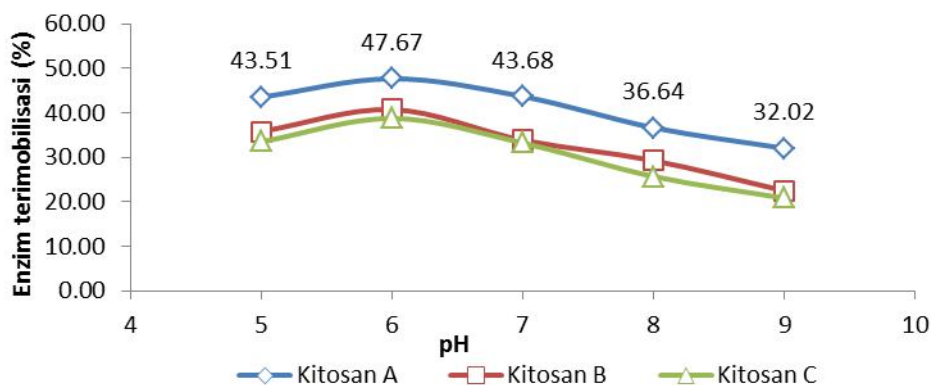
Pengaruh pH pelarutan enzim terhadap efisiensi imobilisasi

Tahap awal dalam proses imobilisasi enzim lipase adalah pembuatan larutan enzim lipase menggunakan buffer fosfat. Buffer fosfat ini berfungsi untuk melarutkan enzim lipase. Semakin banyak enzim yang dapat larut, maka semakin banyak pula enzim yang akan terimobilisasi. Hasil kelarutan enzim lipase dalam buffer fosfat disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap jumlah enzim terlarut

Gambar 2 menunjukkan bahwa jumlah enzim lipase terlarut paling banyak dalam buffer fosfat pH 6. Semakin banyak enzim lipase yang terlarut maka akan semakin banyak pula enzim lipase yang terimobilisasi dalam kitosan serbuk. Hal ini sesuai dengan data dalam Gambar 3 sebagai berikut:



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap efisiensi imobilisasi

Dari Gambar 3, terlihat bahwa enzim lipase terimobilisasi paling banyak pada pH 6 baik untuk kitosan A, B maupun C.

Pada pH rendah, medium kaya akan ion H^+ sehingga gugus $-NH_2$ pada kitosan akan menjadi NH_3^+ . Hal inilah yang menyebabkan enzim terimobilisasi menjadi rendah. Namun ketika pH terlampaui tinggi, jumlah enzim terimobilisasi justru semakin menurun. Hal ini dikarenakan enzim akan terdeaktivasi pada pH yang tinggi sehingga jumlah enzim terimobilisasi menjadi rendah. pH optimum akan menyebabkan penutup sisi aktif (lid) pada sisi aktif enzim lebih mudah terbuka sehingga ikatan silang yang terbentuk akan semakin banyak dan jumlah enzim terimobilisasi menjadi semakin banyak (Maruyama, 2000).

Aktifitas hidrolisis enzim lipase terimobilisasi

Aktivitas enzim lipase terimobilisasi diuji dengan menggunakan reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit. Tujuannya adalah untuk mengetahui seberapa besar aktivitas dari enzim lipase hasil imobilisasi. Untuk kontrol reaksi digunakan enzim lipase bebas. Hasil dari reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit ditunjukkan pada Tabel 1.

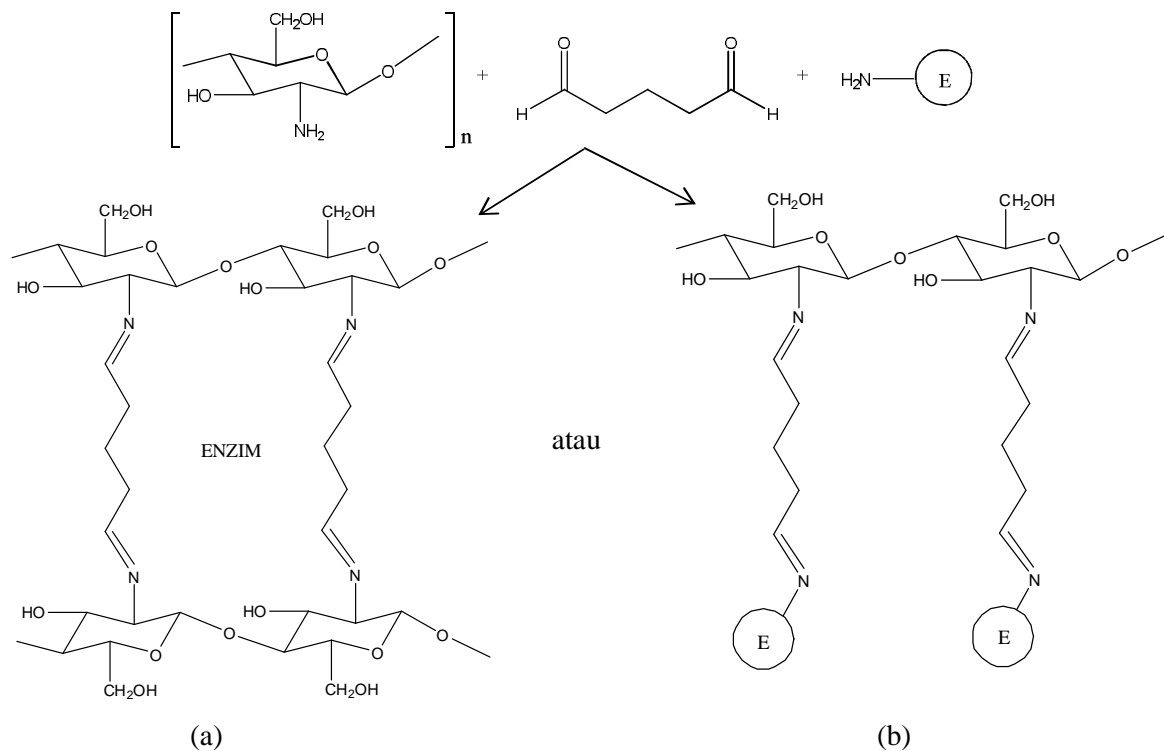
Tabel 1. Aktivitas enzim lipase terimobilisasi dalam reaksi hidrolisis

Sampel	Nilai FFA (%)	Aktivitas (U) ($\mu\text{mol}/\text{menit}$)	Jumlah enzim terimobilisasi (mg)	Aktifitas spesifik (U/g)
Enzim lipase bebas	85,41	3,59		23,94
Enzim lipase terimobilisasi pada kitosan A	43,60	0,00176	40,42	0,0435
Enzim lipase terimobilisasi pada kitosan B	12,88	0,00052	34,68	0,0178
Enzim lipase terimobilisasi pada kitosan C	11,29	0,00046	31,82	0,0175

Pada hidrolisis minyak kelapa sawit menggunakan enzim lipase akan dihasilkan asam lemak bebas (FFA) yang nilainya sebanding dengan aktivitas enzim lipase. Dari data Tabel 1 menunjukkan bahwa enzim lipase terimobilisasi mampu mempertahankan aktivitas katalitiknya meskipun terlihat bahwa enzim lipase bebas mempunyai aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan enzim lipase terimobilisasi. Aktivitas enzim lipase terimobilisasi pada kitosan lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas enzim lipase bebas dikarenakan adanya hambatan-hambatan apabila enzim berada dalam bentuk imobil. Hambatan-hambatan tersebut antara lain:

1. Sifat fisika kimia enzim lipase dalam bentuk imobil fase barunya berbeda dengan fase pada saat masih enzim lipase bebas. (Ferdiansyah, 2005).
2. Perubahan konformasi karena reaksi asam amino dengan senyawa pengikat silang atau padatan pendukung yang ditambahkan (Suhartono, 1989).
3. Glutaraldehid dapat bereaksi dengan ion alkoksida pada serin yang merupakan sisi aktif enzim. Hal ini dapat menghambat aktivitas enzim karena sisi aktifnya menjadi berkurang.
4. Enzim lipase terimobilisasi fleksibilitasnya menjadi berkurang, karena diikat oleh kitosan dan glutaraldehid.

Perbedaan derajat deasetilasi yang berbeda menggambarkan jumlah gugus $-NH_2$ yang berbeda sehingga dibutuhkan glutaraldehid dengan jumlah tertentu untuk dapat mengait silangkan kitosan sebagai padatan pendukung dengan enzim. Interaksi antara glutaraldehid dengan kitosan dan enzim dapat terjadi melalui dua kemungkinan seperti yang digambarkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Interaksi kitosan, glutaraldehida dan enzim

Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, menunjukkan semakin banyaknya gugus -NH_2 yang dimiliki. Jika kitosan mempunyai banyak gugus -NH_2 , maka akan semakin banyak pula glutaraldehida dan enzim yang terikat silang pada kitosan. Namun gugus -NH_2 kitosan yang terlalu banyak dapat mengganggu proses taut silang. Hal ini dikarenakan gugus -NH_2 kitosan dapat berkompetisi dengan gugus -NH_2 dari enzim. Pada penelitian ini kondisi derajat deasetilasi optimum didapatkan pada kitosan A dengan derajat deasetilasi 81,34%.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa enzim lipase mempunyai kelarutan paling tinggi pada pH 6, sehingga pada pH 6 enzim lipase yang terimobilisasi pada kitosan serbuk semakin banyak. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan serbuk, jumlah enzim lipase terimobilisasi justru semakin sedikit, sehingga jumlah asam lemak bebas yang dihasilkan dalam reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit juga semakin sedikit. Derajat deasetilasi optimum kitosan serbuk untuk imobilisasi enzim dalam penelitian ini adalah pada derajat deasetilasi 81,34%.

Saran

Dalam penelitian ini masih banyak hal-hal yang perlu diperbaiki, antara lain perlu dilakukan optimasi jumlah glutaraldehida yang digunakan, dan juga kestabilan enzim lipase terimobilisasi baik kestabilan termal maupun kestabilan penggunaan berulangannya, sehingga dapat dihasilkan biokatalis dengan aktifitas yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Azhar, M., Effendi, J., Syafyeni, E., Lesi, R.M., dan Novalina, S., 2010, Pengaruh Konsentrasi NaOH dan KOH terhadap Derajat Deasetilasi Kitin dari Limbah Kulit Udang, *EKSAKTA*, 1, 1-8
- Balcao, V. M., Paiva, A. L., and Malcanta, F. X., 1996, Bioreactors With Immobilized Lipases: State of the Art, *Enz. Microb. Technology*, 18, 392-416.
- Brena, B.M., dan Batista-Viera, F., 2006, *Immobilization of Enzymes*, Humana Press, Spanyol
- Cahyaningrum Sari Edi, 2009, Peranan Jembatan Kation Logam Dalam Imobilisasi Papain Pada Kitosan, *Disertasi*, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta
- Ferdiansyah, V., 2005, Pemanfaatan Kitosan dari Cangkang Udang Sebagai Matriks Penyangga pada Imobilisasi Enzim Protease, *Skripsi*, Fak. Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor.

- Krajewska, B., 2004, Application of Chitin and Chitosan based Materials for Enzyme Immobilizations: a Review, *Enz Microb. Technol.*, 35, 126-139
- Lehninger, A.L. 1990, *Dasar-dasar Biokimia* (diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaya), *Edisi I*, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., dan Seki, M., 2000, Oil-Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 1121-1126
- Sanjaya, I., dan Yuanita, L., 2007, Adsorpsi Pb (II) oleh Kitosan Hasil Isolasi Kitin Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla sp*), *Jurnal Ilmu Dasar*, 8 (91), 30-36
- Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sugiyono Warlan, Narsito, and Santoso, S.J., 2001, Sifat Fisikokimia Adsorpsi Cd(III) dan Ni(II) pada Adsorben Cangkang Kepiting darah (*Scylla serrata*), *Prosiding Seminar Nasional Kimia IX*, 21 Mei 2001.