

Karakterisasi Enzim Komersial Siklodekstrin Glukanotransferase

Characterization of Commercial Enzyme Cyclodextrin Glukanotransferase

Elidar Naiola* dan Nunuk Widhyastuti

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI.Gd. Herbarium, Cibinong Science Center, Cibinong 16911
E-mail: camplong2003@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The objective of this study is to investigate the characteristic of commercial enzyme Cyclodextrin Glukanotrasferase (CGTase) from *Bacillus macerans*. The CGTase was purified by dialysis, gel filtration and ion exchange chromatography. Study on Characterization of the enzyme showed that the hydrolytic activity of CGTase was 480 U/mg, the optimum tempetature and pH for enzyme reaction were 45⁰C to 55⁰C and pH 5.0 to 8.0, respectively. The CGTase was relatively stable after heating at 55⁰C for 10 minutes, and maintained its activity at the pH 5.0 to 9.0. The enzyme activity was inhibited by the presence of 1 mM metal ions and cause CGTase lost approximately 40% of its activity. Among the metal ions it was found that Cu²⁺ was the strongest inhibitor, with presence of 1mM Cu²⁺ the residual activity of CGTase was 24.4%. Results of purification showed that Specific activities of the enzyme during purification were 269 U/mg (crude enzyme); 955 U/mg (dialysis); 481 U/mg (gel fitrations); and 544 U/mg (ion exchange chromatography).

Key words: Cyclodextrin Glukanotransferase, *Bacillus macerans*, purification, characterization

Diterima: 29 Januari 2008, disetujui: 17 April 2008

Pendahuluan

Siklodekstrin glukanotransferase (1,4- α -D-glukan 4- α -D-glukan(1,4-glukano)-transferase, siklik (CGTase) adalah suatu enzim yang memiliki aktivitas transglukosilasi atau dapat mentransfer gugus glikosil dari donor ke aseptor yang sesuai baik secara intermolekular maupun intramolekular. Disamping aktivitas transfer, CGTase juga memiliki kemampuan untuk menghidrolisis pati dan siklodekstrin menjadi senyawa yang lebih sederhana (Kometani *et al.*, 1996). Siklodekstrin merupakan suatu senyawa siklik homolog dari oligosakarida yang tersusun atas 6, 7 atau 8 gugus glikosil dengan ikatan α -1,4. Senyawa ini telah dimanfaatkan secara luas dalam industri, sebagai stabilisator, sebagai senyawa emulsifier, penghilang bau dan pengubah viskositas serbuk (Mori *et al.*, 1994). Untuk

meningkatkan solubilitas senyawa-senyawa flavonoid dilakukan dengan cara memindahkan suatu gugus tertentu dari senyawa donor pada senyawa flovonoid dengan bantuan enzim transferase (Kometani *et al.*, 1990).

Berdasarkan jenis produk utama yang dihasilkan melalui reaksi transglukosilasi intramolekular, CGTase digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu tipe yang dihasilkan *Bacillus macerans* yang menghasilkan α siklodekstrin, tipe yang dihasilkan *Bacillus megaterium* yang menghasilkan β siklodekstrin dan tipe yang dihasilkan *Bacillus* sp. yang menghasilkan γ siklodekstrin. Berat molekul CGTase dari *Bacillus subtilis* adalah 64.000, *Bacillus formis* adalah 75.000 dan *Brevibacterium* sp. adalah 75.000 (Mori *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari beberapa karakter dari enzim kasar siklodekstrin glukanotransferase

(CGTase) terutama kondisi optimum untuk reaksi enzimatisnya karena enzim CGTase banyak diaplikasikan dalam bentuk ekstrak kasar atau semi murni.

Metode Penelitian

Enzim

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah CGTase (Siklodekstrin Glukanotransferase) komersial yang dihasilkan oleh *Bacillus macerans*. Enzim ini masih merupakan “*crude*” atau enzim kasar yang diperoleh dari Jepang.

Pengukuran aktivitas hidrolitik CGTase

Aktivitas hidrolitik CGTase diuji dengan metoda yang digunakan oleh Mori *et al.*, 1994 dan Rashid *et al.*, 2002. Pada 0,5 ml substrat (1,5% pati terlarut dalam 0,1 M bufer Atkins & Pantin pH 9,0) ditambahkan 50 µl larutan enzim (yang diencerkan 10 kali dengan menggunakan 0,1 M bufer Atkins & Pantin pH 9,0) diinkubasikan pada suhu 40°C selama 30 menit. Kemudian pada larutan tersebut ditambahkan 5 ml 1 N HCl untuk menghentikan reaksi enzimatis, dan ditambahkan 5 ml larutan pewarna Iodine (0,005% Iod dalam 0,05% larutan KI). Selanjutnya dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang dapat menurunkan unit absorbansi sebanyak 0,5 pada panjang gelombang 660 nm.

Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas CGTase

Pengaruh suhu terhadap enzim CGTase diuji dengan cara mengukur aktivitas hidrolitik enzim pada berbagai suhu (30,35,40,45,50,55, 60, 65 dan 70°C) selama 30 menit. Stabilitas CGTase terhadap suhu diuji dengan cara menginkubasikan larutan enzim pada pada berbagai suhu (35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 dan 70°C) selama 10 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan enzim didinginkan dengan cepat pada permukaan es. Aktivitas enzim tersisa diukur pada kondisi standar pengujian aktivitas hidrolitik dan nilainya dinyatakan dalam persen

terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan (Sulistyo *et al.*, 2000).

Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas CGTase

Untuk melihat pengaruh pH terhadap aktivitas enzim, pengukuran aktivitas CGTase dilakukan menurut cara yang sama, tetapi pengujian dilakukan dalam 0,1 M larutan bufer pada berbagai pH. Larutan bufer yang digunakan adalah 0,1 M bufer Mc Ilvaine pH 3,0 – 7,0 dan 0,1 M bufer Atkins dan Pantin pH 8,0 – 11,0, selanjutnya ditambah dengan substrat (1,5% pati terlarut). Stabilitas CGTase terhadap pH diuji dengan cara menginkubasikan larutan enzim dalam 0,1 M larutan bufer pada berbagai pH selama 1 jam dan 24 jam pada suhu kamar. Selanjutnya, aktivitas enzim tersisa diukur pada kondisi standar pengujian aktivitas hidrolitik dan nilainya dinyatakan dalam persentase terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan (Sulistyo *et al.*, 2000).

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara menginkubasikan larutan enzim dalam 0,1 M bufer Atkins dan Pantin pH 8,0 yang mengandung 1 mM berbagai ion logam selama 10 menit. Senyawa logam yang digunakan adalah: AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CdCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeCl₃, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, SnCl₂, SrCl₂, ZnCl₂. Aktivitas enzim diukur pada kondisi standar pengujian aktivitas hidrolitik enzim dan nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan (Mori *et al.*, 1994).

Pemurnian CGTase

Pemurnian enzim CGTase dilakukan pertama kali dengan cara dialisis, yaitu cara sederhana yang umum dilakukan untuk pemurnian enzim (Deutcher, 1990). Larutan enzim hasil dialisis selanjutnya diikuti filtrasi gel dengan menggunakan matrik DEAE Sephadex A50. Tingkat kemurnian enzim serta aktivitas spesifiknya ditentukan (Trevor, 1991).

Dialisis

Larutan enzim CGTase kasar (produk komersial) didialisis dengan menggunakan membran dialisis yang memiliki *molecular weight cutoff* 14.000. Sebanyak 3-5 ml larutan enzim dimasukkan dalam membran dan didialisis dalam 500 mL bufer fosfat 0,05 M, pH 7,0 selama 24 jam pada suhu dingin yaitu sekitar 4°C (suhu dijaga tetap dingin untuk mencegah kerusakan enzim) menggunakan es yang diletakkan sekelilingnya. Penggantian bufer dilakukan sebanyak tiga kali masing-masing 500 ml.

Pemurnian enzim dengan filtrasi gel

Larutan enzim (5 ml) yang telah didialisis dilewatkan melalui kolom kromatografi (panjang 80 cm, diameter 1,5 cm) yang telah diisi dengan matriks Sephadex G100 yang sebelumnya telah diekuilibrasikan dengan larutan 0,05 M bufer fosfat pH 7,0. Protein enzim dielusi dengan larutan bufer yang sama pada kecepatan aliran 0,5 ml/menit. Setiap 3 ml hasil elusi ditampung dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Grafik pola elusi dibuat berdasarkan hasil pengukuran OD₂₈₀ dan aktivitas CGTase (Smith, 1990).

Pemurnian enzim dengan kromatografi pertukaran ion

Larutan enzim hasil pemurnian dengan filtrasi gel selanjutnya dilewatkan ke dalam kolom kromatografi yang berisi matriks DEAE Sephadex A 50 yang sudah diekuilibrasikan dengan 0,05 M larutan bufer fosfat pH 7,0. Untuk mengeluarkan protein atau senyawa lain yang tidak terikat oleh matriks, kolom dibilas dengan bufer yang sama (2x volume kolom), dan protein enzim yang diperkirakan terikat pada matriks dibilas dengan menggunakan gradien linier larutan 0,5 N NaCl dengan kecepatan aliran 0,5 ml/menit. Setiap 3 ml hasil elusi ditampung dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Pola elusi dibuat berdasarkan hasil pengukuran OD₂₈₀ dan aktivitas CGTase. Cara Pemurnian enzim dengan kromatografi penukar ion dilakukan menurut Smith (1990).

Penentuan kadar protein enzim

Protein enzim ditentukan menurut cara Bradford (1976).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengujian aktivitas hidrolitik CGTase menunjukkan bahwa CGTase komersial yang dihasilkan oleh *Bacillus macerans* mempunyai aktivitas 480 U/ml dengan aktivitas spesifik 269. Selanjutnya beberapa karakter dari enzim CGTase kasar ini diuji karena enzim CGTase banyak diaplikasikan dalam bentuk ekstrak kasar (*crude*), hasilnya ditunjukkan pada Gambar 1-4. Aktivitas enzim CGTase pada beberapa tahap pemurnian ditunjukkan pada Tabel 1.

Karakterisasi enzim

Pengaruh pH

Dari data pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa pada kondisi pH 3,0 dan pH 4,0 aktivitas enzim sangat rendah, yaitu masing-masing sebesar 3,125 U/ml dan 6,667 U/ml. Pada kisaran pH 5,0 – 8,0 aktivitas CGTase cukup tinggi yaitu berkisar antara 196,296 U/ml – 198,642 U/ml. Sejalan dengan peningkatan pH larutan dari 8,0 sampai 9,0 aktivitas enzim mengalami penurunan sampai pada pH 11,0 dan aktivitas enzim sudah tidak terdeteksi.

Pengukuran aktivitas enzim terhadap pH (Gambar 2) menunjukkan bahwa CGTase dari *Bacillus macerans* kelihatannya relatif stabil pada kisaran pH 5,0 – 9,0, aktivitas relatif enzim pada kisaran pH tersebut adalah sekitar 95%. Pada pH >9,0, atau <5,0 stabilitas enzim tersebut mulai menurun. Lamanya inkubasi pada berbagai pH juga berpengaruh terhadap stabilitas CGTase. Setelah enzim diinkubasikan selama 1 jam pada pH 3,0, pH 4,0 dan pH 11,0 masih terlihat adanya aktivitas enzim yang tersisa, bahkan enzim masih menyisakan sekitar 90% aktivitasnya setelah diinkubasikan pada pH 5,0 dan setelah diinkubasikan selama 24 jam pada pH tersebut enzim CGTase dari *Bacillus macerans* kehilangan seluruh aktivitasnya (Gambar 2).

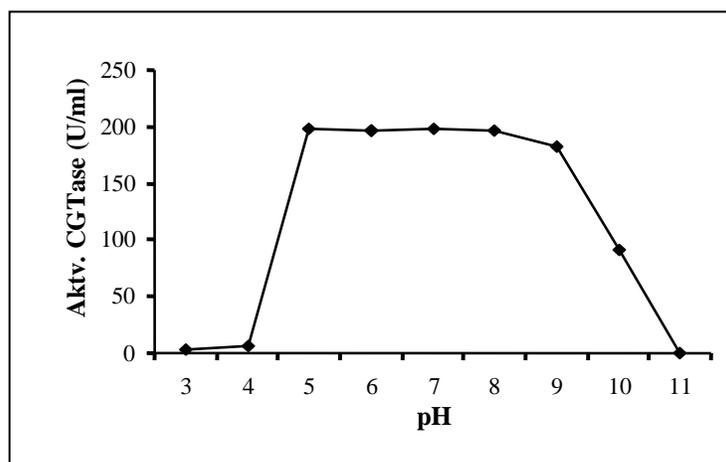
Terjadinya penurunan aktivitas enzim sebagai akibat perubahan pH tidak terlalu

besar. Menurut Palmer (1981), perubahan kondisi ion enzim dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi katalitik dalam mengikat substrat maupun pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kwarterner enzim yang aktif. Aktivitas enzim yang mengalami penurunan dapat dipulihkan kembali dengan mengembalikan kondisi reaksi enzimatis pada

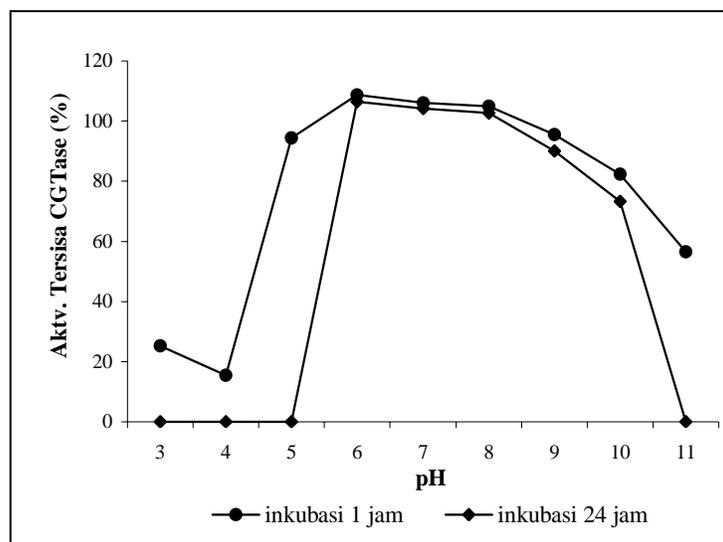
pH optimum. Pada pH yang sangat tinggi atau sangat rendah (pH ekstrim) akan menyebabkan perubahan muatan ion pada rantai samping sehingga mengakibatkan terjadinya denaturasi enzim yang disertai dengan hilangnya aktivitas katalitik enzim. Disamping itu, perubahan struktur tersier menyebabkan terjadi kontak kelompok hidrofobik dengan air sehingga solubilitas dan aktivitas enzim menurun.

Tabel 1. Aktivitas enzim CGTase dengan berbagai cara pemurnian

Tahapan purifikasi	Total volum (ml)	Kons. Protein (µg/mL)	Total protein (mg)	Aktiv. CGTase (U/mL)	Total aktiv. (Unit)	Aktiv. Spesifik (U/mg)	Hasil (%)
CGTase awal	3	1784	5,352	480	1440	269	100
Dialisis	5	286,6	1,433	273,6	1368	955	95
Filtrasi gel	57	4,37	0,249	2,1	269	481	8,3
Kromatografi pertukaran ion	40	19,87	0,745	10,8	119,7	544	30



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas CGTase



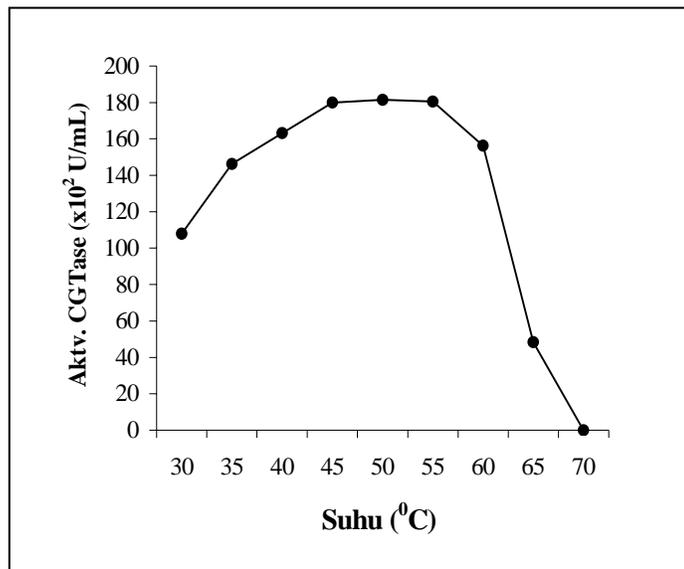
Gambar 2. Stabilitas CGTase terhadap pH

Pengaruh suhu

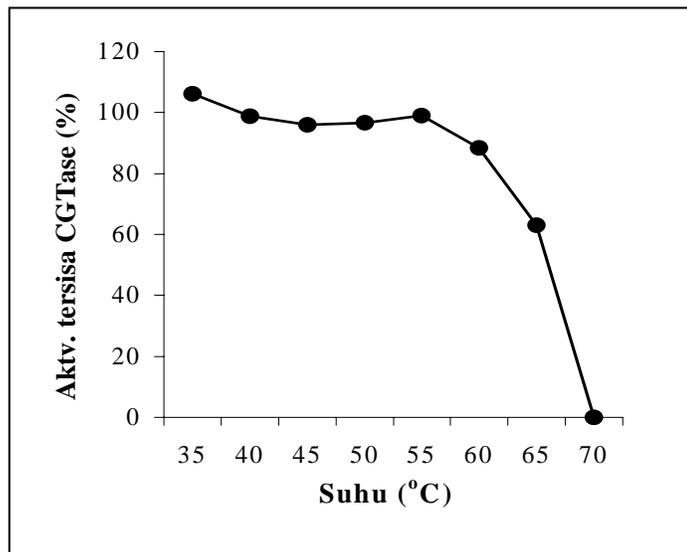
Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas CGTase dari *Bacillus macerans* dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4. Seiring dengan meningkatnya suhu reaksi sampai mencapai 50°C, aktivitas CGTase juga semakin meningkat. Selanjutnya aktivitas enzim mulai menurun meskipun suhu dinaikkan, dan pada suhu 70°C enzim CGTase kehilangan aktivitasnya. Aktivitas optimum CGTase adalah pada kisaran suhu 45°C – 55°C.

Tampaknya enzim CGTase dari *Bacillus macerans* merupakan enzim yang cukup stabil terhadap perlakuan pemanasan (Gambar 4).

Setelah enzim diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit, aktivitas enzim tersisa masih sekitar 88,4% dan pada suhu 60°C sekitar 60%. Menurut Harper *et al.*, (1984), terjadinya peningkatan aktivitas enzim dibawah suhu optimum disebabkan oleh meningkatnya energi kinetika dari molekul-molekul yang bereaksi (meningkatnya frekuensi tumbukan) sebagai akibat kenaikan suhu reaksi.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas CGTase



Gambar 4. Stabilitas CGTase terhadap suhu

Terjadinya penurunan aktivitas enzim pada keadaan diatas suhu optimum adalah disebabkan oleh terputusnya ikatan sekunder enzim karena besarnya energi kinetika dari molekul enzim. Putusnya ikatan sekunder pada keadaan katalitik aktif akan mengakibatkan hilangnya struktur sekunder dan tersier dari enzim, disertai dengan hilangnya aktivitas enzim. Pada suhu yang tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga tidak dapat memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989). CGTase dari *Bacillus macerans* sedikit lebih tahan terhadap pemanasan jika dibandingkan dengan CGTase yang dihasilkan *Brevibacterium* sp. No.9605 (Mori *et al.*, 1994). Setelah inkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit dalam larutan bufer Atkins dan Pantins pH 8,0, CGTase dari *Bacillus macerans* masih memiliki aktivitas relatif sebesar 88,37%, sedangkan untuk *Brevibacterium* sp No.9605 hanya sekitar 50%.

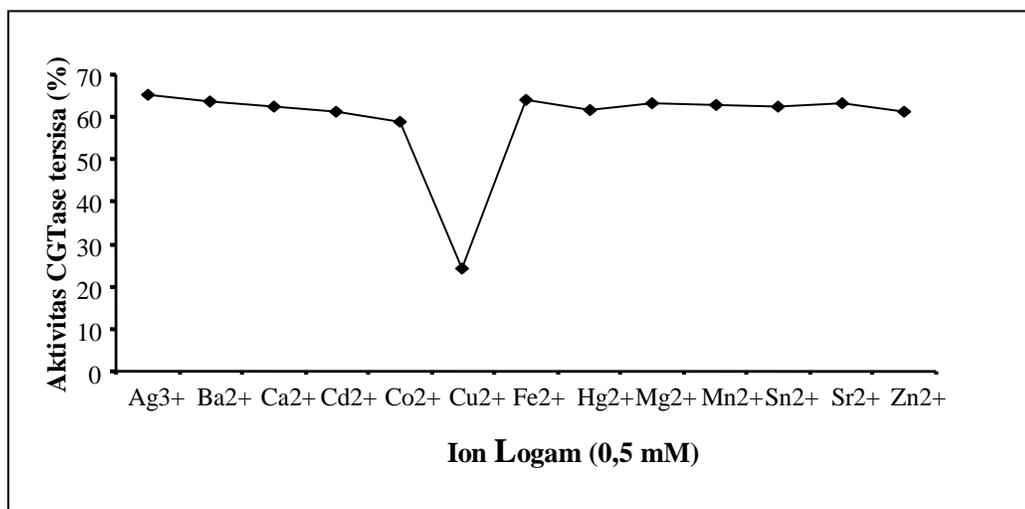
Pengaruh ion logam

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas CGTase dapat dilihat pada Gambar 5. Reaksi enzimatik dari CGTase yang tampak dipengaruhi ion-ion logam. Setelah diinkubasikan selama 10 menit dalam 0,1 M bufer Atkins dan Pantin yang mengandung 1 mM masing-masing ion logam terlihat dapat

menyebabkan penurunan aktivitas 30-40%. Diantara ion-ion tersebut, ion Cu²⁺ merupakan inhibitor CGTase yang paling kuat karena setelah diinkubasikan selama 10 menit dalam 0,1 M bufer Atkins dan Pantin aktivitas CGTase yang tertinggal sekitar seperempatnya. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas CGTase dari *Bacillus macerans* tampak agak berbeda dibandingkan dengan aktivitas CGTase dari *Brevibacterium* sp. N0.9605. Aktivitas CGTase dari *Brevibacterium* sp. No.9605 sangat dihambat oleh adanya ZnCl₂, AgNO₃, CuCl₂, CdCl₂, bahkan adanya HgCl₂ menyebabkan aktivitas CGTase hilang. Untuk senyawa logam yang lain relatif tidak berpengaruh terhadap aktivitasnya (Mori *et al.*, 1994).

Pemurnian CGTase

Aktivitas hidrolitik CGTase (enzim pada awal pemurnian) menunjukkan bahwa CGTase komersial yang dihasilkan oleh *Bacillus macerans* mempunyai aktivitas 480 U/ml dengan aktivitas spesifik 269 U/mg. Selanjutnya, pemurnian enzim CGTase dilakukan pertama kali dengan cara dialisis diikuti filtrasi gel dan kromatografi pertukaran ion. Tingkat kemurnian enzim serta aktivitas spesifiknya pada tahap-tahap pemurnian ditentukan.



Gambar 5. Pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas CGTase

Dialisis

Hasil pada dialisis terhadap enzim awal adalah sebesar 95% (Tabel 1). Enzim hasil dialisis berikutnya dimurnikan dengan cara filtrasi gel melalui kolom berisi matrik Sephadex G 100 dan dibilas dengan larutan 0,05 M bufer larutan Atkin & Pantin's pH 7,8. Filtrasi gel adalah suatu teknik memisahkan zat-zat berdasarkan ukuran molekulnya. Pemisahan terjadi antara fase cair di dalam partikel dan cairan yang mengelilingi partikel gel. Akibat dari perbedaan laju permeasi masing-masing molekul zat terlarut maka terjadi pemisahan. Dengan cara filtrasi gel (melalui kolom berisi matrik Sephadex G 100) yang dibilas dengan larutan 0,05 M larutan Atkin & Pantin's pH 7,8 protein yang memiliki berat molekul lebih rendah akan terbilas lebih dahulu. Hasil elusi memperlihatkan adanya dua puncak utama protein, satu diantaranya adalah protein enzim CGTase yaitu dari fraksi 22 – 29 dengan aktivitas spesifik sebesar 481 U/mg, sedang satu puncak lainnya tidak memperlihatkan adanya aktivitas enzim CGTase.

Fraksi yang mengandung enzim CGTase setelah digabungkan (fraksi 22 – 29 U/mg), dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi penukar ion yaitu dengan cara melewatkannya pada kolom berisi matrik DEAE Sephadex A50. Protein yang terikat dibilas dengan gradien linier 0 - 0,5 M NaCl dalam bufer Atkin dan Pantin's pH 7,8. Penentuan aktivitas spesifik setiap fraksi penting untuk menentukan tingkat kemurnian (Trevor, 1991). Aktivitas spesifik CGTase setelah melalui khromatografi penukar ion meningkat dari 481 U/mg menjadi 544 U/mg. Hasil yang ditemukan setelah melalui khromatografi penukar ion terhadap enzim awal adalah sebesar 30%.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa siklodekstrin glukano transferase (CGTase) komersial yang dihasilkan oleh *Bacillus macerans* mempunyai aktivitas hidrolitik 480 U/ml. Aktivitas optimum CGTase pada pH 5,0-8,0 dan suhu 45-55°C.

Stabilitas CGTase dicapai pada kondisi pH 5,0-9,0. Enzim ini relatif stabil terhadap pemanasan pada suhu 55°C selama 10 menit. Ion-ion logam dapat menyebabkan penurunan aktivitas CGTase sampai 60%. Ion Cu^{2+} merupakan ion logam yang paling menghambat aktivitas CGTase. Aktivitas spesifik protease krude enzim adalah 269 U/mg; hasil dialisis 955 U/mg, filtrasi gel 481 U/mg dan kromatografi penukar ion 544 U/mg.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Joko Sulistyono yang telah memberikan dorongan moril, literatur dan bahan penelitian kepada penulis.

Daftar Pustaka

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Deutscher, P.M. 1990. *Methods in Enzymology*. 182. Academic Press Inc., New York, 285-289.
- Harper, H.A., Rodwel, V.W. and Mayer, P.A. 1984. *Review of Physiological Chemistry*. Lenge Medical Publication, California USA.
- Kometani, T., Yoshinobu, T., Takashi, N., Hiroshi, T. and Shigetaka, O. 1990. Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Biosci. Biochem.* 58 (11): 1990-1994.
- Kometani, T., Yoshinobu, T., Takashi, N., Hiroshi, T. and Shigetaka, O. 1996. Acceptor specificity of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and synthesis of glycosyl rhamnose. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (7): 1176-1178.
- Mori, S., Susumu, H., Takaichi, O. and Sumio, K. 1994. Purification and properties of of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No.9605. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (11): 1968-1972.
- Palmer, T. 1981. *Understanding enzymes*. Ellis Horwood Ltd. England. p.76.

Karakterisasi Enzim

- Rashid, N., Cornista, J., Ezaki, S., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. 2002. Characterization of an Archaeal Cyclodextrin Glucanotransferase with a Novel C-Terminal Domain. *J. of Bacteriology* 184 (3): 777-784.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan bioteknologi. PAU-IPB.* pp.71-75.
- Sulistyo, J., Dinoto, A., Choliq, A. dan Soeka, Y.S. 2000. Mikroba Indigen Penghasil Enzim dengan Aktivitas Transglukosilasi. Mikrobiologi, Enzim dan Bioteknologi dalam Perspektif Ekonomi dan Industri. *Pros. Sem. Nas. Industri Enzim dan Bioteknologi II. Jakarta.*
- Smith, E.J. 1990. *Biotechnology Principle*, Terjemahan Usman, F.S., Bambang, S. dan Agung, S. PT Gramedia, Jakarta. 132- 135; 182-183.
- Trevor, P. 1991. *Understanding Enzyme*, 3rd Ed. Elis Harwood, New York, pp. 306-307.