II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme perantara (*intermedietary metabolism*) dari sel. Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (*globular*), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri dari lebih dari satu polipeptida (Wirahadikusumah, 1989).

Menurut Poedjiadi (1994), fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, di samping itu mempunyai derajat kekhasan yang tinggi. Seperti juga katalis lainnya, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Kelebihan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalisator sintetik antara lain: (1) enzim mempunyai spesifitas tinggi, (2) enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu), (3) tidak terbentuk produk samping yang tidak diinginkan, (4) mempunyai produktivitas tinggi, (5) produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin and Bucke, 1990).

Keunggulan lain dari enzim adalah dapat bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*), sehingga dapat menekan konsumsi energi (suhu dan tekanan tinggi). Hal ini menyebabkan reaksi yang dikatalisis enzim menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh

katalisis kimia. Enzim sebagai biokatalis telah dapat diaplikasikan secara komersil untuk proses–proses industri, antara lain industri pangan, medis (diagnosis), kimia, dan farmasi (Junita, 2002). Enzim dapat bekerja secara efektif pada suhu dan pH tertentu, namun aktivitasnya akan berkurang dalam keadaan di atas atau di bawah titik tertentu. Aktivitas enzim tidak hanya dipengaruhi oleh suhu dan pH, tetapi juga faktor lain seperti konsentrasi.

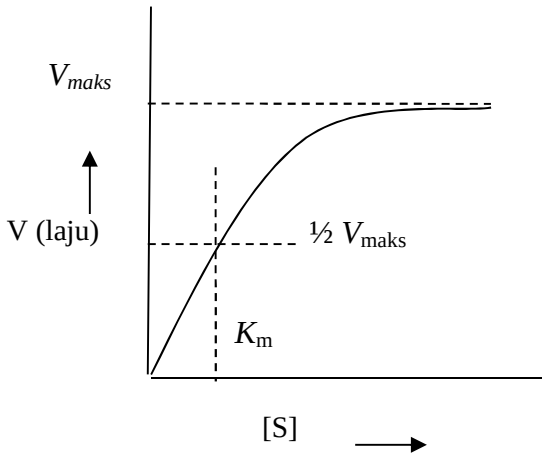
Berikut ini faktor–faktor yang mempengaruhi kerja enzim :

1) Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, laju reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

2) Konsentrasi substrat

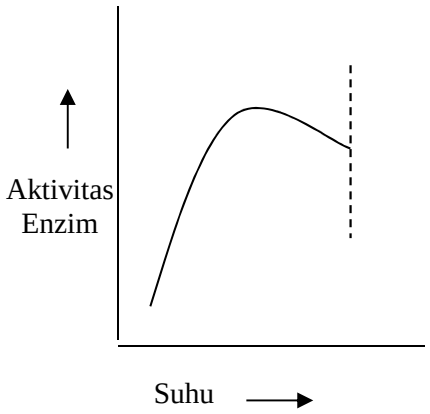
Laju reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim hanya menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang berhubungan dengan enzim pada bagian aktif, sehingga konsentrasi enzim-substrat makin besar dan menyebabkan besarnya laju reaksi. Namun pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi substrat. Dalam kondisi ini, bertambahnya konsentrasi enzim–substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya pun tidak bertambah (Poedjiadi, 1994). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005)

2) Suhu

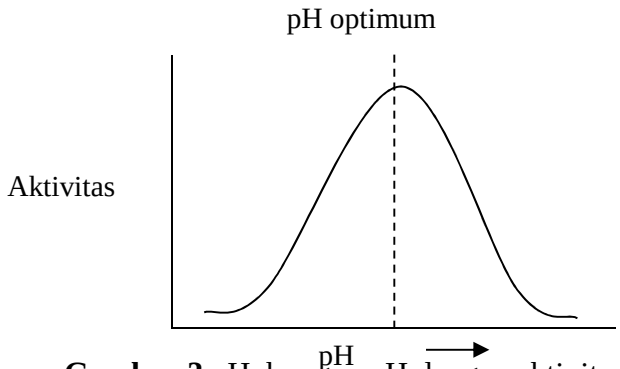
Suhu dapat meningkatkan laju reaksi enzimatik sampai batas tertentu. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan laju reaksi enzimatik menurun (Poedjiadi, 1994).



Gambar 2. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim (Shahib, 2005)

3) pH

Struktur ion enzim bergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat berbentuk ion positif dan ion negatif (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH akan mempengaruhi efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim–substrat. Selain itu, pH yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan menghakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH antara 4,5–8,0 (Winarno, 1986).



Gambar 3. Hubungan pH dengan aktivitas (Shahib, 2005)

4) Inhibitor

Inhibitor merupakan molekul atau ion yang menghambat reaksi enzimatik (Poedjiadi, 1994). Inhibitor akan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1986).

5) Kofaktor Logam

Kofaktor adalah suatu faktor yang membantu keaktifan enzim. Ikatan antara kofaktor dan enzim dapat sangat kuat dan ada pula yang tidak terikat kuat (Poedjiadi, 1994).

6) Pelarut organik

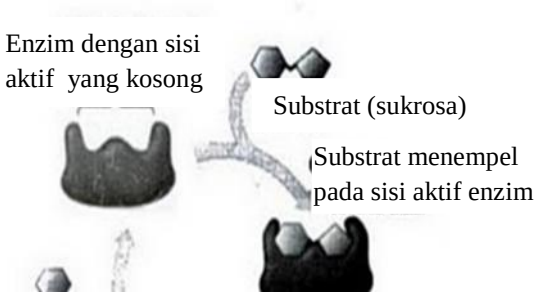
Penggunaan pelarut dalam reaksi enzimatik memberikan keuntungan antara lain ialah kelarutan substrat-organik dan enzim lebih tinggi dibandingkan dengan air serta meningkatkan kestabilan enzim dengan pelarut
(Kwon and Rhee, 1986).

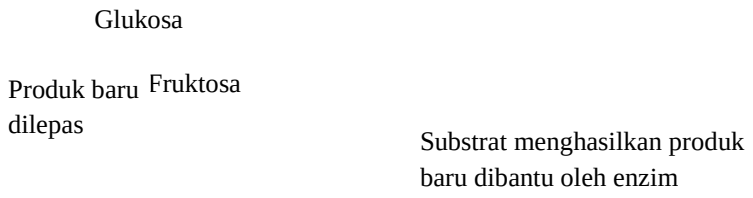
Selain itu, aktivitas enzim berhubungan langsung dengan perubahan struktur tertier dari dari molekul protein enzim. Pada keadaan suhu, pH, dan konsetrasi ion normal, struktur tersier protein distabilkan oleh empat jenis interaksi. lnteraksi tersebut adalah ikatan hidrogen, gaya tarik ionik, dan jembatan kovalen (Mosan and Combes, 1984).

Menurut Shahib (2005), ada dua teori pembentukan kompleks enzim-subtrat yaitu teori *lock and key* dan teori *induced-fit*.

1. Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*)

   Teori ini dikemukakan oleh Emil Fisher yang menyatakan bahwa kerja enzim seperti kunci dan anak kunci, melalui hidrolisis senyawa gula dengan enzim invertase. Terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim adalah karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif (*active site*) dari enzim. Dengan begitu sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci (*key*) dan sisi aktif (*lock*) berperan sebagai gembok. Substrat masuk ke dalam sisi aktif sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Hubungan antara enzim dan substrat membentuk ikatan yang lemah. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Teori Kunci Gembok *(Lock and Key Theory)* dapat dilihat pada Gambar 4.

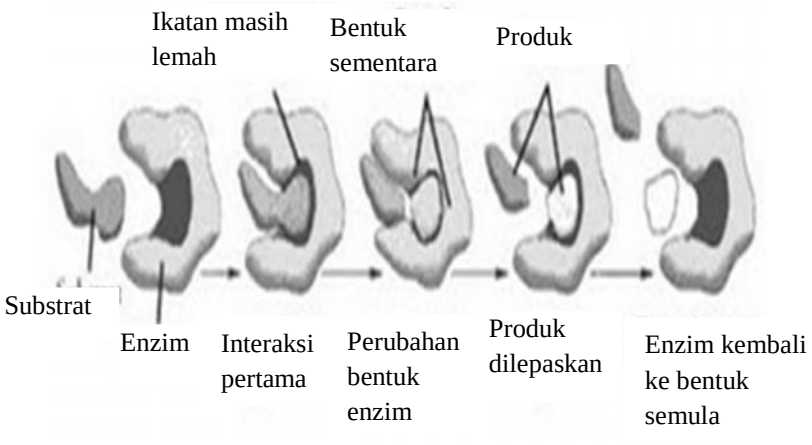




Gambar 4. Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*)

2. Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*)

Teori ini dikemukakan oleh Daniel Koshland yang menyatakan bahwa sisi aktif tidak bersifat kaku tetapi lebih fleksibel. Sisi aktif secara terus menerus berubah bentuknya sesuai dengan interaksi antara enzim dan substrat. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif akan termodifikasi menyesuaikan bentuk substrat sehingga terbentuk kompleks enzim substrat. Sisi aktif akan terus berubah bentuknya sampai substrat terikat secara sepenuhnya, yang mana bentuk akhir dan muatan enzim ditentukan. Ketika substrat terikat pada enzim, sisi aktif enzim mengalami beberapa perubahan sehingga ikatan yang terbentuk antara enzim dan substrat menjadi lebih kuat. Interaksi antara enzim dan substrat disebut *Induced fit*. Teori Kecocokan Induksi *(Induced Fit Theory)* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*)

Enzim digolongkan menurut reaksi yang diikutinya, sedangkan masing-masing enzim diberi nama menurut nama substratnya. *Commision on Enzymes of the international Union of Biochemistry* membagi enzim menjadi enam golongan besar, yaitu :

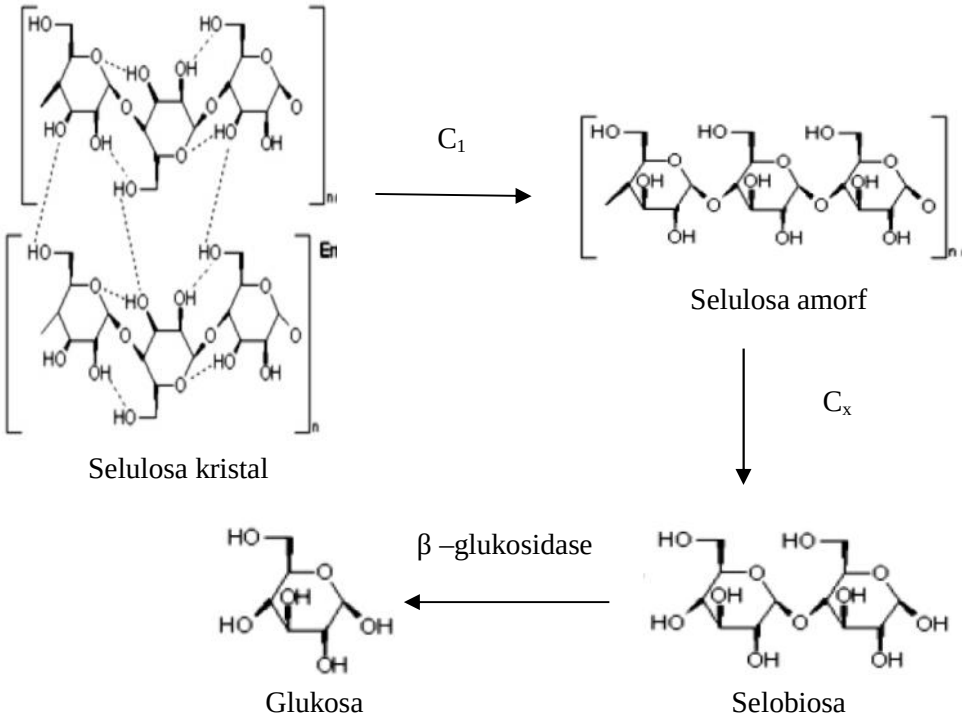
1. Oksidoreduktase, enzim golongan ini dibagi dalam dua bagian yaitu dehidrogenase dan oksidase. Dehidrogenase bekerja pada reaksi dehidrogenasi yaitu reaksi pengambilan atom hidrogen dari suatu senyawa. Sedangkan oksidase bekerja sebagai katalis pada reaksi pengambilan hidrogen dari suatu substrat.
2. Transferase, enzim golongan ini bekerja sebagai katalis pada reaksi pemindahan suatu gugus dari suatu senyawa kepada senyawa lain. Beberapa contoh enzim golongan ini yaitu metiltransferase, hidroksimetiltransferase, karboksiltransferase, asiltransferase dan aminotransferase.
3. Hidrolase, enzim golongan ini bekerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis. Beberapa contoh ialah lipase, phospatase, amilase, pepsin, tripsin dan kimotripsin.
4. Liase, enzim golongan ini mempunyai peranan penting dalam reaksi pemisahan suatu gugus dari suatu substrat atau sebaliknya. Contoh enzim golongan ini yaitu dekarboksilase, aldose dan hidratase.
5. Isomerase, enzim golongan ini bekerja pada reaksi perubahan intramolekuler, misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa.
6. Ligase, enzim golongan ini bekerja pada reaksi penggabungan dua molekul. Contoh enzim golongan ini antara lain glutamin sintetase dan piruvat karboksilase (Poedjiadi, 1994).

B. Enzim Selulase

Enzim selulase dikenal sebagai multienzim yang terdiri dari tiga komponen, yaitu:

1. Ekso-β-(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor C_1. Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis selulosa dalam bentuk kristal.
2. Endo-β-(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor C_x. Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis ikatan β-(1,4)-glukosida (selulosa amorf).
3. β-(1,4)-glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.

Mekanisme penguraian selulosa oleh enzim selulase dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 6. Mekanisme penguraian selulosa

Untuk menghidrolisis sempurna selulosa yang tidak larut atau selulosa kristal diperlukan kerja sinergistik dari ketiga komponen enzim tersebut (Reese, 1976).

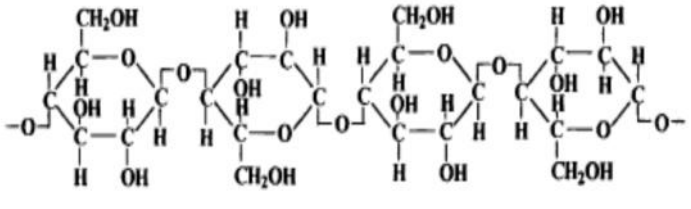
Enzim selulase dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri seperti industri sari buah, industri bir, pengolahan limbah pabrik kertas, dan zat pelembut kain (Rahayu, 1991).

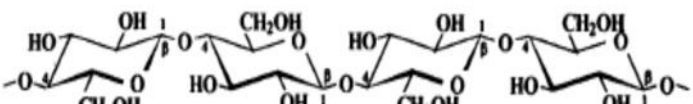
C. Selulosa

Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di bumi, diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis per tahun (Fessenden, 1989). Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan glukosa yang terikat dengan ikatan -1,4-glikosidik. Molekul selulosa merupakan mikrofibil dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang (Fan *et al.*, 1982).

Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulosa. Serat selulosa alami terdapat di dalam dinding sel tanaman dan material vegetatif lainnya. Selulosa murni mengandung 44,4% C; 6,2% H dan 49,3% O. Rumus empiris selulosa adalah $(C_6H_{10}O_5)_n$, dengan banyaknya satuan glukosa yang disebut dengan derajat polimerisasi (DP), dimana jumlahnya mencapai 1.200-10.000 dan panjang molekul sekurang-sekurangnya 5.000 nm. Berat molekul selulosa rata-rata sekitar 400.000. Mikrofibril selulosa terdiri atas bagian amorf (15%) dan bagian berkristal (85%). Struktur berkristal dan adanya lignin serta hemiselulosa di sekeliling selulosa merupakan hambatan utama untuk menghidrolisa selulosa (Sjostrom, 1995).

Berdasarkan strukturnya, selulosa dapat saja diharapkan mempunyai kelarutan yang tinggi dalam air, akan tetapi kenyataannya selulosa tidak larut dalam air, bahkan pelarut lainnya. Hal ini disebabkan karena kekakuan rantai dan gaya rantai yang tinggi akibat ikatan hidrogen antara gugus –OH pada rantai berdekatan. Faktor ini dipandang sebagai penyebab tingginya kekristalan dari serat selulosa (Cowd dan Stark, 1991).





Gambar 7. Struktur Selulosa (Roberts, 1996)

D. *Aspergillus niger*

Aspergilus niger merupakan fungi dari filum *ascomycetes* yang berfilamen, mempunyai hifa berseptat, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Fungi ini biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada agar dekstrosa kentang (PDA) 25°C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur (Rao, 1994).

Aspergillus niger dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C, dan suhu maksimum 45-47°C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). Fungi memiliki warna dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Dalam metabolismenya *Aspergillus niger* dapat menghasilkan asam sitrat sehingga banyak digunakan sebagai model fermentasi karena fungi ini tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat, oleh karena itu banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan berapa enzim seperti amilase, pektinase, amiloglukosidase, kitin deasetilase dan selulase.

Menurut tinjauan umum *A.niger* diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi : Fungi imperfecti

Sub kelas : Hyphomyces

Ordo : Monoliales

Famili : Monoleaceae

Genus : Aspergillus

Spesies : *Aspergillus niger*

Aspergillus niger dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat di sekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler seperti protease, selulase, mananase, dan

α-galaktosidase. Bahan organik dari substrat digunakan oleh *Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel, dan mobilitas sel (Dwijoseputro, 1984).

E. Kinetika Reaksi Enzim

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatis. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat ini dapat divariasikan untuk mempelajari mekanisme suatu reaksi enzim, yakni bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1989).

Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dimana E adalah enzim dan S adalah

substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005).

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \dashrightarrow E + P$$

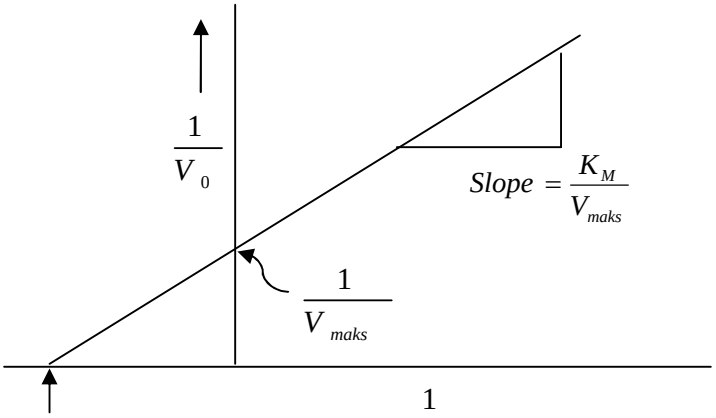
Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan *Michaelis Menten* (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.,* 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat mantap dengan afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat
(Page, 1989).

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* yang ditunjukkan dalam Gambar 8 (Page, 1989).

$$V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]} \longrightarrow \text{Persamaan Michaelis-Menten}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks}[S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow \text{Persamaan } \textit{Lineweaver-Burk}.$$



Gambar 8. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989)

F. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu dan pH yang ekstrim (Wiseman, 1978 dalam Junita, 2002). Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam prinsip aplikasinya sebagai biokatalis.

Ada dua cara yang dapat ditempuh untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak/kurang stabil (Junita, 2002). Beberapa cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim adalah penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi, dan rekayasa protein (Illanes, 1999).

1) Stabilitas termal enzim

   Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1989).

   Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi. Penggunaan suhu yang tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan

masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu yang tinggi ini merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi. Oleh sebab itu, diperlukan enzim dengan stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu :

a. Adanya pembukaan parsial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern and Klibanov, 1987).

Air memegang peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakueus, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat.

Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

2) Stabilitas pH enzim

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.,* 2005). Dari faktor-faktor tersebut, pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat.

Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

G. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi dari intraseluler karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 1986).

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan endapan dari supernatan dengan teknik sedimentasi, yaitu teknik yang membuat suatu larutan dipusingkan dengan kecepatan tinggi, sehingga yang mempunyai berat molekul besar akan mengendap pada dasar tabung. Pada proses sentrifugasi sebaiknya dilakukan pada suhu 2-4°C untuk mencegah terjadinya denaturasi akibat panas yang ditimbulkan proses sentrifugasi.

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter).

$F = \omega^2 r$

Gaya F dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, karena itu dinyatakan sebagai gaya sentrifugal relatif (RCF dengan satuan g (gravitasi).

$$RCF = \frac{\mu^2 r}{980}$$

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm. Oleh sebab itu, harga rpm dikonversikan kedalam bentuk radian menggunakan persamaan:

$$\omega = \frac{®(rpm)}{30}$$

$$RCF = (\pi rpm)^2 \, r \, x \, \frac{980}{30^{\ 2}}$$

$$RCF = (1.119x10^{-5})(rpm)^2 r$$

(Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan amonium sulfat $(NH_4)_2SO_4$

Fraksinasi merupakan proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat, atau amonium sulfat. Terjadinya pengendapan dikarenakan ion-ion garam yang tersolvasi cenderung akan menarik molekul-molekul air dari molekul hidrofobik protein sehingga molekul-molekul protein dapat berinteraksi satu sama lain untuk membentuk agregat. Protein yang hidrofobisitasnya tinggi akan mengendap lebih dahulu, sedangkan protein yang memiliki sedikit residu non polar akan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang paling tinggi (Scopes, 1982; Walsh and Headon, 1994).

Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah amonium sulfat karena (1) kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, (2) memiliki kelarutan yang besar dalam air,

(3) mempunyai daya pengendapan yang besar, dan (4) mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim. Penambahan garam ini dalam larutan enzim akan mempengaruhi kelarutan enzim. Pada konsentrasi garam rendah, kelarutan enzim dalam air bertambah. Peristiwa ini disebut dengan *"salting in"*. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, dimana kandungan garam dalam jumlah banyak maka kelarutan enzim akan turun. Sehingga garam yang berlebih ini menyebabkan pengendapan enzim. Peristiwa ini disebut dengan *"salting out"* (Wirahadikusumah, 1989).

3. Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein enzim. Proses dialisis secara umum dapat dilakukan dengan memasukkan larutan enzim dalam suatu kantong dialisis yang terbuat dari membran semipermiabel seperti selofan. Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam buffer atau air sambil diputar -putar, maka molekul kecil yang ada di dalam larutan enzim akan keluar melewati pori-pori membran. Sedangkan molekul besar akan tertahan dalam kantong dialisis. Kendala ini dapat dilakukan dengan cara mengganti larutan buffer secara kontinyu atau menggunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah sampai ion-ion dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Lehninger, 1982).

Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis diganti dengan larutan yang baru agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Mc Phie, 1971 dalam Boyer 1993). Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian

besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

4. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode yang banyak digunakan untuk isolasi dan pemurnian enzim. Pada kromatografi kolom, suatu fluida dialirkan ke dalam kolom yang mengandung matriks bahan pengisi dan molekul yang ingin dipisahkan menjadi beberapa komponen dengan adanya perbedaan daya ikat terhadap bahan pengisi. Pada proses isolasi dan pemurnian enzim ada tiga jenis kromatografi yang dikenal, yaitu:

a) Kromatografi filtrasi gel

Kromatografi filtrasi gel dilakukan berdasarkan pemisahan berat molekul antara protein yang mempunyai berat molekul tinggi dengan molekul lain yang memiliki berat yang rendah. Dimana molekul kecil akan masuk ke pori-pori matriks tetapi molekul besar akan diteruskan. Matriks yang digunakan adalah gel, merupakan media pemisah (Watson, 1987).

Kromatografi filtrasi gel merupakan teknik pemurnian yang kapasitasnya lemah. Namun, metode ini efektif dalam pemisahan enzim dari pelarut penggumpal, larutan garam, dan buffer yang tidak dikehendaki. Kapasitas sampelnya cukup tinggi dan efesiensi filtrasi gel meningkat dengan semakin tingginya kolom (Suhartono, 1989).

b) Kromatografi penukar ion

Prinsip dasar kromatografi penukar ion adalah pemisahan berdasarkan muatan ioniknya. Penukar ion terdiri atas matriks yang tidak larut dan gugus bermuatan yang terikat secara kovalen pada matriks. Gugus-gugus bermuatan ion disebut "*counter*

ion". *Counter ion* dapat digantikan secara *reversible* dengan ion-ion yang bermuatan sama. Penukar ion positif mempunyai *counter ion* yang bermuatan negatif, sehingga disebut penukar anion. Sedangkan penukar ion negatif mempunyai *counter ion* yang bermuatan positif, sehingga disebut penukar kation (Wolfe, 1993).

Prinsip pada kromatografi penukar ion ialah 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 memiliki 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). Matriks dapat berupa senyawa anorganik, resin sintetik, polisakarida dan sebagainya. Matriks yang banyak digunakan dalam pemisahan protein adalah DEAE-selulosa (dietilaminoetil-selulosa) dan CM-selulosa (karboksimetil-selulosa). Gugus DEAE, $-OC_2H_5NH(C_2H_5)_2$ bermuatan positif pada pH 6,0-8,0 sehingga dapat digunakan untuk protein yang bermuatan negatif pada rentang pH tersebut. Sedangkan CM-selulosa (selulosa-OCH_2COO-) dapat digunakan untuk memisahkan protein yang bermutan positif pada pH 4,5 (Palmer, 1991 dalam Sariningsih, 2000).

Kelebihan metode ini dibandingkan dengan kromatografi fitrasi gel adalah kromatografi penukar ion tidak terlalu dipengaruhi oleh tinggi kolom. Efesiensi dapat diperbaiki dengan meningkatkan diameter kolom, apabila digunakan jumlah sampel yang lebih banyak. Pada filtrasi gel memerlukan kolom yang lebih tinggi untuk penggunaan sampel yang lebih banyak (Suhartono, 1989).

c) Kromatografi afinitas

Ciri yang paling menonjol pada kromatografi adalah kemampuannya untuk selektif mengeluarkan satu protein tertentu dari campuran protein yang kompleks. Teknik ini mengunakan matriks yang tak bergerak yang mengadakan interaksi spesifik dengan enzim yang akan dimurnikan. Protein yang tidak diinginkan akan dikeluarkan. Protein yang diinginkan akan dielusikan dari matriks menggunakan cairan elusi yang umum yaitu cairan garam (Murray, 2003).

Keuntungan menggunakan teknik ini adalah sifat interaksinya yang spesifik. Jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat disesuaikan dengan jumlah zat yang akan diadsorpsi, partikel-partikel yang terserap dapat dilepaskan dengan mudah dan adsorben dapat diregenerasi beberapa kali
(Suhartono, 1989).

5. Pengujian aktivitas enzim dengan metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk. Satuan aktivitas enzim yang digunakan adalah unit/mL, yaitu banyaknya mikromol (μmol) gula pereduksi yang terbentuk yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit (Mandels *et al.*, 1976 dalam Prasetyo, 2006).

6. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian dengan aktivitas yang atau tetap baik. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry didasarkan pada pengukuran serapan cahaya oleh ikatan kompleks yang berwarna ungu. Ini terjadi karena protein bereaksi dengan tembaga dalam lingkungan alkali yang mudah larut, dimana kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida akan tereduksi menjadi Cu^{+}. Lalu, Cu^{+} akan mereduksi folin-ciocalteu yang mengikat protein sekitar pH

10. Sehingga komplek fosfomolibdat-fosfotungstat menghasilkan *heteropolymolybdenum* dari warna kuning menjadi biru. Ini disebabkan karena oksidasi gugus aromatik terkatalis Cu, sehingga menghasilkan komplek berwarna biru dalam derajat yang berbeda tergantung pada komposisi triftofan dan tirosinnya. Karena itu, protein yang berbeda akan memberikan tingkat warna yang berbeda (Alexander, 1993).

Metode ini merupakan metode relatif sederhana dengan biaya yang relatif murah juga. Tetapi juga mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Hal ini dapat diatasi dengan menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

H. Senyawa Poliol

Menurut Suhartono (1989), aktivitas enzim dapat menurun atau terganggu apabila terjadi perubahan ikatan kovalen pada sisi aktif atau perubahan konformasi tiga dimensi enzim. Penggunaan zat aditif penstabil terbukti dapat mempertahankan konformasi enzim karena dapat menjaga kemungkinan oksidasi gugus tiol pada enzim dan menjaga stabilitas interaksi non kovalen, termasuk interaksi hidrofobik di dalam molekul enzim.

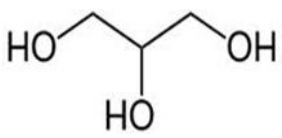
Senyawa aditif merupakan senyawa yang jika ditambahkan pada larutan enzim akan meningkatkan stabilitas struktur protein enzim tanpa mempengaruhi interaksi kovalen pada enzim. Pengaruh senyawa aditif terbatas pada interaksi non kovalen dengan enzim atau pada sistem pelarut enzim (Wulandari, 2008). Schwimmer (1981) menggolongkan zat aditif menjadi beberapa kelompok yaitu: substrat, senyawa hidrofilik, larutan garam dan gula, ion logam, anion, polianion, polikation, protein dan polimernya, inhibitor protease, senyawa pengkelat, anti buih, serta senyawa pereduksi dan antioksidan.

Senyawa aditif yang akan digunakan pada penelitian ini adalah golongan senyawa polihidroksi alkohol. Proses stabilitas enzim oleh senyawa poliol terjadi karena adanya perubahan pada lingkungan enzim yang menyebabkan konformasi struktur menjadi lebih *rigid* karena intensitas interaksi hidrofobik antara gugus nonpolar yang meningkat. Interaksi hidrofobik merupakan faktor yang sangat penting dalam stabilitas struktur protein karena dapat menyebabkan enzim mengalami *folding* sehingga menjadi lebih stabil dibandingkan dengan struktur *unfolding*
(Lemos *et al.*, 2000).

Golongan poliol yang diketahui reaktif adalah yang mengandung 3 karbon atau lebih. Hal ini disebabkan sifat menarik airnya (hidrofilik) yang dapat menurunkan aktivitas air. Selain itu, penambahan senyawa alkohol meningkatkan interaksi hidrofobik di antara molekul protein enzim dan dapat bertindak sebagai penangkap atau pengikat senyawa radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan oksidasi enzim (Suhartono, 1989). Berikut ini adalah senyawa poliol yang akan digunakan dalam penelitian ini.

1. Gliserol

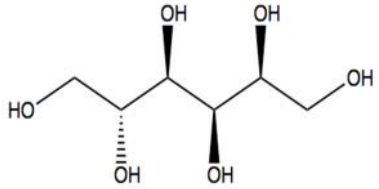
   Gliserol ialah suatu trihidroksi alkohol yang terdiri atas 3 atom karbon. Jadi tiap atom karbon mempunyai gugus –OH. Satu molekul gliserol dapat mengikat satu, dua, tiga molekul asam lemak dalam bentuk ester, yang disebut monogliserida, digliserida dan trigliserida. Gliserol atau dikenal juga dengan gliserin, merupakan cairan tidak berwarna, tidak berbau dengan rasa yang manis mempunyai berat molekul 92,094 g/mol, densitas 1.261 g/cm^3, titik didih 290°C dan titik leleh 18°C. Gliserol juga digunakan sebagai penghalus pada krim cukur, sabun, dalam obat batuk dan syrup atau untuk pelembab (Hart, 1983).



Gambar 9. Struktur gliserol

2. Sorbitol

Sorbitol juga dikenal dengan glusitol. Sorbitol mempunyai berat molekul 182,17 g/mol, densitas sebesar 0,68 g/cm^3, titik didih 296°C dan titik leleh
95°C. Sorbitol berbentuk kristal pada suhu kamar, berwarna putih, tidak berbau dan rasanya manis. Sorbitol larut dalam air, gliserol dan propilen glikol, sedikit larut dalam metanol, etanol, asam asetat dan fenol serta tidak larut dalam sebagian besar pelarut organik (Perry, 1999).



Gambar 10. Struktur sorbitol