

## Pengaruh Penambahan Ion – Ion Logam terhadap Aktivitas Pektinase Isolasi dari *Bacillus Subtilis* pada *Bleaching* Kertas

Mardiana P. Putri<sup>1)\*</sup>, Anna Roosdiana<sup>1)</sup>, Sasangka Prasetyawan<sup>1)</sup>, Diah Mardiana<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Program Pasca Sarjana Kimia, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No.1 Malang,

Diterima 26 Februari 2013, direvisi 20 April 2013

### ABSTRAK

Enzim pektinase digunakan sebagai biokatalis untuk merombak senyawa pektat atau pektin. Aktivitas pektinase di pengaruhi oleh ion –ion logam. Tujuan penelitian ini yaitu menentukan pengaruh penambahan ion – ion logam terhadap aktivitas pektinase dan menentukan jenis inhibisinya. Penentuan aktivitas enzim didasarkan pada pembentukan asam galakturonat, dianalisis secara spektrofotometri dengan pereaksi DNS. Pengaruh ion diuji dengan variasi konsentrasi ion logam  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  masing-masing 2-10 mM. Nilai  $V_m$  dan  $K_M$  tanpa penambahan ion berturut – turut 161,29  $\mu\text{mol/mL}$ menit dan 0,55%(b/v). Sedangkan nilai  $V_{mapp}$  untuk penambahan ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  berturut – turut 147,06  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 156,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dan 153,85 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Nilai  $K_{Mapp}$  dari penambahan ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  yaitu 0,56%, 0,63%, dan 0,65%. Nilai  $K_I$  berturut-turut untuk ion logam  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$  yaitu 333,33; 41,38; 32,97. Inhibisi untuk ketiga ion yaitu inhibisi non-kompetitif.

**Kata kunci:** Pektinase,  $V_m$ ,  $K_M$ ,  $K_I$ , Inhibisi.

### ABSTRACT

Pectinase enzyme used as biocatalyst to overhaul pectat compounds or pectin. Pectinase activity was affected by metal ions. The purpose of this study is to determine the effect of adding metal ions on pectinase activity and its inhibition type.. Determination of enzyme activity was based on galacturonic acid produced, which was analyzed by spectrophotometric using DNS reagent. Concentration of metal ions used i.e.  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  were 2-10 mM. The result showed that  $V_m$  and  $K_M$  number without ions were 161.29  $\mu\text{mol/mL}$  minutes and 0.55%(w/v), respectively. While the presence of ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  were producing  $V_{mapp}$  147.06; 156.25 and 153.85 $\mu\text{g.ml}^{-1}\text{min}^{-1}$ ,  $K_{Mapp}$  of 0.56%; 0.63% and 0.65%, and also  $K_I$  of 333,33; 41,38; 32,9. The inhibition to metal ions are non-competitif inhibition.

**Key word:** Pectinase,  $V_m$ ,  $K_M$ ,  $K_I$ , Inhibition.

### PENDAHULUAN

Salah satu jenis enzim yang dapat digunakan pada proses *bleaching*, yaitu enzim pektinase. Pektinase banyak digunakan baik dalam pengolahan limbah cair, pemutihan kertas, maupun pada penjernihan sari buah [1].

Pektinase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis senyawa pektin menghasilkan asam galakturonat. Enzim ini

berperan dalam pemecahan ikatan glikosidik dari rantai panjang karbon. Sisi aktif dari pektinase atau poligalakturonase yaitu residu asam amino aspartat dan histidin. Enzim pektinase dapat diisolasi dari *Aspergillus niger*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium chrysogenum* [2].

Isolasi enzim dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi. Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisis, kimiawi dan enzimatik melalui penghancuran

-----  
\*Corresponding author :

E-mail: neyna\_ub@yahoo.co.id

membran atau dinding sel. Setelah penghancuran sel, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari senyawa-senyawa yang tidak larut. Isolasi enzim dilakukan pada temperatur rendah dan campuran ditambah larutan penyangga (buffer) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) [3].

Analisis kinetika reaksi enzimatik meliputi dua parameter, yaitu kecepatan maksimum ( $V_m$ ) dan tetapan Michaelis–Menten ( $K_M$ ).  $V_m$  adalah batas teoritis dari laju reaksi yang akan tercapai bila kadar substrat sedemikian tinggi sehingga tempat aktif selalu ditempati oleh substrat. Jadi,  $V_m$  merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim jenuh dengan substrat.  $K_M$  dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah  $V_m$ . Persamaan Michaelis-Menten (a) merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif diantara kecepatan reaksi awal ( $V_1$ ), kecepatan maksimum ( $V_{max}$ ), dan konsentrasi substrat awal ( $S$ ).  $K_M$  bersifat khas bagi enzim tertentu dengan substrat spesifik pada kondisi pH dan temperatur tertentu [4].

$$v_1 = \frac{V_{max}[S]}{\{K_m + [S]\}} \quad (1)$$

Beberapa enzim tidak memerlukan komponen tambahan untuk mencapai aktivitas penuhnya. Namun beberapa pula memerlukan molekul non-protein yang disebut kofaktor untuk berikatan dengan enzim dan menjadi aktif sehingga dapat melaksanakan fungsi katalitiknya. Kofaktor dapat berupa senyawa in-organik yaitu logam disebut kofaktor logam dan berupa senyawa organik yang disebut dengan koenzim contohnya adalah NAD dan FAD [5].

Kofaktor yang berupa ion-ion logam berperan sebagai katalisator agar enzim tetap aktif dan dapat meningkatkan aktivitas enzim. Ion-ion logam tersebut yaitu  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  [6].

Banyak bahan-bahan yang mengubah aktivitas suatu enzim dengan menggabungkannya dalam suatu jalur yang mempengaruhi ikatan substrat enzim. Bahan-bahan yang mereduksi aktivitas suatu enzim dengan cara ini dikenal sebagai inhibitor. Kerja enzim dapat dihambat secara *reversible* atau *irreversible*. Penghambatan secara *irreversible* merupakan pembentukan atau pemecahan ikatan kovalen dalam enzim sedangkan secara *reversible* suatu senyawa dapat terikat dan kemudian dapat lepas kembali. Dari penelitian, penambahan  $MgCl_2$  dan  $ZnCl_2$  menghambat aktivitas enzim pektinase yang diisolasi dari *Penicillium chrysogenum* sebesar 21,2% dan 14,8% [7].

Dengan demikian pektinase dari *Bacillus subtilis* perlu diuji aktivitasnya dengan penambahan variasi konsentrasi ion logam  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$  sehingga diketahui jenis penghambatannya.

## METODE PENELITIAN

**Bahan.** Kultur murni *Bacillus subtilis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

**Metode.** *Bacillus subtilis* dibiakkan dengan menggunakan media padat yaitu *Nutrient Agar (NA)* kemudian dilanjutkan dengan media cair. Ekstrak kasar enzim pektinase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dimurnikan dengan menggunakan pengendapan fraksinasi bertingkat dengan menambahkan amonium sulfat sehingga diperoleh fraksi 0 – 40%, 40 – 80%, dan 80 – 100% kemudian dilanjutkan dengan dialisis. Setelah proses dialisis berakhir diperoleh pektinase dari berbagai fraksi kemudian diuji aktivitasnya dengan melakukan uji penentuan kadar gula pereduksi dengan metode DNS, penambahan variasi konsentrasi ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$  serta ditentukan konstanta kinetika reaksi enzimatik untuk penambahan maupun tanpa penambahan ion-ion logam tersebut. Data yang diperoleh kemudian dianalisa

menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%.

#### **Penentuan Aktivitas Pektinase.**

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat pektin. Larutan uji terdiri dari 1 mL substrat pektin 0,5%, 1 mL larutan buffer pada pH optimum, 1 mL ekstrak kasar enzim serta 1 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada temperatur optimum dan waktu inkubasi optimum. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan ditambahkan 2 mL reagen DNS yang selanjutnya dipanaskan kembali selama 15 menit lalu didinginkan hingga temperatur kamar. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva standar sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis pektin yang dikatalis enzim pektinase. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus :

$$AE = \frac{x \cdot V \cdot f_i}{p \cdot q} \quad (2)$$

dimana :

- AE = aktifitas enzim ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ )
- x = konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
- V = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)
- q = waktu reaksi (menit)
- p = volum ekstrak kasar pektinase (mL)
- fp = faktor pengenceran

#### **Pengaruh Penambahan Ion $\text{Zn}^{2+}$ terhadap Aktivitas Pektinase.**

Diambil 1 mL substrat pektin 0,5% (b/v) kemudian dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi (kecuali tabung 1). Selanjutnya tiap tabung (tabung 1–6) ditambahkan 1 mL pektinase, 1 mL buffer fosfat pH 7, dan 1 mL air bebas reduktor. Selanjutnya masing–masing tabung (tabung 2–6) ditambahkan 1 mL  $\text{ZnCl}_2$  2, 4, 6, 8, 10 mM. Untuk menyamakan volume larutan, pada

tabung 1 ditambahkan 2 mL akuades. Kemudian semua tabung reaksi tersebut di inkubasi dalam inkubator pada suhu optimum dan temperatur optimum. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan di panaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian di dinginkan dalam air es sampai mencapai temperatur kamar. Kemudian diukur kadar gula pereduksinya menggunakan spektrofotometer UV–Vis pada panjang gelombang 540 nm.

#### **Pengaruh Penambahan Ion $\text{Cu}^{2+}$ terhadap Aktivitas Pektinase.**

Untuk mengetahui pengaruh penambahan ion  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap aktivitas pektinase, cara yang dilakukan sama seperti pada penambahan ion  $\text{Zn}^{2+}$ . Dalam hal ini  $\text{CuCl}_2$  yang ditambahkan sebanyak 1 mL dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 mM.

#### **Pengaruh Penambahan Ion $\text{Fe}^{3+}$ terhadap Aktivitas Pektinase.**

Untuk mengetahui pengaruh penambahan ion  $\text{Fe}^{3+}$  terhadap aktivitas pektinase, cara yang dilakukan sama seperti pada penambahan ion  $\text{Zn}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ . Dalam hal ini,  $\text{FeCl}_3$  yang ditambahkan sebanyak 1 mL dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 mM.

**Penentuan  $V_m$ ,  $K_M$  dan  $K_I$ .** Pada perhitungan nilai  $V_m$  dan  $K_M$  ditentukan melalui uji aktivitas enzim pektinase dengan substrat pektin pada pH optimum, temperatur optimum, dan waktu inkubasi optimum. Variasi konsentrasi substrat pektin sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (b/v). Sedangkan untuk penentuan konstanta inhibisi,  $K_I$  diperoleh dengan membandingkan 2 persamaan dari kurva variasi konsentrasi substrat tanpa penambahan logam dan variasi konsentrasi substrat dengan penambahan logam. Larutan uji yang digunakan adalah substrat pektin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5% (b/v) dan larutan logam.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Penentuan Aktivitas Pektinase.** Enzim pektinase yang digunakan diuji karakternya yang meliputi penentuan pH, temperatur, dan

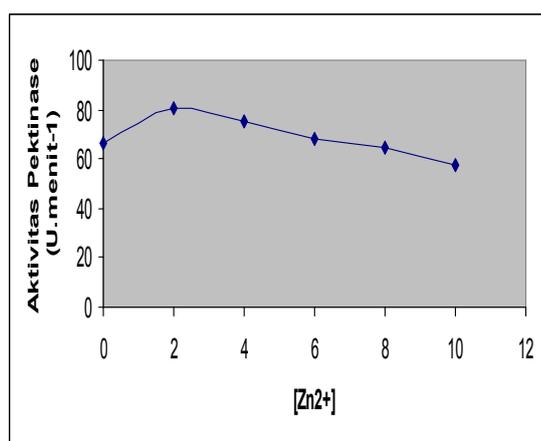
waktu inkubasi optimum menghasilkan pH 7, temperatur 35 °C, dan waktu inkubasi 50 menit. Selanjutnya dilakukan pemurnian enzim pektinase menggunakan amonium sulfat dengan memfraksinasi ekstrak kasar enzim menjadi beberapa fraksi yaitu 0 – 40%, 40 – 80%, dan 80 – 100%. Data aktivitas pektinase pada berbagai fraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Aktivitas Pektinase pada Berbagai Fraksi.

Fraksi	Aktivitas enzim rata-rata (U)	Kadar protein rata-rata (mg.mL <sup>-1</sup> )	Aktifitas spesifik rata-rata (U.mg <sup>-1</sup> )
Ekstrak kasar	82,73	0,633	130,69
0 – 40 %	78,33	0,550	142,42
40 – 80 %	99,85	0,600	166,42
80 – 100 %	76,52	0,550	139,13

Tabel 1 menunjukkan hubungan pengaruh fraksinasi terhadap aktivitas pektinase. Fraksi 40 – 80% merupakan fraksi pektinase yang mempunyai aktivitas tertinggi, hal ini menunjukkan pada fraksi 40 – 80% terdapat pektinase yang lebih banyak dibandingkan dengan fraksi lainnya.

**Pengaruh Penambahan Ion Zn<sup>2+</sup> terhadap Aktivitas pektinase.** Pengujian aktivitas pektinase dengan penambahan ion Zn<sup>2+</sup> dengan konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM.

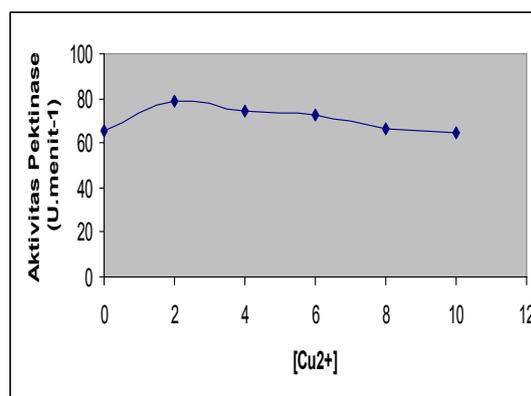


**Gambar 1.** Kurva aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi ion Zn<sup>2+</sup>.

Pada Gambar 1 aktivitas pektinase semakin menurun dengan bertambahnya

konsentrasi Zn<sup>2+</sup>. Hal ini membuktikan Zn<sup>2+</sup> hanya bertindak sebagai inhibitor bukan sebagai aktivator. Penambahan Zn<sup>2+</sup> dapat menurunkan aktivitas enzim pektinase, hal ini dimungkinkan karena Zn<sup>2+</sup> mengganggu pembentukan kompleks enzim-substrat sehingga pembentukan gula pereduksi berupa asam galakturonat juga terhambat, hal ini berakibat menurunnya aktivitas enzim. Semakin besar konsentrasi Zn<sup>2+</sup> yang ditambahkan maka kompleks enzim substrat yang terbentuk semakin sedikit sehingga kemampuan enzim untuk menghidrolisis substrat menjadi berkurang yang ditunjukkan dengan aktivitas enzim yang menurun.

**Pengaruh Penambahan Ion Cu<sup>2+</sup> terhadap Aktivitas pektinase.** Untuk mengetahui pengaruh penambahan Cu<sup>2+</sup> terhadap aktivitas pektinase, dilakukan dengan memvariasi konsentrasi Cu<sup>2+</sup> yaitu 0-10 mM.

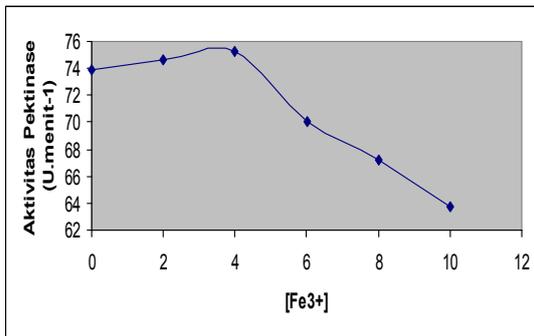


**Gambar 2.** Kurva aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi ion Cu<sup>2+</sup>.

Pada Gambar 2 dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 2 mM, ion Cu<sup>2+</sup> berfungsi meningkatkan aktivitas pektinase yang berperan dalam pembentukan kompleks enzim-substrat. Sedangkan pada konsentrasi 4-10 mM ion Cu<sup>2+</sup> mengalami penurunan aktivitas pektinase. Hal ini disebabkan karena ion Cu<sup>2+</sup> tidak lagi menarik pasangan elektron bebas pada reaksi enzimatik antara pektinase dengan pektin tetapi ion Cu<sup>2+</sup> mengikat sisi aktif pektinase sehingga menghalangi pektin berikatan dengan pektinase dan mengakibatkan aktivitas pektinase semakin menurun. Maka

dapat disimpulkan bahwa penambahan ion  $\text{Cu}^{2+}$  berpengaruh terhadap aktivitas pektinase.

**Pengaruh Penambahan Ion  $\text{Fe}^{3+}$  terhadap Aktivitas pektinase.** Pengaruh penambahan variasi konsentrasi ion  $\text{Fe}^{3+}$  terhadap aktivitas pektinase pada fraksi 40 – 80%. Variasi konsentrasi ion  $\text{Fe}^{3+}$  yang ditambahkan dalam larutan enzim yaitu 0-10 mM.



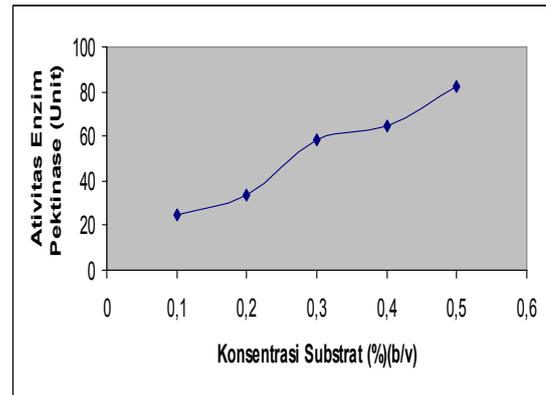
Gambar 3. Kurva aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi ion  $\text{Fe}^{3+}$ .

Dari Gambar 3 aktivitas pektinase berubah dengan penambahan ion  $\text{Fe}^{3+}$ . Penambahan ion  $\text{Fe}^{3+}$  pada konsentrasi 2 mM dan 4 mM meningkatkan aktivitas pektinase. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 6, 8, dan 10 mM ion  $\text{Fe}^{3+}$  menurunkan aktivitas pektinase.

Ion  $\text{Fe}^{3+}$  dapat bersifat sebagai aktivator maupun sebagai inhibitor pada kondisi tertentu. Ion  $\text{Fe}^{3+}$  pada konsentrasi 2 mM dan 4 mM berperan sebagai aktivator karena dapat meningkatkan aktivitas enzim pektinase. Dimungkinkan bahwa ion  $\text{Fe}^{3+}$  dapat berperan sebagai aktivator enzim dalam pembentukan intermediet kompleks enzim substrat. Selain itu ion  $\text{Fe}^{3+}$  dapat berfungsi sebagai stabilisator yakni membantu menstabilkan keadaan transisi pada reaksi antara enzim dengan substrat sehingga kompleks enzim substrat yang terbentuk tidak terurai kembali menjadi enzim dan substrat tetapi cenderung bereaksi ke arah kanan membentuk gula pereduksi yaitu asam galakturonat.

**Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis.** Penentuan  $V_m$  dan  $K_M$  dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi

konsentrasi substrat yang berbeda dengan jumlah enzim yang digunakan konstan dan dilakukan pada kondisi optimum enzim. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan yaitu (0,1-0,5) (b/v).



Gambar 4. Kurva hubungan konsentrasi substrat pektin terhadap aktivitas enzim pektinase.

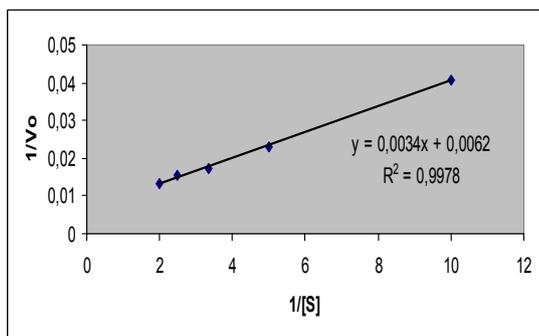
Gambar 4 menunjukkan bahwa konsentrasi substrat sebanding dengan aktivitas enzim. Pada konsentrasi substrat rendah, aktivitas enzim juga rendah karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang makin tinggi, maka sisi aktif enzim akan makin banyak mengikat substrat sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga semakin banyak. Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas.

Harga  $V_m$  dan  $K_M$  dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* sebagai berikut :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (3)$$

Berdasarkan persamaan di atas dapat dibuat persamaan regresi liniernya ( $y = ax + b$ ), dimana nilai  $a$  sebagai  $K_M/V_m$  dan nilai  $b$  merupakan  $1/V_m$ .

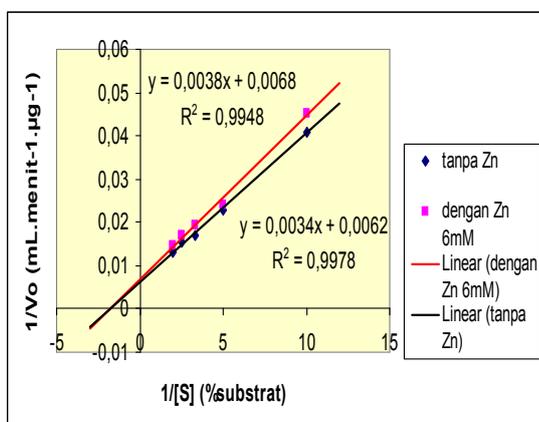
Berdasarkan Gambar 5 diperoleh nilai  $a$  ( $K_M/V_m$ ) sebesar 0,0034 dan nilai  $b$  ( $1/V_m$ ) sebesar 0,0062 sehingga dari persamaan linier tersebut diperoleh nilai  $K_M$  sebesar 0,55%( $b/v$ ) dan nilai  $V_m$  sebesar 161,29  $\mu\text{mol/mL}$  menit.



Gambar 5. Kurva hubungan  $1/[S]$  terhadap  $1/V_0$ .

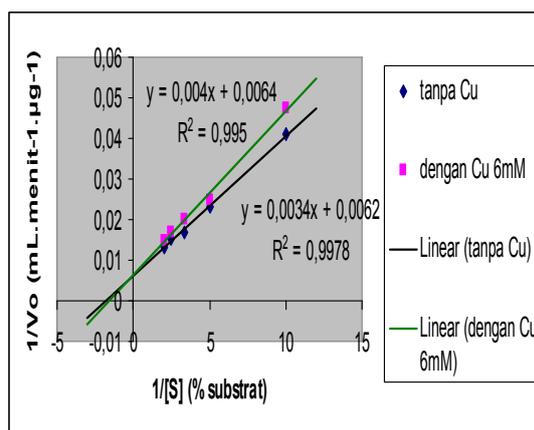
Nilai  $K_M$  merupakan konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh enzim agar dapat bekerja maksimal. Sehingga dari harga  $K_M$  yang diperoleh dapat menunjukkan bahwa enzim pektinase dapat bekerja maksimal pada konsentrasi substrat 0,5%( $b/v$ ).

Adanya pengaruh inhibisi ion-ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$  pada konsentrasi tinggi dapat diketahui dengan membandingkan gabungan kurva hubungan  $1/[S]$  dengan  $1/V_0$  pada konsentrasi ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$  6 mM (konsentrasi ion 6 mM merupakan salah satu dari konsentrasi  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$  yang menyebabkan aktivitas enzim menurun).



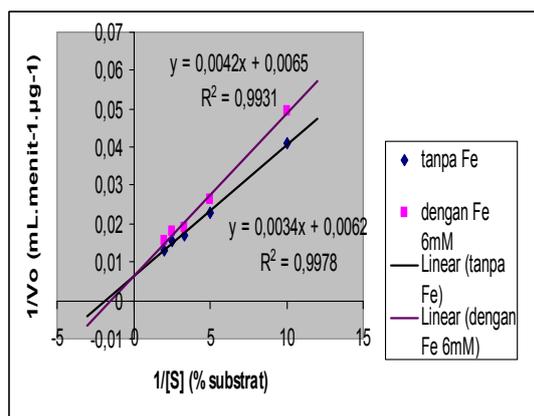
Gambar 6. Kurva jenis inhibisi  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas pektinase.

Pada Gambar 6 terlihat bahwa pektinase dengan penambahan ion  $Zn^{2+}$  dengan konsentrasi 6 mM, diperoleh intersep sebesar 0,0068 dan slope 0,0038, sehingga nilai  $V_{mapp}$  sebesar 147,06  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dan  $K_{Mapp}$  sebesar 0,56%.



Gambar 7. Kurva jenis Inhibisi  $Cu^{2+}$  terhadap aktivitas pektinase.

Pada Gambar 7 terlihat bahwa pektinase dengan penambahan ion  $Cu^{2+}$  konsentrasi 6 mM, diperoleh intersep sebesar 0,0064 dan slope 0,004, sehingga nilai  $V_{mapp}$  sebesar 156,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dan  $K_{Mapp}$  sebesar 0,63%.



Gambar 8. Kurva jenis Inhibisi  $Fe^{3+}$  terhadap aktivitas pektinase.

Pada Gambar 8 terlihat bahwa pektinase dengan penambahan ion  $Fe^{3+}$  konsentrasi 6 mM, diperoleh intersep sebesar 0,0062 dan slope 0,0042, sehingga nilai  $V_{mapp}$  sebesar 153,85  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dan  $K_{Mapp}$  sebesar 0,65%

Bila dibandingkan nilai  $V_m$  dan  $K_m$  tanpa penambahan logam mempunyai nilai yang hampir sama untuk  $K_M$  tetapi nilai  $V_m$  berbeda dimana nilai  $V_m$  tanpa penambahan ion logam mempunyai nilai yang relatif lebih besar jika dibandingkan dengan nilai  $V_{mapp}$  dengan penambahan logam ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ). Jika dilihat dari ketiga gambar kurva jenis inhibisi ion logam terhadap aktivitas pektinase maka dapat disimpulkan bahwa jenis inhibisi ion ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$ ) adalah jenis inhibisi non-kompetitif. Pada kondisi ini ion-ion logam tidak berperan dalam membantu sisi aktif enzim sebagai asektor elektron karena kemampuan sisi aktif enzim untuk mengikat ion-ion asing terbatas.

Dengan adanya inhibitor yang terikat pada sisi allosterik enzim akan menekan keberadaan gugus aktif enzim sehingga konformasi enzim tidak sesuai dengan substrat. Sehingga mengakibatkan enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan pembentukan asam galakturonat terhambat yang mengakibatkan aktivitas enzim pektinase menurun.

Konstanta inhibisi atau  $K_I$  yaitu konstanta yang menggambarkan kesetimbangan di sosiasi kompleks enzim-inhibitor (EI). Jika nilai  $K_I$  besar maka enzim memiliki afinitas yang rendah terhadap inhibitor, sehingga kompleks EI menjadi tidak stabil dan mudah terurai kembali menjadi enzim dan inhibitor, begitu juga sebaliknya jika nilai  $K_I$  kecil maka enzim memiliki afinitas yang tinggi terhadap enzim sehingga inhibitor akan terikat dengan kuat pada enzim yang mengakibatkan konformasi enzim mengalami perubahan dan tidak sesuai dengan bentuk konformasi substrat sehingga tidak terbentuk kompleks enzim substrat yang akan bereaksi lebih lanjut untuk membentuk produk yaitu asam galakturonat.

Harga  $K_I$  dapat diperoleh dengan membandingkan kedua persamaan *Lineweaver-Burk*. Nilai  $K_I$  berturut-turut untuk ion logam  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$  yaitu 333,33; 41,38; 32,97.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa kondisi kerja optimum aktivitas ekstrak kasar enzim pektinase dalam menghidrolisis substrat pektin menjadi gula pereduksi terjadi pada pH 7, temperatur 35 °C, dan waktu inkubasi selama 50 menit dan dihasilkan aktivitas enzim sebesar 99,85 Unit. Harga  $V_m$  dan  $K_M$  yang diperoleh dari persamaan *Lineweaver-Burk* untuk enzim tanpa penambahan ion logam ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$ ) sebesar 161,29  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$  dan 0,55% (b/v). Nilai  $V_{mapp}$  dan  $K_{Mapp}$  yang diperoleh dari persamaan *Lineweaver-Burk* untuk enzim dengan penambahan ion logam ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Fe^{3+}$ ) dengan konsentrasi 6 mM yaitu berturut-turut sebesar (147,06; 156,25; 153,85)  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$  sedangkan untuk nilai  $K_M$  berturut-turut sebesar (0,56; 0,63; 0,65) %. Serta nilai  $K_I$  berturut-turut sebesar (333,33; 41,38; 32,97). Dengan jenis inhibisi untuk ketiga ion yaitu inhibisi non-kompetitif.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Aslim, B., Necdet, S., dan Yavuz, B., (2000), *Determination of Some Properties of Bacillus Isolated from Soil*, Turk J Biol 26 (2002) 41-48, Turkey.
- [2] Banu, A. R., M. K. Devi, G. R. Gnanaprabhal, B. V. Pradeep, dan M. Palaniswamy, (2010), Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium chrysogenum*, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol. 3 No. 4, ISSN: 0974-6846.
- [3] Bayoumi, R. A., Hesham, M.Yassin, Mahmoud, A. Swelim, Ebstam, dan Z. Abdel-All, (2008), Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Waste Under Solid State Fermentation Conditions, *Journal of Applied Sciences Research*, 4 (12): 1708-1721, INSInet

Publication.

- [4] Dali, S., Abd., Rauf P., M. Noor J., dan Pirman AP., (2009), Pengaruh Substrat dan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopra Berjamur, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, Vol. 13, No. 3 (ISSN : 1410-7031).
- [5] Dharani dan Aiyer, (2004), Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by *Bacillus Licheniformis* SPT 27, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3 (10), pp.519-522.
- [6] Jayani, R. S., S. Saxena, dan R. Gupta, (2005), Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review, *Process Biochemistry*, **40**, 2931-2944.
- [7] Rahman, D., (2001), *Pengantar Teknologi Fermentasi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas, Bioteknologi IPB, Bogor