

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri

Bakteri merupakan mikrobial uniseluler yang pada umumnya tidak mempunyai klorofil. Bakteri tersebar luas di alam, di dalam tanah, di dalam air, pada sumber air panas, dalam tubuh hewan, manusia dan tumbuhan. Bakteri umumnya berukuran kecil dengan karakteristik dimensi 1 μm . Beberapa kelompok memiliki *flagella* dan dapat bergerak aktif. Bakteri memiliki berat jenis 1.05 - 1.1 g cm^{-3} dan berat sekitar 10^{-12} g. Ukuran aktual tergantung dari laju pertumbuhan, media tumbuh dan sebagainya. Ada tiga bentuk dasar bakteri, yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang silindris, bentuk lengkung atau vibrio. Bentuk bulat atau kokus dapat dibedakan dalam : mikrokokus, diplokokus, streptokokus, tetrakokus, sarsina dan stafilo kokus. Bakteri berbentuk batang dapat dibedakan ke dalam bentuk batang panjang dan batang pendek dengan ujung datar atau lengkung. Bakteri berbentuk lengkung dapat dibagi menjadi bentuk koma (*vibrio*), jika lengkungnya kurang dari setengah lingkaran. Bentuk bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu (Hidayat dkk., 2006).

Untuk mendapatkan bakteri yang potensial dilakukan dengan penapisan mikroorganisme dari lingkungan. Umumnya isolat bakteri yang diperoleh sesuai dengan lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan tersebut biasanya digunakan bakteri sebagai substrat utamanya. Misalnya, bakteri amilolitik dapat diisolasi dari sampel yang berasal dari limbah pengolahan singkong, limbah sayur (Chakrabarty and Sen, 1984), rumen (Freer, 1993), serta hasil fermentasi ikan dan bahan makanan dari beras (Olympia *et al.*, 1995).

1. Nutrien untuk Pertumbuhan Bakteri

Suatu Organisme hidup memerlukan nutrisi untuk pertumbuhannya. Substansi kimia organik dan anorganik diperoleh dari lingkungan dalam berbagai macam bentuk. Nutrien diambil dari lingkungan kemudian ditransformasikan melalui membran plasma menuju sel. Di sel, beberapa nutrisi diolah menghasilkan energi yang digunakan dalam proses seluler (Lim, 1998).

Jasad renik heterotrof membutuhkan nutrien untuk kehidupan dan pertumbuhannya, yakni sebagai: sumber karbon, sumber nitrogen, sumber energi, dan faktor pertumbuhan, yakni mineral dan vitamin. Nutrien tersebut dibutuhkan untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel. Setiap jasad renik bervariasi dalam kebutuhannya akan zat-zat nutrien tersebut (Suhartono, 1989).

Kebutuhan nutrien harus meliputi unsur makro esensial dan mikro esensial yang terlibat baik dalam proses metabolisme sel juga untuk mengaktifkan enzim, mensintesis vitamin dan berperan dalam sporulasi. Nutrien dasar bagi mikroorganisme harus mengandung sumber energi untuk tumbuh seperti unsur karbon, nitrogen, dan logam. Nutrien yang tergolong sumber energi adalah senyawa hasil oksidasi dari lemak, protein, amonium, karbohidrat, dan gula sederhana. Kebutuhan sumber karbon dapat dipenuhi dengan adanya CO_2 atau senyawa seperti gula, pati, dan karbohidrat lain. Kebutuhan akan nitrogen dapat dipenuhi oleh NH_4^+ atau senyawa nitrat organik/anorganik. Untuk pertumbuhan normal mikroorganisme membutuhkan ion logam yang berfungsi sebagai kofaktor (Suhartono, 1989).

Ada tujuh komponen utama yang dibutuhkan semua makhluk hidup, yaitu karbon, oksigen, nitrogen, hidrogen, fosfor, sulfur dan kalium. Untuk kebutuhan akan sumber karbon dipenuhi oleh adanya gula, pati, serta karbohidrat lainnya. Terdapat dua macam mikronutrien yakni mikronutrien organik dan mikronutrien anorganik. Zat-zat yang bertindak sebagai

mikronutrien organik yaitu pada beberapa asam amino (triptofan) dan pada beberapa komponen-komponen DNA dan RNA (purin dan pirimidin). Beberapa unsur logam yang termasuk dalam mikronutrien anorganik adalah Co, Mo, Cu, Zn. Unsur logam ini sangat diperlukan untuk kehidupan sel meskipun jumlahnya sangat sedikit (Irianto, 2006).

2. Fase Pertumbuhan Bakteri

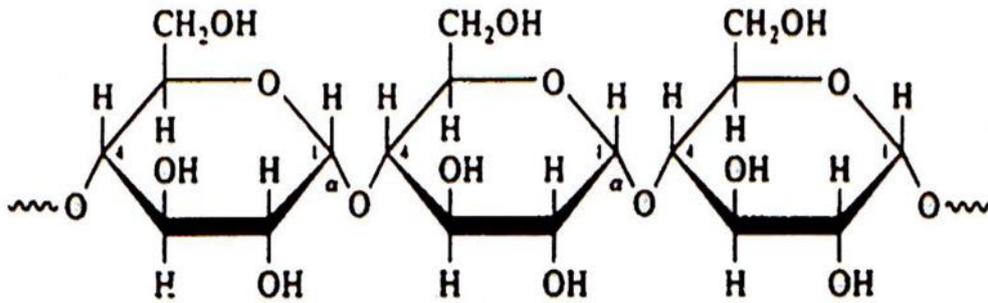
Suatu mikroorganisme mempunyai siklus pertumbuhan tertentu tergantung produk yang akan dihasilkan. Fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase logaritma atau fase eksponensial yang ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrien dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup (Volk dan Wheeler, 1993).

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan

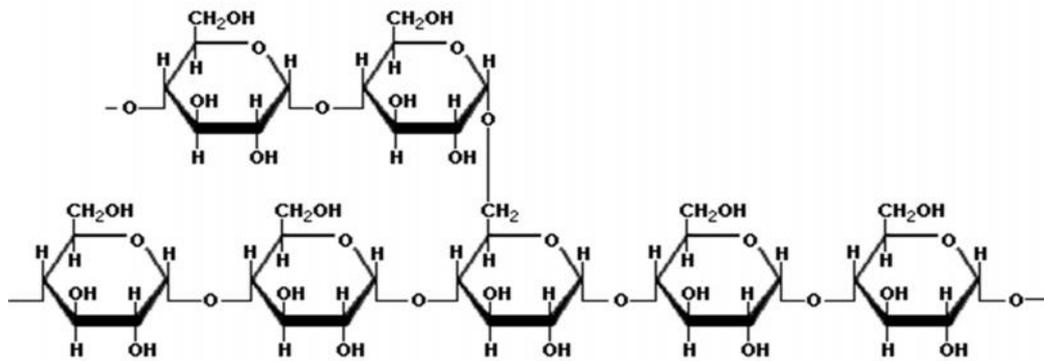
peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri (Volk dan Wheeler, 1993).

B. Pati

Pati atau amilum merupakan karbohidrat yang tersebar dalam tanaman terutama tanaman berklorofil. Bagi tanaman, pati merupakan cadangan makanan yang terdapat pada biji, batang dan pada bagian umbi tanaman. Banyaknya kandungan pati pada tanaman tergantung dari asal pati tersebut, misalnya pati yang berasal dari biji beras mengandung pati 50-60% dan pati yang berasal dari umbi singkong mengandung pati 80% (Winarno, 1986). Pati apabila diamati dengan mikroskop ternyata berbentuk granula-granula kecil yang bentuk dan ukurannya berbeda-beda tergantung dari tumbuhan apa pati tersebut diperoleh (Poedjiadi, 1994). Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi tidak larut disebut amilopektin (Winarno, 1986). Amilosa (15-20%) merupakan rantai panjang tidak bercabang yang terdiri dari molekul-molekul α -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan α -1,4. Amilosa terdiri atas 250-300 unit D-glukosa yang terikat dengan ikatan α -1,4-glikosidik, jadi molekulnya merupakan rantai terbuka sedangkan amilopektin (80-85%) merupakan rantai bercabang sebanyak 20-30 molekul α -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan α -1,4 dan α -1,6. Adanya ikatan α -1,6-glikosidik ini menyebabkan terjadinya cabang, sehingga molekul amilopektin berbentuk rantai terbuka dan bercabang (Poedjiadi, 1994). Pati sagu memiliki kandungan amilosa 25-35% dan amilopektin 65-75%. Pati jagung normal mengandung 24-26% amilosa dan 74-76% amilopektin. Pati singkong dari tepung tapioka memiliki rasio 17% amilosa dan 83% amilopektin. Struktur amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Struktur amilosa



Gambar 2. Struktur amilopektin

Amilum dalam kehidupan manusia dapat berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat, di samping itu amilum juga dapat berperan sebagai bahan aditif pada proses pengolahan makanan, misalnya sebagai penstabil dalam proses pembuatan puding. Amilum juga berperan dalam pembuatan sirup dan pemanis buatan seperti sakarin. Dalam bidang non makanan, amilum digunakan untuk bahan baku dalam proses pembuatan kertas, pakaian dari katun, industri cat, maupun untuk produksi hidrogen (Liu, 2005).

Amilum dapat dihidrolisis sempurna dengan menggunakan asam sehingga menghasilkan glukosa. Hidrolisis juga dapat dilakukan dengan bantuan enzim amilase. Pada reaksi hidrolisis parsial, amilum terpecah menjadi molekul-molekul yang lebih kecil yang dikenal

dengan nama dekstrin. Jadi dekstrin adalah hasil antara pada proses hidrolisis amilum sebelum terbentuk maltosa (Poedjiadi, 1994). Untuk mengetahui adanya pati maka dilakukan pengujian dengan menggunakan larutan iodium (I_2 dalam KI). Bila terdapat amilosa, polimer-polimer glukosa yang lebih besar dari 20 maka akan menghasilkan warna biru. Bila polimer-polimer glukosa kurang dari 20 maka akan menghasilkan warna merah. Dekstrin dengan polimer enam, tujuh, dan delapan akan memberikan warna coklat. Polimer yang lebih kecil dari lima tidak memberikan warna dengan iodium (Winarno, 1986).

C. Enzim

Enzim adalah suatu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis yaitu senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia (Maton *et al.*, 1993). Berdasarkan cara menghasilkannya, enzim dibagi menjadi dua, yaitu enzim ekstraseluler dan enzim intraseluler. Enzim ekstraseluler dapat diperoleh dalam keadaan murni pada biakan cair dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak begitu rumit (Smith, 1990). Sedangkan enzim intraseluler memiliki peran dalam mensintesis bahan seluler dan menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel (Wirahadikusumah, 1989).

Enzim mempunyai peranan sebagai katalis dalam menurunkan aktivitas dari reaksi energi. Aktivasi dapat diartikan sebagai sejumlah energi atau kalori yang diturunkan oleh suatu mol zat pada temperatur tertentu untuk membawa molekul ke dalam aktifnya atau keadaan aktifnya, menurunkan energi aktivasi, mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya, dan mengendalikan reaksi (Wirahadikusumah, 1989).

Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Meningkatnya suhu akan

semakin meningkatkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1982).

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008). pH lingkungan juga berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1982).

Selain suhu, pH dan konsentrasi substrat, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh ada tidaknya inhibitor. Jika terdapat pengurangan laju reaksi oleh suatu senyawa, senyawa tersebut dinamakan inhibitor. Inhibitor dapat bersaing dengan substrat dalam berikatan dengan enzim, sehingga menghalangi substrat terikat pada tapak aktif enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

Klasifikasi enzim secara internasional berdasarkan atas reaksi yang dikatalisis antara lain:

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi reduksi serta sering menggunakan koenzim seperti NAD, NADP, FAD, atau lipoleat sebagai akseptor hidrogen.
2. Transferase, mengkatalisis berbagai jenis reaksi transfer kelompok seperti aminotransferase, karnitin asil transferase, dan transkarboksilase.
3. Hidrolase, mengkatalisis reaksi pembelahan ikatan antara karbon dan beberapa atom lain dengan adanya penambahan air.
4. Liase, mengkatalisis reaksi pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon sulfur dan karbon nitrogen tertentu.
5. Isomerase, mengkatalisis reaksi isomer optik dan geometrik dan oksidasi reduksi intramolekuler tertentu.
6. Ligase, mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan antara karbon dan oksigen (Lehninger, 1982).

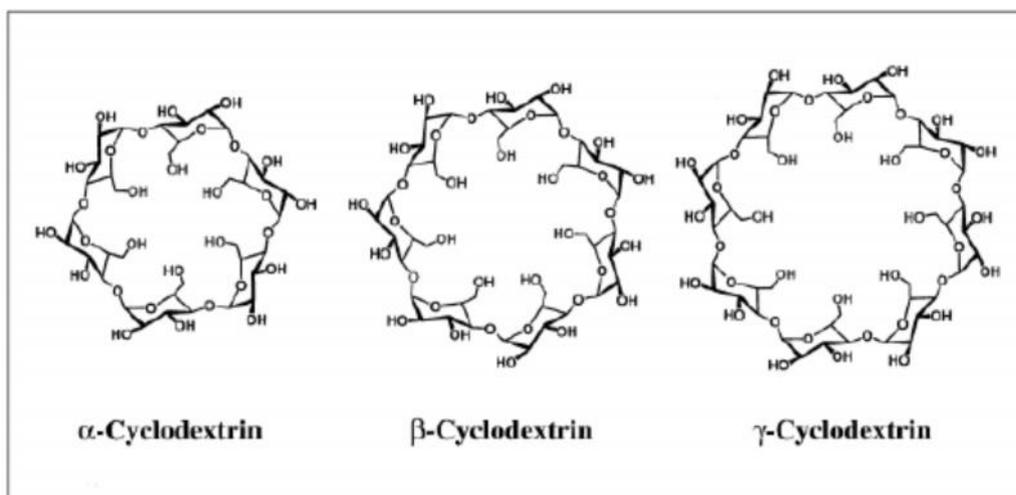
D. Enzim CGT-ase dan Produk Siklodekstrin

Siklodekstrin Glukanotransferase (CGT-ase) merupakan enzim golongan transferase yang digunakan untuk menghasilkan oligosakarida siklik berikatan α -1-4 yang disebut siklodekstrin (CD) dari pati serta dapat juga digunakan untuk menghasilkan oligosakarida lain dengan sifat yang beragam (Weijers *et al.*, 2008). CGT-ase diproduksi oleh beberapa bakteri, umumnya diproduksi oleh bakteri dengan genus *Bacillus*, dan kebanyakan CGT-ase yang berasal dari *Bacillus sp.* merupakan enzim ekstraseluler kecuali CGT-ase yang berasal dari *Bacillus macerans* ATCC8514 (Nogrady *et al.*, 1996). CGT-ase merupakan anggota dari keluarga enzim α -amilase (Leemhuis *et al.*, 2003 ; Gawande *et al.*, 2003). Meskipun CGT-ase memiliki hubungan yang dekat dengan α -amilase, namun α -amilase mengkatalisis reaksi hidrolisis dengan menggunakan molekul air sebagai akseptornya. Sedangkan CGT-ase

mengkatalisis reaksi transglukosilasi dimana residu glukosil digunakan sebagai akseptor dalam membentuk siklodekstrin sebagai produk utama (Nakamura *et al.*, 1992). CGT-ase memiliki berat molekul yang bervariasi dari 60-110 kDa dan terdiri dari 700 asam amino. Sebagian memerlukan kalsium sebagai agen pelindung terhadap denaturasi panas (Bovetto *et al.*, 1992).

Secara umum CGT-ase merupakan enzim induktif, memerlukan pati sebagai proses induksi, kecuali CGT-ase yang berasal dari *Bacillus cereus* RJ-30 (Jamuna *et al.*, 1993). CGT-ase alkalofilik optimum pada pH 9-10 (Tao, 1991). Suhu maksimal bagi kebanyakan bakteri CGT-ase antara 40°C sampai 80°C dan sebagian besar CGT-ase diinhibisi kuat oleh Zn^{2+} , Cu^{2+} dan Fe^{2+} (Tonkova, 1998).

Siklodekstrin merupakan oligosakarida berbentuk siklis yang tersusun atas beberapa unit glukosa dengan ikatan α -1-4. Senyawa tersebut dapat dihasilkan dari degradasi pati secara enzimatis. Berdasarkan jumlah unit glukosanya, siklodekstrin dibagi menjadi tiga bentuk yaitu α -siklodekstrin yang terdiri dari 6 unit glukosa, β -siklodekstrin 7 unit glukosa dan γ -siklodekstrin 8 unit glukosa. Struktur siklodekstrin berbentuk silinder dengan permukaan luarnya bersifat polar sedangkan bagian dalam rongganya bersifat non polar (Szejtli, 1988). Adapun struktur α -CD, β -CD dan γ -CD dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur α -, β - dan γ -siklodekstrin (van der Veen *et al.*, 2000)

Penggunaan siklodekstrin telah dilakukan di berbagai industri. Dalam industri pangan, siklodekstrin digunakan sebagai bahan enkapsulasi untuk beberapa bahan yang beraroma, vitamin C, dan pewarna alami (Reineccius, 1986). Dalam industri kosmetika digunakan untuk meningkatkan stabilitas minyak parfum terhadap oksidasi dan bau, sedangkan di industri farmasi siklodekstrin digunakan sebagai bahan pengomplek dengan vitamin A, E dan K agar stabil terhadap oksidasi (Dziezak, 1988). Selain itu siklodekstrin digunakan di industri untuk penstabil emulsi, menutup bau dan rasa dari bahan makanan serta dapat mengurangi kadar kolesterol (Yen dan Tsui, 1995; Smith *et al.*, 1995).

Produksi siklodekstrin tidak lepas dari penggunaan enzim CGT-ase, sebab hanya enzim CGT-ase yang mampu mengkonversi pati menjadi siklodekstrin. CGT-ase dihasilkan oleh mikroorganisme biasanya adalah adalah *Bacillus sp.* Perbedaan jenis *Bacillus* akan menghasilkan perbandingan jenis siklodekstrin yang berbeda (Akimaru *et al.*, 1991). Adapun sifat dari α -CD, β -CD dan γ -CD dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat-sifat siklodekstrin (van der Veen *et al.*, 2000)

Karakteristik	Jenis siklodekstrin		
	α -CD	β -CD	γ -CD
Berat molekul (g/mol)	972	1135	1297
Jumlah monomer glukosa	6	7	8
Diameter rongga internal (Å)	5	6	8
Kelarutan dalam air (g/100mL 25°C)	14.2	1.85	23.2
Tegangan permukaan (mN/m)	71	71	71
Titik leleh (°C)	255 - 260	255 - 265	240 - 245
Kristalisasi air	10.2	13 - 15	8 - 18
Molekul air dalam rongga	6	11	17

-CD memiliki kelarutan yang tinggi di dalam air sedangkan -CD memiliki kelarutan yang rendah. Namun kompleksasi akan mengakibatkan perubahan dalam kelarutan CD. -CD lebih banyak digunakan untuk berbagai aplikasi dibandingkan dengan CD yang lain, karena memiliki kelarutan yang rendah di dalam air dan mudah dipisahkan dari campuran dengan menggunakan pelarut organik (Biwer *et al.*, 2002).