

ARTIKEL PENELITIAN

EFEKTIVITAS ENKAPSULASI ENZIM PROTEASE DENGAN *BEAD*
HIDROGEL BERBAHAN ALGINAT-KITOSAN

*ENCAPSULATION EFFECTIVITY OF PROTEASE ENZYME WITH
ALGINATE-CHITOSAN HYDROGEL BEADS*

Christian Joseph Tanuwidjaja¹, Eko Adi Prasetyanto^{2,*}

¹ Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya No. 2, Jakarta Utara 14440

² Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya No. 2, Jakarta Utara 14440

* **Korespondensi:** prasetyanto@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

Introduction: The addition of the protease enzyme from an external source can increase protein absorption in the human digestive system. Protease enzyme is formulated by encapsulated inside alginate-chitosan hydrogel beads to deny immediate proteolysis reaction with the protein consumed and maintain the encapsulated enzyme in a temperature range acidity. This research aims to know the encapsulation effectivity of protease enzyme with alginate-chitosan hydrogel beads.

Methods: Experiments were conducted to encapsulate protease enzyme with ionotropic gelation method using alginate and chitosan. Encapsulation yield, bead size, encapsulated enzyme activity, release rate, and stability were analyzed from the hydrogel beads that were obtained. The data is then analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Results: From four variants of hydrogel beads that were obtained, this research shows that the volume addition of alginate solution in the encapsulation material will increase the value of encapsulation yield (EY), bead size, and release rate of the encapsulated protease enzyme. Therefore, the volume addition of chitosan solution will increase the value of encapsulation efficiency (EE). Hydrogel beads incubation at 6°C for 24 days maintain 75,55% of encapsulated enzyme activity.

Conclusion: Protease enzyme can be formulated with protein by being encapsulated with alginate-chitosan hydrogel beads.

Key Words: alginate, chitosan, protease enzyme encapsulation

ABSTRAK

Pendahuluan: Penambahan enzim protease dari sumber lain dapat meningkatkan penyerapan protein oleh organ pencernaan manusia. Enzim protease dari sumber lain diformulasikan dengan cara dienkapsulasi dalam *bead* hidrogel agar tidak langsung bereaksi dengan protein yang dikonsumsi dan tahan terhadap lingkungan suhu dan keasaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas enkapsulasi enzim protease dengan *bead* hidrogel berbahan alginat-kitosan.

Metode: Penelitian ini dilakukan secara eksperimental untuk mengenkapsulasi enzim protease dengan metode *ionotropic gelation* dengan bahan alginat dan kitosan. *Bead* hidrogel yang terbentuk akan dianalisis *yield* enkapsulasi, ukuran *bead* yang terbentuk, aktivitas, tingkat pelepasan, dan stabilitas enzim protease yang dienkapsulasi. Data kemudian akan dianalisis variasinya dengan menggunakan uji analisis keragaman (ANOVA) dan uji beda nyata terkecil *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil: Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa dari keempat variasi *bead* hidrogel yang terbentuk, penambahan volume larutan alginat pada bahan enkapsulasi akan meningkatkan nilai *yield* enkapsulasi (EY), ukuran *bead*, dan tingkat pelepasan enzim yang dienkapsulasi (L), sementara penambahan volume larutan kitosan akan meningkatkan nilai efisiensi enkapsulasi (EE). Inkubasi *bead* selama 24 hari pada suhu 6°C berhasil mempertahankan aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi sebesar 75,55%.

Simpulan: Enzim protease dapat diformulasikan dengan dienkapsulasi dalam *bead* hidrogel berbahan alginat-kitosan.

Kata Kunci: alginat, enkapsulasi enzim protease, kitosan

PENDAHULUAN

Manusia membutuhkan asupan protein dalam konsumsi hariannya yang berguna sebagai bahan pembentukan dan perbaikan jaringan dalam, seperti otot, kulit, dan jaringan lainnya. Setiap harinya, manusia membutuhkan asupan protein 1,6g/kgBB¹. Proses pencernaan protein dalam tubuh manusia berlangsung pada organ usus halus, yang diperantarai oleh enzim protease seperti pepsin yang dihasilkan oleh lambung, dan tripsin yang dihasilkan oleh pankreas.² Protein yang dikonsumsi oleh individu akan diabsorpsi oleh tubuh dengan reaksi anabolisme seperti denaturasi protein dan transaminasi yang dilakukan oleh berbagai enzim protease untuk membentuk senyawa asam amino agar bisa melewati epitel usus dan masuk ke dalam pembuluh darah untuk disalurkan ke jaringan target. Namun protein yang dikonsumsi tidak bisa seluruhnya diserap oleh tubuh karena tergantung pada kecepatan kerja enzim protease dalam tubuh untuk melakukan reaksi anabolisme dan diubah menjadi asam amino, kecepatan absorpsi dari asam amino, dan juga tipe aktivitas yang dilakukan oleh individu.^{3,4}

Gagasan yang muncul dari permasalahan tersebut adalah penambahan enzim protease dalam protein yang akan dikonsumsi agar terjadi peningkatan reaksi anabolisme pada protein yang dikonsumsi sehingga dapat diserap oleh tubuh secara maksimal. Penelitian yang dilakukan oleh Oben, *et al.* mengenai masalah tersebut terbukti dapat meningkatkan kadar asam amino yang ada di dalam darah, yang menandakan adanya pening-

katan penyerapan protein yang dikonsumsi oleh tubuh.⁴

Protease merupakan enzim pemecah protein yang mudah ditemukan dan diekstrak dari bakteri, kacang-kacangan, atau bahkan saluran pencernaan hewan.⁵⁻⁷ Enzim protease dari sumber lain dapat diformulasikan bersamaan dengan suplemen protein yang akan dikonsumsi, maka protease tersebut perlu dienkapsulasi agar kerja dari protease tersebut dapat dikontrol dan tidak mudah rusak atau habis ketika dicampurkan dengan suplemen. Proses enkapsulasi dapat menggunakan berbagai polimer seperti dengan alginat, gelatin, kitosan, ataupun campuran dua polimer diantara seluruh polimer tersebut.⁸⁻¹³ Pada penelitian ini, metode enkapsulasi *ionotropic gelation* akan dilakukan untuk mengenkapsulasi enzim protease tersebut dengan menggunakan bahan campuran dari alginat dan kitosan karena dinilai memiliki hasil yang baik dari penelitian-penelitian sebelumnya.¹³ Protease yang sudah dienkapsulasi akan diuji karakteristik kerja enzimnya dan dibandingkan dengan protease yang tidak dienkapsulasi.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dengan melakukan enkapsulasi dari enzim tripsin sebagai sumber enzim protease dalam *bead* hidrogel dari bahan campuran alginat dan kitosan dengan menggunakan metode *ionotropic gelation*. Sediaan *bead* akan dibuat dengan variasi volume larutan bahan yang berbeda, lalu akan dilakukan analisis nilai *yield* enkapsulasi,

ukuran *bead*, efisiensi enkapsulasi, tingkat pelepasan enzim yang terenkapsulasi, dan stabilitas enkapsulasi dari sediaan *bead* yang terbentuk.

Pembuatan *bead* hidrogel terdiri dari pembuatan larutan polimer kompleks dan larutan kationik untuk persiapan enkapsulasi enzim protease dengan menggunakan metode yang dipakai oleh Anjani, *et al.*¹³ Preparasi larutan alginat menggunakan alginat 2% (w/v) yang dilarutkan dalam air deionisasi pada suhu 65-75°C selama 1 jam. Larutan kitosan dibuat dengan cara melarutkan 0,2 g kitosan dalam 10 ml asam asetat 1% (w/v) menggunakan *magnetic stirrer*. Air deionisasi ditambahkan hingga volume larutan menjadi 90 ml dan ditambahkan larutan NaOH sampai mencapai pH 6,4. Lalu tambahkan 0,01 ml Tween 80 dan larutan CaCl₂ 0,1M hingga volume larutan menjadi 100 ml. Maka akan didapat larutan akhir yang terdiri dari 0,2% (w/v) larutan kitosan dan 9% (w/v) larut-

an 0,1 M CaCl₂ dan 0,1% Tween 80.

Enkapsulasi enzim protease dilakukan dengan metode *ionotropic gelation* seperti yang dilakukan oleh Anjani, *et al.* dengan modifikasi.¹³ Sebesar 1 ml ekstrak enzim protease 2% (w/v) dicampur dengan 4 ml larutan alginat yang sudah dipreparasi. Kemudian campurkan larutan ke dalam 10 ml larutan kitosan yang sudah dipreparasi sehingga membentuk *bead* hidrogel pada suhu ruang. Campuran dengan kombinasi volume dari ketiga larutan juga akan dibuat seperti pada Tabel 1, *bead* akan terbentuk selama 30 menit. Setelah itu *bead* dipisahkan melalui filtrasi dengan membilas menggunakan air deionisasi, dan kemudian dikeringkan dengan udara pada suhu ruang selama 30 menit. *Bead* yang sudah dikeringkan disimpan pada suhu -20°C. Enzim protease yang telah dienkapsulasi dalam *bead* kemudian dianalisis dalam berbagai macam uji.

Tabel 1. Variasi Kombinasi Volume Larutan Bahan Pembuatan *Bead* Hidrogel

Varian <i>Bead</i> Hidrogel	Volume Ekstrak Enzim Protease (ml)	Volume Larutan Alginat (ml)	Volume Larutan Kitosan (ml)
X1	1	5	9
X2*	1	4	10
X3	1	3	11
X4	2	4	10

* kombinasi standar

Analisis *yield* enkapsulasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$EY = \frac{M'}{M} \times 100\%$$

dengan M' = total massa *bead* (g); M = total massa larutan kopolimer dan larutan enzim (g). Analisis ukuran *bead* hidrogel hasil enkapsulasi dilakukan dengan memilih 80 *bead* secara acak dan mengukur diameter *bead* menggunakan jangka sorong, lalu dihitung nilai rata-ratanya.

Aktivitas enzim protease dilakukan dengan metode kaseinolitik seperti yang dilakukan oleh Hidalgo, *et al.* dengan modifikasi.⁷ Uji aktivitas enzim protease dapat dilakukan

dengan membuat larutan pada tabung sampel dengan melarutkan 0,5 ml kasein 1% (w/v) dalam 0,5 ml *buffer* fosfat (Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4) 0,1M (pH 8,0-9,0) dan dicampur dengan 0,25 ml sampel enzim protease, baik yang sudah dienkapsulasi dalam *bead* hidrogel maupun belum. Cara membuat larutan sampel enzim protease yang sudah dienkapsulasi adalah dengan melarutkan 1 g *bead* hidrogel pada 25 ml larutan trisodium sitrat 2%, lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 70 rpm selama 30 menit pada suhu ruang. Campuran sampel diinkubasi selama 1 jam dalam suhu 37°C. Kemudian reaksi pada campuran sampel dihentikan dengan menambahkan 0,75 ml asam trikloroasetat (TCA) 8% (w/v) pada campuran, lalu diinkubasi kembali pada suhu 6°C selama 1 jam. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Pada tabung blanko diisi dengan campuran antara 0,25 ml air deionisasi, 0,5 ml larutan kasein 1% (w/v), dan 0,5 ml *buffer* fosfat 0,1M, lalu ditambahkan 0,75 ml larutan TCA 8%. Pada tabung standar, larutkan 0,5 ml larutan tirosin dengan konsentrasi yang telah diketahui (25-200 µg/ml) dalam 0,25 ml air deionisasi dan 0,5 ml *buffer* fosfat 0,1M. Setelah itu campuran pada tabung standar ditambahkan 0,75 ml larutan TCA 8%. Semua larutan pada masing-masing tabung kemudian

disentri-fugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang telah disentrifugasi dianalisis absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang sebesar 280 nm. Hasil ukur 1 unit dari aktivitas enzim bermakna sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis reaksi pemecahan kasein menjadi 1 µg tirosin setiap 1 menit.

Nilai absorbansi yang didapat akan dilakukan perhitungan nilai aktivitas enzim protease dari sampel dengan menggunakan rumus berikut:¹⁴

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}] \times V}{(p \times q) \times Fp}$$

dengan [tirosin] = konsentrasi tirosin yang terbentuk (µg/ml); V = volume total sampel pada tiap tabung (ml); p = jumlah enzim (ml); q = waktu inkubasi (menit); Fp = faktor pengenceran. Hasil ukur 1 unit dari aktivitas enzim bermakna sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis reaksi pemecahan kasein menjadi 1 µg tirosin setiap 1 menit.¹⁵

Nilai aktivitas enzim dari enzim yang sudah dienkapsulasi dibandingkan dengan nilai aktivitas enzim yang belum dienkapsulasi untuk menentukan persentase efisiensi enkapsulasi (EE). Persentase efisiensi enkapsulasi dapat dihitung dengan cara:

$$EE = \frac{\text{Aktivitas enzim recovered pada bead}}{\text{Aktivitas enzim yang belum terenkapsulasi}} \times 100\%$$

Tingkat pelepasan enzim yang dienkapsulasi (L) dianalisis dengan melarutkan 5 g *bead* hidrogel dalam 25 ml air deionisasi. Lalu dilakukan *shaking* menggunakan *shaker*

pada kecepatan 150 rpm selama 120 menit. Kemudian, 5 ml sampel dari suspensi tersebut diambil dengan interval waktu yang berbeda (0, 30, 60, 90 dan 120 menit). Sampel akan

dianalisis aktivitas enzim dari konsentrasi enzim yang terdapat pada sampel. Aktivitas enzim protease dari sampel akan dianalisis

$$L = \frac{\text{Aktivitas enzim pada air deionisasi}}{\text{Aktivitas enzim pada bead yang diujikan}} \times 100\%$$

Enzim yang telah dienkapsulasi dalam *bead* hidrogel disimpan pada suhu 6°C selama 24 hari. 1 g *bead* dilarutkan dalam 25 ml trisodium sitrat 2% (w/v) dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang untuk menginisiasi pelepasan enzim protease yang dienkapsulasi. Sampel dianalisis aktivitas enzimnya pada hari ke-0, 7, 14, dan 24. Aktivitas enzim dipertahankan selama periode penyimpanan 24 hari.

Penelitian dilakukan sebanyak 1 kali ulangan perlakuan, setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan analisis. Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik dengan analisis keragaman (ANOVA) dan uji

dan dibandingkan dengan aktivitas enzim pada variasi *bead* yang diuji.

beda nyata terkecil *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat signifikan 95%.

HASIL

Analisis dilakukan dengan mengukur massa dari larutan kopolimer dan larutan enzim protease yang akan digunakan untuk melakukan enkapsulasi, dan mengukur massa *bead* hidrogel yang terbentuk dari enkapsulasi. Kedua nilai massa yang didapat dibuat dalam perbandingan untuk mendapatkan nilai *yield* enkapsulasi (EY). Berdasarkan hasil analisis pada data Tabel 2, *bead* X4 memiliki nilai *yield* enkapsulasi tertinggi (50,96%), sementara *bead* X3 memiliki nilai *yield* enkapsulasi terendah (29,27%).

Tabel 2. Data Analisis *Yield* Enkapsulasi Enzim Protease

Variasi <i>Bead</i> Hidrogel	Total Massa Larutan (g)	Massa <i>Bead</i> Hidrogel yang Terbentuk (g)	EY (%)
X1	14,94	7,17 ± 1,61	47,99
X2	14,47	5,81 ± 0,47	40,15
X3	14,69	4,30 ± 0,47	29,27
X4	15,64	7,97 ± 0,08	50,96

Tabel 3. Data Analisis Ukuran *Bead* Hidrogel Hasil Enkapsulasi

Variasi <i>Bead</i> Hidrogel	Diameter (mm)
X1	7,285 ± 1,239
X2	5,594 ± 1,299
X3	5,043 ± 0,712
X4	5,887 ± 0,842

Sebanyak 80 *bead* hasil enkapsulasi dari tiap variasi diukur diameternya secara acak dengan menggunakan jangka sorong

dengan ketelitian 0,05 mm. Berdasarkan hasil analisis pada data Tabel 3, *bead* X1 memiliki diameter paling besar (7,285 mm), sementara

bead X3 memiliki diameter paling kecil (5,043 mm).

Analisis aktivitas enzim protease ditunjukkan pada Tabel 4, ditemukan bahwa enzim protease yang terenkapsulasi dalam *bead* hidrogel yang dilarutkan dalam larutan natrium sitrat dengan variasi X4 memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi (0,875 U/ml), sedangkan

enzim protease yang terenkapsulasi dalam *bead* X1 memiliki nilai aktivitas enzim yang terendah (0,297 U/ml). Hasil analisis ini kemudian akan digunakan oleh peneliti untuk melakukan analisis efisiensi enkapsulasi enzim protease, tingkat pelepasan enzim protease yang dienkapsulasi, dan stabilitas enkapsulasi enzim protease.

Tabel 4. Data Analisis Aktivitas Enzim Protease

Bahan	Absorbansi	Konsentrasi Tirosin Terlarut ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas Enzim (U/ml)
EP*	2,034 \pm 0,035	2,519 \pm 0,433	2,687 \pm 0,046
X1	0,225 \pm 0,004	0,279 \pm 0,004	0,297 \pm 0,006
X2	0,649 \pm 0,003	0,804 \pm 0,005	0,858 \pm 0,004
X3	0,581 \pm 0,008	0,719 \pm 0,009	0,767 \pm 0,009
X4	0,662 \pm 0,030	0,821 \pm 0,037	0,875 \pm 0,039

EP: enzim protease yang tidak dienkapsulasi

Tabel 5. Data Analisis Efisiensi Enkapsulasi dari *Bead* Hidrogel yang Terbentuk

Variasi <i>Bead</i> Hidrogel	Efisiensi Enkapsulasi (%)
X1	11,06 \pm 0,16
X2	31,93 \pm 0,21
X3	28,57 \pm 0,37
X4	32,58 \pm 1,48

Analisis efisiensi enkapsulasi enzim protease dalam *bead* hidrogel yang terbentuk dilakukan dengan membandingkan antara nilai aktivitas enzim dari enzim protease yang sudah terenkapsulasi dengan nilai aktivitas enzim dari enzim protease yang tidak dienkapsulasi. Hasil analisis data pada Tabel 5 memperlihatkan bahwa variasi *bead* hidrogel X4 memiliki nilai efisiensi enkapsulasi tertinggi (32,58%), dan *bead* hidrogel dengan variasi X1 memiliki nilai efisiensi enkapsulasi terendah (11,06%).

Hasil analisis tingkat pelepasan enzim protease oleh *bead* hidrogel pada data Tabel 6 menunjukkan bahwa tingkat pelepasan

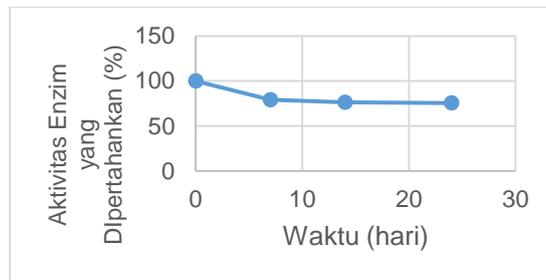
enzim protease paling cepat dialami oleh *bead* X1 dengan pelepasan seluruh konten enzim (100%) setelah dilakukan *shaking* pada air deionisasi selama 120 menit, sementara *bead* X3 dan X4 memiliki tingkat pelepasan enzim protease yang serupa dan lebih lambat dibandingkan dengan tingkat pelepasan *bead* X2 setelah dilakukan *shaking* selama 120 menit.

Berdasarkan hasil analisis data stabilitas enkapsulasi enzim protease pada variasi *bead* X3, tingkat stabilitas enkapsulasi menurun sejauh 20,71% dari hari ke-0 sampai 7, dan tidak menurun jauh pada hari ke-14 (3,00%) dan hari ke-24 (0,74%). Selama

aktivitas enzim dipertahankan selama 24 hari, penurunan keseluruhan tingkat aktivitas enzim yang dienkapsulasi terjadi hanya sebanyak 24,45%.

Semua data diuji keragamannya dengan

menggunakan metode ANOVA dan DMRT pada tingkat signifikansi 95% dan menunjukkan bahwa seluruh data memiliki perbedaan atau variasi yang bermakna secara signifikan ($p \leq 0,95$).



Grafik 1. Tingkat Stabilitas Enkapsulasi Enzim Protease

Tabel 6. Data Analisis Tingkat Pelepasan Enzim Protease yang Dienkapsulasi

Variasi <i>Bead</i> Hidrogel	Tingkat Pelepasan Enzim yang Dienkapsulasi pada Menit ke-0 (%)	Tingkat Pelepasan Enzim yang Dienkapsulasi pada Menit ke-30 (%)	Tingkat Pelepasan Enzim yang Dienkapsulasi pada Menit ke-60 (%)	Tingkat Pelepasan Enzim yang Dienkapsulasi pada Menit ke-90 (%)	Tingkat Pelepasan Enzim yang Dienkapsulasi pada Menit ke-120 (%)
X1			100%		
X2	20,43 ± 5,94	26,39 ± 5,01	25,62 ± 2,99	33,78 ± 4,57	33,62 ± 4,02
X3	17,15 ± 5,86	22,38 ± 0,79	20,99 ± 2,48	29,78 ± 4,51	28,14 ± 3,53
X4	9,81 ± 2,22	23,69 ± 2,57	23,84 ± 2,77	29,83 ± 2,03	26,86 ± 1,74

PEMBAHASAN

Yield enkapsulasi dari enzim protease dalam *bead* hidrogel yang terbentuk merupakan suatu faktor penting dari sisi ekonomis untuk menentukan jumlah bahan polimer dan kopolimer yang dibutuhkan serta menentukan harga dalam memproduksi produk yang diinginkan.¹⁶ Peneliti menemukan bahwa semakin banyaknya volume larutan alginat dan larutan enzim yang digunakan, maka akan meningkatkan nilai *yield* enkapsulasi dari *bead* hidrogel yang terbentuk. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mong Thu dan Krasaekoopt juga ditemukan hal yang serupa,

bahwa penambahan konsentrasi alginat akan meningkatkan nilai *yield* enkapsulasi.¹⁷ Hal tersebut terjadi karena peran alginat sebagai struktur utama dari *bead* berperan besar dalam menentukan massa dan juga ukuran dari *bead* yang dihasilkan, sementara kitosan yang digunakan sebagai kopolimer dari proses enkapsulasi ini hanya bersifat sebagai pembungkus.

Peneliti tidak menemukan bahwa penambahan larutan kitosan dapat meningkatkan nilai *yield* enkapsulasi karena variasi *bead* pada penelitian yang menambahkan volume larutan kitosan diikuti juga dengan

pengurangan dari volume larutan alginat yang digunakan, sehingga hasil penelitian lebih menunjukkan pengaruh dari volume larutan alginat yang digunakan sebagai bahan dasar dari struktur *bead* hidrogel yang terbentuk, sedangkan larutan kitosan hanya sebagai pembungkus dari *bead* hidrogel yang terbentuk. Menurut penelitian yang dilakukan sebelumnya, penambahan larutan kitosan dapat memengaruhi nilai *yield* enkapsulasi dari *bead* yang terbentuk.^{16,17}

Hasil pada analisis ukuran *bead* hidrogel hasil enkapsulasi enzim protease menunjukkan bahwa penambahan larutan alginat akan mempengaruhi ukuran *bead* yang dihasilkan. Semakin banyak larutan alginat yang digunakan maka akan menambah bahan yang akan mengalami *gelling* ketika larutan alginat ditetaskan kedalam larutan kitosan dalam CaCl_2 . Penelitian yang dilakukan oleh Mong Thu dan Krasaekoopt juga menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi alginat pada bahan enkapsulasi akan menambah diameter *bead* yang terbentuk sebanyak 0,10-0,12 mm. Hal tersebut terjadi karena alginat sebagai polimer utama dalam pembentukan *bead* memiliki pengaruh besar dalam menentukan ukuran *bead* yang terbentuk.¹⁷

Peneliti juga menemukan bahwa semakin besar volume larutan alginat yang digunakan, maka struktur dari *bead* hidrogel yang terbentuk akan semakin lunak dibandingkan dengan variasi *bead* yang menggunakan volume larutan alginat yang lebih sedikit, namun penambahan volume larutan kitosan akan membuat *bead* yang terbentuk semakin keras. Hal ini disebabkan oleh matriks alginat

yang memiliki pori cukup besar sehingga membuat struktur *bead* menjadi lebih lunak. Namun peran kitosan sebagai kation membantu CaCl_2 sebagai *cross-linker* dalam menutup pori di antara matriks alginat sehingga dapat membuat struktur *bead* menjadi lebih kuat.^{13,17}

Pengujian aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi dilakukan dengan melarutkan *bead* hidrogel yang terbentuk dalam larutan natrium sitrat 2%. Hasil dari pengujian aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi kemudian akan digunakan untuk mendapatkan nilai efisiensi enkapsulasi dari setiap *bead* hidrogel yang terbentuk.

Hasil dari analisis nilai efisiensi enkapsulasi dari *bead* yang terbentuk menunjukkan bahwa penambahan volume larutan alginat dari kombinasi volume standar dalam melakukan enkapsulasi enzim protease akan menurunkan nilai aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi dan nilai efisiensi enkapsulasi dari *bead* hidrogel yang terbentuk, sementara penambahan larutan kitosan dari kombinasi volume standar akan meningkatkan nilai aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi dan nilai efisiensi enkapsulasi. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Anjani, *et al.*, penambahan konsentrasi kitosan dalam larutan CaCl_2 sebagai larutan kation akan meningkatkan efisiensi enkapsulasi secara signifikan. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan nilai efisiensi enkapsulasi sebanyak 54-76% dari *bead* yang tidak diberikan bahan kopolimer kitosan bila dibandingkan dengan *bead* yang ditambahkan larutan kitosan 0,1-0,3%. Hal tersebut terjadi karena

konsentrasi kitosan yang lebih banyak pada proses enkapsulasi akan berikatan seperti anion dan kation, serta ukuran molekul dari kitosan yang besar dapat menutup pori-pori pada matriks alginat sehingga dapat mencegah keluarnya larutan enzim protease yang akan dienkapsulasi pada saat terjadinya proses *gelling*.¹³

Pada analisis tingkat pelepasan enzim protease dari *bead* hidrogel, peneliti menemukan bahwa tingkat pelepasan enzim protease oleh *bead* X1 langsung mencapai 100% pada saat dilarutkan pada air deionisasi pada menit ke-0. Temuan tersebut dapat dikaitkan dengan penggunaan volume larutan kitosan yang lebih sedikit dibandingkan dengan variasi lainnya sehingga peran kitosan yang digunakan tidak cukup dalam menutupi pori-pori pada matriks alginat sehingga menyebabkan tingkat pelepasan yang sangat tinggi dari enzim protease yang dienkapsulasi sehingga seluruh konten enzim langsung dilepaskan oleh *bead* pada air deionisasi.¹³

Penelitian juga menunjukkan bahwa pelepasan oleh variasi *bead* X2-4 memiliki tingkat pelepasan yang bervariasi di antara 26,86 – 33,62% setelah dilakukan *shaking* pada air deionisasi selama 120 menit. Pola pada *bead* variasi X2-4 menunjukkan pola pelepasan *bead* yang meningkat setiap 60 menit sekali, terlihat dari pola yang meningkat diantara uji menit ke-0 dan 30 serta menit ke-60 dan 90, sementara di antara menit ke-30 dan 60 serta menit ke-90 dan 120 tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan. Tingkat pelepasan enzim yang rendah pada *bead* X3 dapat dikaitkan dengan peran kitosan

sebagai kation yang berfungsi untuk menutupi pori-pori yang ada pada molekul alginat yang terbentuk pada *bead* yang disebutkan pada penelitian Anjani, *et al.* dan penelitian Mong Thu dan Krasaekoopt, sehingga membuat tingkat pelepasan dari enzim protease yang dienkapsulasi menjadi lebih rendah apabila dibandingkan dengan *bead* X2.^{13,17} Pada *bead* X4, pemakaian volume larutan enzim yang lebih banyak untuk dicampurkan bersama dengan larutan alginat membuat konsentrasi dari larutan alginat yang dipakai pada proses *gelling* menjadi lebih encer dan membuat perbandingan antara larutan alginat dengan larutan kitosan menjadi lebih rendah, sehingga peran kitosan dalam membungkus *bead* yang terbentuk lebih terlihat pada variasi *bead* ini dan menyebabkan tingkat pelepasan enzim protease yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan variasi *bead* X2.

Pada hasil penelitian, ditemukan bahwa stabilitas enkapsulasi enzim protease pada *bead* variasi X3 cukup tinggi dengan masih mempertahankan 75,55% dari aktivitas enzim yang dapat diperoleh dari *bead* setelah diinkubasi selama 24 hari. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mong Thu dan Krasaekoopt, dipaparkan bahwa *bead* hidrogel yang memiliki konsentrasi kitosan yang lebih banyak memiliki peran yang dominan dalam meningkatkan tingkat stabilitas enkapsulasi dan menurunkan waktu paruh dari pelepasan enzim protease yang dienkapsulasi oleh *bead*. Hal ini terjadi karena kitosan yang lebih bermuatan positif akan membentuk suatu membran semipermeabel yang kuat apabila berikatan dengan polimer bermuatan

negatif seperti alginat. Membran yang terbentuk membantu untuk mencegah keluarnya enzim protease yang dienkapsulasi oleh *bead* yang terbentuk serta meningkatkan nilai stabilitas enkapsulasi enzim protease.¹⁷

Tindakan pengeringan pada *bead* dalam penelitian ini dilakukan hanya pada udara terbuka (*air drying*). Pengeringan lebih lanjut dengan menggunakan *freeze drying* dapat meningkatkan nilai stabilitas enkapsulasi dari enzim protease dibandingkan dengan pengeringan dengan udara terbuka (*air drying*).¹³ Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan mengeringkan *bead* yang dibentuk dengan *freeze drying* guna mendapatkan *bead* hidrogel dengan stabilitas enkapsulasi yang lebih optimal.

SIMPULAN

Enzim protease dapat diformulasikan dengan cara dienkapsulasi dengan *bead* hidrogel berbahan alginat-kitosan, ditinjau dari tingkat efektivitas yang tinggi berdasarkan parameter yang telah diujikan, yaitu nilai *yield* enkapsulasi, ukuran *bead* yang terbentuk, nilai efisiensi enkapsulasi, tingkat pelepasan enzim protease, dan stabilitas enkapsulasi. Karakteristik kerja dari enzim protease yang dienkapsulasi dalam *bead* hidrogel yang terbentuk dapat ditinjau dari hasil analisis nilai aktivitas enzim protease yang dienkapsulasi sebesar 0,297 – 0,897 U/ml. Perbandingan karakteristik kerja dari enzim protease yang dienkapsulasi dengan enzim protease yang tidak dienkapsulasi ditinjau dari hasil analisis nilai efisiensi enkapsulasi sebesar 11,06 – 32,58%.

SARAN

Pembuatan variasi volume yang digunakan pada saat pembuatan *bead* dapat menunjukkan pengaruh volume larutan yang digunakan pada karakteristik *bead* yang terbentuk. Namun penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan membuat variasi *bead* dengan penambahan atau pengurangan volume salah satu larutan tanpa melakukan penambahan atau pengurangan volume larutan yang lain. Hal ini bertujuan supaya pengaruh dari penambahan atau pengurangan volume dari suatu bahan dapat terlihat jelas tanpa terpengaruh dari volume larutan bahan lain yang digunakan pada saat penelitian. Tindakan lanjutan berupa pengeringan dengan *freeze drying* atau pengujian tingkat pelepasan enzim yang dienkapsulasi dengan stimulasi lingkungan yang mirip dengan organ pencernaan manusia, seperti dengan larutan *simulated gastric fluid* (SGF) atau *simulated intestinal fluid* (SIF) juga dapat dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut mengenai ketahanan *bead* secara lebih mendetail dan efektivitasnya apabila *bead* yang diproduksi bertujuan untuk dikonsumsi secara langsung oleh manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Schoenfeld BJ, Aragon AA. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* [internet]. 2018;15(1). <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12970-018-0215-1>
2. Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems*. Ed ke-9. Boston, MA, USA: Cengage Learning; 2016.

3. Schoenfeld BJ, Aragon AA. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Apr 27];15(1). Available from: <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12970-018-0215-1>
4. Sharawy A. The effects of A pre-and post-exercise Whey Protein Supplement on Protein Metabolism and muscular strength among elite wrestlers. *Ovidius University Annals, Series Physical Education & Sport/Science, Movement & Health* [serial online]. 2013 Mar 1;13(1):5-10.
5. Padmapriya M, Williams BC. Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2012;2(4):612–18.
6. Akhtaruzzaman M, Mozumder NHM, Jamal R, Rahman A, Rahman T. Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agricultural Science Research Journals*. 2012;2(8):434–40
7. Hidalgo MC, Urea E, Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*. 1999;170(3–4):267–83.
8. Zhang S, Shang W, Yang X, Zhang S, Zhang X, Chen J. Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of p-nitrophenol butyrate. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2013;34(9):2741-6.
9. Pichayakorn W, Wannaphatchaiyong S, Saisin W. Preparation process and properties of crosslinked gelatin beads for drug loading. *Advanced Materials Research*. 2014;1060:74–8.
10. Dimida S, Demitri C, De Benedictis VM, Scalera F, Gervaso F, Sannino A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015 Jul 20;132(28).
11. Campos EV, de Oliveira JL, Fraceto LF, Singh B. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agronomy for sustainable development*. 2015 Jan 1;35(1):47-66.
12. Basu SK, Kavitha K, Rupeshkumar M. Evaluation of ionotropic cross-linked chitosan/gelatin B microspheres of tramadol hydrochloride. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(1):28–34.
13. Anjani K, Kailasapathy K, Phillips M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2007;17(1):79–86.
14. Noviyanti T, Ardiningsih P, R W. Pengaruh temperature terhadap aktivitas enzim protease dari daun sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *Jurnal Kimia Khatulistiwa* [Internet]. 2013;1(1). <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmipa/article/view/990>
15. Hanum WM, Susilo U, Priyanto S. Aktivitas protease dan kadar protein tubuh ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) pada kondisi puasa dan pemberian pakan kembali. Purwokerto: Fakultas Biologi Unsoed; 2013.
16. Khorshidian N, Mahboubi A, Kalantari N, Hosseini H, Yousefi M, Arab M, et al. Chitosan-coated alginate microcapsules loaded with galactagogue herbs extract: formulation optimization and characterization. *IJPR* [Internet]. 2019;18(3). <http://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100776>
17. Mong Thu TT, Krasaekoopt W. Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginosus* using alginate and different copolymer types. *Agriculture and Natural Resources*. 2016;50(3):155–61.