

I. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan mikroorganisme tanah yang umum dijumpai pada berbagai jenis tanah. Populasinya berada pada urutan kedua setelah bakteri bahkan kadang kadang hampir sama (Alexander, 1961). *Actinomycetes* hidup sebagai saprofit dan aktif mendekomposisi bahan organik sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah (Nonomura and Ohara, 1969a). Pada umumnya *Actinomycetes* tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada keadaan lingkungan dengan pH dibawah 5.0 (Jiang and Xu, 1985). Rentang pH yang paling cocok untuk *Actinomycetes* adalah antara 6,5-8.0. Temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *Actinomycetes* adalah 25-30°C, tetapi pada suhu 55-65°C *Actinomycetes* masih dapat hidup dalam jumlah cukup besar khususnya genus *Thermoactinomycetes* dan *Streptomyces* (Rao, 1998).

Actinomycetes merupakan kelompok mikroba bersifat gram positif (Lay dan Hastowo, 1992). Pernyataan tersebut sesuai dengan Alexander (1961) yang mengatakan bahwa *actinomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer-polimer gula, asam amino dan asam gula seperti dinding sel bakteri gram positif.

Actinomycetes dikatakan sebagai mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi (Alexander, 1961). Terlihat dari luar ia berfilamen seperti jamur yang memiliki sel eukariotik, namun organisme ini sesuai dengan semua kriteria seperti bakteri yaitu bersel prokariotik (Magarvey *et al.*, 2004). Selain itu, *Actinomycetes* menyerupai fungi karena memiliki hifa bercabang dengan membentuk miselium. Miselium tumbuh menjulang ke udara dan memisah dalam bentuk fragmen-fragmen pendek sehingga terlihat seperti cabang pada

bakteri (Sutedjo dan Kartasapoetra, 1991) serta *actinomycetes* memiliki kesamaan dengan bakteri pada struktur sel dan ukuran irisan yang melintang (Foth, 1991).

B. Enzim

Enzim adalah suatu katalisator protein atau dalam bentuk gabungan dengan molekul asam nukleat yang berfungsi mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologi (Shahib, 2005). Enzim merupakan katalis biologi, yang mampu meningkatkan laju reaksi dengan cara selektif dan efisien yang mendasar pada hukum termodinamika dan kinetika. Sifat-sifat katalitik khas dari enzim ialah sebagai berikut (Page, 1989):

1. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologi) dari tekanan, suhu dan pH.
2. Enzim berfungsi dengan selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
3. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa.

Enzim memiliki beberapa keunggulan diantaranya ialah memiliki produktivitas dan spesifisitas yang tinggi tanpa pembentukan senyawa samping, sehingga mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin and Bucke, 1990).

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain konsentrasi enzim, substrat, suhu, pH, kofaktor, pelarut organik dan inhibitor. Tiap enzim memiliki suhu dan pH optimum yang berbeda-beda, karena enzim merupakan protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan pH berubah. Diluar suhu dan pH optimal enzim tidak dapat bekerja maksimal atau bahkan akan kehilangan fungsinya sebagai katalis karena rusaknya struktur protein enzim (Maton *et al.*, 1993).

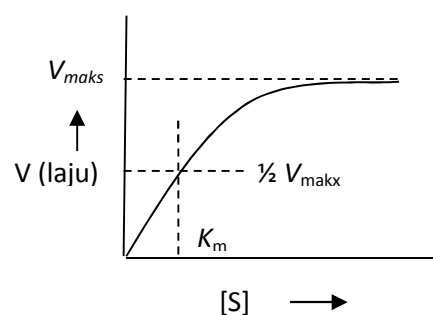
Berikut ini faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim :

1) Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit dari pada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1989).

2) Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi enzim tetap dan konsentrasi enzim bervariasi terdapat hubungan antara aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang terlalu rendah aktivitas katalitiknya pun rendah. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat aktivitas enzim meningkat secara linier, kemudian secara logaritmik dan akhirnya mencapai harga maksimum dimana penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak mempengaruhi laju reaksi enzim. Gejala ini disebut kinetika penjumlahan (Page, 1989). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan dalam Gambar 1.



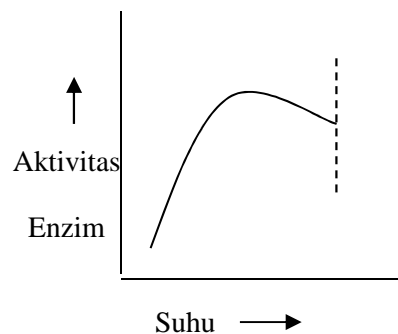
Gambar 1. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005)

3) Inhibitor

Inhibisi atau hambatan reaksi enzim adalah penurunan kecepatan reaksi enzimatik akibat adanya suatu senyawa kimia tertentu dalam larutan enzim substrat (Mara, 1999). Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor (Poedjiadi, 1994). Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

4) Suhu

Suhu optimum merupakan suhu pada saat enzim memiliki aktivitas maksimum. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 2. Dalam gambar diterangkan bahwa suhu dapat meningkatkan laju reaksi enzimatik sampai batas tertentu. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Hal ini disebabkan karena terbukanya lipatan molekul enzim, sehingga interaksi hidrofobik menurun dan akhirnya akan membentuk agregat. Pada suhu tinggi substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya rusak atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989).

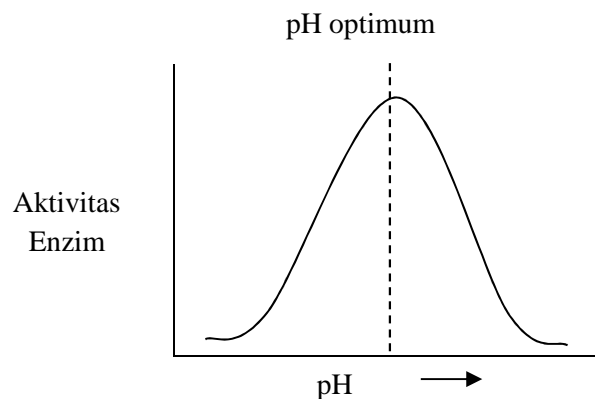


Gambar 2. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim (Shahib, 2005)

5) pH

Struktur ion enzim bergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat berbentuk ion positif dan 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 mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Secara umum pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 3. Pada beberapa enzim memiliki aktivitas maksimum pada kisaran pH antara 4,5-8,0 (Winarno, 1989)



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

6). Kofaktor logam.

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

7). 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).

Enzim bekerja berdasarkan teori kunci gembok, menurut teori ini terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan situs aktif dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan

kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Berbeda dengan Teori kunci gembok, menurut Teori kecocokan induksi reaksi antara enzim dengan substrat berlangsung karena adanya induksi substrat terhadap situs aktif enzim sedemikian rupa sehingga keduanya merupakan struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Menurut teori ini sisi aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Yandriano, 2006).

C. Protease

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Berdasarkan CIUEB (*Commision on Enzym of the International Union of Biochemistry*) protease merupakan enzim kelas 3, hidrolase dan subkelas 3,4 peptida hidrolase atau peptidase (Beynom and Bond, 1989). Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibedakan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase terdiri atas karboksil eksopeptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino eksopeptidase dari gugus amino terminal, sedangkan endopeptidase memecah ikatan peptida dari dalam. Menurut Harley (1960) dalam Winarno (1989) endopeptidase dapat dibedakan berdasarkan gugus reaktif pada sisi aktif yang terlibat dalam katalisis, menjadi:

1. Protease serin merupakan enzim protease yang memiliki residu serin dalam sisi aktifnya. Contohnya adalah enzim tripsin dan subtilisin. Enzim protease golongan ini dihambat kuat oleh senyawa diisopropil fluorophosphat (DFP).
2. Protease Sulfidril (proteasetiol) artinya enzim yang aktivitasnya bergantung pada adanya satu atau lebih residu sulfidril pada sisi aktifnya.

3. Protease Metal yaitu protease yang keaktifannya bergantung pada adanya logam per mol enzim. Metal tersebut terdiri dari Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Ni dan sebagainya. Enzim ini dihambat oleh EDTA yang dapat mengkhelat metal sehingga keaktifan enzim hilang.
4. Protease Asam yaitu enzim yang keaktifannya disebabkan adanya dua gugus karbonil pada sisi aktifnya. Protease asam memotong substrat protein pada asam amino aromatik atau asam amino berukuran besar. Keaktifannya dapat dihambat oleh p-bromofenasilbromida.

D. 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).

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). Untuk meningkatkan stabilitas enzim yang secara alami tidak/kurang stabil, salah satunya adalah dengan penambahan senyawa aditif.

a. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemandapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemandapannya rendah. Daerah suhu saat kemandapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1997).

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.

Penggunaan enzim dalam industri umumnya dilakukan pada suhu relatif rendah, misalnya pada suhu 50-60 °C (untuk glukamilase dan glukosa isomerase) atau lebih rendah.

Penggunaan enzim pada suhu yang lebih tinggi hingga 85-100 °C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan α -amilase bakterial. Oleh sebab itu, diperlukan enzim dengan stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

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

- 1) Adanya pembukaan partial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
- 2) Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern and Klivanov, 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).

b. 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, 1989).

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 elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

E. Senyawa Poliol (Polihidroksi Alkohol)

Polihidrat alkohol atau biasa disebut dengan poliol adalah senyawa organik rantai lurus yang hanya memiliki hidroksil sebagai gugus fungsionalnya. Senyawa ini dinilai lebih stabil, baik dari suhu maupun struktur kimianya daripada gula konvensional. Harga senyawa ini tentu lebih mahal, namun diimbangi dengan penampilan yang cantik pada produk akhir. Contoh senyawa polihidrat alkohol yang sering dijumpai dalam produk pangan adalah gliserin, sorbitol, manitol, dan propilen glikol.

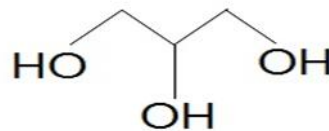
a. Gliserol

Gliserol atau sering disebut gliserin, gliseritol dan glisil alkohol adalah gula alkohol yang memiliki 3 gugus hidroksil alkoholik yang bertanggungjawab pada kelarutannya dalam air. Gliserol diproduksi dari dihidroksiaseton fosfat (DHAP) oleh enzim gliserol

triospat dehidrogenase dalam sitoplasma sel eukariot selama glikolisis. Gliserol merupakan komponen penting dalam trigliserida dan komponen lipid.

Dalam bentuk murni merupakan senyawa yang tidak berbau, tidak berwarna, higroskopis dan berupa cairan kental yang berasa manis dengan titik leleh 18°C , titik didih 290°C , densitas sebesar $1,261\text{ g/cm}^3$, massa molekulnya $92,0982\text{ g/mol}$, dengan nama IUPAC propane-1,2,3-triol (Hart, 2003).

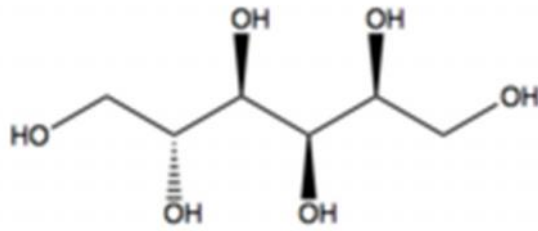
Struktur gliserol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Gliserol

b. Sorbitol

Sorbitol juga dikenal dengan glusitol. Sorbitol memiliki berat molekul $182,17\text{ g/mol}$, densitas sebesar $0,68\text{ g/cm}^3$, titik didih 296°C dan titik leleh 95°C . Sorbitol banyak ditemukan pada buah-buahan dan biji-bijian dari genus *Sorbus*. Sorbitol digunakan sebagai bahan campuran sirup obat batuk, selain itu sorbitol digunakan sebagai gula pengganti pada makanan dan minuman rendah kalori. Struktur dari sorbitol dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Sorbitol

F. 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 and Chan, 1986).

a. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim dengan memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (dibawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989) selain itu mempercepat pengendapan debris sel. Sentrifugasi akan menghasilkan filtrat yang jernih yang merupakan ekstrak kasar enzim dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan.

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 (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 (gramavitasi)).

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

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

$$\omega = \frac{f(\text{rpm})}{30}$$

$$RCF = \left(\frac{\text{rpm}}{30}\right)^2 r \times \frac{980}{r}$$

$$RCF = (1.119 \times 10^{-5})(\text{rpm})^2$$

(Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).

b. Fraksinasi Garam amonium sulfat

Menurut Suhartono (1989), Penambahan senyawa elektrolit menurunkan kelarutan protein, karena kelarutannya dipengaruhi oleh kekuatan ion. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*, setelah mencapai suatu titik tertentu kelarutannya akan semakin menurun atau disebut peristiwa *salting out*. Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan

kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion, dan jika interaksi antar ion kuat, kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agoestin dan Munir, 1997).

Senyawa elektrolit yang sering digunakan untuk mengendapkan protein ialah amonium sulfat. Kelebihan amonium sulfat dengan dibandingkan dengan senyawa-senyawa elektrolit lain ialah memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap yang efektif, efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

c. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein berdasarkan pada sifat semipermeabel membran. Secara umum, proses dialisis berlangsung sebagai berikut: Larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam kantung dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel (selofan). Jika kantung yang berisi larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam larutan buffer, maka molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul protein atau enzim yang berukuran besar tetap tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (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).

d. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Salah satu metode untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru.

Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi basa. Cu^+ dan rantai samping tirosin, triftofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau*. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau *tungesteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triftofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).