

## KARAKTERISASI ENZIM PENISILIN ASILASE DARI *ESCHERICIA COLI* B-130.

Nies Suci Mulyani

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia F MIPA Universitas Diponegoro

---

### ABSTRAK

Telah dilakukan karakterisasi enzim penisilin asilase hasil isolasi dari *Escherichia coli* B-130. Karakterisasi meliputi pH optimum, temperatur optimum, tetapan Michaelis Menten ( $K_m$ ), kecepatan maksimum ( $V_m$ ). Aktivitas enzim penisilin asilase ditentukan dengan metode Kornfeld pada  $\lambda$  538 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH optimum = 7,5, temperatur optimum 55°C, tetapan Michaelis Menten ( $K_m$ ) = 0,86  $\mu$ M kecepatan reaksi maksimum ( $V_m$ ) untuk pembentukan produk 6-APA sebesar 147  $\mu$ mol/mL enzim

**Kata kunci :** Enzim, penisilin asilase, karakterisasi.

### ABSTRACT

#### Enzym Penicillin Acylase Characterisation of *E. Coli* B-130

Characterisation as the optimum pH, the optimum temperature, the Michaelis Menten constant ( $K_m$ ) and the maximum rate. The activity of penicillin acylase was determined by Kornfeld method at  $\lambda$  538 nm. The conclusion are the optimum pH was 7,5, the optimum temperature was 55°C. The Michaelis Menten constant was 0,86 mM and the maximum rate of 6-APA was 147 mmol 6-APA/mL enzim.

**Keyword :** Enzyme, penicillin acylase, characterisation

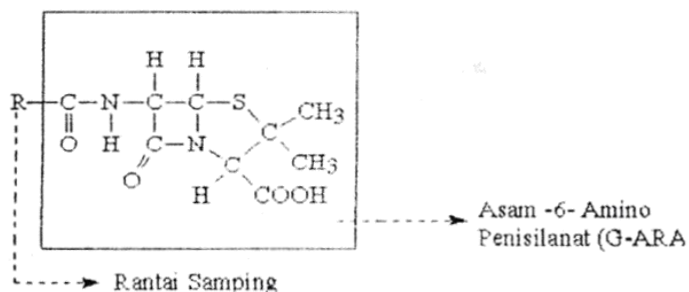
---

### PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini hampir seluruh obat jadi farmasi sudah dapat dibuat di dalam negeri, tetapi sebagian besar bahan bakunya masih harus didatangkan dari luar negeri. Hal ini disebabkan karena Indonesia sampai saat ini belum mampu memenuhi kebutuhan akan bahan baku obat terutama untuk antibiotika.

Penisilin merupakan salah satu jenis antibiotika yang banyak digunakan untuk

pengobatan berbagai penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti jamur, bakteri dan virus, karena kemampuan antimikrobanya cukup tinggi<sup>(1)</sup>. Penisilin termasuk antibiotik  $\beta$  laktam yang terdiri dari 6-APA (sebagai inti penisilin) dan rantai samping yang terikat pada  $C_6$  dari asam 6-amino penisilinat (6-APA)<sup>(2)</sup>.



Penisilin alam yang mula-mula ditemukan oleh Fleming, diperoleh pada media biakan jamur *Penicillium notatum*<sup>(3)</sup>. Kekurangan dari sifat penisilin alam tidak tahan panas, asam dan basa, sering menimbulkan alergi. Serta banyaknya kuman yang kebal terhadap antibiotika, terutama yang mampu mensintesa  $\beta$ -laktanase<sup>(4)</sup>. Hal inilah yang mendorong peneliti untuk memperoleh jenis penisilin baru yang sifatnya lebih baik dari penisilin alam.

Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Abraham dan kawan-kawan, diperoleh hasil bahwa perbedaan struktur samping dari penisilin menimbulkan sifat antibiotika yang baru. Penisilin yang diperoleh dengan cara ini disebut penisilin semisintetik<sup>(4)</sup>. Yang menjadi masalah utama dalam pembuatan penisilin semi

sintetik adalah penyediaan inti molekul penisilin yaitu asam 6-amino penisilat (6-APA). Senyawa 6-APA ini dapat diperoleh secara hidrolisis kimiawi, enzimatik maupun fermentasi dari penisilin alam maupun secara fermentasi. Yang banyak dilakukan orang adalah cara enzimatik, karena biayanya relatif lebih murah. Pada cara enzimatik, 6-APA diperoleh melalui reaksi hidrolisis penisilin dengan bantuan enzim penisilin asilase yang dapat diperoleh dari berbagai mikroorganisme<sup>(5)</sup>.

Penisilin asilase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis penisilin pada ikatan amida yang menghubungkan rantai samping asil dengan inti penisilin menjadi 6-APA dan asam karboksilat<sup>(2)</sup>



Reaksi sintesis penisilin dikatalisis oleh enzim yang sama, hidrolisis berlangsung pada pH sedikit basa (7,5 - 9,0), sedangkan reaksi sintesis berlangsung pada pH sedikit asam. Keberhasilan dalam penyediaan 6-APA

dan pembuatan penisilin semi sintetik selain ditentukan oleh kualitas dari enzim penisilin asilase juga perlu diketahui kondisi optimum yang merupakan karakter dari enzim penisilin asilase yang digunakan<sup>(6)</sup>. Karena dengan

menggunakan enzim penisilin asilase yang mempunyai aktivitas yang tinggi dan kondisi lingkungan (temperatur, pH) yang mendukung, maka produksi 6-APA sebagai inti penisilin akan meningkat demikian juga hasil penisilin semi sintetikrya.

Dalam penelitian ini akan dicoba untuk mengetahui kondisi optimum enzim penisilin asilase hasil isolasi dari *Eschericia coli* B-130.

### TUJUAN PENELITIAN

Memperoleh kondisi optimum dan parameter kinetik enzim penisilin asilase hasil isolasi dari bakteri *Eschericia coli* B-130.

### METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan enzim penisilin asilase hasil isolasi dari bakteri *Eschericia coli* B-130 yang ditumbuhkan dalam medium Morita dan Iwata yang mengandung asam fenil asetat 0,2% sebagai penginduksi.

Hasil yang diperoleh kemudian di-fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat secara bertingkat, dilanjutkan pemurnian dengan kolom kromatografi DEAE-Sephacel.

Enzim yang diperoleh dari hasil pemurnian terakhir, kemudian ditentukan pH optimum, temperatur optimum serta parameter kinetik  $V_m$  (kecepatan maksimum) dan  $K_m$  (tetapan Michaelis Menten). Pengukuran aktivitas enzim penisilin asilase dengan cara Kornfeld, atas dasar pengukuran intensitas warna yang ditimbulkan oleh pereaksi Erlich pada panjang gelombang 538 nm dan kadar protein ditentukan dengan cara Lowry.

1 Unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai aktivitas enzim yang dapat menghasilkan 1  $\mu$ mol substrat (bensilpenisilin) pada kondisi percobaan.

### HASIL dan PEMBAHASAN

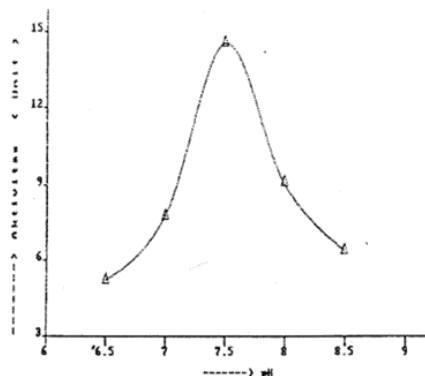
#### a. Penentuan pH optimum enzim penisilin asilase.

Penentuan pH optimum enzim penisilin asilase dilakukan berdasarkan pengukuran 6-APA hasil reaksi enzimatik antara enzim penisilin asilase dengan substrat bensil penisilin pada berbagai harga pH. Harga pH yang menunjukkan jumlah 6-APA yang tertinggi merupakan pH optimum bagi kerja enzim penisilin asilase tersebut.

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim penisilin asilase dapat dilihat dari tabel 1 dan gambar 1 berikut :

Tabel 1. Data penentuan pH optimum

pH	Aktivitas spesifik unit/mg prot
6,5	5,24
7,0	7,78
7,5	14,55
8,0	9,08
8,5	6,04



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim penisilin asilase

Pada pH 7,5 diperoleh aktivitas enzim penisilin asilase tertinggi, oleh karena itu pH tersebut merupakan pH optimum dari enzim penisilin asilase. Perubahan pH sangat mempengaruhi aktivitas enzim sebab pH dalam larutan, menunjukkan jumlah ion  $H^+$  yang ada dalam larutan. Sehingga perubahan pH-sangat mempengaruhi muatan listrik pada enzim maupun substrat. Pada enzim perubahan pH sangat mempengaruhi pusat aktif enzim yang terdiri dari asam-asam amino. Perubahan muatan listrik dapat mengakibatkan perubahan kon-formasi maupun perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi sebagai pengikat substrat.

#### b. Penentuan temperatur optimum enzim penisilin asilase.

Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim seperti halnya reaksi kimia biasa yang akan meningkat dengan peningkatan suhu. Tetapi perlu diingat bahwa enzim seperti halnya semua protein yang akan mudah rusak konformasinya pada temperatur tertentu

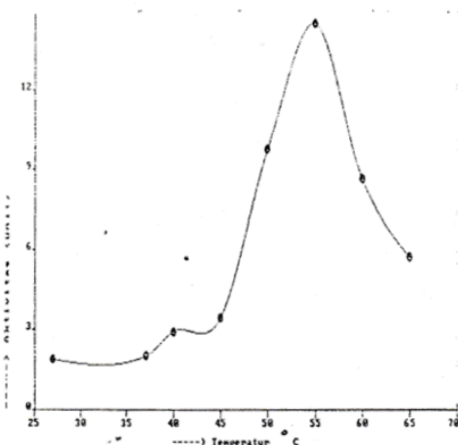
Setiap enzim mempunyai temperatur optimum yang karakteristik, pada temperatur tersebut enzim akan memiliki aktivitas tertinggi.

Penentuan temperatur optimum enzim penisilin asilase dilakukan berdasarkan pengukuran 6-APA yang terbentuk dari hasil reaksi antara enzim penisilin asilase dengan substrat benzil penisilin pada berbagai temperatur. Harga temperatur yang menunjukkan jumlah 6-APA tertinggi merupakan temperatur optimum untuk kerja enzim tersebut. Pengaruh temperatur terhadap

aktivitas enzim dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2.

Tabel 2. Data penentuan temperatur optimum

Temperatur	Aktivitas spesifik unit/mg protein
27	1,89
37	2,01
40	2,93
45	3,42
50	9,76
55	14,56
60	8,64
65	5,72



Gambar 2. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim penisilin asilase

Aktivitas enzim yang tertinggi diperoleh pada temperatur 55°C yang merupakan temperatur optimum untuk enzim tersebut. Pada temperatur 27°C sampai 55°C terlihat adanya kenaikan aktivitas enzim dengan naiknya temperatur, sedangkan mulai 55°C

sampai 65°C terlihat penurunan aktivitas enzim dengan naiknya temperatur. Hal ini disebabkan kenaikan temperatur akan berpengaruh terhadap ikatan-ikatan yang lemah seperti ikatan hidrogen, sehingga akan terjadi pembukaan ikatan non kovalen pada struktur kwarterner menjadi struktur tertier. Hal tersebut akan menyebabkan perubahan konformasi enzim terutama pada residu asam amino yang berfungsi untuk mengikat substrat sehingga akan menurunkan aktivitas enzim penisilin asilase tersebut.

### c. Penentuan parameter kinetik enzim penisilin asilase.

Keefektifan enzim sebagai katalis dapat diperkirakan dari harga  $V_m$  dan  $K_m$  nya. Harga  $V_m$  (kecepatan reaksi maksimum). sangat tergantung dari kadar enzim pada suatu larutan. Ini merupakan batas teoritis karena hanya dapat dicapai bila substrat terdapat dalam konsentrasi yang tinggi sekali, dan tidak ada produk yang menempati tempat aktif. Jadi merupakan kecepatan reaksi bila enzim telah dijenuhi oleh substrat.

Sedangkan  $K_m$  (tetapan Michaelis-Menten) merupakan kecenderungan bergabungnya enzim dengan substrat untuk menghasilkan produk.

Penentuan  $V_m$  dan  $K_m$  enzim penisilin asilase dilakukan berdasarkan pada pengukuran aktivitas enzim penisilin asilase pada berbagai konsentrasi substrat. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim penisilin asilase dapat dilihat pada tabel 3 dan gambar 3.

Dari data yang diperoleh dapat dianalisis dengan persamaan Lineweaver Burk yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis Menten berikut :

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$v$  : laju reaksi (aktivitas enzim)

$V_m$  : laju reaksi maksimum

$K_m$  : tetapan Michaelis Menten

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m + [S]}$$

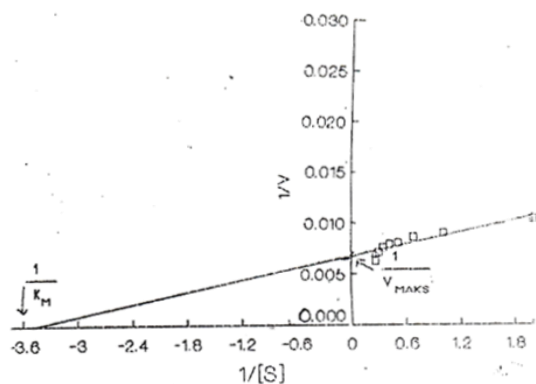
$$\frac{1}{v} = \left[ \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} \right] + \frac{1}{V_m}$$

yang bila dibuat grafik  $1/v$  vs  $1/[S]$  akan diperoleh garis lurus. Titik potong antara garis dengan absis akan diperoleh  $1/V_m$  sedangkan titik potong garis dengan ordinat akan diperoleh  $1/K_m$

Tabel 3. Data penentuan  $K_m$  dan  $V_m$

[S]	v	1/[S]	1/v
0,5	96,636	2	0,01035
1,0	111,912	1	0,00894
1,5	117,004	0,67	0,00855
2,0	125,151	0,50	0,00799
2,5	127,188	0,40	0,00786
3,0	132,888	0,33	0,00756
3,5	140,428	0,29	0,00712
4,0	160,795	0,25	0,00622

$V$  = aktivitas enzim  $\mu\text{mol 6-APA/mL enzim}$



**Gambar 3. Hubungan antara  $1/v$  dan  $1/[S]$  dari enzim penisilin asilase.**

Dari gambar diperoleh nilai  $K_m$  sebesar  $0,86 \mu\text{M}$ , sedangkan  $V_m$   $147,93 \mu\text{mol 6-APA/mL enzim}$

#### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa enzim penisilin asilase hasil isolasi dari *Escherichia coli* B-130 mempunyai pH optimum 7,5 temperatur optimum  $55^\circ\text{C}$ , tetapan Michaelis Menten ( $K_m$ ) =  $0,86 \mu\text{m}$  dan kecepatan reaksi maksimum ( $V_m$ ) =  $147 \mu\text{mol 6-APA/mL enzim}$ .

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada DR. Muhammad Wirahadikusumah (alm) dan DR. Muliawati Sinduwarta, staf pengajar Kimia FMIPA-ITB atas bantuan dan bimbingannya.

#### PUSTAKA

1. Gillman, G.A., L.S. Goodman, T.W. Rall., and F. Murad. "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 7<sup>th</sup> ed., Macmillan Publishing Company, New York, 1985, 1115-1137.
2. Crueger, W., and A. Crueger, "Biotechnology A Textbook of Industrial Microbiology", Science Tech., Inc. Madison USA, 1984, 178-180, 197-206.
3. Perlman, D(editor), "Advances in Applied Microbiology", vol XII, Academic Press, New York, 1974
4. Carington, T.R., *Proc. R. Soc. London.*, 179, 321-333.
5. Huber, F.M., R.R. Chauvette, and B.G. Jackson, "Cephalosporin & Penicillius", Academic Press, New York, 1972, 27-37
6. Balashingham, et. al., "The Isolation and Kinetics of Penisillin Amidase from *E.E.coli*", Biochemical 1972.