

KINETIKA ENZIM PEKTIN METIL ESTERASE (PME) ENDOGENOUS DARI PULP BIJI KAKAO

G.P. Ganda Putra

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana

ABSTRACT

This research was conducted to determine the enzymatic kinetics (K_m and V_{max}) of isolate of endogenous pectin methylesterase enzyme (PMEs) from cocoa pulp. This research was carried out by assaying the enzyme activity in various pectin concentration used as substrate which its value was between 0.25 and 2.00% at 0.25% interval. The results showed that the enzymatic kinetics of endogenous PMEs isolate from cocoa pulp in term of K_m and V_{max} were 15.75 μ g NaOH/minute/ml and 0.21%.

Keywords: enzymatic kinetics, PMEs, cocoa pulp.

PENDAHULUAN

Penghancuran pulp dapat dilakukan dengan depolimerisasi menggunakan enzim-enzim pektolitik endogenous. Depolimerisasi pektin dapat berlangsung karena adanya aktivitas enzim-enzim pektolitik yang menghidrolisis substrat pektin, yaitu polisakarida struktural pada dinding sel primer dan ruang antar sel. Aktivitas enzim tersebut dalam menghidrolisis pektin menyebabkan jaringan pulp rusak terdisintegrasikan, membentuk cairan dan menetes keluar tumpukan biji (*watery sweatings*).

Pulp biji kakao mengandung pektin sekitar 1-1.5% (Case, 2004), sehingga dimungkinkan adanya enzim-enzim pektolitik endogenous dalam pulp biji kakao. Ganda Putra, dkk. (2007), telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi secara parsial enzim-enzim pektolitik endogenous pada pulp biji kakao, diantaranya adalah enzim pektin metil esterase (PME). Salah satu karakteristik enzim yang perlu dipelajari adalah kinetika enzim, berupa parameter K_m dan V_{maks} .

Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisasi lain yang disebut *velocity* (V). Harga V dari suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat $[S]$, akan tetapi setelah $[S]$ meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga V hampir linier dengan $[S]$. Pada kondisi dimana V tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya $[S]$ disebut kecepatan maksimum (V_{maks}). V_{maks} merupakan salah satu parameter kinetika enzim (Wiesman, 1989).

Parameter kinetika enzim yang lain adalah konstanta *Michaelis-Menten*, yang lebih dikenal dengan K_m . K_m merupakan konsentrasi substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi

enzim telah mencapai $\frac{1}{2} V_{maks}$ (Wiesman, 1989; Page, 1997).

Menurut Fox (1991), nilai K_m dapat digunakan dalam menentukan ukuran afinitas enzim-substrat ($E-S$), yang merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks $E-S$ atau suatu tetapan keseimbangan untuk disosiasi kompleks $E-S$ menjadi E dan S . Nilai K_m kecil berarti kompleks $E-S$ mantap, afinitas enzim tinggi terhadap substrat, sedangkan bila K_m besar berlaku kebalikannya.

Tujuan penelitian ini untuk menentukan parameter K_m dan V_{maks} enzim pektin metil esterase (PME) endogenous dari pulp biji kakao. Hasil penelitian ini adalah untuk mengkaji parameter kinetika enzim tersebut, sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan standar prosedur dalam pemanfaatan enzim PME untuk keperluan pengolahan pangan.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan penelitian adalah buah kakao jenis lindak yang langsung dipetik dari kebun kakao milik petani. Bahan lain adalah bahan-bahan kimia, diantaranya: alkohol 90%, Na-bisulfit, PEG 4000, bufer Na-fosfat 0.2 M, NaCl, Na-EDTA, pektin standar (citrus pektin/SIGMA).

Peralatan yang digunakan diantaranya: timbangan, termometer, lemari es (*freezer*), pengaduk magnetik, *cool chamber*, sentrifuge, spektrofotometer, *water bath*, pH meter, *hot plate* dan alat-alat gelas.

Metode yang Digunakan

Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim PME pada pulp biji kakao menggunakan prosedur ekstraksi enzim pektolitik pada buah-buahan (Munoz and Barcelo, 1996; Zhou *et al.*, 2000).

Ekstrak pulp biji kakao ditimbang sebanyak 40 g, lalu ditambahkan 80 ml PEG 4000 12%; Na-bisulfit 0.2%. Campuran diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit dalam ruangan bersuhu 4°C (*cool chamber*). Setelah itu disentrifugasi pada 5000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, residunya dicuci dengan menambahkan Na-bisulfit 0.2% dengan jumlah 2 kali volume residu dan disentrifugasi lagi seperti di atas selama 10 menit.

Residu yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambahkan 50 ml larutan NaCl 7.5 %; Na-EDTA 0.75 % (pH 6.5) untuk ekstraksi enzim PME. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi

sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 1 jam pada suhu 4°C. Setelah itu disentrifugasi pada 5000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan sebagai isolat enzim, ditampung dalam botol dan disimpan dalam lemari es (suhu -20°C).

Penentuan kinetika enzim PME

Penentuan kinetika enzim PME (K_m dan V_{maks}) didasarkan atas plot grafik hubungan antara konsentrasi substrat $[S]$ dan aktivitas enzim (V) (Fayyaz *et al.*, 1995; Dinu, 2001).

Larutan substrat citrus pektin (SIGMA) dibuat dengan konsentrasi antara 0.25 – 2.00% dengan interval 0.25% dalam larutan bufer Na-fosfat 0.2 M; NaCl 0.15 M (pH 7.0), lalu dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai prosedurnya. Setelah itu ditentukan aktivitas enzim ($\mu\text{g NaOH}/\text{menit}/\text{ml}$) pada masing-masing konsentrasi substrat.

Selanjutnya dibuat tabel V dan $[S]$ dan dikonversi menjadi $1/V$ dan $1/[S]$ serta dibuat plot grafik hubungan antara $1/V$ dan $1/[S]$, lalu ditentukan nilai V_{maks} dan K_m yang didasarkan atas persamaan kurva *Lineweaver-Burk* (Whitaker, 1996), dengan cara:

- Bahwa dari persamaan: $\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_m}{V_{maks}} \left(\frac{1}{[S]} \right)$
- Bila $1/V = Y$ dan $1/[S] = X$, maka rumusnya dapat ditulis menjadi: $Y = a + bX$, sehingga: $a = 1/V_{maks}$ dan $b = K_m/V_{maks}$
- Dengan demikian bila harga $1/V_{maks}$ diketahui maka nilai V_{maks} didapat, begitu pula nilai K_m akan juga didapat dari persamaan $b = K_m/V_{maks}$.

Pengujian aktivitas enzim PME

Prosedur pengujian aktivitas enzim PME sesuai metode Kapat *et al.* (1998): larutan substrat citrus pektin (SIGMA) 1.5 % disiapkan dalam bufer Na-fosfat 0.2 M; NaCl 0.15 M (pH 7.0). Sebanyak 10 ml larutan substrat pektin dan 2 ml isolat enzim PME dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian segera dilakukan pengukuran pH dengan pH meter begitu penambahan isolat enzim ke dalam substrat ($t = 0$ menit). Campuran diinkubasi pada suhu 37°C dalam *water bath* selama 60 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran pH akhir ($t = 60$ menit), lalu pH akhir dikembalikan ke pH awal dengan penambahan NaOH 0.02 N. Volume NaOH 0.02 N yang ditambahkan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

Unit aktivitas enzim PME adalah $\mu\text{g NaOH}$ yang dibutuhkan untuk mengembalikan pH akhir ($t = 60$ menit) sampai ke pH awal ($t = 0$ menit) per menit per ml isolat enzim ($\mu\text{g NaOH}/\text{menit}/\text{ml}$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim PME pada beberapa konsentrasi substrat citrus pektin (Tabel 1), menunjukkan bahwa

aktivitas enzim PME mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat, sampai pada konsentrasi substrat 1.75%, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 2.00%. Hal ini terjadi karena suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat $[S]$, akan tetapi setelah $[S]$ meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada kondisi dimana kecepatan reaksi enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya $[S]$ disebut kecepatan maksimum (V_{maks}) (Wiesman, 1989).

Penentuan V_{maks} akan menghasilkan gambaran tentang sifat-sifat kinetika enzim lain, $\frac{1}{2} V_{maks}$, yaitu suatu konsentrasi substrat yang separuh lokasi aktifnya telah terisi atau bila kecepatan reaksi enzimatik telah mencapai setengah dari kecepatan maksimum, yang dikenal dengan K_m (tetapan *Michaelis-Menten*). Nilai K_m digunakan selain sebagai ukuran afinitas *E-S* juga berhubungan dengan tetapan keseimbangan disosiasi kompleks *E-S* menjadi *E* dan *S*. Fox (1991) menambahkan bila nilai K_m kecil berarti kompleks *E-S* mantap dan afinitas enzim terhadap substrat tinggi, sedangkan bila nilai K_m besar afinitasnya menjadi rendah. Harga K_m enzim sangat bervariasi tergantung dari jenis substrat, keadaan lingkungan dan kekuatan ion.

Tabel 1. Aktivitas enzim PME pada beberapa konsentrasi substrat pektin

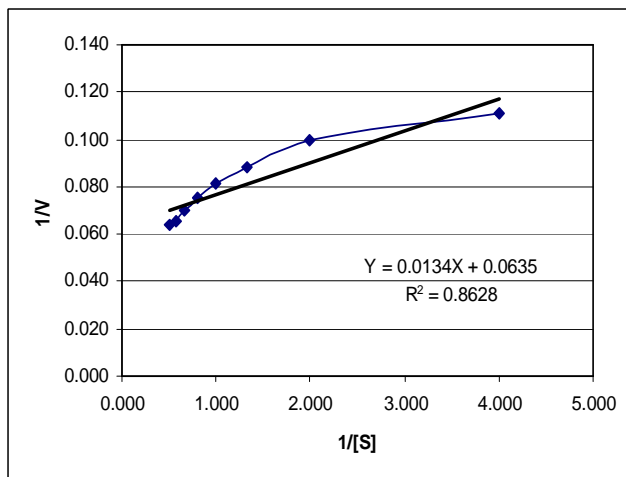
| Konsentrasi substrat (%) [S] | Unit aktivitas ($\mu\text{g NaOH}/\text{menit}/\text{ml}$) (V) | 1/[S] | 1/V |
|---------------------------------|--|-------|-------|
| 0.25 | 9.00g | 4.000 | 0.111 |
| 0.50 | 10.00f | 2.000 | 0.100 |
| 0.75 | 11.34e | 1.333 | 0.088 |
| 1.00 | 12.34d | 1.000 | 0.081 |
| 1.25 | 13.33c | 0.800 | 0.075 |
| 1.50 | 14.34b | 0.667 | 0.070 |
| 1.75 | 15.33a | 0.571 | 0.065 |
| 2.00 | 15.67a | 0.500 | 0.064 |
| BNT 5% | 0.99 | | |

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh tidak nyata ($P > 0.05$).

Penentuan V_{maks} dan K_m didasarkan atas persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ (Tabel 1), seperti disajikan pada Gambar 1. Selanjutnya dari persamaan regresi $Y = 0.0635 + 0.0134 X$, maka diperoleh: $1/V_{maks} = 0.0635$ sehingga $V_{maks} = 15.75$ dan $K_m/V_{maks} = 0.0134 =$ sehingga $K_m = 0.21$.

Hasil perhitungan penentuan V_{maks} dan K_m isolat enzim PME adalah sebesar 15.75 $\mu\text{g NaOH}$ atau 0.39 μmol (eq) asam karboksilat atau 0.43 μmol metanol/menit/ml dan 0.21%. Hasil tersebut menggambarkan komparasi bahwa V_{maks} lebih kecil dan K_m lebih besar dibandingkan dengan V_{maks} dan K_m enzim PME pepaya sebesar 770.5 μmol metanol/menit/mg protein dan

0.012 g/l (0.0012%) (Lim and Chung, 1993) atau sebesar 730 μmol asam karboksilat/menit/mg protein dan 0.11 mg/ml (0.011%) (Fayyaz *et al.*, 1995), tetapi relatif sama dengan V_{maks} dan lebih besar dari K_m enzim PME jeruk mandarin sebesar 0.38 μmol asam karboksilat/menit/ml dan 0.84 mg/ml (0.084%) (Rille *et al.*, 1992). Begitu pula dibandingkan dengan V_{maks} dan K_m enzim PME jeruk varietas Valencia sebesar 4.2378 μmol metanol/menit/mg protein dan 0.0487 mg/ml (0.00487%) (Cameron *et al.*, 2003).



Gambar 1. Grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$.

Perbedaan nilai V_{maks} dan K_m seperti di atas berhubungan dengan tingkat kemurnian enzim. Enzim yang murni memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga meningkatkan aktivitasnya yang berdampak pada penurunan nilai K_m . Selain itu enzim yang diekstraksi dari sumber berbeda akan memiliki sifat-sifat berbeda, terutama responnya terhadap kondisi lingkungan, seperti: suhu, pH dan konsentrasi NaCl optimum untuk aktivitasnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dapat disimpulkan bahwa parameter kinetika enzim pektin metil esterase (PME) endogenous dari pulp biji kakao adalah V_{maks} sebesar 15.75 μg NaOH/menit/ml dan K_m sebesar 0.21%.

Hasil tersebut kiranya dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan standar prosedur dalam pemanfaatan enzim PME untuk keperluan pengolahan pangan.

DAFTAR PUSTAKA

Cameron, R.G., B.J. Savary, A.T. Hotchkiss, M.L. Fishman, H.K. Chau, R.A. Baker dan K. Grohmann. 2003. Separation and characterization of a salt-dependent pectin methylesterase from Citrus

sinensis var. Valencia fruit tissue. J. Agric. Food Chem. 51(7): 2070-2075.

Case, C.L. 2004. The Microbiology of Chocolate. <http://smccd.net/accounts/case/chocolate.html>. Diakses tanggal 18 Maret 2004.

Dinu, D. 2001. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. Roum. Biotechnol. 6(5): 397-402.

Fayyaz, A., B.A. Asbi, H.M. Ghazali, Y.B. Che-Man dan S. Jinap. 1995. Kinetics of papaya pectinesterase. Food Chem. 53: 129-135.

Fox, P.F. 1991. Food Enzymology. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London.

Ganda Putra, G.P., L.P. Wrasati dan N.M. Wartini. 2007. Kajian Depolimerisasi Pulp Biji Kakao Oleh Enzim-Enzim Pektolitik Endojinus Sebagai Dasar Pengembangan Proses Fermentasi Pada Pengolahan Kakao: (I) Isolasi, Karakterisasi dan Optimasi Enzim-Enzim Pektolitik Endojinus Pulp Biji Kakao. Laporan Penelitian Hibah Bersaing (Tahap I/2007). Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana.

Kapat, A, G. Zimand dan Y. Elad. 1998. Effect of two isolate of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 52: 127-137.

Lim, Y.M. dan M.C.M. Chung. 1993. Isolation and Characterization of Pectin Methylesterase from Papaya. Archives of Biochemistry and Biophysics, 307(1): 5-20.

Munoz, R. dan A.R. Barcelo. 1996. Enzymes. Didalam L.M.L. Nollet (Ed.). Handbook of Food Analysis. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.

Rille, L., D. Castaldo, J.A. Giovane, L. Servillo, Z.C. Balestrieri dan L. Quagliuolot. 1992. Purification and properties of pectin methylesterase from Mandarin Orange fruit. J. Agric. Food Chem. 40: 591-593.

Whitaker, J.R. 1996. Enzymes. Didalam O. R. Fennema (Ed.). Food Chemistry. 3rd Edition. Marcel Dekker, Inc., New York.

Wiseman, A. 1989. Handbook of Enzymes Biotechnology. 2nd. Edition. Ellis Howard, New York.

Zhou, H.W., R. Ben-Arie dan S. Lurie. 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. Phytochemistry. 55: 191-195.