

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel, bekerja dengan urutan-urutan yang teratur, mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menyimpan dan mentransformasikan energi kimiawi, serta membuat makromolekul sel dan prekursor sederhana (Lehninger, 1982). Menurut Martoharsono (1981), enzim tersusun atas asam amino-asam amino yang melipat-lipat membentuk globular, dimana substrat yang dikatalisis bisa masuk dan bersifat komplementer.

Enzim berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, selain itu mempunyai derajat kekhasan yang tinggi. Enzim berperan sebagai katalis proses biokimia yang terjadi di dalam maupun di luar sel. Seperti katalis lainnya, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994).

1. Klasifikasi enzim

Berdasarkan fungsinya enzim dapat diklasifikasikan menjadi enam kelas dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi

dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC:

- a. Oksidoreduktase yang mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi yang menggunakan koenzim seperti nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), nikotinamid adenin dinukleotida fosfaat (NADP^+), flavin adenin dinukleotida (FAD^+) atau lipoat. Nama trivial yang umum lainnya adalah dehidrogenase, oksidase, peroksidase dan reduktase.
- b. Transferase yang mengkatalisis berbagai perpindahan gugus seperti amino, karbonil, metil, asil, glikosil atau fosforil. Nama trivial yang umum lainnya adalah aminotransferase (transaminase), karnitin asil transaminase dan transkarboksilase.
- c. Hidrolase yang mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain dengan adanya penambahan air. Nama trivial yang umum lainnya adalah esterase, peptidase, amilase, fosfatase, urease, pepsin, tripsin dan kimotripsin.
- d. Liase yang mengkatalisis pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon-sulfur, dan karbon-nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida). Nama trivial lainnya adalah dekarboksilase, aldolase, sintase, sitratliase dan dehidratase.
- e. Isomerase yang mengkatalisis reaksi rasemisasi isomer optik atau geometrik dan reaksi oksidasi-reduksi intramolekul tertentu. Nama trivial lainnya adalah epimerase, resemasase dan mutase.

- f. Ligase yang mengkatalisis pembentukan ikatan karbon-oksigen, karbon-sulfur, karbon-nitrogen, dan karbon-atom lainnya. Energi yang diperlukan untuk pembentukan ikatan diperoleh dari hidrolisis ATP. Nama trivial lainnya adalah tiokinase dan karboksilase (Montgomery, 1993).

2. Sifat katalitik enzim

Sifat-sifat katalitik khas dari enzim ialah sebagai berikut:

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim berfungsi dengan selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1989).

3. Faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Berikut ini adalah faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim:

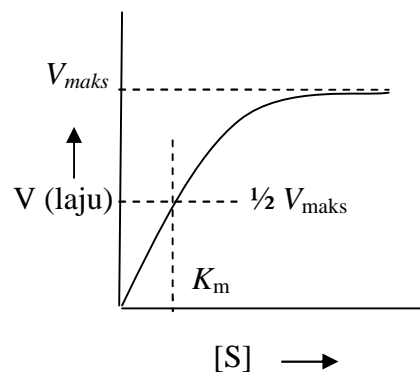
- a. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatis dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjadi, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier

selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit dari pada konsentrasi substrat (Page, 1989).

b. Konsentrasi substrat

Jika konsentrasi substrat diturunkan dan konsentrasi enzim tetap, maka laju reaksi menjadi lambat, sehingga kompleks enzim-substrat terbentuk sedikit. Hal ini karena tidak semua substrat diikat oleh enzim. Jika konsentrasi substrat dinaikkan dan kadar enzim tetap, maka kecepatan reaksi akan naik sampai dicapai kondisi konstan, yaitu ketika semua substrat sudah diikat oleh enzim (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)

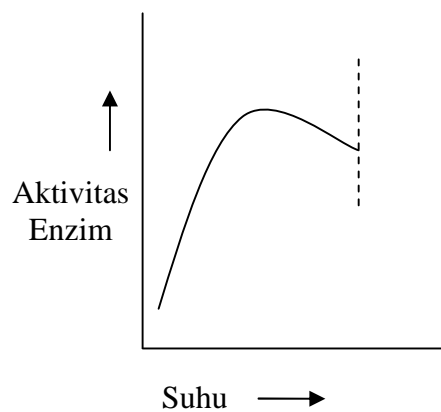
c. Inhibitor

Menurut Wirahadikusumah (1997) inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. 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).

d. Suhu

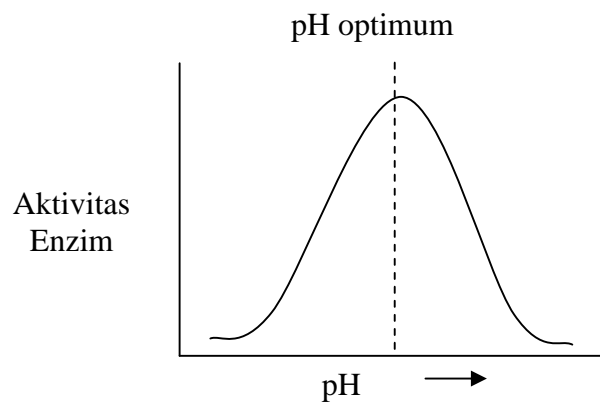
Suhu dapat meningkatkan laju reaksi enzimatik sampai batas tertentu. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Pada suhu 0°C enzim tidak aktif (tidak rusak) dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 2.



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

e. pH

Perubahan pH dapat mempengaruhi perubahan asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1989). 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)

f. Kofaktor logam

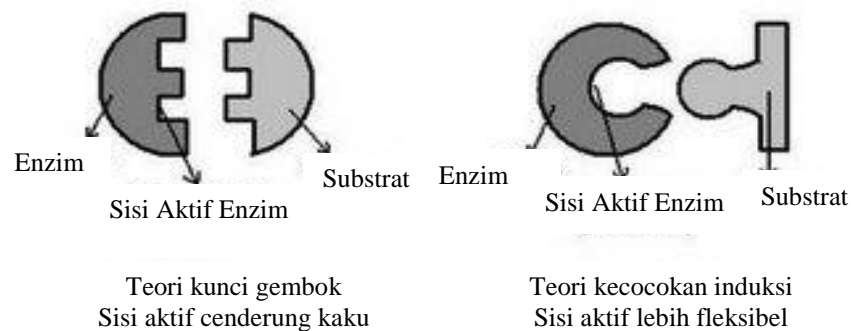
Kofaktor adalah suatu faktor yang membantu keaktifan enzim. Ikatan antara kofaktor dan enzim dapat sangat kuat dan ada pula yang tidak terikat dengan kuat (Poedjiadi, 1994).

g. 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).

4. Teori pembentukan enzim-substrat

Enzim bekerja dengan dua mekanisme reaksi yaitu teori kunci gembok (*lock and key theory*) yang diterangkan oleh Emil Fisher dan teori kecocokan induksi (*induced fit theory*) oleh Daniel Koshland (Shahib, 2005), yang ditunjukkan dalam Gambar 4.



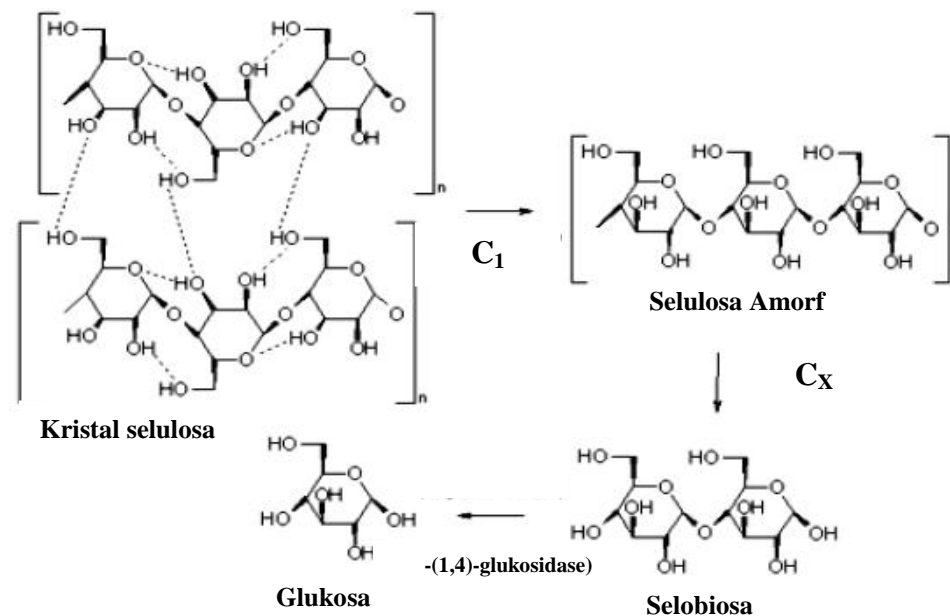
Gambar 4. Teori kunci gembok dan teori kecocokan induksi
(Yandriano, 2006)

Menurut teori kunci gembok, 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 menjadi struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Menurut teori ini sisi aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Yandriano, 2006).

B. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim induksi yang disintesis oleh mikroorganisme selama ditumbuhkan dalam medium selulosa (Lee and Koo, 2001). Selulase termasuk sistem multienzim yang terdiri dari tiga komponen. Untuk menghidrolisis selulosa yang tidak larut atau selulosa kristal diperlukan kerja sinergistik dari

ketiga komponen enzim tersebut. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat dalam Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase

Adapun ketiga komponen enzim tersebut yaitu:

- 1) Ekso- $-(1,4)$ -glukanase dikenal sebagai faktor C_1 .

Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis selulosa dalam bentuk kristal

- 2) Endo- $-(1,4)$ -glukanase dikenal sebagai faktor C_x .

Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis ikatan $-(1,4)$ -glukosida (selulosa amorf).

- 3) $-(1,4)$ -glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Reese, 1976).

Aktivitas selulase disebabkan oleh enzim C_1 , hidrolisis selulosa yang telah diaktifkan dilakukan oleh enzim C_x . Menurut hipotesa ini, mikroba yang tumbuh pada selulosa kristal membentuk C_1 , sedangkan mikroba yang hanya dapat

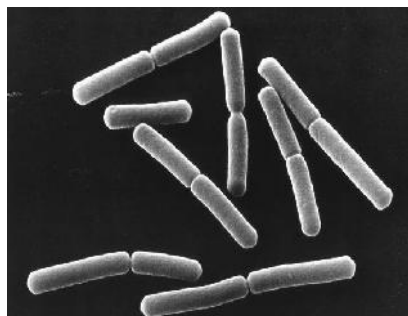
menguraikan selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat atau selulosa tersubstitusi akan kekurangan enzim C₁, tetapi banyak menghasilkan enzim C_x (Muchtadi *et al.*, 1992).

Enzim selulase memiliki aplikasi yang luas dan potensial dalam bidang pangan, pakan ternak, tekstil, bahan bakar, industri kimia, industri pulp dan kertas, pengolahan limbah, industri farmasi, produksi protoplas, dan teknik genetik (Coughlan, 1985; Mandels, 1985; Beguin and Aubert, 1994; Tarek and Nagwa, 2007).

C. *Bacillus subtilis*

Bakteri merupakan suatu kelompok mikroorganisme prokariotik bersel tunggal yang sangat beragam dan terdapat dalam air, udara, maupun tanah. Hal tersebut dikarenakan bakteri mampu membentuk spora untuk mempertahankan diri.

Bacillus subtilis adalah bakteri yang mempunyai spora berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya. Mikroorganisme ini bersifat gram positif dan aerob (Schelege and Schmidt, 1994). Gambar *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. *Bacillus subtilis*

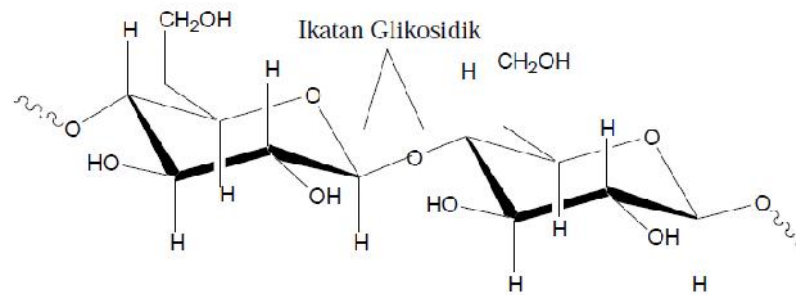
Berikut ini adalah klasifikasi *Bacillus subtilis* menurut Madigan (2005):

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus subtilis*

D. Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa yang membentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4-glikosidik. Struktur linier ini menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Umumnya selulosa di alam berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzapple, 1993).

Dalam dinding sel, senyawa ini terdapat dalam bentuk mikrofibril yang terdiri dari beberapa rantai molekul. Konfigurasi molekulnya berupa suatu kumpulan yang sangat kokoh karena adanya ikatan hidrogen yang kuat antara rantai molekul yang paralel (Southgate and Englyst, 1985). Secara singkat struktur selulosa dapat terlihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur selulosa

Secara umum selulosa sulit dihidrolisis karena mempunyai tingkat struktur kristal yang tinggi dan lapisan lignin yang menyelubungi jaringan selulosa merupakan suatu penghalang. Bagian selulosa yang mudah dihidrolisis adalah bagian amorf. Umumnya selulosa mengandung 15% bagian amorf dan 85% bagian kristalin (Tsao *et al.*, 1978).

E. Kinetika Reaksi Kimia

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). 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).

Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi enzimatis relatif rendah. Kecepatan ini terus meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat sampai suatu titik tertentu dimana kecepatan reaksi hanya akan meningkat

sedemikian kecilnya hingga mendekati garis maksimum, walaupun beberapa substrat ditambahkan. Pada kondisi ini, semua sisi aktif enzim telah terisi dengan substratnya dan tidak dapat lagi berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1982).

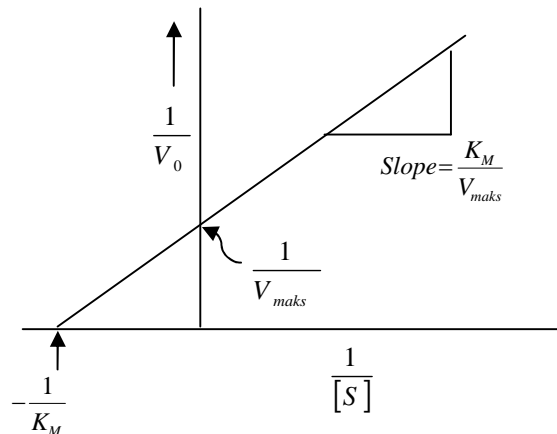
Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan 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 adalah 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 atau kondisi non fisiologis lainnya (Wiseman, 1985).

Terdapat 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.

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. Kenaikan suhu enzim akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi, namun hanya sampai batas tertentu dan dapat menyebabkan denaturasi protein. Daerah suhu saat kemantapan 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.

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

- a. Adanya pembukaan partial (*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 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).

2. Stabilitas pH enzim

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 *irreversibel* 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 and Chan, 1986).

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, kemudian dipisahkan secara manual. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 g selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh and Headon, 1994).

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 (gravitasi)).

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

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

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

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

$$RCF = (1.119 \times 10^{-5})(rpm)^2 r \text{ (Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).}$$

2. Fraksinasi garam ammonium sulfat

Fraksinasi merupakan proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat atau ammonium sulfat. Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah ammonium sulfat karena (1) kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, (2) memiliki kelarutan yang besar dalam air, (3) mempunyai daya pengendapan besar, dan (4) mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim (Wirahadikusumah, 1997).

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 (Agustien dan Munir, 1997).

3. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Metode ini berdasarkan pada sifat semipermeabel membran yang dapat menahan molekul-molekul besar, tapi dapat meloloskan molekul-

molekul kecil seperti garam. Proses dialisis berlangsung karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. 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 dikenal tiga jenis kromatografi, yaitu kromatografi filtrasi gel, kromatografi afinitas, dan kromatografi ion. Namun, dalam penelitian ini dilakukan pemurnian enzim selulase dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel.

Kromatografi filtrasi gel digunakan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul tinggi dengan protein atau molekul lain yang berat molekulnya rendah. Salah satu bahan terpenting sebagai gel adalah dektran (polimer gula yang biasa larut dalam air) yang telah mengalami reaksi "*cross linkage*" yang secara komersil dikenal dengan nama Sephadex. Pemisahan dengan metode ini didasarkan pada ukuran protein. Matriks filtrasi gel mengandung pori yang memungkinkan buffer dan protein lebih kecil

memasukinya sedangkan protein yang lebih besar tidak dapat memasukinya sehingga akan keluar terlebih dahulu.

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 efisiensi filtrasi gel meningkat dengan semakin tingginya kolom (Suhartono, 1989).

H. Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels

Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan produk glukosa dimana karboksimetil selulosa sebagai substratnya. Semakin tinggi absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas enzim tersebut.

I. 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 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, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau*. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan 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).

J. Senyawa Aditif

Senyawa aditif digolongkan menjadi beberapa kelompok yaitu substrat, senyawa hidrofilik, larutan garam dan gula, ion logam, anion, polianion, polilakton, protein dan polimernya, inhibitor, senyawa pengkelat, anti buih serta senyawa pereduksi dan antioksidan.

Golongan alkohol polihidrat termasuk ke dalam senyawa hidrofilik. Senyawa hidrofilik akan menimbulkan hidrasi sehingga konformasi protein terjaga dari kemungkinan “membuka”, artinya konformasi aslinya cenderung tetap stabil. Senyawa ini sifatnya menarik air (hidrofilik) sehingga dapat menurunkan aktivitas air. Selain itu penambahan senyawa ini akan meningkatkan interaksi hidrofobik di

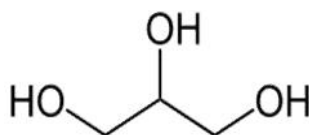
antara molekul protein enzim sehingga diduga meningkatkan kestabilannya. Senyawa ini dapat bertindak sebagai penangkap atau pengikat radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan oksidasi terhadap enzim (Schwimmer, 1981).

K. Polioli (Alkohol Polihidrat)

Polioli dikenal juga sebagai gula alkohol, polihidrik alkohol, atau polialkohol adalah bentuk hidrogenasi dari karbohidrat, dimana gugus karbonil (aldehid atau keton, gula pereduksi) telah tereduksi menjadi gugus hidroksil primer atau sekunder. Polioli biasanya digunakan untuk menggantikan sukrosa dalam makanan (Hart *et al.*, 2003).

Semakin besar berat molekul polioli maka makin tinggi pengaruhnya terhadap stabilitas enzim. Pada penelitian akan dipelajari pengaruh penambahan gliserol dan sorbitol terhadap stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

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. Adapun rumus molekul gliserol dapat ditunjukkan pada Gambar 9.



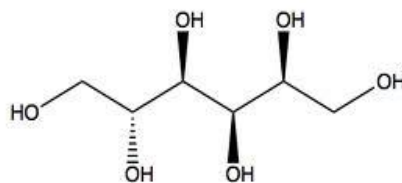
Gambar 9. Struktur gliserol

Sifat fisik dari gliserol merupakan cairan tidak berwarna, tidak berbau, cairan kental dengan rasa yang manis, densitas $1,261 \text{ g.cm}^{-3}$, titik lebur $18,2^\circ\text{C}$, titik didih 290°C . Gliserol juga digunakan sebagai penghalus pada krim cukur, sabun, dalam obat batuk dan sirup atau untuk pelembab (Hart *et al.*, 2003).

Gliserol larut baik dalam air dan tidak larut dalam eter. Gliserol digunakan dalam industri farmasi dan kosmetika sebagai bahan dalam preparat yang dihasilkan. Di samping itu gliserol berguna bagi kita untuk sintesis lemak di dalam tubuh.

Gliserol yang diperoleh dari hasil penyabunan lemak atau minyak adalah suatu zat cair yang tidak berwarna dan mempunyai rasa yang agak manis, larut dalam air dan tidak larut dalam eter (Poedjiadi, 1994).

Sorbitol yang biasanya dikenal sebagai glusitol adalah gula alkohol yang metabolismenya lambat dalam tubuh. Sorbitol dihasilkan oleh reduksi glukosa dengan penggantian gugus aldehid dengan gugus hidroksil. Sorbitol digunakan dalam berbagai sirup obat batuk, sebagai pengganti gula dalam makanan diet dan permen karet bebas gula, dan sering digunakan dalam kosmetik modern sebagai penghilang noda. Sorbitol memiliki titik leleh 95°C , titik didih 296°C , massa molekul sebesar $182,17 \text{ g.mol}^{-1}$, densitas sebesar $0,68 \text{ g.cm}^{-3}$, dengan nama IUPAC heksana-1,2,3,4,5,6-heksaon (Hart *et al.*, 2003). Struktur sorbitol dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Struktur sorbitol