

PROSIDING SEMINAR

**WAWASAN KEILMUAN  
UNTUK MENINGKATKAN KUALITAS  
PEMBANGUNAN BANGSA INDONESIA**



**PENYUNTING :**

Mohammad Noer, MA.

Herri, SE., MBA.

Ir. Lala M. Kolopaking, MS.

Drs. Novesar Jamarun, MS.

Drs. Muslim, MSi., Apt.

Drs. Helmi Arifin, MS., Apt.

Drs. M. Zarlis, M.Sc.

Ir. Rahmad Setia Budi

**PPI UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

**PULAU PINANG - MALAYSIA**

**1997**

## PURIFIKASI PENISILIN ASILASE DARI *BACILLUS*

**Anthoni Agustien dan Erman Munir**

(School of Biological Sciences Universiti Sains Malaysia)

*Penisilin asilase merupakan enzim yang mengkatalisis substrat penisilin menjadi 6-amino penisilinat (6-APA). Enzim ini dapat dihasilkan oleh Bacillus secara ekstraseluler. Isolasi enzim ini telah dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi dan selanjutnya purifikasi enzim dilakukan dengan metode salting out bertingkat dan dilanjutkan dengan metode kromatografi penukaran ion. Aktivitas spesifik enzim tertinggi didapatkan pada 16 jam fermentasi. Aktivitas spesifik penisilin asilase yang dimurnikan dengan kromatografi DEAE-selulosa adalah 0,112 unit mg dan dengan fraksinasi amonium sulfat 0,037 unit mg. Tingkat kemurnian penisilin asilase yang dipurifikasi dengan kromatografi DEAE-selulosa adalah tiga kali enzim kasar.*

Penicillin acylase hydrolyzes penicillin to 6-amino penicillinate acid (6-APA). This extracellular enzyme can be produced by *Bacillus* species. Isolation of this enzyme has been performed by centrifugation method, and purification carried out through "salting out and ion exchange chromatography" methods. The highest specific activity of enzyme is at 16 hours fermentation. The specific activity of enzyme purified with DEAE-cellulose chromatography is higher than that of ammonium sulfate fractionation method, 0.112 and 0.037 unit/mg respectively. The purity level of penicillin acylase purified from DEAE-cellulose is three folds of crude enzyme.

### PENDAHULUAN

Penisilin merupakan salah satu jenis kelompok antibiotik yang paling banyak dimanfaatkan, karena efektif, relatif lebih aman dan tidak toksik (Martin dan Larias, 1985). Adanya hubungan aktivitas antimikroba dengan struktur kimia penisilin maka dilakukan pengembangan penisilin baru melalui modifikasi strukturnya dengan tujuan untuk memperoleh penisilin yang ideal (Crueger dan Crueger, 1984)

Penelitian untuk mencari antibiotika baru yang lebih efektif dengan potensi yang lebih baik adalah dengan melakukan modifikasi struktur kimia 6 amino penisilinat (6-APA) yang dikenal sebagai inti penisilin yang dihasilkan dari mikroba (Collowick dan Kaplan, 1975). Flynn (1972) menyatakan, penisilin asilase dapat

bersifat ekstraselular maupun intraselular, tergantung dari jenis mikroba penghasilnya. Untuk itu dilakukan pengujian aktivitas enzim penisilin asilase terhadap media dan sel mikroba. Enzim ini dihasilkan pada iodofase yang bersifat induktif, dimana fenil asetat sering digunakan sebagai induser.

Penisilin asilase umumnya dihasilkan oleh bakteri, jamur dan ragi. Pada umumnya bakteri dan ragi menghasilkan enzim ini secara intraselular, kecuali pada *Bacillus* dan *Streptomyces lavendulae* yang menghasilkan penisilin asilase secara ekstraseluler (Cruger dan Cruger, 1984). Robinson dan Howell (1985) berdasarkan kepada substratnya enzim ini dapat dibedakan atas tiga kelas yaitu Fenoksimetil penisilin asilase (penisil V asilase), Penisilin G asilase dan Ampisilin asilase.

Penisilin asilase yang dihasilkan oleh *Bacillus* bersifat ekstraseluler. Untuk mendapatkan enzim ini dilakukan sentrifugasi terhadap media pertumbuhan, setelah sentrifugasi, enzim berada dalam supernatan. Untuk memekatkan enzim dapat ditingkatkan dengan penambahan senyawa kimia tertentu agar protein mengendap. Enzim kasar merupakan campuran dari bermacam enzim mikroba. Untuk mendapatkan enzim yang murni maka perlu dilakukan beberapa tahap purifikasi. Ada beberapa cara, yaitu dengan pengendapan dan pemisahan dengan khromatografi. Pengendapan enzim dapat dilakukan dengan cara; penambahan senyawa elektrolit, penambahan senyawa netral polietilen glikol, dan penambahan pelarut organik.

Menurut Suhartono (1989), penambahan senyawa elektrolit menurunkan kelarutan protein, karena kelarutannya dipengaruhi oleh kekuatan ion. Pada umumnya dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan protein akan semakin besar "salting in", setelah mencapai suatu titik tertentu kelarutannya akan semakin menurun "salting out". Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion mengakibatkan meningkatnya kadar air yang terikat pada ion. Dan bila interaksi antar ion kuat, kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun.

Pemurnian enzim yang lebih spesifik adalah dengan menggunakan kromatografi. Prinsip pemisahan dengan kromatografi adalah adanya perbedaan interaksi antara molekul enzim yang berlainan jenis dengan matriks fasa diam atas pengaruh fasa gerak (pengelusi). Kromatografi terdiri atas kromatografi filtrasi gel, penukaran ion dan afinitas. Kromatografi penukaran ion ada dua macam yaitu kromatografi anion seperti DEAE-selulosa dan kromatografi penukaran kation seperti CMC selulosa.

Prinsip pada kromatografi penukaran ion adalah jika enzim yang dimurnikan mempunyai muatan yang sama dengan muatan gugus fungsi pada matriks fasa diam, maka enzim tersebut tidak diikat oleh matriks tetapi akan keluar bersama pengelusi. Jika enzim yang digunakan mempunyai muatan yang berlawanan dengan muatan gugus fungsi pada matriks fasa diam, maka enzim akan diikat oleh matriks dan untuk melepaskan enzim tersebut harus dilakukan elusi dengan pelarut yang mempunyai kekuatan ion yang lebih besar daripada pengelusi pertama. (Wiseman, 1985).

### METODOLOGI PENELITIAN

Fermentasi penghasil enzim penisilin asilase dari *Bacillus* dilakukan secara "submerged fermentation". Enzim diisolasi dari media dengan teknik sentrifugasi. Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Balasingham dan kadar protein dengan metoda Lowry. Purifikasi enzim dilakukan dengan dua metoda sebagai berikut.

- a. *Metode "Salting Out"* yaitu dengan menggunakan amonium sulfat secara bertingkat. Enzim kasar difraksinasi dengan penambahan amonium sulfat jenuh mulai dari konsentrasi 0-20%, 20-40%, 40-60%, sampai 60-80%. Penambahan ini dilakukan sedikit demi sedikit menggunakan magnetik stirer pada 4<sup>0</sup> C. Setelah beberapa jam disentrifugasi pada 12.500 rpm, suhu 4<sup>0</sup> C selama 15 menit, kemudian didialisis selama 12 jam, bufer diganti beberapa kali.
- b. *Pemurnian dengan Kromatografi DEAE-selulosa*. DEAE-selulosa dimasukkan ke dalam kolom dengan hati-hati, jangan sampai terdapat gelembung udara dalam gel.

Setelah gel padat, elusi dengan bufer fosfat pH. 6,0 ( pada pH mana enzim terikat). Larutan enzim dari fraksinasi amonium sulfat yang telah didialisis dimasukkan ke dalam kolom sebanyak 5% dari volume gel, kemudian dielusi dengan bufer fosfat pH. 7,5 yang mengandung HCl 1 M. Uji kadar protein pada 280 nm dan dengan metoda Lowry serta ditentukan aktivitas spesifik enzimnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari analisis yang telah dilakukan didapatkan hasil-hasil sebagai berikut

### 1. Pertumbuhan bakteri *Bacillus*.

Kurva pertumbuhan *Bacillus* yang dikultur dalam medium NA dapat dilihat pada gambar 1. Dari gambar 1 dapat dilihat bahwa jumlah bakteri paling tinggi adalah pada 16 jam fermentasi. Penentuan iodofase untuk produksi penisilin asilase, dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada 16, 18 , dan 20 jam inkubasi, pemberian asam fenil asetat pada inkubasi 10 jam. Tabel 1 menunjukkan aktifitas spesifik penisilin asilase.

Dari tabel 1 terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim penisilin asilase tertinggi yaitu pada 16 jam inkubasi, sehingga percobaan untuk isolasi enzim penisilin asilase lanjutan dilakukan pada 16 jam inkubasi.

### 2. Fraksinasi bertingkat amonium sulfat

Pengaruh penambahan amonium sulfat secara bertingkat terhadap aktivitas spesifik penisilin asilase dapat dilihat pada tabel 2.

Dari tabel 2 pemurnian bertingkat dengan penambahan amonium sulfat memberikan peningkatan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim yang tertinggi pada fraksi 40-60% jenuh sebelum dialisis yaitu 0,044 unit/mg dan setelah dialisis 0,040 unit/mg. Hal ini menunjukkan pada fraksi tersebut enzim penisilin asilase relatif lebih murni. Adanya penurunan aktivitas spesifik enzim setelah dialisis

disebabkan pada waktu dialisis adanya logam-logam tertentu sebagai kofaktor keluar bersama bufer fosfat sehingga aktivitas spesifik enzim menjadi lebih rendah.

### 3. Pemurnian enzim dengan kromatografi DEAE-selulosa

Dari pemurnian enzim penisilin asilase dengan menggunakan kromatografi penukar ion DEAE-selulosa dapat dilihat pada gambar 2.

Aktivitas spesifik enzim penisilin asilase dimulai pada fraksi 5 yaitu 0,028 unit/mg, sedangkan aktivitas spesifik yang tertinggi yaitu pada fraksi 13 sebesar 0,112 unit/mg. Kemudian aktivitas spesifik enzim terakhir pada fraksi 16. Tingginya aktivitas spesifik enzim penisilin asilase pada fraksi 13, ini membuktikan bahwa DEAE-selulosa merupakan salah satu matriks yang baik dalam hal pemisahan protein. Tabel 3 berikut menunjukkan tingkat aktivitas spesifik dari enzim dari beberapa tingkat pemurnian.

Dari tabel di atas terlihat bahwa kemurnian yang paling tinggi adalah dengan menggunakan kromatografi DEAE-selulosa, yaitu sebesar 3,73 kali, amonium diikuti dengan amonium sulfat sebelum dialisis yaitu sebesar 1,23 kali dan amonium sulfat setelah dialisis 1,67 kali dibandingkan dengan enzim kasar. Lebih murninya enzim dengan perlakuan pemurnian menggunakan kromatografi penukar ion DEAE-selulosa dibandingkan dengan yang lainnya, disebabkan DEAE-selulosa dapat memisahkan protein lebih baik pada fraksi-fraksi tertentu bila dibandingkan dengan fraksinasi amonium fosfat.

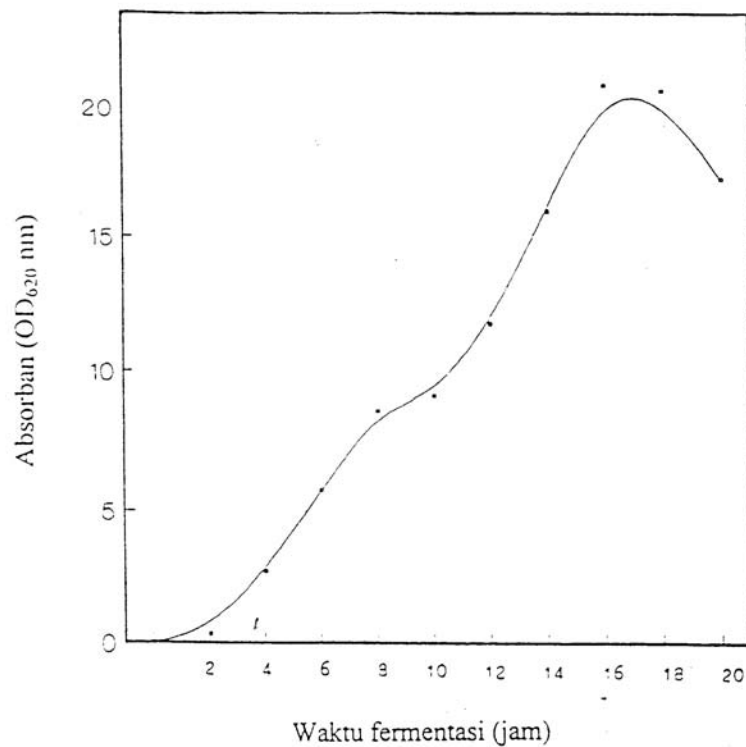
### Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada PAU Bioteknologi ITB yang telah memberikan bantuan dana dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

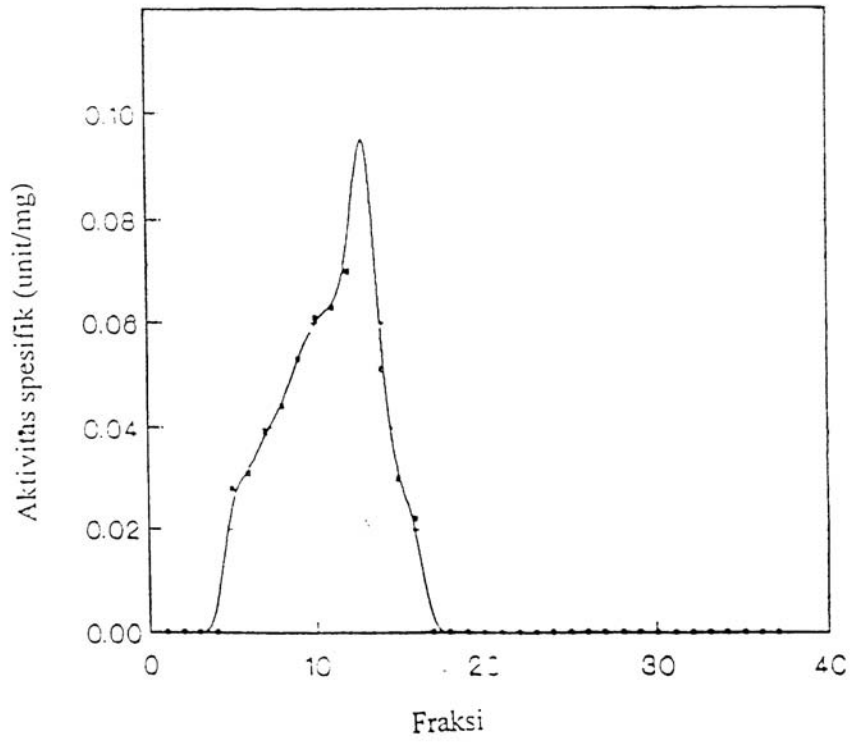
### RUJUKAN

- Collowick and Kaplan. 1975. *Methods in enzymology*. 53: 698-727.  
Crueger, U., and A. Crueger. 1984. *Biotechnology: A Text Book of Industrial Microbiology*. Science Tech. Inc. Madison.

- Flynn, E.H. 1972. *Chepalosporins and Penicillins*. Academic Press. new York.
- Marthin, J.F., and P. Larias. 1985. "Biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics design and construction of over producing strain". *Trens Biotech*. 3: 39-40.
- Suhartono, M.T. 1989. *Petunjuk praktikum dasar-dasar biokimia*. PAU. IPB. Bogor.
- Wiseman, A. 1985. *Hand Book of Enzym Biotechnology*. Ellis Harwood Limited.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Bacillus*, bakteri dikultur dalam medium Nutrien Broth pada 37<sup>o</sup> C.



Gambar 2. Kromatogram aktivitas spesifik penisilina asilase setelah dimurnikan dengan kromatografi DEAE-selulosa

Tabel 1. Aktivitas spesifik penisilin asilase.

No	Waktu (jam)	Aktivitas (unit)	Kadar protein (mg)	Aktivitas spesifik (unit/mg)
1	16	0,0336	8,22	0,0041
2	18	0,0051	8,31	0,0006
3	20	0,0000	8,44	0,0000

Tabel 2. Aktivitas spesifik penisilin asilase dari fraksinasi ammonium sulfat.

No	Konsentrasi ammonium sulfat (%)	Aktivitas spesifik
1	Enzim kasar	0,037
2	0 - 20 %	0,000
3	20 - 40 %	0,001
4	40 - 60 %	0,040
5	60 - 80 %	0,000
6	40 - 60 % sebelum dialisa	0,044
7	40 - 60 % setelah dialisa	0,040

Tabel 3. Tingkat kemurnian enzim penisilin asilase

No	Perlakuan enzim	Aktivitas spesifik (unit/mg)	Kemurnian (kali)
1	Enzim kasar	0,030	1
2	Ammonium sulfat	0,037	1,23
3	Dialisis	0,035	1,16
4	DEAE-selulosa	0,112	3,73