

Pengaruh Pemerangkapan Enzim Alkalin Fosfatase ke dalam Silika dari Abu Sekam Padi terhadap Aktivitas Enzimatiknya

Sriyanti^{a,*}

a Inorganic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: sriyanti@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
Alkaline phosphatase, RHA, entrapment, silica, enzyme.

Kata kunci:
Alkalin fosfatase, abu sekam padi, pemerangkapan, silika, enzim.

Abstract

Alkaline phosphatase was entrapment in silica from rice hull ash by sol-gel process. In this procedure, silica solution was extracted from rice hull ash (RHA) by 1.5 N of sodium hydroxide. The 0.1 N of hydrochloride acid solution was added to decrease pH until 10. Alakline phosphatase (in tris-HCl buffer solution at pH: 8) was added to silica solution, placed in desicator until gel formed. Dry gel formed was immobilized enzyme. The catalytic properties and kinetic parameters both free enzyme in solution and immobilized enzyme was studied. Results showed that the optimal pH and temperature for the immobilized alkaline phosphatase in silica were 9.0 and 45°C, which were higher than those of the free form (8.5 and 40°C). It was found, at room temperature and pH 8.5, that the Michaelis-Menten constant (K_m) was 7.50 mM and that specific activity was 0.051 U/mg enzyme for entrapment alkaline fosfatase, compared to a K_m of 0.08 mM and specific activity 1.041 U/mg enzyme for free the alkaline phosphatase.

Abstrak

Alkalin fosfatase telah diperangkap ke dalam silika dari abu sekam padi melalui proses sol-gel. Dalam prosedur ini, larutan silika dihasilkan melalui ekstraksi abu sekam padi menggunakan larutan natrium hidroksida 1,5 N. Larutan asam klorida 0,1 N ditambahkan untuk menurunkan pH larutan silika hingga 10. Alkalin fosfatase (dalam larutan buffer tris-HCl pH:8) ditambahkan ke dalam larutan silika, didiamkan di dalam desikator hingga terbentuk gel. Gel kering merupakan enzim terperangkap (terenkapsulasi). Parameter katalitik dan kinetik ditentukan baik untuk enzim bebas dalam larutan maupun untuk enzim terimobilisasi. Hasil menunjukkan bahwa pH dan suhu optimal untuk alkalin fosfatase terimobilisasi dalam silika adalah 9,0 dan 45°C, lebih tinggi dibandingkan dengan bentuk bebasnya (8,5 dan 40°C). Pada suhu kamar dan pH 8,5, konstanta Michaelis-Menten (K_m) adalah 7,50 mM dan aktivitas spesifiknya adalah 0,051 U/mg enzim untuk alkalin fosfatase terenkapsulasi, sedangkan untuk alkalin fosfatase bebas dalam larutan berturut-turut 0,08 mM dan 1,041 U/mg enzim.

1. Pendahuluan

Enzim adalah biokatalis yang diproduksi oleh jaringan hidup untuk meningkatkan laju reaksi yang terjadi dalam jaringan. Enzim mengkatalisis hampir semua reaksi-reaksi biologis penting. Dewasa ini penggunaan enzim sebagai biosensor untuk uji klinik

dalam mendeteksi berbagai penyakit semakin banyak digunakan, selain di bidang industri [1]

Alkalin fosfatase (E.C. 3.1.3.1) atau Ortofosforik monoester fosfohidrolase adalah enzim yang mengkatalisis perubahan fosfat organik menjadi fosfat anorganik. Dalam bidang kedokteran digunakan sebagai biosensor untuk mendiagnosa penyakit liver dan tulang

[1]. Dalam bidang industri digunakan untuk menguji produk susu dan air minum [2].

Permasalahan umum yang timbul pada pemakaian enzim adalah ketidakstabilan enzim yaitu mudah rusak selama penyimpanan dan tidak tahan terhadap panas maupun kondisi keasaman (pH) tertentu. Selain itu, sebagai katalis reaksi yang akan terbentuk kembali bersama produk, ternyata tidak mudah untuk dipisahkan dari produknya sehingga tidak dapat digunakan secara berulang. Untuk menjaga kestabilan enzim, biasanya dilakukan dengan mengimobilkan pada media tertentu seperti membrane, selulose atau silika [1].

Imobilisasi enzim melalui pemerangkapan (enkapsulasi) sol-gel ini berkembang dengan pesat. Silika banyak digunakan sebagai prekursor karena stabil dalam berbagai kondisi, mempunyai kestabilan termal yang tinggi, tidak mengembang (*swelling*), inert dan transparan secara optis [3]. Enzim Kloroperoksidase telah berhasil diperangkap dalam TEOS dengan mempertahankan aktivitasnya [4]. Natrium silikat dapat digunakan sebagai prekursor dalam proses sol-gel karena mudah mengalami hidrolisis dan kondensasi pada keadaan tertentu [5] Natrium silikat dapat dihasilkan dari ekstraksi abu sekam padi menggunakan natrium hidroksida atau karbonat [6]

Sebagai negara agraris, sejak tahun 1999 Indonesia dapat memproduksi padi sekitar 50 juta ton pertahun. Padi sejumlah itu dapat menghasilkan abu sekam sekitar 1-3 juta ton, yang sejauh ini belum dapat dimanfaatkan secara optimal. Ekstraksi silika dari abu sekam padi dapat dilakukan dengan metode basah menggunakan larutan natrium hidroksida mendidih [6]. Hasil ekstraksi yang berupa natrium silikat telah digunakan sebagai prekursor dalam pembuatan silika xerogel dengan kemurnian yang tinggi melalui metode sol-gel [6, 7]. Metode sol-gel diawali dengan reaksi hidrolisis fasa sol untuk selanjutnya mengalami kondensasi membentuk polimer menuju gel [8].

Dalam penelitian ini dikaji pengaruh imobilisasi sol-gel alkalin fosfatase ke dalam natrium silikat hasil ekstraksi dari abu sekam padi terhadap sifat-sifat katalitik dan kinetiknya.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari: Alkalin fosfatase (ALP) dari *bovine intestinal mucosa*, para-Nitrofenil fosfat, para-Nitrofenol, buffer Tris-HCl (Sigma), magnesium klorida, natrium hidroksida dan Asam klorida (Merck), sedangkan peralatan utama yang digunakan adalah hotplate, sentrifuge, shaker, spektrometri-20, FTIR dan XRD.

Ekstraksi silika dari abu sekam padi

Sekam padi dari daerah Sragen, Jawa Tengah, dikeringkan di bawah matahari dan dibersihkan dari kotoran-kotoran pengikat seperti daun-daun padi, pasir dan kerikil. Selanjutnya dipanaskan di atas kompor hingga membentuk arang yang berwarna hitam. Arang

dimasukkan ke dalam cawan porselen untuk selanjutnya dipanaskan dalam tungku pemanas (*furnace*) selama 4 jam dengan temperatur 700°C. Abu yang dihasilkan digerus kemudian diayak hingga lolos ayakan 200 mesh.

Larutan natrium silikat dibuat dengan melarutkan abu sekam dengan larutan NaOH mendidih (ekstraksi) mengikuti metode terdahulu [6]. Dibuat larutan NaOH 1,5 N dari NaOH pelet yang ada. Enampuluh mililiter larutan NaOH 1,5 N ditambahkan ke dalam 10 g abu sekam, kemudian dididihkan sambil diaduk. Setelah dingin disaring, dan residu ditambah lagi dengan 60 mL larutan NaOH 1,5 N dan kembali dididihkan setelah dingin, disaring dan filtratnya disatukan dengan filtrat pertama sebagai larutan natrium silikat dan disimpan dalam botol plastik.

Pembuatan silika gel dari silika terlarut hasil ekstraksi dari abu sekam padi

Dibuat silika gel dengan menambahkan (0,5-5 mL) HCl 0,1 N pada (3,4 mL) silikat terlarut hingga terbentuk gel. Setelah dikeringkan diuji tingkat kekristalannya dengan XRD dan jenis-jenis gugus fungsinya dengan FTIR.

Imobilisasi sol-gel alkalin fosfatase dalam silika terlarut

Mengacu pada metode Wei *dkk* [9] dengan berbagai penyesuaian. Setelah penambahan HCl 0,1 N pada silikat terlarut dengan perbandingan tertentu, selanjutnya ditambahkan 0,04 mL enzim ALP yang sudah dilarutkan dalam buffer Tris-HCl (2 mg ALP dalam 40 mL buffer, pH: 8). Sesudah terbentuk gel, ditutup dengan parafilm yang diberi beberapa lobang untuk menguapkan pelarutnya dan dibiarkan semalam. Sampel kemudian diletakkan dalam desikator vakum dan disimpan selama beberapa hari hingga dipeoleh berat konstan. Sampel dibuat puder dan selanjutnya disimpan dalam freezer. Karakterisasi meliputi uji fisik, yaitu identifikasi gugus fungsional dengan FTIR, dan tingkat kekristalan dengan XRD, sedangkan uji kimiawi meliputi uji aktivitas enzimatik baik ALP bebas dalam larutan maupun ALP terenkapsulasi.

Uji aktivitas ALP bebas [10]

Satu mililiter larutan enzim (mengandung 2 µg ALP) dicampur dengan 1,46 mL buffer Tris-HCl dan 0,3 mL MgCl₂ dalam mixer vortex. Sesudah 30 menit ditambahkan 0,24 mL paranitrofenil fosfat (pNPP) 0,1 M sebagai substrat untuk memulai reaksi. Pembentukan produk para nitrofenol ditandai dengan perubahan warna diukur dengan spektrometri-20. Selanjutnya dicatat perubahan absorbansi terhadap waktu. Uji kinetika dilakukan dengan membuat plot terhadap persamaan Lineweaver-Burk, dengan memvariasi konsentrasi pNPP antara 1-15 mM:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

diperoleh harga V_{maks} dan K_m dari ALP, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik enzim dengan persamaan:

$$V_{maks} = kpEo$$

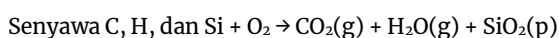
Uji aktivitas ALP terenkapsulasi [9]

Dua-sepuluh (2-10) miligram sampel yang biasanya mengandung 0,08 unit ALP diekstraksi dengan 5 ml aquabides selama 1 jam kemudian diikuti dengan sentrifugasi dan pemisahan dari fasa air. Selanjutnya dilakukan uji seperti ALP bebas dengan mengganti larutan enzim dengan 1 mL H₂O.

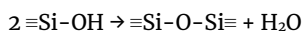
3. Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini diawali dengan pembuatan larutan natrium silikat melalui ekstraksi dengan menggunakan larutan NaOH 1,5 N. Secara keseluruhan pembuatan larutan natrium silikat (silikat terlarut) tersebut kemungkinan melibatkan reaksi kimia berikut:

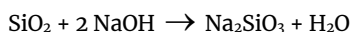
Pengabuan [11]:



Dimungkinkan juga terjadi kondensasi gugus silanol (=Si-OH) seperti penjelasan Iler [12]:



Pada ekstraksi silika dari abu sekam hingga terbentuk larutan natrium silikat mengikuti reaksi sebagai berikut:



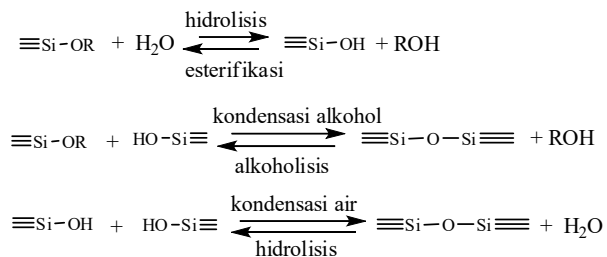
Sebelum digunakan sebagai matriks atau padatan pendukung dalam imobilisasi sol-gel (enkapsulasi) enzim ALP, dilakukan terlebih dahulu pembuatan gel dari natrium silikat hasil ekstraksi ini untuk melihat karakteristik gel yang dihasilkan. Pada umumnya, penambahan asam terhadap natrium silikat akan menyebabkan pembentukan gel secara langsung [13]. Peristiwa ini tidak dikehendaki karena dimungkinkan akan merusak enzim yang dienkapsulasikan. Untuk itu dilakukan variasi volume HCl 0,1 N yang digunakan hingga diperoleh gel yang tidak langsung terbentuk. Pengaruh volume HCl terhadap waktu pembentukan gel (gelasi) ditampilkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh volume HCl terhadap pH larutan dan waktu gelasi

No.	Volume Silikat terlarut (mL)	Volume HCl 0,1 N (mL)	pH	Waktu gelasi
1.	5	5	2	Langsung terbentuk gel
2.	5	4	3	Langsung terbentuk gel
3.	5	3	10	1 menit
4.	5	2	10	4 jam
5.	5	1	11	Tidak terbentuk gel
6.	5	0,5	12	Tidak terbentuk gel
7.	5	0,25	12	Tidak terbentuk gel

Dari tabel 1 terlihat bahwa variasi keempat (5 mL silikat terlarut dengan 2 mL HCl 0,1 N) membentuk gel dalam waktu relatif lama serta pH relatif tinggi. Selanjutnya komposisi ini digunakan pada enkapsulasi enzim.

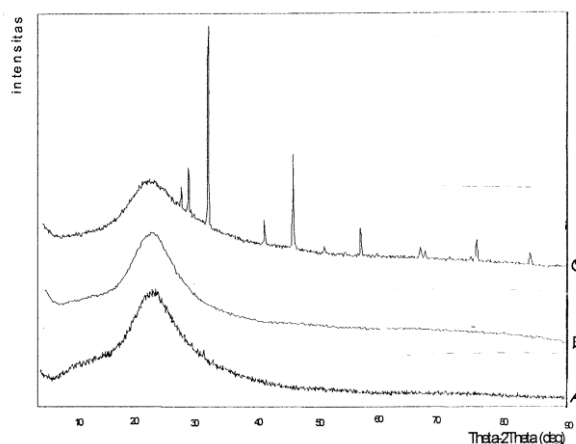
Secara umum reaksi sol-gel (pada pembentukan gel) terdiri dari dua langkah, yaitu hidrolisis logam alkoksida untuk memproduksi gugus hidroksil, diikuti dengan polikondensasi gugus hidroksil dengan sisa gugus alkoksida untuk membentuk jaringan tiga dimensi [8].



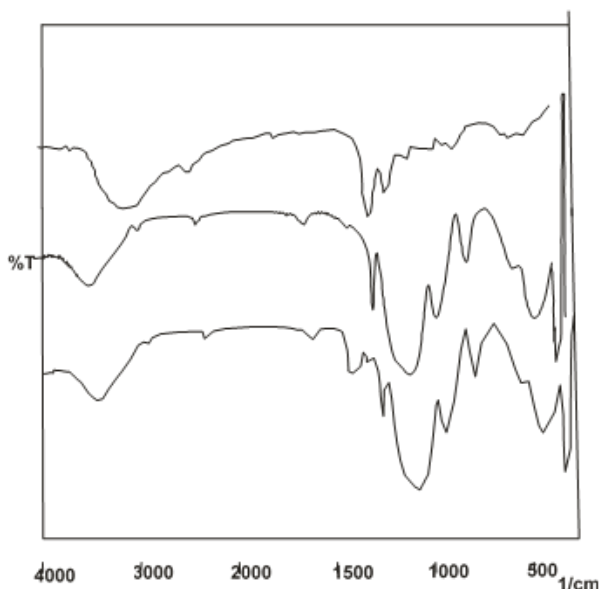
Gambar 1. Reaksi hidrolisis dan kondensasi pada proses sol-gel

Jika pada saat gel terbentuk ditambahkan molekul organik maupun biomolekul, maka molekul tersebut akan terperangkap di dalam gel. Untuk tujuan imobilisasi diharapkan pemerangkapan tersebut tidak menghilangkan keaktifan dari biomolekul yang terperangkap.

Pengaruh enkapsulasi ALP ke dalam silika diamati secara fisik maupun kimiawi. Secara fisik silika diuji tingkat kekristalannya dengan XRD (gambar 2) dan gugus-gugus fungsinya dengan FTIR (Gambar 3). Dari gambar 2 terlihat bahwa, silika dari abu sekam padi bersifat amorf. Sifat amorf ini yang menyebabkan silika bersifat reaktif, sedangkan dari gambar 3 terlihat bahwa spektra FTIR dari silika gel dari abu sekam padi maupun SG-ALP tidak menunjukkan pola yang berbeda, hal ini kemungkinan mengindikasikan bahwa enzim hanya terperangkap secara fisik, tidak membentuk suatu ikatan kimia.

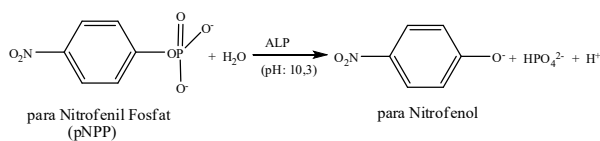


Gambar 2. Difraktogram XRD dari silika gel yang dihasilkan pada (a) pH=7 (b) pH=5 dan (c) pH=3



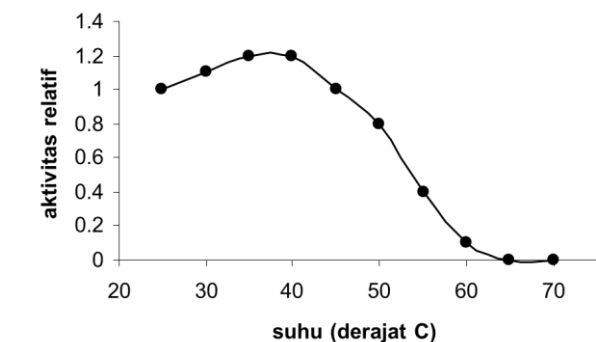
Gambar 3. Spektra FTIR dari silika gel: A. Avidin (protein), B. Silika gel dari abu sekam padi, C. Silika gel-ALP.

Uji secara kimiawi meliputi sifat katalitik dan kinetik dari enzim alkalin fosfatase. Sifat katalitik dari ALP diamati dari reaksi substrat para nitrofenil fosfat (pNPP) yang akan berubah menjadi fosfat anorganik dan para nitrofenol. Aktivitas enzimatik diukur dari terbentuknya produk paranitrofenol yang berwarna kuning dengan panjang gelombang 405 nm, seperti reaksi berikut:

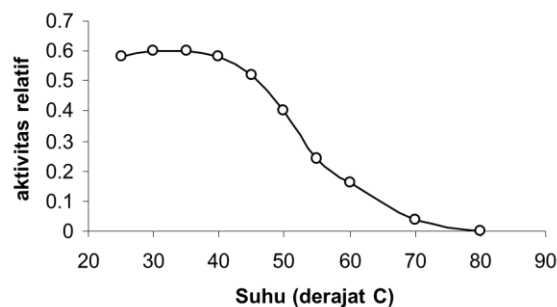


Gambar 4. Reaksi katalitik ALP [14]¹

Pengaruh enkapsulasi terhadap stabilitas enzim diamati dari pengaruh suhu reaksi (gambar 5) dan pH sistem (gambar 6).



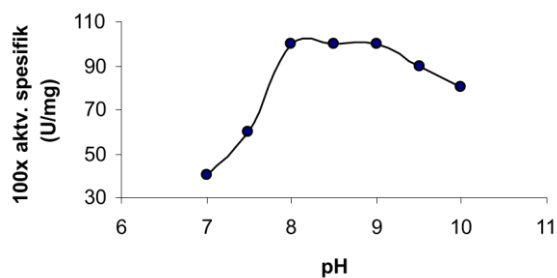
a.



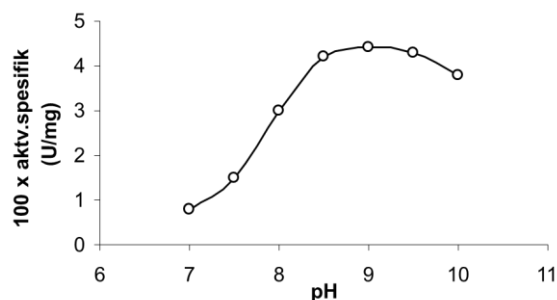
b.

Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Dari gambar 5 terlihat bahwa enkapsulasi menyebabkan pergeseran suhu optimum reaksi enzimatik maupun daya katalitiknya.



a.

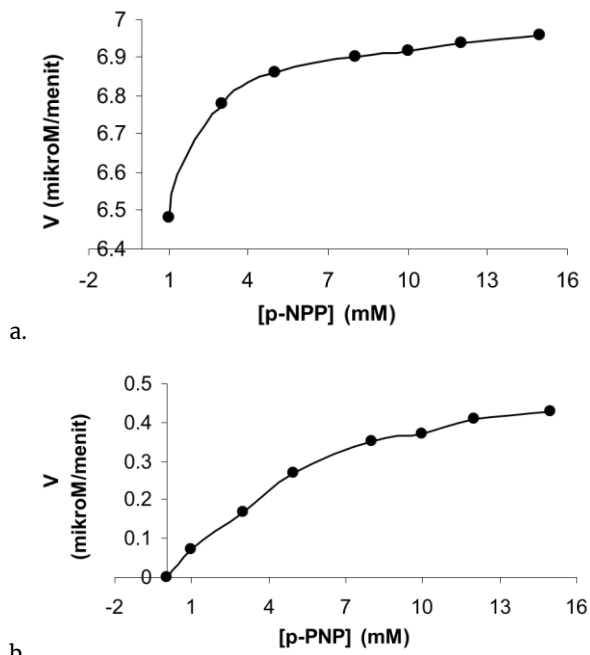


b.

Gambar 6. Pengaruh pH pada aktivitas enzim (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Pengaruh enkapsulasi terhadap range pH kerja enzim relative tidak berubah, sedangkan pH optimum sedikit bergeser ke arah yang lebih tinggi (dari 8 ke 9), seperti terlihat pada gambar 6. Dari hasil tersebut mengisyaratkan bahwa enzim terenkapsulasi dalam silika kemungkinan lebih stabil dibanding enzim bebas dalam larutan.

Sifat kinetik enzim ALP diamati melalui variasi konsentrasi substrat pNPP, sehingga diperoleh kurva Michaelis-Menten (gambar 7).



Gambar 7. Kurva Michaelis-Menten dalam larutan (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Dari gambar 7 terlihat bahwa baik ALP bebas maupun terenkapsulasi dalam silika mengikuti kurva Michaelis-Menten, sehingga dengan mengubah kurva tersebut menjadi kurva linear Lineweaver-Burk, diperoleh parameter-parameter kinetika enzim seperti ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Parameter-parameter kinetika enzim ALP

No.	Enzim ALP	Km (mM)	Vmaks (µM/menit)	Aktv. spesifik U/mg enzim
1.	Bebas	0,08	7,077	1,041
2.	Terenkapsulasi	7,50	0,775	0,051

Dari tabel 2 terlihat bahwa enkapsulasi berhasil dilakukan, namun ALP mengalami penurunan aktivitas yang cukup drastic dan reaksi enzimatik juga berlangsung relative lebih lambat. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya hambatan dalam interaksi antara substrat dengan enzim. Hambatan tersebut kemungkinan disebabkan oleh matriks silika yang terbentuk dari silikat terlarut tidak cukup porous sehingga difusi substrat terhambat, atau terjadi interaksi antara permukaan silika dengan enzim sehingga mengubah konformasi gugus aktif enzim yang berakibat menurunkan aktivitasnya.

4. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Silikat terlarut yang dihasilkan dari ekstraksi abu sekam padi dapat digunakan sebagai matriks pada imobilisasi alkalim fosfatase melalui proses sol-gel, sedangkan pengaruh dari enkapsulasi tersebut adalah sebagai berikut:

Proses enkapsulasi ALP ke dalam silika dari abu sekam padi tidak merubah struktur silika, tetapi menambah gugus aktif dari silika gel yang dihasilkan.

Enkapsulasi ALP menurunkan aktivitas enzimatik ALP dari 1,041 U/mg enzim untuk enzim bebas dalam larutan menjadi 0,051 U/mg enzim untuk ALP terenkapsulasi, dan reaksi berlangsung lebih lambat (Vmaks 7,077 µM/menit turun menjadi 0,775 µM/menit).

Enkapsulasi ALP meningkatkan kestabilan enzim, sehingga range suhu kerja enzim dan pH kerja enzim bergeser lebih tinggi (suhu optimum meningkat dari 40°C menjadi 45°C, dan pH optimum meningkat dari 8,5 menjadi 9).

Saran

Untuk memperkecil penurunan aktivitas enzim sebagai akibat dari enkapsulasi perlu diupayakan untuk memodifikasi matriks dengan tujuan mengatasi hambatan difusi substrat.

Untuk pengembangan lebih lanjut ke arah biosensor perlu diuji pemakaian secara berulang (*recycle*).

5. Daftar Pustaka

- [1] Trevor Palmer, Understanding enzymes, 4 ed., Prentice Hall/Ellis Horwood, 1995.
- [2] F. Sharmin, S. Rakshit, H. Jayasuriya, Enzyme Immobilization on Glass surfaces for the development of Phosphate detection Biosensors, Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal, 9, (2007) 1-12
- [3] Rosaria Ciriminna, Mario Pagliaro, Recent Uses of Sol-Gel Doped Catalysts in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industry, Organic Process Research & Development, 10, 2, (2006) 320-326 <http://dx.doi.org/10.1021/op050211u>
- [4] Tuan Le, Selina Chan, Bassem Ebaid, Monika Sommerhalter, Silica Sol-Gel Entrapment of the Enzyme Chloroperoxidase, Journal of Nanotechnology, 2015, (2015) 10 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/632076>
- [5] Sriyanti, Taslimah, Nuryono, Narsito, Sintesis Bahan Hibrida Amino-Silika dari Abu Sekam Padi Melalui Proses Sol-Gel, Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi, 8, 1, (2005) 1-10
- [6] U. Kalapathy, A. Proctor, J. Shultz, A simple method for production of pure silica from rice hull ash, Bioresource Technology, 73, 3, (2000) 257-262 [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00127-3)
- [7] U. Kalapathy, A. Proctor, J. Shultz, An improved method for production of silica from rice hull ash, Bioresource Technology, 85, 3, (2002) 285-289 [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00116-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00116-5)
- [8] C. Jeffrey Brinker, George W. Scherer, Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing, Academic Press, 1990.
- [9] Yen Wei, Jigeng Xu, Qiuwei Feng, Hua Dong, Muduo Lin, Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process, Materials Letters, 44, 1, (2000) 6-11 [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00287-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00287-6)

- [10] M. H. Ross, J. O. Ely, J. G. Archer, Alkaline phosphatase activity and pH optima, *Journal of Biological Chemistry*, 192, 2, (1951) 561-568
- [11] Nuryono, Kajian Perbandingan Silika termodifikasi gugus sulfonat and iminodiasetat pada pemisahan logam alkali tanah dengan kromatografi ion, in: *The First National Seminar of Ecotoxicology and Environmental Chemistry*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1998.
- [12] Ralph K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, Wiley, 1979.
- [13] Sriyanti, Taslimah, Nuryono, Narsito, Selektivitas Silika Gel Termodifikasi Gugus Tiol untuk Adsorpsi kadmium(II) dan Tembaga(II), *Seminar Nasional Hasil Penelitian MIPA 2004*, Semarang, (2004).
- [14] George N. Bowers, Robert B. McComb, Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum, *Clinical chemistry*, 21, 13, (1975) 1988-1995