

# MEMPELAJARI DAYA INHIBISI ION CU' DAN CA' SERTA POLA INHIBISINYA TERHADAP ENZIM AKONITASE YANG DIISOLASI DARI BUAH KALIKIH ALANG (*RICINUS COMMUNIS*)

Riryng Novianty<sup>1</sup>, Zulkarnain Chaidir<sup>2</sup>, Elida Mardiah<sup>3</sup>

1. Universitas Riau, Pekanbaru

2,3. Universitas Andalas, Padang

## ABSTRAK

Penelitian tentang inhibisi aktivitas enzim akonitase dengan menggunakan inhibitor ion Cu<sup>2+</sup> dan Ca<sup>2+</sup> telah dilakukan. Enzim akonitase diisolasi dari buah *Ricinus communis* dengan menggunakan aseton dingin. Untuk menentukan aktivitas dari akonitase digunakan metoda pengukuran substrat asam sitrat sisa berdasarkan metoda LStahre's test. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metoda Lowry.

Optimasi dari enzim akonitase didapatkan dari hasil pH optimum 7,3, temperatur optimum 40 °C, dan konsentrasi substrat 1 %. Dari kurva Lineaweaver Burk diperoleh harga Km = 0,104 M. Sedangkan untuk mengetahui daya pola inhibisi ion Cu<sup>2+</sup> dan Ca<sup>2+</sup> dilakukan dengan bervariasi konsentrasi dari masing-masing ion tersebut. Daya inhibisi ion Cu<sup>2+</sup> dengan konsentrasi 0,1 M adalah 93,347 % dan daya ion Ca<sup>2+</sup> pada konsentrasi 0,1 M adalah 60,124 %. Hasil tersebut menunjukkan pola inhibisi yang sama yakni inhibisi non kompetitif dan masing-masing ion memiliki daya inhibisi yang berbeda.

**Kata kunci:** enzim akonitase, inhibitor, *Ricinus communis*

## 1. PENDAHULUAN

Asam sitrat (C6I-1807) merupakan salah satu jenis asam organik yang banyak digunakan sebagai food aditif pada industri makanan dan minuman. Pemakaian asam sitrat pada industri makanan dan minuman, tujuannya untuk meningkatkan cita rasa dan dapat juga digunakan sebagai anti oksidan. Asam sitrat merupakan produk metabolit primer yang terbentuk dalam siklus asam tri karboksilat ( siklus Krebs), yang terdapat dalam sel hewan, tumbuhan dan mikroba

Produksi asam sitrat dapat ditingkatkan dengan cara mengendalikan aktivitas akonitase yang berperan mengkatalisis perubahan sitrat menjadi Cis-akonitat dan perubahan Cis-akonitat menjadi isositrat begitu juga sebaliknya dalam siklus asam trikarboksilat (siklus krebs)<sup>(1°)</sup>. Enzim akonitase termasuk enzim intraselluler dimana proses pemisahan enzim dilakukan pemecahan dan pengeluaran sel("J". Enzim Akonitase adalah suatu enzim yang mempunyai gugus prostetik besi sulfida (4Fe-4S) yang sangat sensitif terhadap radikal superoksida. Dengan adanya radikal superoksida maka gugus prostetik yang mengandung Fe<sup>2+</sup> dioksidasi

menjadi Fe<sup>3+</sup>. Hal ini menyebabkan rusaknya struktur enzim akonitase, sehingga menjadi tidak aktif, yang merupakan dasar pengendalian aktifitas enzim akonitase.

Penelitian ini berjudul Mempelajari Daya Inhibisi Ion Cu<sup>2+</sup> dan Ca<sup>2+</sup> Serta Pola Inhibisinya Terhadap Enzim Akonitase Yang Diisolasi Dari Buah *Ricinus communis*. Mekanisme Reaksi inhibisi akonitase yang berperan sebagai katalis pada pembentukan isositrat dari sitrat pada daur trikarboksilat belum diketahui dengan jelas. Hal ini sangat menarik sekali untuk diteliti karena enzim akonitase berfungsi sebagai katalitik pada reaksi perubahan dari sitrat menjadi isositrat, begitu pula sebaliknya mengkatalisis perubahan isositrat menjadi sitrat.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

*Ricinus communis* (dalam bahasa minang: kalikih alang) <sup>(4,5)</sup> diambil di daerah Kalawi Padang, Sumatera Barat. Proses awal adalah isolasi enzim akonitase dan sampel dengan penambahan aseton yang dilakukan seraa bertahap guna menghasilkan fraksi berdasarario derajat kejenuhan. Pengekstraksian dikalaikasi dari volume filtrat awal 100 mL dengan aletNt

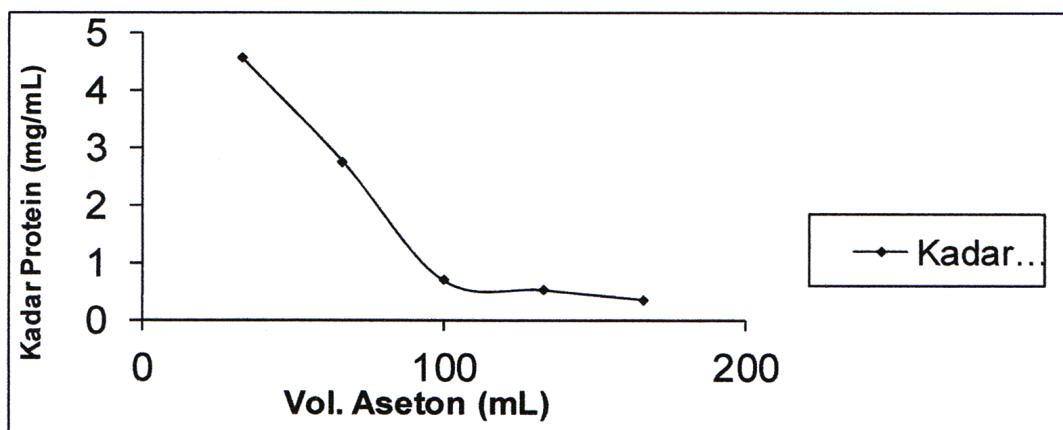
dingin secara bertingkat (33,3 mL, 66,7 mL, 166,7 mL). Setiap endapan yang telah diencerkan diuji dengan larutan ninhydrin untuk membuktikan endapan yang terbentuk adalah protein, jika terjadi warna ungu setelah penambahan ninhydrin endapan positif protein. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metoda Lowry. Endapan protein yang terbentuk setelah diencerkan dengan buffer fosfat diukur aktifitasnya dengan substrat asam sitrat menggunakan metoda L-Stahre test. Untuk menentukan aktivitas maksimum enzim akonitase dilakukan variasi pH bufer fosfat 6.5, 6.7, 6.9, 7.1, 7.3, 7.5; variasi suhu inkubasi 25, 30, 35, 40, 45 °C dan variasi konsentrasi substrat 1, 2, 3, 4, 5, 6 %. Inhibitor yang digunakan pada percobaan ini adalah ion  $\text{Cu}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$ . Untuk melihat daya inhibisinya dilakukan variasi

konsentrasi inhibitor ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...)M. Aktivitas enzim akonitase ditentukan dengan metoda L-Stahre's tes berdasarkan pengukuran substrat asam sitrat.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Isolasi Enzim Akonitase dari *Ricinus communis* dan penentuan kadar protein enzim dengan Metoda Lowry<sup>(3)</sup>

Enzim hasil isolasi ditentukan kadar proteinnnya dengan metoda Lowry yang menggunakan larutan standar Bovin Serum Albumin (BSA). Dari kurva standar BSA ini, diperoleh persamaan regresi linier  $Y = 0,036 + 0,0014 X$  dimana dengan menggunakan persamaan regresi ini kadar protein tiap fraksinasi dapat ditentukan sebagai berikut:



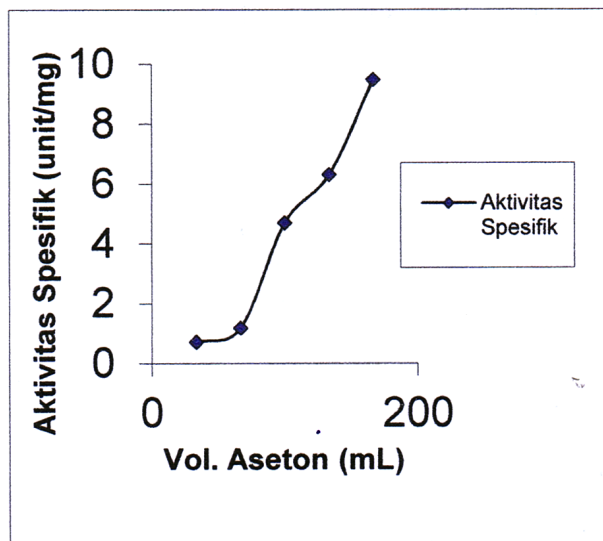
Gambar 20. Kadar Protein pada Sampel *Ricinus communis*.

Dari Gambar di atas dapat dilihat bahwa kadar protein semakin rendah dengan bertambahnya tingkat kejenuhan aseton dingin. Pada setiap penambahan aseton dingin secara bertingkat didapatkan koloid berwarna putih keabu-abuan karena kontak dengan oksigen selama proses sentrifugasi. Pada penambahan aseton 166,7 mL tidak terbentuk lagi koloid, meningkatnya volume aseton yang ditambahkan sebanding dengan kadar protein yang semakin menurun. Endapan yang didapatkan dari masing-masing ekstraksi diuji dengan ninhydrin

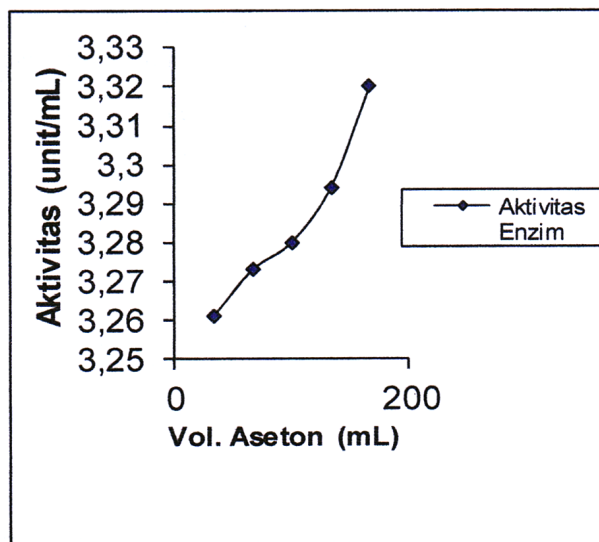
yang akan memberikan warna ungu bervariasi sesuai dengan volume penambahan aseton, karena semakin spesifiknya enzim yang terekstrak.

#### Penentuan Aktivitas Enzim Akonitase dengan Metoda L-Stahre Test<sup>(8)</sup>

Kurva aktivitas enzim dan aktivitas spesifik dari sampel *Ricinus communis* diperoleh dari konversi persamaan regresi larutan standar asam sitrat, yaitu  $Y = -0,0078 + 0,0671 X$ , sebagai berikut:



Gambar 21. Aktivitas Enzim pada Fraksi Aseton



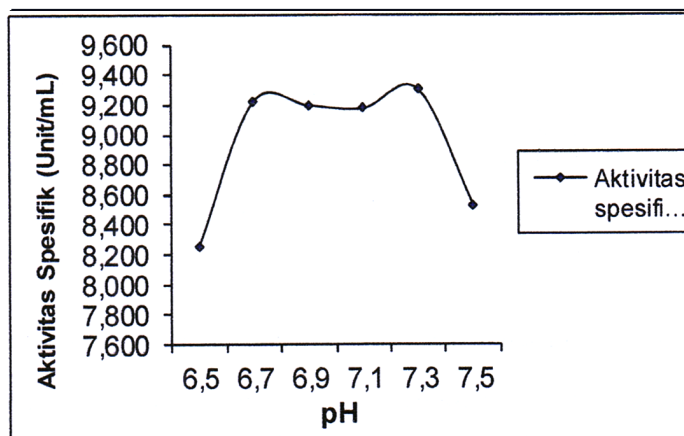
Gambar 22. Aktivitas Spesifik Enzim pada Fraksi Aseton

Gambar 21 dan 22 memperlihatkan bahwa aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim pada fraksi aseton semakin besar sesuai dengan volume aseton yang ditambahkan. Aktivitas spesifik adalah suatu ukuran kemurnian enzim dan yang terbesar didapatkan yaitu pada fraksi aseton V ( 166,7 mL aseton ) dimana kemurnian enzim sampai 86,24 kali. Hal ini tidak menjamin semakin besar volume aseton yang ditambahkan maka semakin besar pula aktivitas enzim maupun aktivitas spesifik enzim, karena mungkin saja enzim telah terekstrak pada fraksi sebelumnya. Fraksi V dari proses fraksinasi

aseton yang memiliki kemurnian paling tinggi tersebut digunakan untuk mengkarakterisasi enzim akonitase yang meliputi pH, suhu, konsentrasi enzim dan harga Km ( Konstanta Michaelis).

**Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim Akonitase**

Pengaruh perubahan pH lingkungan dapat menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas enzim akonitase. Untuk menentukan aktivitas spesifik maksimum dari enzim akonitase telah dilakukan pengujian aktivitas enzim akonitase pada suatu kisaran pH 6,5 -7,5 sebagai berikut:



Gambar 23. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim Akonitase

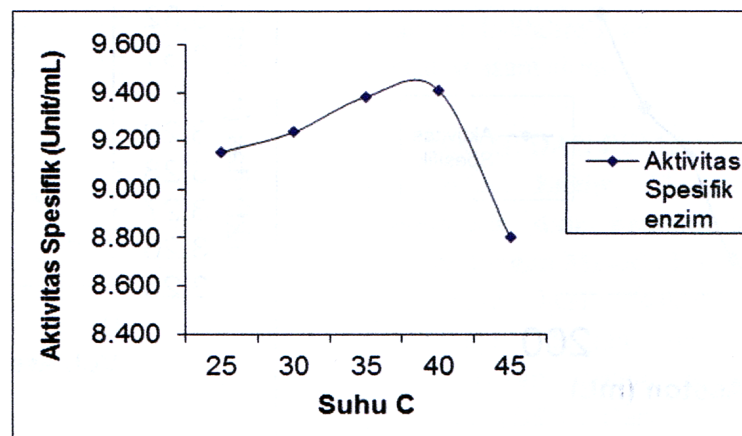
Dari kurva di atas kelihatan bahwa enzim akonitase mempunyai kisaran pH optimum pada pH 7,3 yang artinya mempunyai stabilitas yang tinggi pada pH optimum tersebut. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan

normalnya karena belum tentu pH buffer untuk enzim akonitase itu harus 7.

**Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim Akonitase**

Pengaruh suhu inkubasi 25-45 °C terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase

diperoleh kurva sebagai berikut:



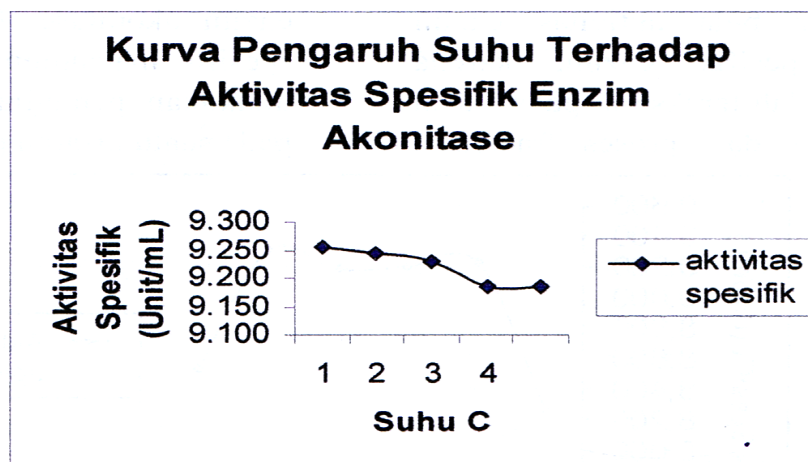
**Gambar 24.** Pengaruh Suhu terhadap aktivitas spesifik enzim Akonitase

Dari Gambar di atas dapat dilihat pengaruh dari suhu terhadap aktivitas enzim akonitase dimana dengan meningkatnya suhu, aktivitas enzim juga meningkat. Dari kurva juga dapat dilihat bahwasanya jika suhu rendah, aktivitas enzim belum bereaksi optimum. Beberapa enzim juga akan rusak apabila dibiarkan pada suhu rendah dan suhu beku. Suhu optimum yang diperoleh untuk aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim akonitase maksimal

adalah pada suhu 40°C. Pada suhu inkubasi 45°C aktivitas katalitik enzim akan menurun dan akan dapat mengalami denaturasi pada suhu yang terlalu tinggi.

#### **Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim Akonitase**

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase sebagai berikut



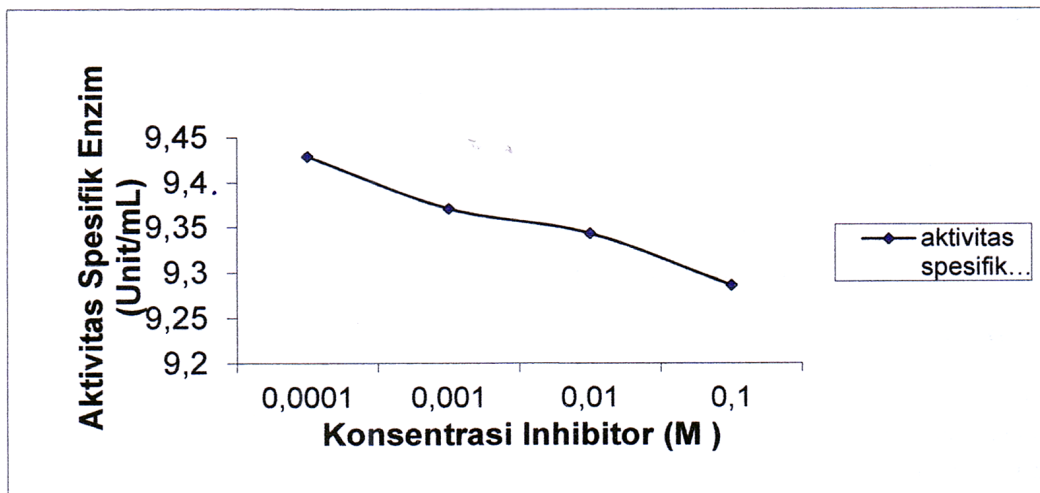
**Gambar 25.** Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap aktivitas Spesifik enzim akonitase

Dari kurva di atas dapat dilihat bahwasanya konsentrasi substrat asam sitrat berbanding lurus dengan aktivitas spesifik enzim, namun penambahan konsentrasi substrat ini tidak selalu meningkatkan aktivitas enzim akonitase. Penelitian terhadap spesifitas enzim ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat 1% dapat memaksimalkan aktivitas enzim

akonitase. Setelah enzim jenuh ( $V_{maks}$ ) apabila konsentrasi substrat dinaikkan terus akan menyebabkan jumlah molar substrat tidak seimbang lagi dengan jumlah molar enzim sehingga penambahan substrat tidak akan menaikkan aktivitas enzim akonitase atau cenderung menurun mendekati mendatar.

Pemikiran ini diperluas menjadi teori umum kerja enzim oleh Michaelis- Menten dimana konsentrasi substrat pada saat dicapai setengah kecepatan maksimum adalah  $K_M$ , yaitu konstanta Michaelis-Menten.

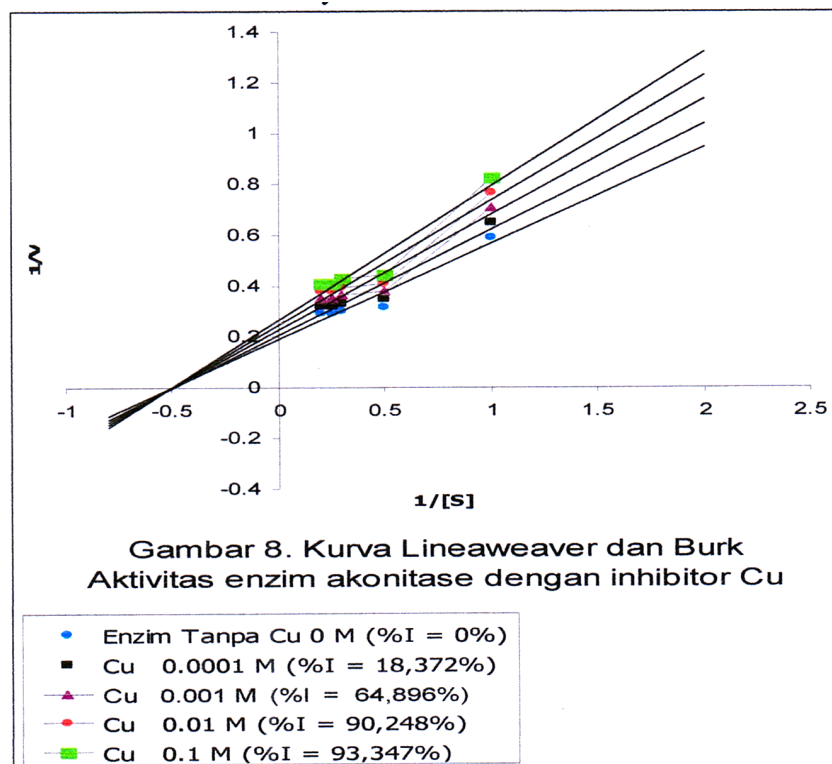
**Pengaruh konsentrasi Inhibitor  $Cu^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  terhadap aktivitas enzim Akonitase**  
**Pengaruh konsentrasi Inhibitor  $Cu^{2+}$**   
 Pengaruh konsentrasi Inhibitor  $Cu'$  terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase sebagai berikut:



Gambar 26. Pengaruh Konsentrasi Inhibitor  $Cu''$  terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase

Selanjutnya untuk mengetahui nilai  $K_m$  (Konstanta Michaelis) yang merupakan konsentrasi substrat yang menghasilkan setengah kecepatan reaksi maksimal yaitu

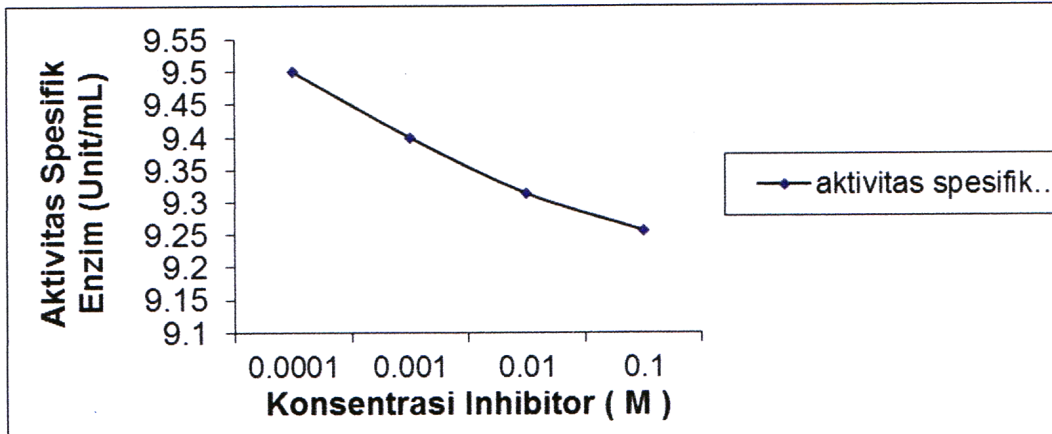
dengan mengalurkan  $1/[S]$  versus  $1/V$  didapatkan suatu kurva Lineweaver dan Burk sebagai berikut:



Gambar 27. Kurva Lineaweaver dan Burk Aktivitas enzim akonitase dengan inhibitor Cu

**Pengaruh konsentrasi Inhibitor Ca<sup>2+</sup>**

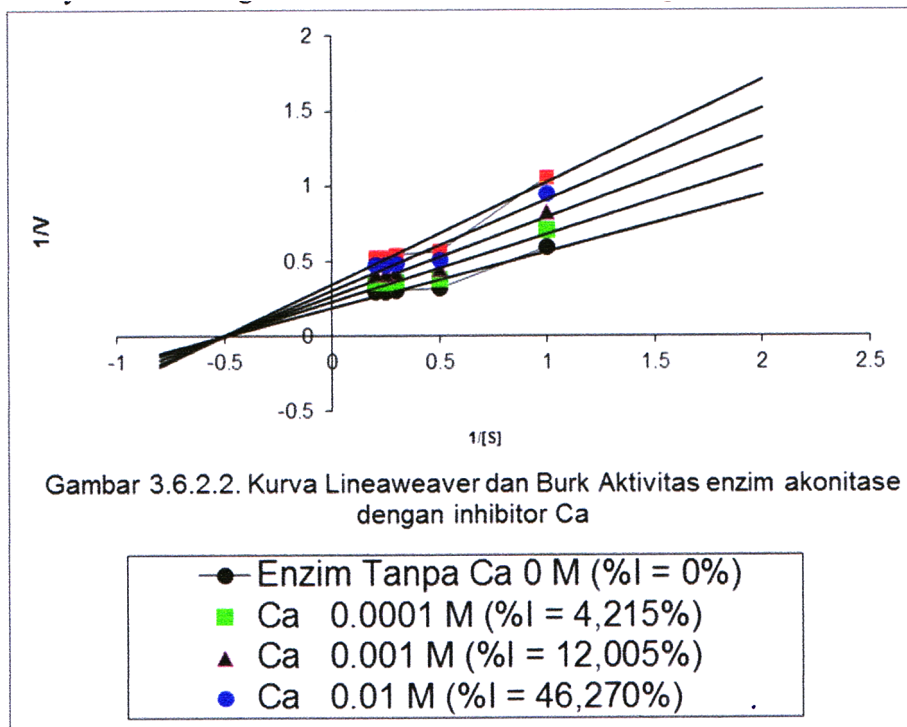
Pengaruh konsentrasi Inhibitor Ca' terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase sebagai berikut:



**Gambar 28.** Pengaruh Konsentrasi Inhibitor Ca' terhadap aktivitas spesifik enzim akonitase

Berdasarkan data yang didapat di atas mengenai pengaruh inhibitor Ca<sup>2+</sup> maka dapat dibuat pola inhibisinya. Sesuai dengan nilai Km

(Konstanta Michaelis) dari mengalurkan 1/[S] versus 1/V didapatkan suatu kurva Lineweaver dan Burk sebagai berikut:



**Gambar 3.6.2.2.** Kurva Lineaweaver dan Burk Aktivitas enzim akonitase dengan inhibitor Ca

**Gambar 29.** Kurva Lineaweaver dan Burk Aktivitas enzim akonitase dengan inhibitor Ca

Dari gambar 27 dan 27 di atas dapat dilihat bahwasanya penambahan inhibitor Cu' 0,1 M dan Ca' 0,1 M sama-sama dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim sehingga sangat baik digunakan untuk memproduksi asam sitrat. Dan dari gambar 28 dan 29 juga dapat ditentukan nilai Km dari enzim akonitase dengan menggunakan

persamaan  $-1/Km = X$ . Jika dimasukkan harga X pada persamaan ini akan diperoleh harga Km = 0,104 M.

Harga Km suatu enzim sangat bervariasi harganya berkisar antara  $10^{-1}$ - $10^{-10}$  M. Harga Km suatu enzim tergantung pada jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu dan pH sehingga harga Km merupakan konsentrasi

substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yakni jika kecepatan telah mencapai 'A V maks. Karena itu bila keadaan tersebut terpenuhi, maka Km merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks enzim dengan substrat. Bila Km besar berarti ikatan kompleks enzim dan substrat lemah sebaliknya bila harga Km kecil maka ikatan kompleks enzim dan substrat kuat. Bila konsentrasi substrat kurang lebih sama dengan nilai Km, kecepatan reaksi sangat peka terhadap perubahan konsentrasi substrat maka enzim akan bekerja pada setengah efisiensi maksimal<sup>(9,13)</sup>.

Pengaruh konsentrasi inhibitor menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi inhibitor maka semakin kecil aktivitas enzim maupun aktivitas spesifik enzim akonitase dan pola inhibisi untuk ke dua logam Cu' dan Ca' adalah non kompetitif dimana inhibitor dengan enzim tidak berikatan di pusat aktif enzim sehingga inhibitor dan substrat tidak saling berkompetisi

#### 4. KESIMPULAN

Aktivitas dari enzim akonitase semakin besar dengan meningkatnya volume aseton dan didapatkan aktivitas terbesar pada fraksi V (166, 7 mL aseton). Kadar protein tertinggi dari sampel *Ricinus communis* adalah pada *crude* enzim, dan kadar protein semakin sedikit dengan penambahan volume aseton pada saat isolasi. Aktivitas enzim akonitase maksimal pada pH 7,3, suhu 40 °C dan konsentrasi substrat 1 %. Inhibitor Cu' dan Ca' 10<sup>-1</sup>M dapat mengurangi aktivitas enzim akonitase sehingga baik untuk produksi asam sitrat yang lebih banyak. Daya inhibisi Cu' lebih besar sebanyak 35,591 % daripada Ca'. Pola inhibisi untuk kedua ion adalah non kompetitif.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Khare,-S.K; Jha,-K.; Gandhi,A.P. (1995), Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresourtechnol.* Oxford, U.K. v. 54 (3) p/ 323-325.
- Verhoff, F.H, (1986), Citric Acid, Ullaman's Encyclopedia of Industry of Chemistry, v. A7. p 103-108.

- Lackie,J.M., Dow, JAT., Third Edition, The Dictionary of cell and molecular biology: Firdaus, I.U., Analisa Investasi Jarak (kaliki), <http://www.google.co.id>.
- Sinaga, Ernawati, *Ricinus communis* Linn, <http://www.google.co.id>.
- Crueger, Wulf., Anneliase., 1984, *Biotechnology, A text Book of Industrial Microbiologi*, editor Brock, Thomas D., Sience Tech Inc, USA
- Treadwell, F, D., William, T., Hall, S, B., 1956, *Analytical Chemistry*, vol 1: Qualitative analisis, 9th ed, John Willey and sons Inc, New York: 387-389.
- Tani, Yoishiki Sakai, Yasugoshi., Chou, Shin-Gen., 1990, Production of citric acid from metanol by a fluoroasetat resistant mutant of *Candida* sp, Y-1 *Applied microbiology and bioteknologi*, 34: 5-9.
- Lehninger, Albert L., *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*, Erlangga, Jakarta, 1988: 251-256
- Cook, -GM.; Russel, -J.B., 1994, Dual mechanism of tricarboxylate transport and catabolism by *Acidaminococcus fermentans*. *Appl-environ-microbiol.*, v. 60 (7): 2538-2544.
- Pelezar ,M.J. dan M.C.S. Chan, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia, Jakarta, 1988, 317-320.
- Urata, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science pub. London, 1983: 10-57.
- Winarno, F.G, (1983), *Enzim Pangan*, PT. Gramedia Jakarta