

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah produk protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel (Poedjadi, 1994). 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). Fungsi utama dari enzim tersebut adalah melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrisi di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrisi tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraseluler memiliki peran dalam mensintesis bahan seluler dan menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel (Wirahadikusumah, 1989).

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Semua enzim yang diketahui hingga kini hampir seluruhnya adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim, seperti protein lain, memiliki berat molekul yang berkisar kira-kira 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Oleh karena itu, enzim berukuran sangat besar dibandingkan substrat atau gugus fungsional targetnya (Lehninger, 1998).

1. Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim pemecah pati, glikogen dan polisakarida lain dengan cara menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 atau ikatan glikosidik α -1,6. Amilase dibagi menjadi empat golongan, yaitu: α -amilase, β -amilase, glucoamilase dan enzim pemutus cabang. Berdasarkan produk akhir hidrolisisnya, enzim amilase dibagi menjadi α -amilase sakarifikasi dan amilase likuifikasi. Golongan pertama memberikan produk akhir gula bebas sedangkan golongan kedua adalah enzim yang memecah pati tetapi tidak menghasilkan gula bebas, kedua golongan amilase ini dibedakan secara eksperimen (Crueger, 1984).

Enzim α -amilase (α -1,4 glukon-glukanhidrolase), termasuk enzim pemecah dari dalam molekul, bekerja menghidrolisis dengan cepat ikatan α -1,4 glukosida pada pati. Berat molekul α -amilase \pm 50 kDa (Suhartono, 1989). Enzim ini banyak digunakan pada industri sirup, sari buah, dan selai. Enzim α -amilase mengandung paling sedikit 1 atom kalsium permolekul dan melekat dengan erat pada molekul enzim. Adanya kalsium tersebut menyebabkan enzim ini disebut "*calcium metal coenzyme*" (Judoamidjojo dkk., 1989). Ion kalsium ini penting untuk stabilitas dan aktivitas enzim. Afinitas ion kalsium pada α -amilase lebih kuat dari kation-kation lain. Masih belum jelas apakah ion kalsium dapat diganti oleh kation-kation lain (Vihinen and Mantsala, 1989).

Mekanisme kerja enzim α -amilase pada amilosa dibagi dalam dua tahap, pertama degradasi secara cepat molekul amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Pada tahap ini terjadi penurunan kekentalan dengan cepat. Tahap kedua, degradasi α -amilase pada amilosa menghasilkan glukosa dan

maltosa dengan laju lebih lambat dan tidak secara acak (Winarno, 1995).

Aktivitas α -amilase dapat diukur berdasarkan penurunan kadar pati yang larut, kadar dekstrin yang terbentuk, dan pengukuran viskositas atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Judoamidjojo dkk., 1989).

Pati bereaksi secara kimiawi dengan iodium, reaksi ini terlihat sebagai warna biru-kehitaman. Warna biru-kehitaman ini terjadi bila molekul iodium masuk ke dalam bagian yang kosong pada molekul zat pati (amilosa) yang berbentuk spiral. Proses iodinisasi zat pati menghasilkan molekul yang mengabsorpsi semua cahaya, kecuali warna biru. Bila zat pati ini telah diuraikan menjadi maltosa atau glukosa, warna biru ini tidak terjadi karena tidak adanya bentuk spiral (Lay, 1994).

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan mengukur penurunan kadar pati yang larut dengan menggunakan substrat jenuh. Kejenuhan pati berpengaruh terhadap laju reaksi enzimatik. Apabila larutan pati terlalu jenuh maka enzim sulit terdifusi ke dalam larutan sehingga kerja enzim akan terhambat (Winarno, 1995).

α -amilase (α -1,4 glukon maltohidrolase), memutus dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung nonpereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glikosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4 dengan menginversi konfigurasi posisi atom C (1) atau atom C nomor 1 molekul glukosa dari menjadi . Enzim α -amilase memiliki pH optimum antara 5-6 (Judoamidjojo dkk., 1989).

Gamma amilase (γ -amilase), EC.3.2.1.3. disebut juga glukon 1,4- β -glukosidase, amiloglukosidase, ekso-1,4- β -glukosidase, lisosomal β -glukosidase, glukoamilase, 1,4- β -D-glukan glukohidrolase. Merupakan pemutus terakhir ikatan glikosida pada bagi ujung nonreduksi dari amilosa dan amilopektin untuk menghasilkan unit glukosa.

Pullulanase, EC.3.2.1.41. merupakan enzim pemutus cabang, menghidrolisis hanya pada ikatan β -1,6 glikosida, seperti pullulan 6-glukanohidrolase. β -Glukosidase, EC.3.2.1.20. Memutus ikatan β -1,4 glikosida dari molekul amilosa ataupun amilopektin menjadi rantai-rantai pendek oligosakarida (Hagihara *et al.*, 2001).

Berdasarkan arah memutusnya ikatan glikosida dari amilum, maka enzim amilase dapat dikategorikan menjadi 2 kelompok (Reddy *et al.*, 2003) yaitu endoamilase dan ektoamilase. Endoamilase melakukan hidrolisis secara acak dari bagian depan molekul amilum sehingga menghasilkan molekul oligosakarida dalam bentuk rantai lurus maupun bercabang dengan panjang rantai yang bervariasi sedangkan ektoamilase melakukan hidrolisis dari ujung nonreduksi dan dengan produk akhir molekul yang pendek.

Enzim amilase secara konstitusi merupakan kelompok enzim yang sangat dibutuhkan dalam bidang industri, dengan pangsa pasar mencapai hampir 25% dari pasaran enzim di dunia (de Carvalho *et al.*, 2008). Penggunaan enzim amilase dalam industri sangat luas mulai dari industri pembuatan roti, sirup, pemanis, campuran oligosakarida, dekstrin, industri tekstil, pembuatan etanol,

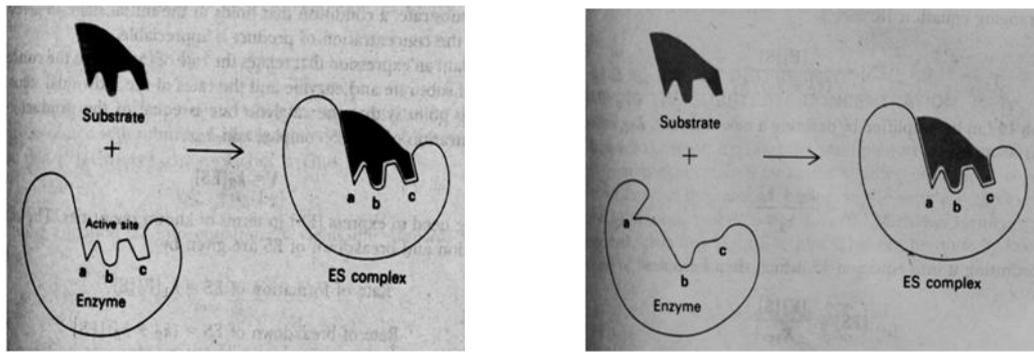
pengujian limbah cair yang mengandung amilum, industri detergen, industri obat dan suplemen enzim (Palmer, 1985).

2. Fungsi dan Cara Kerja Enzim

Enzim adalah satu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Dimana suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Seperti katalis lainnya enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Saat berlangsungnya reaksi enzimatik terjadi ikatan sementara antara enzim dengan substrat (reaktan). Ikatan sementara ini bersifat labil dan hanya untuk waktu yang singkat saja. Selanjutnya ikatan enzim-substrat akan pecah menjadi enzim dan hasil akhir. Enzim yang terlepas kembali setelah reaksi dapat berfungsi lagi sebagai biokatalisator untuk reaksi yang sama. Enzim bekerja dengan dua cara, yaitu menurut Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dan Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*).

Menurut teori kunci-gembok, terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan situs aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat.



Gambar 1. Pembentukan kompleks enzim-substrat berdasarkan Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dan Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*).

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 situs aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Murray *et al.*, 1997).

3. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Reaksi Enzimatik

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik, antara lain:

a) Substrat (reaktan)

Kecepatan reaksi enzimatik umumnya dipengaruhi kadar substrat.

Penambahan kadar substrat sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang tetap, akan mempercepat reaksi enzimatik sampai mencapai maksimum. Penambahan substrat selanjutnya tidak akan menambah kecepatan reaksi (Orten and Neuhaus, 1970).

b) Suhu

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Kenaikan suhu sampai optimum akan diikuti pula oleh kenaikan kecepatan reaksi enzimatik. Kepekaan enzim terhadap suhu pada keadaan suhu melebihi optimum disebabkan terjadinya perubahan fisikokimia protein penyusun enzim. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu diatas 50 °C (Wolfe, 1993).

c) Keasaman (pH)

pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Daya katalisis enzim menjadi rendah pada pH rendah maupun tinggi, karena terjadi denaturasi protein enzim. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif (+) dan negatif (-). Aktivitas enzim akan optimum kalau terdapat keseimbangan antara kedua muatan. Pada keadaan asam cenderung bermuatan positif, dan pada keadaan basa cenderung bermuatan negatif, sehingga aktivitas enzim menjadi berkurang atau bahkan menjadi tidak aktif. pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama (Orten and Neuhaus, 1970).

d) Penghambat enzim (Inhibitor)

Inhibitor enzim adalah zat atau senyawa yang dapat menghambat enzim. Ada beberapa cara penghambatan enzim, seperti penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (*feed back inhibitor*), dan penghambat alosterik (Wolfe, 1993).

e) Waktu inkubasi

Waktu yang diperlukan oleh enzim untuk bereaksi secara optimum dengan produk tidaklah seragam, ada beberapa yang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk bereaksi (Orten and Neuhaus, 1970).

B. Mikroorganisme

Sel merupakan unit struktural dan fungsional organisme hidup. Organisme terkecil terdiri dari sel tunggal. Terdapat berbagai jenis sel yang amat bervariasi dalam ukuran, bentuk, dan fungsi khususnya. Ada dua kelas utama sel, yaitu sel prokariot dan sel eukariot (Albert *et al.*, 1994). Sel yang paling tua dikenal sebagai prokaryotis (dari kata “pro” yang artinya sebelum, dan “karyon” yang artinya nukleus). Golongan ini terdiri dari dua golongan utama yaitu bakteri dan sianobakteri (alga hijau-biru), dimana molekul nukleid terdapat secara langsung pada sitoplasma tanpa ada sistem membran yang memisahkannya sebagai kompartemen yang terpisah (Wolfe, 1993).

Sel prokariot memiliki struktur yang sederhana, pertumbuhan selnya mudah dan cepat, serta mekanisme yang relatif sederhana dalam proses reproduksi. Sel prokariot bereproduksi dengan cara aseksual yang sangat sederhana. Organisme ini tumbuh hingga ukurannya berlipat ganda, kemudian membelah diri menjadi sel anak yang identik (Lehninger, 1988).

1. Nutrien Mikroba

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 CO₂ atau senyawa seperti gula, pati, dan karbohidrat lain. Kebutuhan akan nitrogen dapat dipenuhi oleh NH₄⁺ atau senyawa nitrat organik/anorganik. Untuk pertumbuhan normal mikroorganisme membutuhkan ion logam yang berfungsi sebagai kofaktor (Suhartono, 1989).

Histidin, ditiotreitol dan merkaptoetanol merupakan senyawa yang berperan sebagai kofaktor enzim ini. Selain itu beberapa logam juga dapat berperan sebagai kofaktor antara lain Ca²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, dan Fe²⁺. Sedangkan Hg²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Rb²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Cd²⁺ dan Ni²⁺ merupakan inhibitor enzim -amilase (Schomburg and Salzmann, 1991).

2. Fase Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan mikroorganisme untuk menghasilkan produk tertentu mempunyai siklus pertumbuhan tertentu tergantung produk yang akan dihasilkan. Fase pertumbuhan mikroorganisme dibagi menjadi empat diantaranya fase lag, fase esponensial, fase stasioner, dan fase menurun (kematian) (Dwidjoseputro, 1987).

a. Fase lag

Pada fase ini mikroorganisme melakukan metabolisme mempersiapkan adaptasi dengan lingkungan barunya. Pada fase ini

belum terjadi pembelahan sel dan berlangsung cepat atau lambat tergantung jenis mikroorganisme dan inokulum serta kondisi lingkungan.

b. Fase eksponensial

Pada fase ini sel akan membelah diri sampai mencapai jumlah maksimum sesuai dengan kondisi lingkungannya. Saat ini mikroorganisme mengalami pertumbuhan yang tertinggi tetapi tidak berlangsung sama karena pertumbuhan dibatasi oleh jumlah nutrisi dan penimbunan zat racun sebagai hasil metabolisme sekunder.

c. Fase stasioner

Pada fase ini pertumbuhan mikroorganisme seimbang dengan kematiannya. Pertumbuhan mikroorganisme terhenti dan terjadi akumulasi produk di dalam sel atau media fermentasi. Dengan terakumulasinya produk pada media fermentasi akan mengganggu proses sintesis enzim. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan kimia.

d. Fase menurun (fase menuju kematian)

Pada fase ini sebagian mikroorganisme mulai mengalami kematian. Jumlah sel yang mati semakin lama akan semakin banyak, dan kecepatan kematian dipengaruhi oleh kondisi nutrisi, lingkungan, dan jenis jasad renik.

3. Amilase dari Mikroorganisme

Enzim yang digunakan untuk keperluan industri sebagian besar diisolasi dari mikroba. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan. Keuntungan itu antara lain sel mikroba lebih mudah untuk ditumbuhkan dan kecepatan pertumbuhannya relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan apabila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif lebih murah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya perubahan musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih singkat (Poernomo, 2003).

Amilase secara umum diproduksi oleh tumbuhan, hewan, manusia dan mikroba, tetapi enzim amilase yang berasal dari fungi dan bakteri mendominasi penggunaan enzim amilase di bidang industri. Beberapa dari jenis *Bacillus sp.* dan *Actinomycetes*, termasuk *Termomonospora* dan *Thermoactinomycetes* merupakan kelompok yang memiliki kemampuan besar dalam memproduksi enzim amilase. *Bacillus licheniformis* memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim amilase dalam kondisi lingkungan yang bersifat alkalis (Reddy *et al.*, 2003). Enzim amilase yang dihasilkan oleh mikroba terutama dari bakteri, merupakan jenis enzim ekstraseluler (Palmer, 1985).

Bakteri menghasilkan enzim ekstraseluler di dalam sel dan menggunakannya di luar sel, yaitu untuk menghidrolisis sumber makanan yang mengandung amilum yang terdapat di lingkungannya. Molekul amilum tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri karena ukurannya sangat besar, karena itu molekul amilum dihidrolisis

terlebih dahulu oleh enzim amilase ekstraselular menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana dan kecil ukuran molekulnya. Molekul hasil hidrolisis amilum oleh enzim amilase tersebut selanjutnya akan diangkut masuk ke dalam sel bakteri dan digunakan sebagai sumber karbon bagi aktivitas pertumbuhan dan kehidupannya (Benson, 1994).

Enzim amilase ekstraseluler yang dihasilkan bakteri maupun fungi tersebut dimanfaatkan sebagai katalisator dalam industri maupun untuk keperluan dalam bidang kesehatan. Untuk mendapatkan enzim amilase dari mikroba tersebut maka kultur mikroba yang memproduksi enzim amilase ekstraseluler tersebut disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan yang mengandung enzim amilase ekstraselular (Palmer, 1985).

4. Amilum

Amilum adalah polimer karbohidrat dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Karbohidrat golongan polisakarida ini banyak terdapat di alam, terutama pada sebagian besar tumbuhan. Amilum dalam bahasa sehari-hari disebut juga pati terdapat pada umbi, daun, batang dan biji-bijian. Amilum merupakan kelompok terbesar karbohidrat cadangan yang dimiliki oleh tumbuhan sesudah selulosa (Liu, 2005). Butir-butir pati apabila diamati dengan mikroskop ternyata berbeda-beda bentuknya dan ukurannya tergantung dari tumbuhan apa pati tersebut diperoleh (Poedjiadi, 1994).

Amilum disusun oleh dua kelompok polisakarida yaitu amilosa, kira kira 20–28% dan amilopektin sebagai sisanya (Poedjiadi, 1994). Baik amilosa maupun

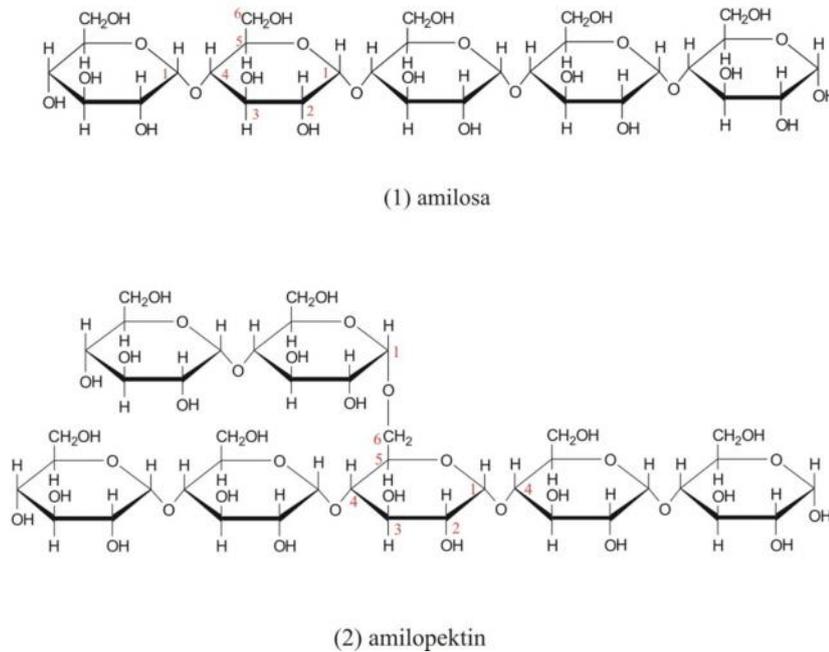
amilopektin memiliki monomer yang sama yaitu molekul glukopiranososa. Amilosa terdiri dari 100-10000 unit D-glukopiranososa permolekulnya, yang tiap unitnya berikatan lewat ikatan α -1,4 glikosida (Liu, 2005). Tiap rantai polimer molekulnya memiliki satu ujung gula tereduksi dan satu ujungnya lagi gula nonreduksi sehingga molekul amilosa merupakan rantai terbuka (Poedjiadi, 1994).

Amilosa merupakan bagian terdepan dari rantai amilum, bersifat larut dalam air yang dipanaskan dan dapat membentuk endapan dalam air, yang sifatnya tidak dapat balik (Aiyer, 2005). Amilopektin merupakan rantai molekul polisakarida yang memiliki banyak percabangan. Molekul D-glukopiranososa yang menjadi unit monomernya yang berikatan lewat ikatan α -1,4 glikosida seperti pada amilosa yang membentuk rantai lurus dan ikatan α -1,6 glikosida yang membentuk percabangan pada rantai amilopektin tersebut (Murray *et al.*, 2003).

Molekul amilopektin lebih besar dari molekul amilosa dengan berat moleklunya berkisar antara 106–109 g permolnya (Liu, 2005). Molekul amilosa merupakan molekul yang larut dalam air dan memberikan warna biru apabila tercampur dengan larutan iodin, sedang amilopektin merupakan molekul yang tidak larut dalam air dan akan kelihatan berwarna merah bila terkena iodin (Sale, 1961).

Butir-butir pati tidak larut dalam air dingin, tetapi apabila suspensi dalam air dipanaskan terbentuk suatu larutan koloid yang kental. Bila pati dipanaskan dan didilusi dengan asam, pati akan terhidrolisis menjadi dekstrin, maltosa dan D-glukosa (Sale, 1961). Semua hasil hidrolisis ini memiliki sifat yang larut dalam air. Hidrolisis dari pati juga dapat terjadi dengan bantuan enzim amilase yang

akan mengubah amilum menjadi maltosa dalam bentuk -maltosa (Poedjadi, 1994).



Gambar 3. Struktur Kimia dari (1) Amilosa dan (2) Amilopektin

Dalam kehidupan manusia amilum berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat, disamping 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 (Liu, 2005).