

PENENTUAN KINETIKA ENZIM POLIGALAKTURONASE (PG) ENDOGENOUS DARI PULP BIJI KAKAO

DETERMINATION OF ENZYME KINETICS OF ENDOGENOUS POLYGALACTURONASE (PG) FROM COCOA PULP

G.P. GANDA PUTRA

*Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian,
Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali
E-mail: putu_gandaputra@yahoo.com*

INTISARI

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kinetika enzim poligalakturonase (PGs) endogenous (K_m dan V_{maks}) yang diisolasi dari pulp biji kakao. Penelitian dilaksanakan dengan menguji aktivitas isolat enzim PG endogenous pada variasi konsentrasi substrat citrus pectin antara 0,1 – 1,0% dengan interval 0,1%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kinetika isolat enzim PG endogenous dari pulp biji kakao adalah K_m sebesar 0,37% dan V_{maks} sebesar 6,69 μmol asam galakturonat/menit/ml.

Kata kunci: kinetika enzim (K_m , V_{maks}), PGs, pulp kakao

ABSTRACT

This research was conducted to determine the enzyme kinetics (K_m and V_{max}) of endogenous polygalacturonase (PGs) isolated from cocoa pulp. This research was carried out by assaying PGs activities in various concentration of citrus pectin substrates which were between 0,1 – 1,0% with 0,1% interval. The result showed that the enzyme kinetics of endogenous PGs from cocoa pulp (K_m) was 0,37% and V_{max} was 6,69 μmol of galacturonic acid/minute/ml.

Keywords: enzymatic kinetics (K_m , V_{max}), PGs, 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 sehingga menyebabkan jaringan pulp rusak terdisintegrasi, 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 poligalakturonase (PG). 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 katalisis 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).

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 kinetika, K_m dan V_{maks} , enzim poligalakturonase (PG) endogenous dari pulp biji kakao. Hasil penelitian nantinya diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan standar prosedur dalam pemanfaatan

enzim PG untuk keperluan pengolahan kakao atau pengolahan pangan.

MATERI DAN METODE

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-asetat 0,05M, NaCl, citrus pektin dengan kadar asam galakturonat 93,5% dan metoksil 9,4% (SIGMA), asam D-galakturonat standar (SIGMA), pereaksi Nelson A, pereaksi Nelson B, pereaksi Arsenomolibdat.

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 suhu 4°C (*cool chamber*). Setelah itu disentrifugasi pada 5.000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, residunya dicuci dengan menambahkan Na-bisulfit 0,2% sebanyak 2 kali volume residu dan disentrifugasi lagi seperti di atas selama 10 menit.

Residu yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambahkan 75 ml larutan bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,5 M (pH 5,0) untuk ekstraksi enzim PG. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 1 jam pada suhu 4°C. Setelah itu disentrifugasi pada 5.000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan sebagai isolat enzim, ditampung dalam botol dan disimpan dalam lemari es (suhu -20°C) sebelum digunakan.

Penentuan kinetika enzim

Penentuan kinetika enzim PME (V_{maks} dan K_m) 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 0,1 – 1,0% dengan interval 0,1% dalam larutan buffer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,15 M (pH 4,5), lalu dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai prosedurnya. Setelah itu ditentukan aktivitas enzim ($\mu\text{mol asam galakturonat/menit/ml}$) 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: $1/V = 1/V_{maks} + K_m/V_{maks} \cdot (1/[S])$

- 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

Prosedur pengujian aktivitas enzim PG dengan metode kombinasi Munoz and Barcelo, (1996) dan Zhou *et al.* (2000): larutan substrat citrus pektin (SIGMA) 0,75 % disiapkan dalam bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,15 M (pH 4,5). Sebanyak 4 ml larutan substrat citrus pektin dan 1 ml isolat enzim PG dimasukkan dalam tabung reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu 35°C dalam *water bath* selama 60 menit, setelah itu reaksi dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sementara itu, blanko juga disiapkan dengan menginkubasi campuran sebanyak 1 ml filtrat enzim yang ditambahkan dengan 4 ml bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,15 M (pH 4,5). Setelah itu, diambil sebanyak 0,1 ml campuran dan ditambahkan 0,9 ml aquadest dengan mikro pipet, selanjutnya diperlakukan sesuai prosedur penentuan kadar asam galakturonat dengan metode *Somogyi-Nelson*. Nilai absorbansi selanjutnya dikonversi menjadi kadar asam galakturonat berdasarkan kurva standar asam D-galakturonat.

Unit aktivitas isolat enzim PG = 1 $\mu\text{mol asam galakturonat yang terbentuk per menit per ml isolat enzim PG atau } \mu\text{mol asam galakturonat/menit/ml}$.

HASIL

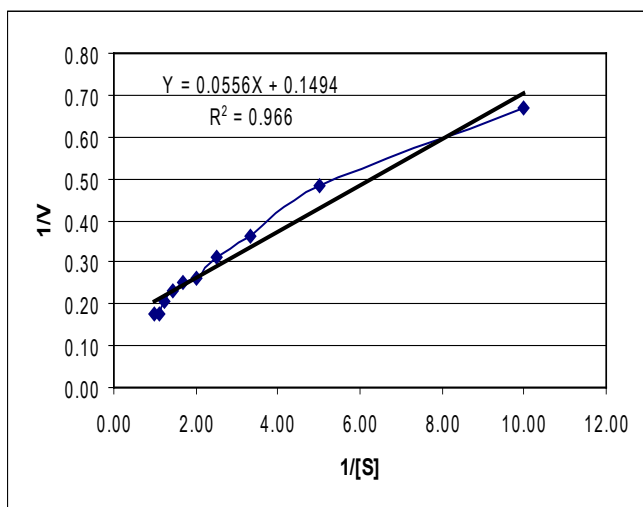
Aktivitas enzim PG endogenous pada beberapa konsentrasi substrat citrus pektin (Tabel 1), menunjukkan bahwa aktivitas enzim PG mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat, sampai pada konsentrasi substrat 0,9%, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 1,0%.

Tabel 1. Aktivitas isolat enzim PG endogenous pada beberapa konsentrasi substrat pektin. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

Konsentrasi substrat (%) [S]	Unit aktivitas ($\mu\text{mol asam galakturonat/menit/ml}$) (V)	$1/[S]$	$1/V$
0,1	1,49 ^g	10,00	0,67
0,2	2,07 ^{fg}	5,00	0,48
0,3	2,77 ^{ef}	3,33	0,36
0,4	3,23 ^{de}	2,50	0,31
0,5	3,85 ^{cd}	2,00	0,26
0,6	4,01 ^c	1,67	0,25
0,7	4,36 ^{bc}	1,43	0,23
0,8	4,89 ^b	1,25	0,20
0,9	5,61 ^a	1,11	0,18
1,0	5,64 ^a	1,00	0,18
BNT 5%	0,8076		

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 $Y = 0,1494 + 0,0556 X$, maka diperoleh: $0,1494 = 1/V_{maks}$ sehingga $V_{maks} = 6,69$ dan $0,0556 = K_m/V_{maks}$ sehingga $K_m = 0,37$.



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

PEMBAHASAN

Aktivitas enzim PG yang mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat ditingkatkan lagi. 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, $1/2 V_{maks}$, 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.

Hasil perhitungan penentuan V_{maks} dan K_m isolat enzim PG endogenous adalah sebesar $6,69 \mu\text{mol asam galakturonat/menit/ml}$ dan $0,37\%$. Hasil V_{maks} enzim PG endogenous tersebut dapat dibandingkan dengan V_{maks} enzim PG exogenous yang diisolasi dari bakteri tanah (*Bacillus sp.*), yaitu berkisar antara $9,07 - 11,51 \mu\text{mol asam galakturonat/menit/mg protein}$ (Wardhani, 2005) dan enzim ekso-PG I *Penicillium frequentans* sebesar $2571 \mu\text{mol asam galakturonat/menit/mg protein}$ (Barense

et al., 2001). Begitu pula dengan V_{maks} enzim PG yang diisolasi dari *Aspergillus niger* sebesar $3133,3; 2974,4$ dan $1892,9 \mu\text{mol asam galakturonat/menit/mg protein}$, masing-masing untuk substrat natrium poligalakturonat, pektin termetilasi 6% dan pektin termetilasi 30% (Dinu, 2001).

Sementara itu, K_m filtrat enzim PG endogenous dari pulp biji kakao sebesar $0,37\%$ lebih besar dibandingkan dengan K_m enzim PG exogenous yang diisolasi dari bakteri tanah (*Bacillus sp.*) berkisar antara $0,04 - 0,09 \text{ mg/ml}$ ($0,004 - 0,009\%$) (Wardhani, 2005), tetapi relatif sama dengan K_m enzim ekso-PG I *Penicillium frequentans* sebesar $1,6 \text{ g/l}$ ($0,16\%$) (Barense *et al.*, 2001). Data lain yang dilaporkan oleh Dinu (2001), menunjukkan bahwa K_m enzim PG yang diisolasi dari *Aspergillus niger*, berturut-turut sebesar: $0,94 \text{ mg/ml}$ ($0,094\%$) pada substrat natrium poligalakturonat, $1,1 \text{ mg/ml}$ ($0,11\%$) pada substrat pektin termetilasi 6% dan $1,98 \text{ mg/ml}$ ($0,198\%$) pada substrat pektin termetilasi 30%.

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. Dinu (2001), menambahkan bahwa pada enzim PG, perbedaan nilai V_{maks} dan K_m juga dapat terjadi karena perbedaan derajat metilasi substrat pektin. Pektin dengan derajat metilasi lebih tinggi akan menghambat kecepatan reaksi enzimatik oleh enzim PG, sehingga akan meningkatkan nilai K_m . Hal ini terlihat dari nilai K_m enzim PG endogenous pulp biji kakao sebesar $0,37\%$ pada substrat citrus pektin termetilasi $9,4\%$, yang juga masih lebih tinggi dibandingkan dengan substrat pektin termetilasi 30% ($0,198\%$) karena masih berupa filtrat enzim kasar.

SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa parameter kinetika isolate enzim poligalakturonase (PGs) endogenous dari pulp biji kakao adalah V_{maks} sebesar $6,69 \mu\text{mol asam galakturonat/menit/ml}$ dan K_m sebesar $0,37\%$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan bagian dari hasil Penelitian Hibah Bersaing (Tahap I/2007), untuk itu penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada DP2M Ditjen Dikti, Depdiknas RI yang telah membiayai penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Barensse, R.I., M.A. Chellegatti, M.J.V. Fonseca and S. Said. 2001. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase I and II of *Penicillium frequentans*. *Braz. J. Microbiol.*, 32 (4): 5-8.
- 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 and S. Jinap. 1995. Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, 53 : 129-135.
- Ganda Putra, G.P., L.P. Wrsiati dan N.M. Wartini. 2007. Kajian Depolimerisasi Pulp Biji Kakao Oleh Enzim-Enzim Pektolitik Endojinus Sebagai Dasar Pengembangan Proses Fermentasi Pada Pengolahan Kakao: (1) *Isolasi, Karakterisasi dan Optimasi Enzim-Enzim Pektolitik Endojinus Pulp Biji Kakao*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing (Tahap I/2007). Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana.
- Munoz, R. and A.R. Barcelo. 1996. Enzymes. In L.M.L. Nollet (Ed.). *Handbook of Food Analysis*. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wardhani, O.R. 2005. Karakterisasi parsial poligalakturonase yang diisolasi dari bakteri tanah. Tesis S-2. Tidak Dipublikasikan. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Whitaker, J. R. 1996. Enzymes. In O. R. Fennema (Ed.). *Food Chemistry*. 3rd Edition. Maecel Dekker, Inc., New York.
- Wiseman, A. 1989. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. 2nd. Edition. Ellis Howard, New York.
- Zhou, H.W., R. Ben-Arie and S. Lurie. 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry*, 55 : 191-195.