

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ENZYME FROM *Penicillium sp-3* LOCAL STRAIN

Imobilisasi Enzim Glukosa Oksidase dari Penicillium sp-3 Galur Lokal

Ahyar Ahmad^{1,*}, Andi Syaiful¹, Firman AP² and Abdul Rauf Patong¹

¹ Biochemistry and Biotechnology Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Hasanuddin University, Makassar, 90245

² Bioprocess Laboratory, Ujung Pandang State Polytechnic, Makassar, 90245.

Received 5 January 2007; Accepted 2 February 2007

ABSTRACT

Immobilization of glucose oxidase (GOD) enzyme from Penicillium sp-3 local strain has been carried out using ionotropically entrapping method in Ca-alginate membrane coupled with Na-polyacrylate. The entrapment of the enzyme in diffusion membrane occur spontaneously by cross-linking between Na-alginate/Na-polyacrylate and CaCl₂. The GOD enzyme immobilized by addition of 1 % Na-polyacrylate has the highest encapsulation efficiency, that is 87.13 % with the smallest percentage of diffusion, i.e. 23.37% and the relative activity of 50%. The GOD immobilized enzyme had good stability at the pH range 4 – 7 during 30 minutes of storage and was stable at a temperature of 20 °C. The activity of the GOD enzyme after being utilized continuously for 5 times only decrease up to 47,06 % compared to that in the initial utilization.

Keywords: immobilization, glucose oxidase, *Penicillium sp-3*, calcium alginate, sodium polyacrylate.

PENDAHULUAN

Sel hidup dengan ukurannya yang sangat kecil (*mikroskopis*) dapat kita pandang sebagai suatu bioreaktor kimia yang sangat kompleks dalam kemampuannya untuk mengendalikan proses penguraian komponen nutrisi maupun pembentukannya serta konsumsi bagi metabolisme sel. Hal ini berlaku juga untuk beberapa sel bakteri (*bacteria*) dan alga biru-hijau serta beberapa sel jamur (*fungi*) yang memiliki daerah penyebaran yang sangat luas, khususnya di Indonesia yang dapat ditemukan pada berbagai tempat, baik di daratan maupun pada tempat-tempat yang ekstrim seperti di dasar laut, sumber air panas, daerah yang tercemar dan sebagainya. Keanekaragaman hayati (*Biodiversity*) tersebut merupakan potensi alam yang telah banyak dimanfaatkan dalam industri bioproses untuk menghasilkan berbagai biomaterial (*Chemo-diversity*) yang berdaya guna dan bernilai tinggi seperti antibiotik, protein hormon, enzim, biopolimer, bahan kimia dan sebagainya.

Pada bidang industri dan biomedik merupakan sektor yang banyak melibatkan berbagai metode enzimatik menggunakan enzim glukosa oksidase (GOD) dan berbagai enzim lainnya. Dalam bidang industri, enzim GOD digunakan dalam produksi asam glukonat dan sebagai sumber hidrogen peroksida dalam pengawetan bahan makanan [1]. Sedangkan dalam bidang biomedik, enzim GOD dan enzim lainnya digunakan dalam diagnosis berbagai penyakit metabolit. Enzim GOD merupakan biomaterial dasar dalam

perancangan biosensor pada penetapan kadar glukosa dalam darah, serum maupun plasma. Penetapan kadar glukosa dengan metode enzimatik baik secara kolorimetri [2], maupun secara amperometri [3, 4] bila dibandingkan dengan berbagai metode non-enzimatik lainnya, memiliki keunggulan yang lebih besar, karena enzim GOD memiliki spesifitas substrat yang tinggi terhadap β -D-glukosa. Bahkan telah berhasil dikembangkan sistem monitoring analisis secara Online (*in-siliko*) terhadap proses fermentasi yang melibatkan enzim glukosa oksidase imobil [5].

Kelompok fungi genus *Penicillium* telah diketahui aktif memproduksi enzim GOD dan asam glukonat [6]. Glukosa oksidase yang dihasilkan oleh fungi genus *Penicillium* merupakan enzim ekstraseluler. Dewasa ini enzim GOD diproduksi dan dipasarkan berupa serbuk maupun larutan dalam bentuk kit glukosa-test. Penggunaan enzim glukosa oksidase dalam bentuk larutan kurang ekonomis, karena enzim tersebut tidak dapat dimanfaatkan kembali dalam penggunaannya. Untuk efisiensi penggunaan enzim dalam analisis maupun dalam proses produksi, maka dapat dikembangkan teknik imobilisasi enzim [7]. Enzim imobil bila dibandingkan dengan kounterpart dalam larutan mempunyai keuntungan, yaitu mudah diperoleh kembali untuk digunakan secara berlanjut. Disamping itu, enzim terimobilisasi seringkali dapat digunakan untuk diproses secara berlanjut dari aliran substrat dengan kehilangan aktivitas katalisis yang relatif kecil. Karakteristik ini membuat enzim imobil menarik jika

* Corresponding author.
Email address : ahyar1@yahoo.com

substrat yang sangat banyak dibutuhkan dan atau enzim-enzim yang bersangkutan adalah mahal.

Pada dekade terakhir ini telah dikembangkan berbagai metode alternatif dalam teknologi imobilisasi enzim pada penetapan kadar glukosa, kolesterol dan berbagai senyawa metabolit lainnya dalam darah maupun urin. Hingga saat ini dikenal beberapa teknik imobilisasi enzim seperti pengikatan silang pada matriks pendukung (*cross-linking*), penjebakan secara fisik (*entrapment*), adsorpsi enzim pada permukaan zat padat (*adsorption*) dan pengikatan secara kovalen pada bahan padat pendukung (*carrier-binding*) [8,9]. Imobilisasi enzim GOD dan peroksidase secara simultan dengan menggunakan derivat selulosa telah dilaporkan sebelumnya [10], dimana GOD -peroksidase imobil ini dapat digunakan untuk penentuan glukosa secara kolorimetri dengan aktivitas yang meningkat dibandingkan dengan enzim-terlarut. Kemudian kelompok peneliti Jepang [11], melaporkan bahwa imobilisasi enzim GOD dalam membran polikarbonat dimodifikasi oleh urethane terangkai dengan poli-(L-lisin) dan diaktivasi dengan glutaraldehid ternyata memiliki kestabilan suhu dan pH yang lebih besar dibandingkan dengan enzim terlarut. Kelompok peneliti lain [12] juga telah melaporkan bahwa imobilisasi enzim GOD dalam lapisan molekular film poli-ionik (*poly-ionic molecular films*) memiliki aktivitas dan stabilitas enzim yang meningkat, bahkan imobilisasi enzim GOD dalam lapisan film polielektrolit nanoscale (*nanoscale polyelectrolyte film*) memiliki lapisan film yang tipis dan stabil dengan aktivitas yang besar [13].

Imobilisasi enzim merupakan teknik yang sangat efisien dalam perakitan biosensor. Beberapa kelebihan enzim yang diimobilisasi pada permukaan elektroda (*biosensor*) dan bahan pendukung lainnya adalah (1) memungkinkan reaksi enzimatik dilakukan berulang-ulang, (2) analisis dapat dilakukan dalam jumlah sampel yang banyak hanya dalam waktu beberapa menit saja dan (3) tidak diperlukan peroksidase dan pereaksi kimia (khromogen seperti o-dianisidin). Dengan didapatkannya metode imobilisasi enzim GOD pada permukaan elektroda, maka suatu saat analisis glukosa dengan menggunakan biosensor menjadi lebih cepat, efisien dan ekonomis [14, 15].

Hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan sebelumnya [6], adanya indikasi bahwa beberapa isolat fungi diantaranya *Penicillium sp-3* galur lokal potensial menghasilkan enzim GOD intraseluler. Hingga saat ini, imobilisasi enzim GOD dari *Penicillium sp-3* galur lokal belum pernah dilaporkan. Penelitian yang dilakukan meliputi (1) Imobilisasi enzim GOD intraseluler dari *Penicillium sp-3* dalam membran Ca-Alginat, (2) Penentuan pengaruh konsentrasi penambahan Na Poliakrilat terhadap efisiensi enkapsulasi dan persentasi difusi enzim GOD imobil, (3) Karakterisasi enzim GOD imobil dalam membran Ca-alginat dan (4) Penentuan stabilitas pH, suhu serta operasional enzim GOD imobil.

METODE PENELITIAN

Bahan

Fungi *Penicillium sp-3*, Horseradish-Peroksidase (Sigma, P8250, 150-250 U.mg⁻¹ padat), Na Alginat dari alga coklat, (*Laminaria hyperborea*) (Sigma, A2033), Na poliakrilat (Fluka, 81130), o-Dianisidin 2HCl (Sigma, D3252-256), reagen fenol Folin-Ciocalteu, Bovine Serum Albumin (BSA), D-glukosa monohidrat, CuSO₄.5H₂O, C₆H₅O₇Na₃.2H₂O, Na₂CO₃, NaOH, CaCl₂, bufer fosfat (NaH₂PO₄.H₂O dan Na₂HPO₄.12H₂O), dan bufer sitrat (C₆H₅O₇H₃ dan C₆H₅O₇Na₃.2H₂O).

Alat

Autoclave (P-Selecta), Inkubator (Incucell U-39060, Cole Palmer, Inc.), Mikropipet-(20-200) µL (Eppendorf Research), Mikropipet-(100-1000)µL (Finnpipette Campus), Neraca Analitik (Mettler AS 200), pH-meter (Metrohm 632 pH-meter), Spektrofotometer-Vis (Thermospectronic Genesys 20), Magnetik Stirrer (Metrohm 728-Stirrer), Water Bath (Techne, TE-10A), *Syringe tube* dan peralatan gelas kimia.

Prosedur Kerja

Isolasi dan Pemurnian Enzim Glukosa Oksidase

Enzim glukosa oksidase diisolasi dari *Penicillium sp-3* galur lokal yang dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selopahan.

Imobilisasi Enzim Glukosa Oksidase

Imobilisasi enzim glukosa oksidase dilakukan dengan metode penjebakan secara ionotropik dalam alginat yang merupakan polimer karbohidrat [9, 16]. Larutan anionik dibuat dengan melarutkan 0,5 g Na alginat dan Na Poliakrilat ke dalam 50 mL aquades hingga memberikan konsentrasi Na.Poliakrilat (^b/_v) 0; 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5%. Kemudian sebanyak 10 mL larutan enzim glukosa oksidase dicampurkan ke dalam 20 mL larutan anionik. Larutan kationik dibuat dengan melarutkan CaCl₂ ke dalam aquades dengan konsentrasi 200 mM.

Sebanyak 10-20 mL larutan GOD/Poliakrilat / Alginat diteteskan ke dalam 200 mL larutan CaCl₂ melalui syringe tube pada kondisi pengadukan konstan selama 15-20 menit. Sebelum disaring melalui corong Büchner, ditambahkan sebanyak 200 mL aquades. Larutan kemudian disaring untuk memperoleh kapsul yang kemudian disuspensikan kembali ke dalam larutan CaCl₂ dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Larutan CaCl₂ kemudian disaring kembali untuk memperoleh kapsul enzim GOD imobil, dan selanjutnya dicuci dengan aquades untuk menghilangkan sisa larutan CaCl₂. Enzim GOD imobil

kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan ditempatkan pada suhu 4-10 °C.

Penentuan Efisiensi Enkapsulasi Enzim GOD Imobil

Penentuan efisiensi enkapsulasi enzim GOD imobil [16] dengan cara menentukan kadar protein [17] dalam larutan anionik (GOD/Poliakrilat/Alginat) dan dalam inti kapsul GOD imobil. Penentuan kadar protein dalam larutan anionik dilakukan dengan cara menambahkan satu tetes larutan melalui Syringe tube ini ke dalam tabung reaksi berisi 2 mL larutan buffer fosfat pH 6. Kadar protein dalam inti kapsul GOD imobil dilakukan dengan cara membelah kapsul untuk melarutkan kandungan enzimnya ke dalam tabung reaksi berisi 2 mL larutan buffer fosfat pH 6. Selanjutnya secara periodik sebanyak 1 mL larutan buffer fosfat ditentukan kadar proteinnya untuk masa inkubasi selama 5 menit ($t = 0$ jam) dan 20 jam pada temperatur 20 °C.

$$\text{Efisiensi Enkapsulasi (\%)} = \left(\frac{[GOD]_{\text{inti}, t=5 \text{ menit}}}{[GOD]_{\text{anionik}}} \right) \cdot 100$$

Penentuan Persentasi Difusi Enzim GOD Imobil.

Penentuan persentasi difusi enzim GOD imobil dilakukan dengan cara menentukan kadar protein dalam inti kapsul untuk masa inkubasi 24 jam terhadap kadar protein dalam inti kapsul untuk masa inkubasi 5 menit ($t = 0$ jam) berdasarkan prosedur penentuan efisiensi enkapsulasi.

$$\text{Persentasi difusi (\%)} = \left(1 - \frac{[GOD]_{\text{inti}, t=20 \text{ jam}}}{[GOD]_{\text{inti}, t=5 \text{ menit}}} \right) \cdot 100$$

Penentuan Aktivitas Enzim GOD Imobil

Penentuan aktivitas enzim GOD imobil (*coupled method*) dilakukan secara kolorimetri dengan pemanfaatan enzim peroksidase dan senyawa o-dianisidin sebagai khromogen [18, 19, 20]. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer fosfat pH 6 dan 0,3 mL glukosa 18% pada suhu 30 °C selama 5 menit. Selanjutnya filtrat ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan campuran o-dianisidin-buffer pH 6 dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit.

Penentuan pH Optimum Enzim GOD Imobil

Penentuan pH optimum aktivitas enzim GOD imobil dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim pada berbagai kisaran pH antara 4 hingga 8 dengan interval pH 0,5 unit. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer pH 4-8 dan 0,3 mL glukosa 18% pada suhu 30 °C. Selanjutnya filtrat ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan

campuran o-dianisidin-buffer pH 6 dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit.

Penentuan Suhu Optimum Enzim GOD Imobil

Penentuan suhu optimum aktivitas enzim GOD imobil dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim pada berbagai kisaran suhu antara 20 °C hingga 60 °C dengan interval suhu 5 °C. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer fosfat pH 6 dan 0,3 mL glukosa 18% pada suhu 20 hingga 60 °C. Selanjutnya filtrat ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan campuran o-dianisidin-buffer pH 6 dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit.

Penentuan Kestabilan pH Enzim GOD Imobil

Penentuan kestabilan pH terhadap aktivitas enzim GOD imobil dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer pH 4 hingga 8 masing-masing selama 10, 30, 60, 90 hingga 120 menit pada suhu 30 °C. Selanjutnya sebanyak 1 mL larutan enzim-buffer ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan campuran o-dianisidin-buffer pH 6; 0,3 mL glukosa 18% dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit.

Penentuan Kestabilan Suhu Enzim GOD Imobil

Penentuan kestabilan suhu terhadap aktivitas enzim GOD imobil dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer pH 6 pada suhu 20 hingga 60 °C selama 10, 30, 60, 90 hingga 120 menit. Selanjutnya sebanyak 1 mL larutan enzim-buffer yang telah diinkubasi pada suhu 30 °C ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan campuran o-dianisidin-buffer pH 6; 0,3 mL glukosa 18% dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit.

Penentuan Kestabilan Operasional Enzim GOD Imobil

Penentuan stabilitas operasional aktivitas enzim GOD imobil dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim. Sebanyak 0,2 g enzim GOD imobil diinkubasi ke dalam 1 mL larutan buffer pH 6 dan 0,3 mL glukosa 18% pada suhu 30 °C. Selanjutnya filtrat ditambahkan ke dalam kuvet berisi: 1,5 mL larutan campuran o-dianisidin-buffer pH 6 dan 0,2 mL enzim peroksidase 40 Unit/mL, yang telah diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30 °C. Kemudian diukur serapan warnanya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm selama 5 menit dengan interval waktu pembacaan 1 menit. Enzim GOD imobil ini untuk selanjutnya ditentukan aktivitasnya kembali secara berulang-ulang hingga pembacaan aktivitas enzim pada spektrofotometer sudah sangat kecil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imobilisasi Enzim GOD Imobil

Imobilisasi terhadap enzim glukosa oksidase dilakukan dengan tujuan untuk memodifikasi enzim secara fisik dari keadaan enzim-terlarut menjadi keadaan enzim-taklarut, sehingga efek difusi enzim ke dalam substrat dapat dicegah dan mempermudah untuk memperoleh kembali enzim-taklarut tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat-cair sederhana.

Metode yang dilakukan dalam teknik imobilisasi terhadap enzim glukosa oksidase ini adalah dengan cara penjebakan enzim ke dalam suatu matriks pendukung (gel-membran) menggunakan polimer karbohidrat Na Alginat sebagai bahan utama. Metode ini digunakan dengan alasan bahwa penjebakan merupakan metode yang lunak terhadap enzim karena tidak menyebabkan terjadinya modifikasi kimia, dimana enzim sama sekali tidak diikat pada matriks pendukung. Namun kelemahan utama dari metode imobilisasi ini, yaitu hilangnya enzim secara kontinu melalui membran-difusi. Hal ini disebabkan karena terjadinya difusi melalui membran yang permilabel terhadap enzim itu sendiri. Difusi enzim yang terjadi melalui membran-difusi, bergantung pada kekuatan dan ukuran pori membran.

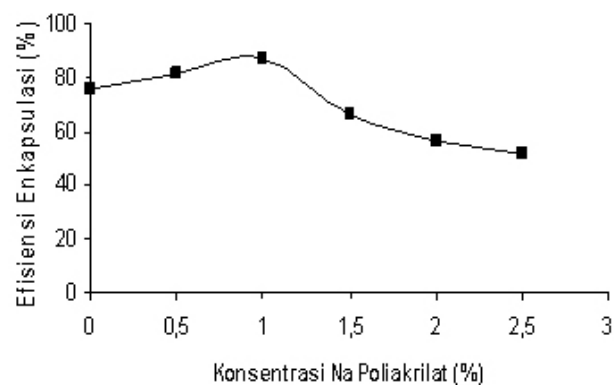
Untuk mengatasi kemungkinan terjadinya kehilangan enzim setelah proses imobilisasi, maka memperoleh matriks pendukung (membran-difusi) yang kuat merupakan hal yang penting dalam metode imobilisasi ini. Penggunaan polimer sintetik Na Poliakrilat bersama dengan polimer pendukung utama Na Alginat diharapkan dapat memberikan membran difusi yang lebih kuat dan stabil. Variasi konsentrasi Na Poliakrilat yang digunakan, yaitu sebesar 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5% ($^{b}/_{v}$) terhadap konsentrasi Na Alginat sebesar 0,1% ($^{b}/_{v}$), selanjutnya disebut larutan Anionik.

Enzim glukosa oksidase (GOD) yang digunakan dalam imobilisasi ini sebesar 1:2 terhadap larutan anionik. Selanjutnya larutan GOD/Anionik ini disetarakan ke dalam larutan CaCl_2 200 mM (larutan Kationik) melalui *syringe tube* dengan menjaga ukuran gel yang akan terbentuk dalam kondisi pengadukan untuk menghindari terjadinya lengket antara gel. Matriks gel (membran-difusi) yang terbentuk seketika (*instant*) merupakan hasil dari pengikatan silang antara kation Ca^{2+} dengan anion Alginat⁻ dan Poliakrilat yang melepaskan garam NaCl. Kemudian enzim GOD imobil yang terbentuk disimpan pada suhu 4-20 °C setelah terlebih dahulu dicuci dan dikeringkan pada suhu kamar.

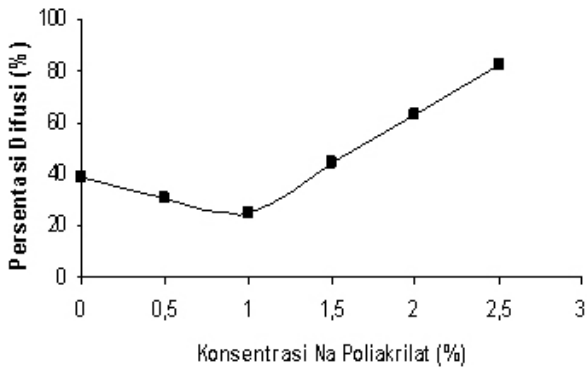
Efisiensi Enkapsulasi Enzim GOD Imobil

Efisiensi enkapsulasi terhadap enzim GOD imobil ditentukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan Na Poliakrilat (konsentrasi tertentu) terhadap pembentukan matriks-gel yang kuat dan stabil dalam penjebakan (daya jebak relatif) enzim. Efisiensi enkapsulasi enzim GOD imobil ditentukan berdasarkan perbandingan jumlah enzim yang terkandung dalam larutan GOD/Anionik dengan enzim yang terjebak dalam inti gel setelah kandungan enzim GOD imobil tersebut didifusikan selama 0 jam ($t= 5$ menit) pada temperatur 20 °C. Konsentrasi protein dari enzim ditentukan melalui penetapan kadar protein menggunakan pereaksi Folin Phenol [17].

Berdasarkan hasil penentuan efisiensi enkapsulasi terhadap enzim GOD imobil yang diperoleh sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1, penambahan polimer Na Poliakrilat ternyata dapat meningkatkan efisiensi enkapsulasi (daya jebak relatif) enzim GOD imobil dari 75,74% (tanpa penambahan Na Poliakrilat) menjadi 81,69% (Na Poliakrilat 0,5%) hingga 87,13% (Na Poliakrilat 1%).



Gambar 1. Pengaruh penambahan Na.Poliakrilat terhadap efisiensi enkapsulasi (daya jebak) enzim GOD imobil dalam membran Ca-Alginat



Gambar 2. Pengaruh penambahan Na.Poliakrilat terhadap persentasi difusi enzim GOD imobil dalam membran Ca-Alginat

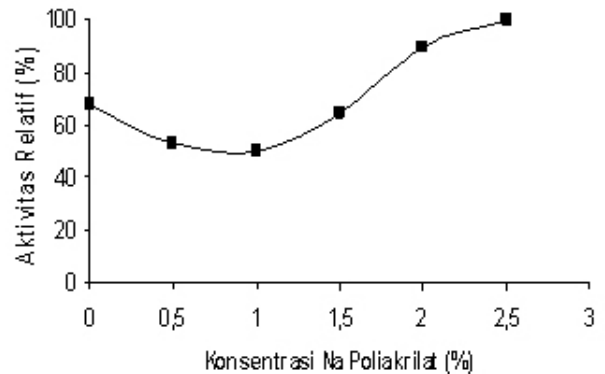
Namun dengan penambahan Na Poliakrilat sebesar 1,5 hingga 2,5%, ternyata menurunkan daya jebak enzim jauh dibawah daya jebak Na Alginat tanpa penambahan Na Poliakrilat, yaitu sebesar 65,88% (Na Poliakrilat 1,5%); 56,65% (Na Poliakrilat 2%) dan 51,35% (Na Poliakrilat 2,5%).

Hal ini disebabkan karena Na Poliakrilat membentuk membran-difusi berupa kisi dimana enzim dijebak di dalam ruangan-ruangan yang terbentuk akibat terjadinya ikatan silang (Ca-Poliakrilat). Meskipun Na.Alginat juga mengalami pengikatan silang (Ca-Alginat), namun enzim dijebak ke dalam inti membran-difusi (inti gel), sehingga enzim yang terjebak lebih sulit untuk berdifusi keluar dibandingkan dengan enzim yang terjebak dalam kisi-kisi membran-difusi Ca Poliakrilat.

Penambahan Na.Poliakrilat dengan konsentrasi antara 0,5-1% terhadap Na Alginat 1% (Na Poliakrilat \leq Na Alginat) membuat daya jebak terhadap enzim menjadi jauh lebih kuat akibat terbentuknya membran-difusi yang berlapis antar kedua polimer. Sedangkan penambahan Na Poliakrilat dengan konsentrasi yang jauh lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi Na.Alginat (Na Poliakrilat $>$ Na Alginat) membuat daya jebak enzim berkurang. Hal ini dapat terjadi disebabkan karena terbentuknya membran-difusi berupa kisi yang jauh lebih besar dibandingkan dengan membran-difusi berupa inti gel sebagai akibat adanya daya kompetitif antara Na Poliakrilat (konsentrasi tinggi) dengan Na Alginat (konsentrasi rendah) terhadap CaCl_2 berkonsentrasi konstan (200 mM).

Persentase Difusi Enzim GOD Imobil

Persentase difusi merupakan parameter yang penting untuk diketahui dalam setiap proses imobilisasi enzim menggunakan metode penjebakan. Parameter ini menunjukkan daya difusi yang dimiliki oleh membran-difusi suatu matriks gel terhadap proses difusi suatu enzim imobil. Persentase difusi enzim GOD imobil ditentukan berdasarkan perbandingan enzim yang ada dalam membran - difusi (inti gel) setelah didifusikan



Gambar 3. Pengaruh penambahan Na Poliakrilat terhadap aktivitas relatif enzim GOD imobil

selama 20 jam dengan enzim yang ada dalam membran-difusi setelah 0 jam ($t = 5$ menit) berdifusi.

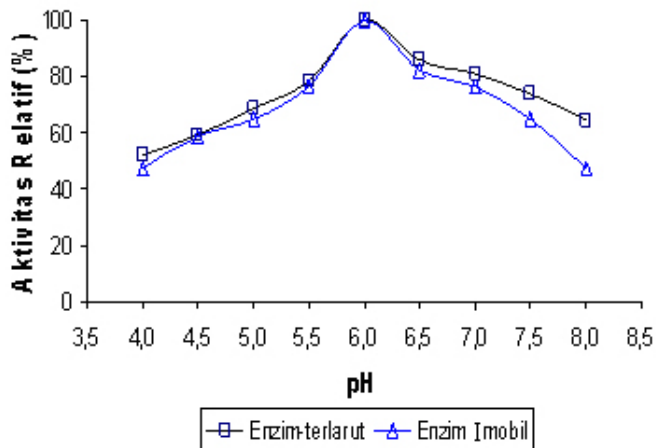
Berdasarkan hasil penentuan persentase difusi enzim GOD imobil yang diperoleh sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2, bahwa penambahan Na Poliakrilat ternyata dapat menurunkan persentase difusi (daya difusi) enzim GOD imobil dari 38,98% (tanpa penambahan Na Poliakrilat) menjadi 30,65% (Na Poliakrilat 0,5%) hingga 25,37% (Na Poliakrilat 1%). Namun pada penambahan Na Poliakrilat sebesar 1,5 hingga 2,5%, ternyata dapat meningkatkan daya difusi membran-difusi enzim GOD imobil, yaitu sebesar 44% (Na. Poliakrilat 1,5%); 62,79% (Na Poliakrilat 2%) dan 82,50% (Na Poliakrilat 2,5%).

Menurunnya daya difusi enzim GOD imobil dengan penambahan Na Poliakrilat 0,5-1% disebabkan oleh peningkatan efisiensi enkapsulasi (daya jebak) membran-difusi terhadap enzim pada konsentrasi yang sama. Sedangkan penambahan Na Poliakrilat dengan konsentrasi 1,5-2,5% menyebabkan meningkatnya difusi enzim sebagai akibat dari menurunnya efisiensi enkapsulasi yang dimilikinya sebagaimana telah dijelaskan pada penentuan efisiensi enkapsulasi enzim GOD imobil.

Aktivitas Enzim GOD Imobil

Penentuan aktivitas enzim GOD imobil dilakukan untuk melihat pengaruh penambahan Na Poliakrilat dengan konsentrasi antara 0,5-2,5% terhadap daya katalisis enzim imobil. Daya katalisis enzim GOD imobil dapat ditentukan secara kolorimetri pada panjang gelombang maksimum 440 nm dengan menggunakan kromogen o-dianisidin, dimana aliran produk yang dihasilkan dikatalisis lebih lanjut dengan bantuan enzim peroksidase dengan menghentikan reaksinya melalui sistem pemisahan padat-cair sederhana antara enzim GOD imobil dengan substrat.

Aktivitas enzim GOD imobil pada berbagai konsentrasi Na Poliakrilat yang ditambahkan, diperlihatkan pada Gambar 3. Aktivitas enzim GOD imobil memiliki pola yang sama terhadap persentase



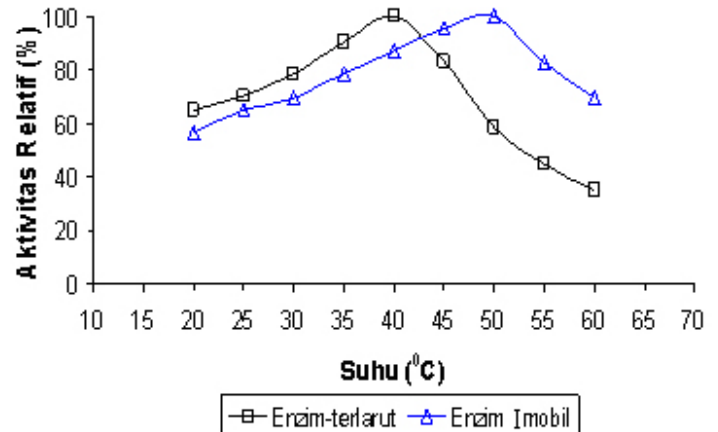
Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas relatif enzim GOD imobil pada konsentrasi Na Poliakrilat 1%

difusi (daya difusi) enzim. Persentasi difusi yang rendah memiliki aktivitas yang rendah pula, dimana hal ini terjadi pada enzim GOD imobil tanpa penambahan Na Poliakrilat (67,86%), dengan penambahan Na Poliakrilat 0,5% (53,57%) dan Na Poliakrilat 1% (50,00%). Sedangkan enzim GOD imobil dengan persentasi difusi yang besar, ternyata memiliki aktivitas yang besar pada penambahan Na Poliakrilat 1,5% (64,29%); Na Poliakrilat 2% (89,29%) dan Na Poliakrilat 2,5% (100,00%). Aktivitas enzim GOD imobil bergantung pada jumlah enzim yang didifusikan pada substrat. Dengan kata lain pada kondisi optimum (konstan) aktivitas enzim GOD imobil berbanding lurus dengan persentasi difusinya.

pH Optimum Enzim GOD Imobil

pH optimum aktivitas enzim GOD imobil dengan konsentrasi Na Poliakrilat 1% ditentukan berdasarkan aktivitas enzim pada berbagai kisaran pH antara 4 hingga 8 (suhu 30 °C) melalui penambahan larutan buffer pada proses reaksi enzim-substrat. Konsentrasi produk (peroksida) yang dihasilkan dari proses katalisis ini kemudian ditentukan dengan pemanfaatan enzim peroksidase pada pH 6 dan suhu 30 °C. Hal ini dilakukan untuk menjaga kondisi pH tetap sama pada saat penentuan konsentrasi produk (peroksida) hasil reaksi enzim-substrat pertama pada pH yang berbeda, sehingga pH dapat diabaikan pada saat pengukuran produk (peroksida) sebagai substrat oleh enzim peroksidase.

Pengaruh pH terhadap aktivitas relatif enzim GOD imobil ditunjukkan pada Gambar 4. Enzim GOD imobil memiliki pH optimum yang sama dengan enzim GOD-terlarut, yaitu pH 6 sehingga tidak terjadi pergeseran nilai pH optimum, kecuali pergeseran kurva pH-aktivitas yang relatif kecil pada daerah basa antara pH 7-8. pH optimum enzim GOD imobil yang tidak mengalami pergeseran terhadap pH optimum enzim GOD-terlarut, disebabkan karena enzim GOD yang diimobilisasi dengan cara penjebakan secara ionotropik dalam



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas relatif enzim GOD imobil pada konsentrasi Na Poliakrilat 1%

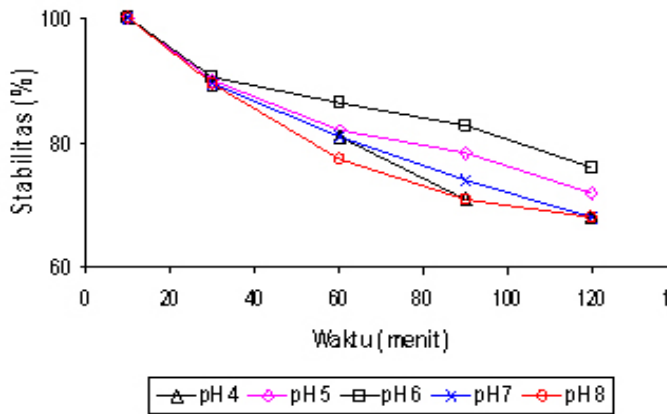
membran gel Ca-Alginat tidak mengalami modifikasi kimia mengingat enzim sama sekali tidak terikat pada matriks pendukung.

Selain itu membran-difusi yang terbentuk melalui pengikatan silang (*ikatan ionik*) antara Alginat/Poliakrilat dengan Ca^{2+} memiliki muatan listrik yang netral. Sehingga enzim GOD imobil yang mengkatalisis substrat baik melalui difusi enzim maupun substrat melalui membran-difusi tetap optimal pada pH 6 seperti pH optimum enzim GOD-terlarut.

Suhu Optimum Enzim GOD Imobil

Suhu optimum aktivitas enzim GOD imobil dengan konsentrasi Na Poliakrilat 1% ditentukan berdasarkan aktivitas enzim pada berbagai kisaran suhu antara 20 °C hingga 60 °C (pH 6). Konsentrasi produk (peroksida) yang dihasilkan dari proses katalisis ini kemudian ditentukan dengan pemanfaatan enzim peroksidase pada pH 6 dan suhu 30 °C. Hal ini dilakukan untuk menjaga kondisi suhu tetap sama pada saat penentuan konsentrasi produk (peroksida) hasil reaksi enzim-substrat pertama pada suhu yang berbeda, sehingga suhu dapat diabaikan pada saat pengukuran produk (peroksida) sebagai substrat oleh enzim peroksidase.

Aktivitas enzim GOD imobil pada berbagai kondisi suhu diperlihatkan pada Gambar 5. Enzim GOD imobil mengalami pergeseran suhu optimum dan kurva suhu-aktivitas, dimana suhu optimum bergeser dari 40 °C pada enzim GOD-terlarut menjadi 50 °C. Hal ini disebabkan karena membran-difusi (matriks gel) yang dimiliki oleh enzim imobil dapat meningkatkan ketahanan enzim terhadap pengaruh suhu yang cukup besar, sehingga aliran substrat yang berdifusi ke dalam membran-difusi dapat dikatalisis dengan maksimal oleh enzim tanpa terganggu oleh suhu yang ada. Sedangkan pergeseran kurva suhu-aktivitas yang terjadi pada kisaran suhu 20-25 °C terjadi akibat suhu rendah menghambat proses difusi enzim dengan terjadinya penurunan mobilitas enzim sebagai akibat



Gambar 6. Pengaruh waktu inkubasi terhadap stabilitas enzim GOD imobil pada kisaran pH 4-8 dan suhu 30 °C

dari meningkatnya viskositas enzim, hingga pada suhu 30-40 °C difusi enzim masih cukup lambat. Pada suhu 50-60 °C aktivitas enzim GOD imobil jauh lebih besar daripada enzim GOD-terlarut meskipun terjadi penurunan aktivitas yang disebabkan oleh terjadinya denaturasi protein enzim.

Stabilitas terhadap pH dari Enzim GOD Imobil

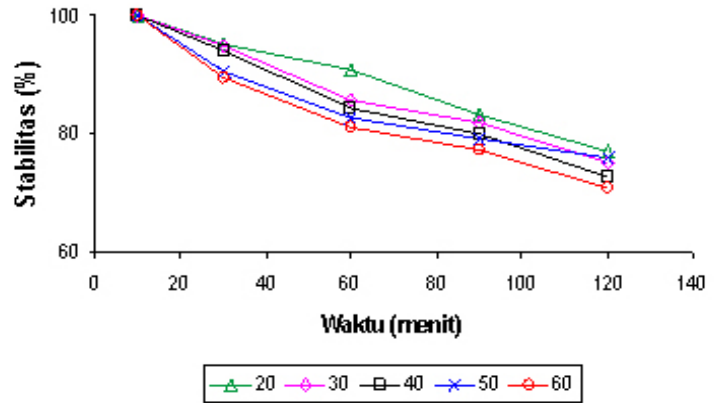
Kestabilan enzim GOD imobil terhadap pH dilakukan dengan cara menginkubasi enzim GOD imobil pada kondisi pH antara 4-5 selama waktu yang telah ditentukan pada suhu 30 °C. Selanjutnya enzim yang telah didifusikan melalui membran difusi ditentukan aktivitasnya berdasarkan penentuan aktivitas enzim GOD imobil.

Stabilitas enzim GOD imobil terhadap kondisi pH tertentu dalam berbagai waktu diperlihatkan dalam Gambar 6. Enzim GOD imobil bersifat lebih stabil pada pH 6 dalam berbagai waktu inkubasi dibandingkan dengan kondisi pH yang lain dimana enzim GOD imobil mengalami difusi enzim dalam jumlah yang kecil. Sedangkan pada kondisi pH yang lain, enzim mengalami penurunan stabilitas terutama pada waktu inkubasi selama 60 hingga 120 menit yang jauh di bawah stabilitas enzim GOD imobil pada pH 6.

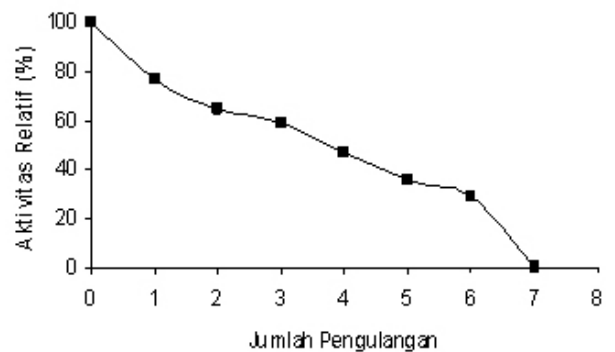
Stabilitas terhadap Suhu dari Enzim GOD Imobil

Kestabilan enzim GOD imobil terhadap suhu dilakukan dengan cara menginkubasi esnzim GOD imobil pada kondisi suhu antara 20-60 °C selama waktu yang telah ditentukan pada pH 6. Selanjutnya enzim yang telah didifusikan melalui membran-difusi ditentukan aktivitasnya berdasarkan penentuan aktivitas enzim GOD imobil.

Stabilitas enzim GOD imobil terhadap kondisi suhu tertentu dalam berbagai waktu diperlihatkan pada Gambar 7. Enzim GOD imobil bersifat lebih stabil pada suhu 20 °C dalam berbagai waktu inkubasi dibandingkan dengan kondisi suhu yang lain. Makin besar kondisi



Gambar 7. Pengaruh waktu inkubasi terhadap stabilitas enzim GOD imobil pada suhu 20-60 °C dan pH 6



Gambar 8. Stabilitas operasional enzim GOD imobil

suhu maka kestabilan enzim semakin menurun. Hal ini disebabkan karena pada kondisi rendah terjadi penghambatan difusi enzim dengan menurunnya mobilitas (viskositas enzim meningkat) sehingga kehilangan enzim secara kontinu pada suhu 20 °C dapat diatasi. Pada suhu tinggi, mobilitas enzim meningkat (viskositas enzim menurun) sehingga enzim mudah berdifusi melalui membran-difusi (matriks gel).

Stabilitas Operasional Enzim GOD Imobil

Stabilitas operasional enzim GOD Imobil ditentukan dengan tujuan untuk mengetahui efektifitas penggunaan enzim GOD imobil secara berulang, dimana hal ini dilakukan berdasarkan penentuan aktivitas enzim. Stabilitas operasional enzim GOD imobil yang diperlihatkan pada Gambar 8 menunjukkan bahwa penggunaan enzim GOD imobil dapat dilakukan secara berulang hingga 6 kali pengulangan dengan aktivitas relatif terkecil sebesar 29,41%. Namun enzim GOD imobil kehilangan aktivitasnya, hingga pada pengulangan ke-4 hanya memiliki aktivitas relatif sebesar 47,06% dari penggunaan awalnya, sehingga penggunaan enzim GOD imobil secara berulang hanya efektif hingga 4 kali pengulangan.

Dewasa ini, sedang dikembangkan pendayagunaan enzim GOD imobil dalam berbagai keperluan termasuk dalam bidang biomedik yang meliputi analisis klinis terhadap berbagai penyakit metabolit melalui pengembangan biosensor glukosa. Pengembangan biosensor ini untuk penetapan kadar gula darah, banyak melibatkan enzim GOD terimobilisasi dengan berbagai metode. Salah satu di antaranya yang dapat dimanfaatkan berdasarkan hasil penelitian ini adalah enzim GOD imobil yang diperoleh dengan menggunakan metode enkapsulasi. Biosensor glukosa menggunakan enzim GOD imobil ini diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif utama dalam pengembangan analisis klinis yang lebih mudah, efisien dan ekonomis.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa enzim glukosa oksidase intraseluler dari *Penicillium sp-3* yang diimobilisasi melalui penjebakan dalam membran Ca-Alginat dengan penambahan Na Poliakrilat, memiliki efisiensi enkapsulasi tertinggi sebesar 87,13% dengan persentasi difusi terendah sebesar 25,37%, pada konsentrasi penambahan Na Poliakrilat sebesar 1%. Enzim glukosa oksidase imobil dengan penambahan Na Poliakrilat 1% memiliki aktivitas maksimum pada pH 6 (pH optimum) dan suhu 50 °C (suhu optimum). Enzim glukosa oksidase imobil dengan penambahan Na Poliakrilat 1% memiliki stabilitas relatif baik terhadap berbagai kondisi pH (4-8) pada penyimpanan hingga 30 menit. Enzim glukosa oksidase imobil dengan penambahan Na Poliakrilat 1% memiliki stabilitas relatif yang baik pada suhu 20 °C. Enzim glukosa oksidase imobil dengan penambahan Na Poliakrilat 1% dapat digunakan secara berulang-ulang, efektif hingga 5 kali pemakaian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh TPSDP (*Technological and Professional Skill Development Sector Project*) Batch II ADB Loan: 1792-INO Dirjen DIKTI DEPDIKNAS.

DAFTAR PUSTAKA

1. Swaisgood, H.E., 1985, Immobilization of Enzymes and Some Applications in the Food Industry., in A.I. Laskin (Ed.), *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology-(Biotechnology Series)* 1-24, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
2. Sudarmadji, S., Haryono, B. and Suhardi, 1984, *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian* (Edisi ketiga), Liberty, Yogyakarta, 51-57.
3. Aubrée-Lecat, A., C. Hervagault, A. Delacour, P. Beaudé, C. Bourdillon and Remy, M. 1989, *Anal. Biochem.*, 178 (2), 427-430.
4. Miao, Y., Chia, L. S. Goh, N. K. and Tan, S. N. 2000, *Analyst*, 125, 1591-1594.
5. Brooks, S. L., Ashby, R. E. Turner, A. P. F. Calder M. R. and Clarke, D. J. 1987, *Biosensors*, 4 (1), 68-71
6. Firman, A.P. and Aryantha, I.N.P., 2003, *Eksplorasi dan Isolasi Enzim Glukosa Oksidase dari Fungi Genus Aspergillus dan Penicillium Galur Indogenus*, Laporan Hasil Penelitian Dasar Lembaga Penelitian ITB, Bandung.
7. Harlander, S. K, 1989, Biotechnology Opportunities for the Food Industry., in Rogers, P. L. and Fleet, G. H. (Ed.), *Biotechnology and the Food Industry* (1-15), Gordon And Breach Science Publishers, Sydney-Australia.
8. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T. 1985, Immobilized Biocatalysts to Produce Amino Acids and Other Organic Compounds., in Laskin A. I. (Ed.), *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology: Biotechnology Series* (37-70), The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
9. Brodelius, P., 1985, Immobilized Plant Cells., in Laskin A. I. (Ed.), *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology: Biotechnology Series* (109-148), The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
10. Lyubov, K. Y. dan Ivanov, I. P., 1996, *Appl. Biochem. Biotech.*, 61, 277-287.
11. Suye, S-I, Y. Kumon, A. and Ishigaki, I., 1998, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 27, 245-248
12. Onda, M., Ariga, K. and Kunitake, T., 1999, *J. Biosci. Bioeng.*, 87 (1) 69-75.
13. Trau, D. and Renneberg, R., 2003, *Biosens. Bioelec.*, 18, 1491-1499.
14. Russel, L. J. and Rawson, K. M., 1986, *Biosensors*, 2 (1), 25-31
15. Weetall, H. H. and Hotaling, T., 1987, *Biosensors*, 3 (2), 57-63
16. Blandino, A., M. Macias, D. and Cantero, 2000, *Enzyme. Microb. Tech.*, 27, 319-324.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr A. L. and Randall, R. J. 1951, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
18. Worthington, C. C., 1988, *Worthington Enzyme Manual: Enzyme and Related Biochemical.*, Worthington Biobchemical Co., USA (155-158).
19. Worthington Glucose Oxidase, *Worthington Glucose Oxidase: Manual Page.*, (Online): http://www.worthington_biochem.com/GOP/default.html
20. Hatzinikolaou, D. G. and Macris, B. J. 1995, *Enzyme. Microb. Technol.*, 17, 530-534.