

## OPTIMASI AMOBILISASI UREASE DARI *Schizosaccharomyces pombe* MENGUNAKAN MATRIK KITOSAN-POLIETILEN GLIKOL

Hastini Artha Dewi, 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

*Schizosaccharomyces pombe* merupakan kapang penghasil urease dan merupakan enzim ekstraseluler. Urease dapat menghidrolisis urea menjadi ammonia dan karbondioksida. Urease bebas tidak dapat digunakan lebih dari satu kali pemakaian, sehingga perlu dilakukan amobilisasi agar dapat digunakan secara berulang. Penelitian ini digunakan untuk menentukan kondisi optimum dari konsentrasi kitosan dan konsentrasi enzim. Urease diamobilisasi menggunakan metode penjebakan dengan menggunakan matrik kitosan-polietilen glikol dengan memvariasi konsentrasi kitosan (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) % (w/v) dan memvariasi konsentrasi urease (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg/mL. 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 kitosan 3% dan konsentrasi urease pada 2,520 mg/mL dan dapat menjebak urease sebanyak 2,36 mg/gram matrik kitosan-polietilen glikol dengan aktivitas sebesar 0,53 Unit.

**Kata kunci:** aktivitas, kitosan-polietilen glikol, *Schizosaccharomyces pombe*, urease

### ABSTRACT

*Schizosaccharomyces pombe* is yeast that production urease and extraceluller enzyme. Urease can hydrolyze urea to be ammonia and carbondioxide. Free urease is unable to be reused, therefore urease is needed to immobilized in certain matrix. This research studies to determine optimum condition from chitosan concentration and enzyme concentration. Urease was immobilized by entrapment method using matrix chitosan-polyethylene glycol with make a variation to chitosan concentration (1.5; 2; 2.5; 3; 3.5) % (w/v) and make a variation to urease concentration (0.840; 1.680; 2.520; 3.360; 4.200) mg/mL. Enzyme activity was defined as the amount of mikromol ammonia per minute, and resulted ammonia was analyzed by Nessler method. The results showed that the optimum condition of immobilization uerase is achieved on chitosan concentration 3% (w/v) and urease concentration of 2.52 mg/mL and urease yielding in 2.36 mg/gram matrix chitosan-polyethylene glycol within the activity of 0.53 Units.

**Key words:** activity, chitosan-polyethylene glycol, *Schizosaccharomyces pombe*, urease

### PENDAHULUAN

Enzim merupakan senyawa organik bermolekul besar yang berfungsi untuk mempercepat jalannya reaksi metabolisme tanpa mempengaruhi keseimbangan reaksi [1]. Urea dibuat dengan cara mereaksikan ammonia dan karbondioksida. Urea merupakan sumber amoniak dari senyawa spesifik, kandungan urea yang tinggi akan diubah menjadi basa oleh aktivitas bakteri [2]. Urease dapat disintesis dari beraneka ragam organisme, salah satu

contohnya *Schizzosaccharomyces pombe* [3]. Penggunaan enzim bebas dalam reaksi memiliki beberapa kelemahan misalnya bersifat tidak stabil dan enzim sulit dipisahkan dari substrat dan produknya [4].

Saat ini penggunaan enzim amobilisasi memperoleh perhatian besar karena amobilisasi membuat enzim menjadi stabil dan lebih mudah dipisahkan dari campuran pada akhir reaksi untuk reaksi selanjutnya [5]. Salah satu bahan organik yang dapat digunakan adalah polietilen glikol. Enzim yang pernah diamobilisasi pada polietilen glikol antara lain glukose, oksidase, peroxidase, tripsin dan lipase [6]. Penggunaan polietilen glikol memungkinkan enzim teramobil secara adsorpsi fisik, tidak bereaksi (*inert*) terhadap substrat yang digunakan. Selain itu stabilitas enzim akan menjadi tinggi karena polietilen glikol dan t-butanol sebagai media esterifikasi memiliki kepolaran yang sama. Beberapa studi terdahulu menunjukkan bahwa membran kitosan murni merupakan membran tidak berpori (*non-porous*) yang terlihat dari hasil pengukuran dengan *scanning electron microscope* (SEM) [7]. Kitosan merupakan suatu biopolimer yang mampu berikatan silang dengan gluteraldehid sehingga dapat dibentuk menjadi membran berpori [8].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum amobilisasi urease dari *Schizzosaccharomyces pombe* menggunakan matrik kitosan-polietilen glikol yang meliputi konsentrasi larutan kitosan optimum dan konsentrasi enzim optimum.

## **METODA PENELITIAN**

### **Bahan dan Alat**

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni ragi/yeast *Schizzosaccharomyces pombe* yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Bahan-bahan yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology*. Bahan-bahan tersebut antara lain : agar, kentang, dekstrosa, buffer asetat, urea, buffer fosfat, pepton, trikloroasetat, Asam Asetat glasial ( $\text{bj}=1,05 \text{ g/cm}^3$ ) (Merck),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , HCl (37% (w/w),  $\text{bj}=1,19 \text{ g/cm}^3$ ),  $\text{BaCl}_2$ , NaCl, NaOH,  $\text{NaCO}_3$ , EDTA, polietilen glikol, kitosan,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , reagen Nessler, kasein dan akuades.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, jarum ose, *magnetic stirrer*, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), inkubator (Heracus tipe B 50 Memmert), pH meter (schott-gerate tipe CG-820), penangas listrik (Janke-Kunkel), autoklaf (All American Model 20X), oven (Memmert), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), *sentrifuse*

dingin (Denley), kuvet, *Spectronic-20* (Bausch & Lomb), kertas saring halus, aluminium foil, kapas steril, *syringe*, kertas saring *Whatman* No.40, kantong selofan dan Bunsen.

## **Prosedur**

### **Preparasi urease**

Inokulum yang mengandung *schizosaccharomyces pombe* diambil 15 mL kemudian ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur kamar lalu diletakkan diatas *shaker* dan dikocok dengan kecepatan putar 175 rpm pada temperatur ruang selama 2 hari. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL buffer asetat pH 5,5 ke dalam media hasil fermentasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan putar 3000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar urease, kemudian dilakukan uji aktivitas menggunakan reagen nessler dan diuji pula kadar protein enzim menggunakan reagen biuret. Ekstrak kasar urease dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat 30–45% dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan.

### **Uji kadar protein**

Penentuan kadar protein dilakukan dengan cara memipet 2 mL enzim, lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, lalu ditambah 2 mL buffer fosfat pH 7 kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruang. Selanjutnya diukur absorbansi dari larutan campuran yang telah diperoleh pada panjang gelombang 536 nm. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades, 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer fosfat pH 7, selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas. Kadar protein dapat diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu  $y=0,00004x$ . Kurva baku dibuat dengan mengukur absorbansi kasein pada konsentrasi 1000–9000 ppm.

### **Penentuan aktivitas urease**

Penentuan aktivitas urease dilakukan dengan cara mereaksikan 5 mL larutan urea 0,2 mM lalu ditambah 1 mL urease, kemudian ditambah 1 mL buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada temperatur 45°C. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  untuk menghentikan hidrolisis. Lalu, disentrifugasi selama 15 menit. Ammonia hasil hidrolisis/supernatan diambil 10 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok sampai homogen. Larutan dipipet 10 mL, dipindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,2 mL reagen Nessler dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara ammonia dan reagen Nessler menggunakan spektronik Genesys 20 pada panjang gelombang 400 nm. Nilai

absorbansi yang diperoleh dikonversikan pada persamaan kurva standar ( $y=0,1569x$ ) sehingga dapat diketahui besarnya konsentrasi ammonia hasil hidrolisis urea yang dikatalis dengan urease. Kurva baku dibuat dari pengukuran absorbansi larutan ammonia dengan konsentrasi 1-4 ppm.

Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai  $1\mu\text{mol}$  ammonia yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas enzim amobil diartikan sebagai  $1\mu\text{g}$  ammonia yang dihasilkan per menit per gram enzim amobil.

### **Amobilisasi urease dengan kitosan-polietilen glikol**

#### **Penentuan konsentrasi kitosan optimum saat amobilisasi urease**

Amobilisasi urease dengan kitosan-polietilen glikol dibuat dengan cara mencampurkan larutan kitosan berbagai konsentrasi (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5)% (w/v) sebanyak 4 mL dengan larutan enzim urease sebanyak 1 mL. Campuran enzim urease dan larutan kitosan diteteskan pada 10 mL larutan polietilen glikol. Manik – manik dibiarkan terendam dalam larutan polietilen glikol selama satu jam, kemudian disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan endapan. Kemudian, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya dan urease amobil yang diperoleh diuji aktivitasnya.

#### **Penentuan konsentrasi urease optimum saat amobilisasi urease**

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi urease dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi optimum kitosan yang hasilnya diperoleh dari tahapan sebelumnya. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim urease hasil pemurnian yang dipipet yaitu (0,2 : 0,4 : 0,6 : 0,8 : 1) mL dan ditambahkan larutan buffer fosfat pH 7 hingga volumenya mencapai 1 mL. Kemudian, dibiarkan terendam selama satu jam di dalam 10 mL larutan polietilen glikol. Hasil preparasi disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Setelah itu, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya dan urease amobil yang diperoleh diuji aktivitasnya.

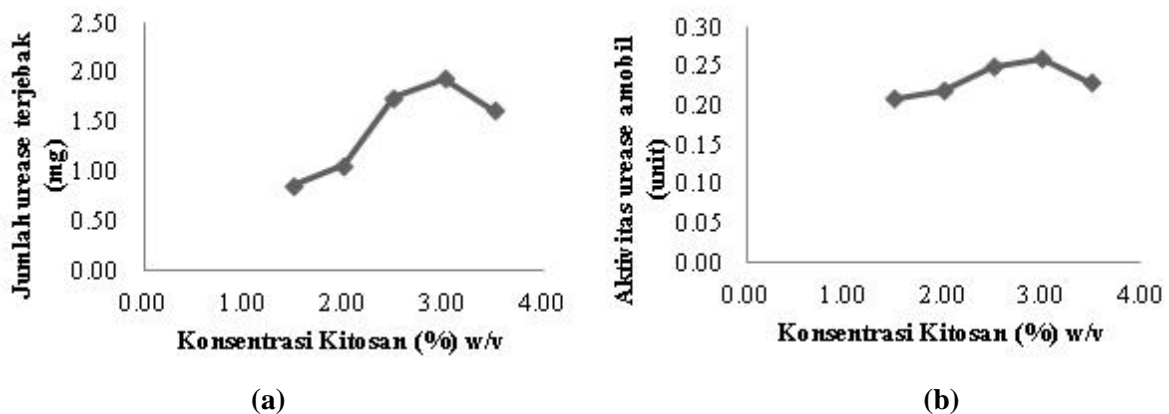
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan konsentrasi kitosan optimum amobilisasi urease**

Pada penelitian diperoleh kadar protein awal yang diuji dengan reagen Biuret dan diuji pula aktivitasnya menggunakan reagen Nessler. Kadar protein urease bebas setelah dilakukan pemurnian yaitu  $4,200\text{ mg/mL}$  dengan aktivitas urease bebas sebesar 0,37 Unit. Pada metode ini, enzim amobil dibuat dengan cara mencampurkan enzim dengan larutan kitosan dan

diteteskan ke dalam larutan polietilen glikol menggunakan *syringe*. Penetasan larutan campuran menggunakan *syringe* bertujuan agar terbentuk manik–manik. Manik yang terbentuk selanjutnya dibiarkan terendam selama satu jam dalam larutan polietilen glikol supaya manik-manik menjadi padat.

Kitosan merupakan senyawa yang berbentuk polimer rantai panjang dari glukosamin dengan rumus kimia (2-amino-2-dioksi- $\beta$ -D-glukosa). Kitosan juga merupakan suatu polimer multifungsi karena mengandung gugus fungsi yaitu gugus amina ( $-\text{NH}_2$ ) dan gugus hidroksil ( $-\text{OH}$ ) yang secara struktur kitosan sendiri mempunyai struktur yang serupa dengan selulosa, namun selulosa hanya memiliki gugus hidroksil ( $-\text{OH}$ ) saja. Adanya gugus fungsi ini menyebabkan kitosan mempunyai reaktifitas kimia yang tinggi dan menyebabkan sifat kitosan yang mudah dimodifikasi. N primer pada gugus amina ( $-\text{NH}_2$ ) pada kitosan dalam suasana asam akan mengakibatkan kitosan bersifat kationik (bermuatan positif).



**Gambar 1.** (a) Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah urease yang terjebak tiap 0,5 gram manik kitosan-polietilen glikol (b) Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas urease amobil pada manik kitosan-polietilen glikol.

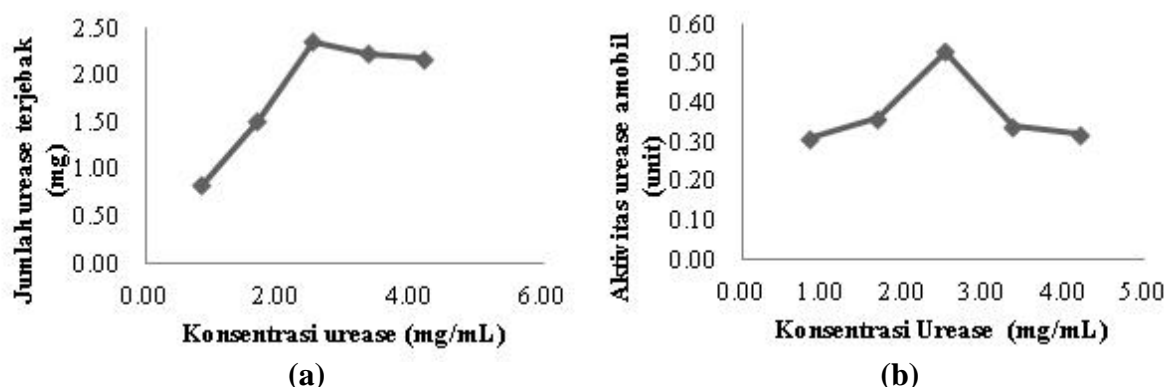
Berdasarkan hasil analisa yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa konsentrasi kitosan 3% merupakan konsentrasi kitosan optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 1,940 mg/gram manik Kitosan-polietilen glikol dengan aktivitas 0,26 Unit.

#### Penentuan konsentrasi urease optimum amobilisasi urease

Suatu reaksi enzimatik dipengaruhi oleh beberapa hal, salah satunya adalah konsentrasi enzim. Pada enzim yang telah teramobilkan, semakin tinggi konsentrasi enzim maka reaksi enzimatik menjadi semakin cepat hingga batas tertentu. Penentuan konsentrasi enzim

optimum dilakukan dengan lima variasi konsentrasi enzim pada saat amobilisasi yaitu (0,840; 1,680; 2,520; 3,360 dan 4,200) mg/mL. Metode yang digunakan pada penentuan konsentrasi enzim optimum sama dengan metode yang digunakan pada penentuan konsentrasi kitosan optimum.

Dalam hal ini konsentrasi kitosan yang digunakan yaitu kitosan 3% karena pada penelitian sebelumnya telah didapatkan konsentrasi optimum kitosan pada saat konsentrasi 3%. Pada keadaan ini enzim mengalami peningkatan dan setelah itu mengalami penurunan. Karena terdapatnya variasi dari konsentrasi enzim yang digunakan maka akan menyebabkan perbaikan stabilitas dari matrik sehingga fungsionalisasi gugus fungsi akan semakin kuat. Hal ini dapat menyebabkan pori kitosan semakin kuat untuk mengikat enzim, sehingga enzim akan semakin banyak terjebak. Setelah enzim mengalami kondisi optimum maka enzim akan mengalami penurunan, kemungkinan hal ini disebabkan karena perlakuan yang diberikan kepada enzim tidak maksimal atau mengalami penurunan.



**Gambar 2.** (a) Pengaruh konsentrasi urease terhadap jumlah urease yang terjebak tiap 0,5 gram manik kitosan-polietilen glikol (b) Pengaruh konsentrasi urease terhadap aktivitas urease amobil pada manik kitosan-polietilen glikol.

Berdasarkan hasil analisa yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa konsentrasi urease 2,520 mg/mL merupakan konsentrasi urease optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 2,250 mg/gram manik Kitosan-polietilen glikol dengan aktivitas 0,53 Unit.

## KESIMPULAN

Konsentrasi larutan kitosan dan konsentrasi urease berpengaruh terhadap jumlah urease yang terjebak dan aktivitas urease. Kondisi optimum amobilisasi urease didapat pada

konsentrasi larutan kitosan 3% dan konsentrasi urease 2,520 mg/mL dengan jumlah enzim terjebak yaitu 2,250 mg/gram kitosan-polietilen glikol dan aktivitas sebesar 0,53 Unit.

### **UCAPAN TERIMAKASIH**

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan yang diberikan oleh berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak Dr. Sasangka Prasetyawan, MS dan Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing I dan II, kedua orang tua dan keluarga serta teman-teman dan semua pihak yang mendukung selama penyusunan skripsi ini.

### **DAFTAR PUSTAKA**

1. Akhyasrinuki, 2009, *Definisi dan Fungsi Enzim*, Yogyakarta, Dani Offset, pp. 122,139.
2. Punit K. S., Arvind dan M. Srinivasah, 2001, Characterization of Gelatin-Immobilized Pigeonpea Urease and Preparation of a New Urea Biosensor, *India Chapman & Hall*, 53, pp. 175-181.
3. Goncalves dan Vanessa L., 2005, Immobilisasi Urease dalam Membran Polianilin, *Saintis*, 1, pp. 6-12.
4. Zuhra C. F., 2002, *Penyediaan Asam Eikosapentanoat (EPA) dan Asam Dokosaheksanoat (DHA) Melalui Transesterifikasi Minyak Ikan dengan Etanol yang Dikatalisis oleh Lipase*, Skripsi, Universitas Sumatera Utara, Sumatera Utara.
5. Masyithah dan Zuhrina, 2005, Pemodelan Numerik Reaksi Enzimatis Imobilisasi, *Media Publikasi Karya Ilmiah Teknik Kimia*, ISSN, 36, pp. 1412-7814.
6. Ngo T. T., J. Ivy dan H.M. Lenhoff, 2004, Polyethylene Beads as Supports for Enzyme Immobilization, *J. Biol chem.*, 2, pp. 240-247.
7. Gupta, Bhuvanesh dan Shalini S., 2011, Chitosan-polyethylene glycol Coated Cotton Membranes for Wound Dressings, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 36, pp. 272-280.
8. Zhang M., Li X. H., Gong Y. D. dan Zhang X. F., *Biomaterials*, *Poly. Adv. Tech*, 23, (2002), pp. 2641.