

KARAKTERISASI ENZIM β -SIKLODEKSTRIN GLUKOSILTRANSFERASE DARI ISOLAT LOKAL (BTS-3A, BTS-3B DAN CK-2) PROVINSI JAMBI

Afrudi Rudheka¹⁾, Arin Fitriani²⁾, Nina Fitriya³⁾, Rahmadevi⁴⁾, Desi Sagita⁵⁾

4,5 Prodi Farmasi, Universitas Adiwangsa Jambi

Email: daisyfarmasi@gmail.com

1,2,3 Prodi Farmasi, STIKES Harapan Ibu Jambi

Email : afrudirudhekaa@gmail.com ; arinfitriani0@gmail.com ; Ninafitriya621@gmail.com

Detail Artikel

Diterima : 14 April 2021

Direvisi : 8 Mei 2021

Diterbitkan : 9 Mei 2021

Kata Kunci

Siklodekstrin

β -Siklodekstrin glukosyltransferase

Horikoshi media

Isolat lokal

Penulis Korespondensi

Name : Desi Sagita

Affiliation : Prodi Farmasi,
Universitas Adiwangsa Jambi

Email :
daisyfarmasi@gmail.com

ABSTRAK

Enzim β -cyclodextrin glucosyltransferase (β -CGTase) adalah enzim ekstraseluler yang mengubah pati menjadi siklodekstrin. Senyawa siklodekstrin banyak dimanfaatkan di industri farmasi salah satunya untuk meningkatkan kelarutan. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri terutama genus *Bacillus* sp. Bakteri genus *Bacillus* sp banyak ditemukan di tanah. Beberapa isolat bakteri yang berasal dari tanah memberikan aktifitas CGTase yang berbeda beda. Pada penelitian sebelumnya telah berhasil diisolasi bakteri dari tanah perkebunan singkong dan kentang di Provinsi Jambi. Isolate tersebut dinamai isolat BTS-3A, BTS-3B dan CK-2. Bakteri tersebut menghasilkan enzim CGTase, namun belum diketahui aktifitas CGTasenya. Tujuan penelitian ini adalah mengkarakterisasi enzim CGTase dari ketiga isolat tersebut. Bakteri difermentasi dalam media Horikoshi cair, lalu di sentrifus pada suhu 4°C kemudian dipekatkan dengan freeze dry. Enzim dimurnikan dengan metode presipitasi ammonium sulfat hingga 59,61% untuk BTS-3A, 59,6% BTS-3B dan 58,1% CK-2. Selanjutnya didialisa menggunakan membran selofan berukuran 14 KDa dalam buffer fosfat. Aktivitas siklisasi crude enzim di karakterisasi dengan memvariasikan waktu inkubasi 30, 60, 120 menit, suhu inkubasi 30°C, 37°C, 55°C. Aktivitas siklisasi CGTase di ukur berdasarkan penurunan absorbansi fenoltalein pada panjang gelombang 550 nm. Enzim CGTase dari isolat BTS-3A memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 33,91 % pada inkubasi suhu 30°C, 48,15% pada suhu inkubasi 37°C dan 55,44% pada suhu inkubasi 55°C. enzim CGTase isolat BTS-3B memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 38,81% pada suhu inkubasi 30°C, 51,29% pada masa inkubasi 37°C dan 68,17% pada suhu inkubasi 55°C. Enzim CGTase dari isolat CK-2 memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 50,12 % pada

inkubasi suhu 30°C , 74,86% pada suhu inkubasi 37°C dan 76,95% pada suhu inkubasi 55°C. Enzim CGTase dari isolat BTS-3A memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 42,15 % jika diinkubasi 30 menit , 27,32% jika diinkubasi selama 60 menit dan 13,91 % jika diinkubasi selama 120 menit. Enzim CGTase isolat BTS-3B memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 44,18% jika diinkubasi selama 30 menit, 28,37% jika diinkubasi selama 60 menit dan 18,11 % jika diinkubasi selama 120 menit. Enzim CGTase dari isolat CK-2 memberikan nilai persen penurunan absorbansi sebesar 66,63% jika diinkubasi selama 30 menit, 49,35% jika diinkubasi selama 60 menit dan 32,34 % jika diinkubasi selama 120 menit. Enzim β -CGTase dari ketiga isolat menunjukkan persen penurunan terbaik pada waktu inkubasi 30 menit, suhu 55 C dan pH 7.

ABSTRACT

The β -cyclodextrin glucosyltransferase (β -CGTase) enzyme is an extracellular enzyme that converts starch to cyclodextrins. Cyclodextrins are widely used in the pharmaceutical industry, one of which is to increase solubility. This enzyme is produced by bacteria, especially the genus *Bacillus* sp. These bacteria are found in soil. Several bacteria isolate originating from the soil gave different CGTase activity. Previous research has been isolated the local bacteria from from the soil of cassava and potato plantations in Jambi. These isolate namely BTS-3A, BTS-3B and CK-2 isolates. These bacteria produced CGTase enzyme but the characteristics of the CGTase enzyme are not yet known. The aim of this research to characterize the CGTase activity of BTS-3A, BTS-3B and CK-2 Isolate. The bacteria are fermented in liquid Horikoshi media, then centrifuged at 4 ° C and then concentrated by freeze dry. The enzyme was purified by the ammonium sulfate precipitation method up to 59.61% for BTS-3A, 59.6% for BTS-3B and 58.1% for CK-2. Then dialyzed using a cellophane membrane with cut off 14 KDa in phosphate buffer. The cyclization activity of crude enzymes was characterized by varying incubation times of 30, 60, 120 minutes and incubation temperatures of 30°C, 37°C, 55°C. CGTase cyclization activity was measured based on the decrease in phenolphthalein absorbance at a wavelength of 550 nm. CGTase enzyme from BTS-3A isolate showed a decrease in the absorption percentage of 33.91 % when incubated at 30°C , 48,15% when incubated at 37°C and 55.44% when incubated at 55°C CGTase enzyme from BTS-3B isolate showed a decrease in the absorption percentage of 38,81% when incubated at 30°C , 51,29% when incubated at 37°C and 68,17% when incubated at 55°C. CGTase enzyme from CK-2 isolate showed a decrease in the absorption percentage of 50,12 % when incubated at 30°C , 74,86% when incubated at 37°C and 76,95% when incubated at 55°C. CGTase enzyme from BTS-3A isolate showed a decrease in the absorption percentage of 42,15 % when incubated 30 minutes , 27,32% when incubated 60 minutes and 13,91% when incubated 120 minutes. CGTase enzyme from BTS-3B isolate showed a decrease in the absorption percentage of 44,18 % when incubated 30 minutes , 28,37% when incubated 60 minutes and 18,11% when incubated 120 minutes. CGTase enzyme from CK-2 isolate showed a decrease in the absorption percentage of 66,63% when incubated 30 minutes , 49,35% when incubated 60 minutes and 32,34% when incubated

120 minutes The β -CGTase enzyme from the three isolates showed the optimum percentage reduction at 55°C for 30 minutes incubation

PENDAHULUAN

Siklodekstrin Glikosiltransferase (CGTase) merupakan salah satu enzim yang diproduksi secara ekstraseluler oleh bakteri dan sebagian archaea. Enzim ini merupakan kelompok dari family glikosida hidrolase yang bekerja pada pati. Enzim CGTase mengkonversi pati menjadi siklodekstrin (CD) melalui reaksi transglikosilasi dan hidrolisis pati (Leemhuis, Kelly and Dijkhuizen, 2010). Siklodekstrin memiliki struktur siklik dengan residu berupa glukosa berjumlah 6,7,8 melalui ikatan α -(1,4) (Ibrahim et al., 2012) (Leemhuis, Kelly and Dijkhuizen, 2010).

Siklodekstrin memiliki struktur bulat dengan sifat hidrofil pada bagian luar nya dan hidrofob pada bagian dalamnya. Dengan struktur seperti ini, maka siklodekstrin dapat membentuk kompleks inklusi dengan molekul asing. Berdasarkan struktur tersebut, maka siklodekstrin sering dimanfaatkan di bidang farmasi seperti untuk meningkatkan kelarutan, penstabil obat, pencegah dari reaksi oksidasi (R Geetha and More, 2010). Siklodekstrin terdiri dari α -CD, β -CD dan δ -CD dengan jumlah glukosa berturut-turut adalah 6, 7, 8 glukosa (Leemhuis, Kelly and Dijkhuizen, 2010).

Hasil produk dari enzim CGTase merupakan gabungan dari siklodekstrin baik α -CD, β -CD dan δ -CD. Jenis dan sifat siklodekstrin yang dihasilkan tergantung dari jenis enzim CGTase. CGTase alfa dominan akan menghasilkan α -CD, CGTase beta dominan akan menghasilkan β -CD dan CGTase gamma dominan akan menghasilkan δ -CD (Elbaz, Sobhi and Elmekawy, 2015). Beberapa jenis bakteri penghasil enzim CGTase yaitu *Paenibacillus* sp, *Klebsiella* sp, *Thermoanaerobacterium* sp, dan *Amphibacillus* sp (Thombre, Kanekar and Rajwade, 2013). Mayoritas bakteri penghasil enzim CGTase berasal dari kelompok Bacillus, khususnya *Bacillus* sp dan sebagian besarnya adalah penghasil β -CD (Qi and Zimmermann, 2005).

Sumber bakteri penghasil enzim CGTase salah satu nyaterdapat di tanah. Mikroorganisme Bacillus merupakan mikroorganisme yang dominan terdapat di tanah. Pencarian bakteri penghasil enzim CGTase bisa ditemukan di tanah tempat tumbuhnya tanaman penghasil pati seperti singkong dan kentang,

Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan bakteri penghasil enzim β -CGTase yaitu isolat BTS-3A, BTS-3B yang berasal dari perkebunan singkong dan isolat CK-2 yang berasal dari perkebunan kentang. Terhadap isolat ini belum dilakukan karakterisasi enzim CGTase yang dihasilkannya. Pada penelitian ini akan dilakukan karakterisasi enzim CGTase dari masing-masing isolat melalui tahapan purifikasi parsial menggunakan ammonium sulfat. Ekstrak kasar dari enzim β -CGTase ditentukan aktivitas siklisasinya terhadap variasi waktu dan suhu inkubasi.

METODE PENELITIAN

Peremajaan isolat BTS-3A, BTS-3B dan CK-2

Masing-masing isolat di inkubasi pada media Nutrient broth (NB) pada suhu 37 °C selama 24-48 jam ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

Produksi dan Isolasi CGTase

Sebanyak 10% (v/v) dari inokulum sampel dimasukkan kedalam 1000 mL media Horikoshi cairtanpa indikator warna (Park, Park and Kim, 1989). Kemudian kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C di inkubator shaker (Memmert) selama 24 jam. Kultur yang telah diinkubasi di uapkan kandungannya dengan freeze dry, kemudian disentrifugasi 3500 rpm selama 30 menit. Supernatan yang mengandung enzim CGTase di endapkan dengan garam ammonium sulfat hingga mencapai kejenuhan. Campuran disentrifugasi, endapan diresuspensi dengan bufer pospat 0.05 M pH 7 dan didialisis dengan membrane dialisa cut off 14 kDa dengan larutan bufer pospat 0.05 M pH 7. Untuk mengetahui proses dialisis sudah selesai, 1 mL HCl 0.1 M (p.a) di tambah 1 mL larutan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan beberapa tetes BaCl₂, jika tidak terbentuk endapan maka proses dialysis dihentikan (Rachmania et al., 2017).

Penentuan Aktifitas siklisasi β-CGTase

Aktivitas siklisasi β-CGTase hasil pemurnian sebagian dilakukan secara spektrofotometri visible melalui penurunan absorbansi zat warna fenolftalein pada panjang gelombang 550 nm. Larutan enzim CGTase hasil pemurnian sebagian sebanyak 500 µL diinkubasi bersama 10% (b/v) dalam 2.5 mL buffer fosfat 0.05 M pH 7 pada suhu 37 C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan 250 µL HCL 1.2 N. sesaat sebelum pengukuran, reaksi dinetralkan dengan penambahan 250 µL NaOH 1.2 N. Aktivitas CD-β dilakukan dengan menambahkan larutan fenolftalin 2 mL (4 mL fenolftalin 4 mM dalam etanol ditambah 100 mL Na₂CO₃ 125 mM) ke dalam 500 µL larutan uji. Tabung divortex dan diukur absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang 550 nm. Persen penurunan indikator warna dihitung terhadap absorbansi kontrol. Larutan kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama dengan enzim namun tanpa diinkubasi. Kadar yang dihasilkan berupa persen penyerapan indikator fenolftalein yang setara dengan produksi CD (Rostinawati and Lestari, 2017).

$$\% \text{ penurunan PP} = \frac{R_0 - R}{R_0} \cdot X 100$$

Keterangan :

R₀ = absorban kontrol

R = absorban sampel

Karakterisasi enzim

Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas CGTase

Sebanyak 500 µL enzim CGTase hasil pemurnian sebagian dari masing-masing isolate diinkubasi bersama 10% (b/v) soluble starch pada berbagai suhu (30, 37 dan 55 °C) selama 30 menit dalam 2.5 mL buffer fosfat 0.05 M pH 7. Reaksi dihentikan dengan penambahan 250 µL HCl 1.2 N. Sesaat sebelum pengukuran, reaksi dinetralkan dengan penambahan 250

μL NaOH 1.2. Aktivitas enzim diukur dengan melihat persen penurunan absorbansi fenolftalein.

Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas CGTase

Sebanyak 500 μL enzim CGTase hasil pemurnian sebagian dari masing-masing isolate diinkubasi bersama 10% (b/v) soluble starch pada berbagai waktu (30, 60 dan 120 menit) pada suhu 37 °C dalam 2.5 mL buffer fosfat 0.05 M pH 7. Reaksi dihentikan dengan penambahan 250 μL HCl 1.2 N. Sesaat sebelum pengukuran, reaksi dinetralkan dengan penambahan 250 μL NaOH 1.2 . Aktivitas enzim diukur dengan melihat persen penurunan absorbansi fenolftalein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

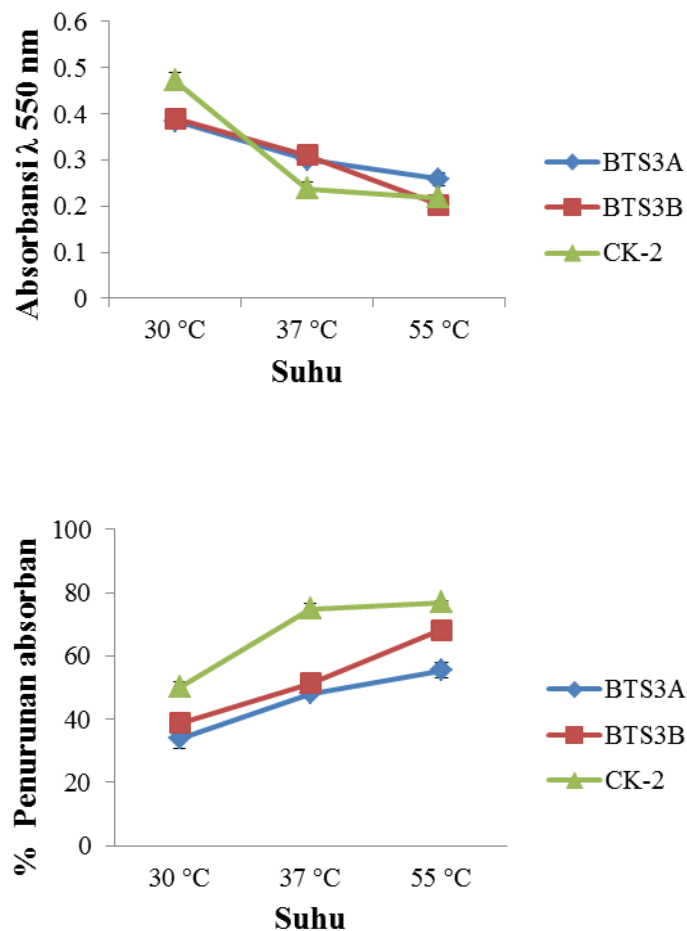
Produksi dan Isolasi β -CGTase

Enzim CGTase adalah enzim yang mampu mengubah pati menjadi siklodekstrin (CD). Hasil produk dari enzim ini menghasilkan campuran α -CD, β -CD dan δ -CD (Li *et al.*, 2007). Kebanyakan mikroorganisme penghasil enzim CGTase berasal dari kelompok bakteri. Umumnya dari genus *Bacillus* sp. Isolate BTS-3A, BTS-3B dan CK-2 merupakan isolat dari tanah yang memiliki ciri dengan genus *Bacillus*. Ketiga isolate ini menghasilkan enzim β -CGTase. Enzim CGTase merupakan enzim ekstraseluler. Untuk mengisolasi enzim CGTase tersebut maka perlu dilakukan fermentasi. Enzim CGTase dapat dimurnikan dengan cara pengendapan ammonium sulfat dan filtrasi gel. Pemurnian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melalui pengendapan ammonium sulfat. Pemilihan metode ini dikarenakan harga yang murah dan garam ammonium sulfat mudah didapatkan. Tujuan penambahan ammonium sulfat adalah untuk mengendapkan protein dikarenakan perbedaan kelarutannya dalam air. Jumlah ammonium sulfat yang digunakan untuk proses pemurnian ini adalah 58% (b/v). Enzim yang dihasilkan di dialisa menggunakan membrane selofan. Proses dialysis merupakan proses perpindahan molekul terlarut melalui membrane selofan. Diharapkan dengan proses dialysis ini enzim CGTase tertahan didalam membrane selofan.

Karakterisasi Enzim

Pengaruh suhu inkubasi enzim CGTase terhadap aktivitas siklisasi

Aktivitas CGTase sangat tergantung pada kondisi reaksi, jenis substrat, bakteri penghasil dan jumlah enzim (Mora *et al.*, 2012). Kondisi reaksi yang mempengaruhi aktifitas siklisasi dari enzim CGTase seperti pH, waktu dan suhu inkubasi. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi waktu dan suhu inkubasi enzim untuk mengetahui kondisi optimum yang digunakan oleh masing-masing isolat untuk menghasilkan jumlah yang maksimal. Aktifitas enzim CGTase dari masing-masing isolat di analisis pada beberapa waktu inkubasi yaitu 30, 60 dan 120 menit. Aktifitas CGTase dapat dianalisis dengan mengukur persen penurunan absorbansi dari fenolftalein. Semakin besar nilai persen penurunan absorbansi fenolftalein maka semakin besar siklodekstrin yang terbentuk. Hasil pengukuran aktivitas CGTase dari isolat BTS-3A, BTS-3B dan CK-2 dapat dilihat pada gambar 1.



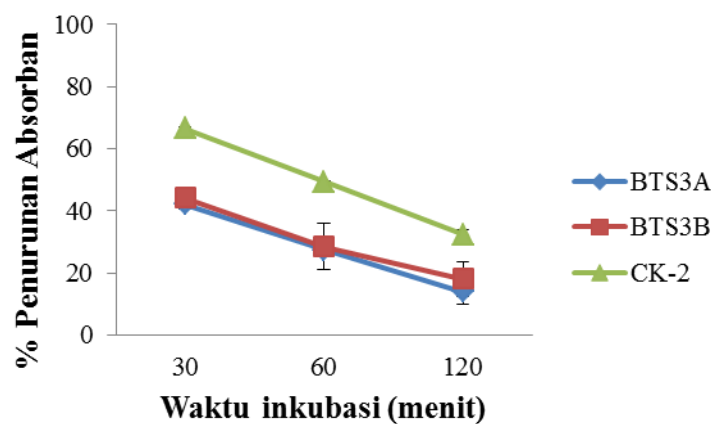
Gambar 1. Penurunan absorbansi fenolftalein selama waktu inkubasi enzim (A) dan persen penurunan absorbansi sampel sebanding dengan aktifitas siklusasi β -CGTase (B)

Dari grafik terlihat bahwa enzim CGTase dari ketiga isolat memberikan aktifitas meningkat pada suhu 55 °C. Hal ini dapat dilihat dari semakin besarnya nilai persen penurunan absorbansi fenolftalein. Hal ini menandakan semakin banyaknya siklodekstrin yang terbentuk dan membentuk kompleks inklusi dengan indikator warna fenolftalein sehingga intensitas warna dari fenolftalein menurun (Makela, Korpela and Laakso, 1987). Dari studi literatur diketahui bahwa enzim kasar CGTase dari *Bacillus macerans* memiliki suhu inkubasi optimum pada suhu 45-55 °C (Naiola, 2008). Diantara ketiga isolat tersebut, terlihat bahwa enzim CGTase dari isolate CK-2 memiliki aktifitas siklusasi lebih besar dari dua isolate lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa aktifitas enzim CGTase berbeda-beda untuk setiap jenis

mikroorganisme. Jenis substrat juga mempengaruhi aktifitas dari enzim. Peneliti lain menemukan *Bacillus lehensis* menghasilkan enzim CGTase yang memberikan aktivitas optimum jika menggunakan pati beras dan diinkubasi pada suhu 60 °C (Elbaz, Sobhi and Elmekawy, 2015)

Pengaruh waktu inkubasi enzim CGTase terhadap aktivitas siklisasi

Kondisi inkubasi lainnya yang mempengaruhi aktifitas enzim adalah waktu inkubasi. Pada penelitian ini variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 30, 60 dan 120 menit. Hasil pengukuran aktivitas CGTase dari masing masing isolat selama waktu inkubasi dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Persen penurunan absorban sampel selama waktu inkubasi

Dari gambar terlihat bahwa enzim CGTase dari ketiga isolat memiliki aktifitas siklisasi yang lebih baik jika diinkubasi selama 30 menit. Semakin lama waktu inkubasi maka ikatan kimia dari sisi aktif enzim terputus sehingga mengubah konformasi enzim dan menyebabkan hilangnya aktifitas enzim.

SIMPULAN

Enzim CGTase dari isolat BTS-3A, BTS-3B dan CK-2 memberikan aktifitas optimum pada suhu inkubasi 55 °C selama 30 menit.

DAFTAR PUSTAKA

Elbaz, A. F., Sobhi, A. and Elmekawy, A. (2015) 'Purification and characterization of cyclodextrin b -glucanotransferase from novel alkalophilic bacilli', *Bioprocess Biosyst Eng*, 38, pp. 767–776. doi: 10.1007/s00449-014-1318-y.

- Ibrahim, A. S. S. et al. (2012) 'A Novel Cyclodextrin Glycosyltransferase from Alkaliphilic *Amphibacillus* sp. NPST-10 : Purification and Properties', *international Journal of Molecular Sciences*, 13(8), pp. 10505–10522. doi: 10.3390/ijms130810505.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M. and Dijkhuizen, L. (2010) 'Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), pp. 823–835. doi: 10.1007/s00253-009-2221-3.
- Li, Z. et al. (2007) ' γ -Cyclodextrin: A review on enzymatic production and applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), pp. 245–255. doi: 10.1007/s00253-007-1166-7.
- Makela, M., Korpela, T. and Laakso, S. (1987) 'Colorimetric determination of β -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 14(2), pp. 85–92. doi: 10.1016/0165-022X(87)90043-1.
- Mora, M. M. M. et al. (2012) 'Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species', *Springerplus*, 1(61), pp. 1–6.
- Naiola, E. (2008) 'Karakterisasi Enzim Komersial Siklodekstrin Glukanotransferase', *Jurnal Mikrobiologi*, 13(2), pp. 89–96.
- Park, C. S., Park, K. H. and Kim, S. H. (1989) 'Screening Method for Glukanotransferase using', *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(4), pp. 1167–1169.
- Qi, Q. and Zimmermann, W. (2005) 'Cyclodextrin glucanotransferase: From gene to applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), pp. 475–485. doi: 10.1007/s00253-004-1781-5.
- R Geetha and More, S. S. (2010) 'Isolation and Characterization of Cyclodextrin Glukanotransferase from Soil Bacterium', *Research Journal of Biological Sciences*, 5(1), pp. 699–707.
- Rachmania, R. A. et al. (2017) 'Profil Berat Molekul Enzim Protease Buah Nanas dan Pepaya Menggunakan Metode SDS-Page', *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 13(1), pp. 52–65.
- Rostinawati, T. and Lestari, H. S. (2017) 'Skrining Bakteri Penghasil Enzim β -Siklodekstrin Transferase (β -CGTase) dari Tanah Jatinangor Glukosil', *Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, 3(2), pp. 10–17.
- Thombre, R. S., Kanekar, P. P. and Rajwade, J. M. (2013) 'Production of cyclodextrin glycosyl transferase from Alkaliphilic *paenibacillus* Sp 155 MCM B - 1034 isolated from Alkaline Lonar Lake, India', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), pp. 515–523.