

II. TINJAUAN PUSTAKA

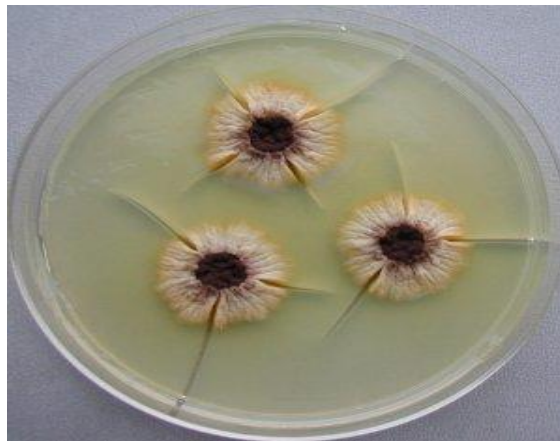
A. *Aspergillus aculeatus*

Sebagai anggota umum dari komunitas mikroba yang ditemukan di tanah, dengan beragam enzim hidrolitik dan oksidatif yang terlibat dalam pemecahan lignoselulosa tanaman, spesies *Aspergillus* merupakan sumber penting dari enzim dan memainkan peran penting dalam siklus karbon global. Penemuan domain peraturan di daerah *non-coding* gen fluks karbon penting ini akan membantu untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi "sirkuit" yang terlibat dalam siklus karbon. Selanjutnya, spesies *Aspergillus* adalah model penting untuk studi sekresi protein eukariotik, efek dari berbagai faktor lingkungan yang memicu ekspor biomassa beragam enzim, mekanisme molekul penting untuk pengembangan proses fermentasi, dan mekanisme yang terlibat dalam pengendalian morfologi jamur.

Aspergillus aculeatus adalah spesies yang sering diisolasi dari tanah dan buah busuk. Spesies *Aspergillus* mempunyai spora berwarna hitam, kriteria morfologi seperti warna, bentuk, ukuran, dan ornamen dari konidia telah digunakan untuk mengklasifikasikan strain. Namun, aspergilli hitam ini bervariasi secara signifikan dalam karakteristik morfologi dan fisiologis, dan identifikasi isolasi memerlukan

teknik identifikasi molekuler dan biokimia. Isolat *Aspergillus aculeatus* telah digunakan untuk menghasilkan sejumlah enzim industri yang penting (selulase, hemisellulase, protease) yang digunakan secara komersial dalam industri makanan dan pakan (Wikipedia, 2011).

Gambar 1. *Aspergillus aculeatus* pada medium PDA (Potato Dextrose Agar)



Aspergillus aculeatus secara taksonomi termasuk ke dalam *Aspergillus section Nigri* (Samson *et al.*, 2006). *Aspergillus* sendiri memiliki paling sedikit empat section, yaitu, *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati* dan *Nigri*. Setiap section memiliki jumlah spesies yang bervariasi. Tabel .1 menunjukkan beberapa spesies *Aspergillus section Nigri*.

<i>Aspergillus homomorphus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus niger</i>	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+/-
<i>Aspergillus piperis</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus sclerotioniger</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus tubingensis</i>	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus vadensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-

N- -P= Naphtho- -pyrones; Asp= asperazine; SeD= asam secaloniati; Ant= antafumicin; Afl= aflavinines; Cor= corymbiferanlactones; Kot= kotanins (kotanin, desmethylkotanin, orlandin).

B. Enzim

Enzim adalah biokatalis yang dihasilkan oleh jaringan yang akan meningkatkan laju reaksi kimia yang berlangsung di jaringan (Montgomery, 1993). Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan yang teratur, mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrient, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimawi dan yang membuat makromolekul sel (Lehninger, 1982).

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 sintentik 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 dan 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 (Junita, 2002).

Enzim sebagai biokatalis telah dapat diaplikasikan secara komersil untuk proses – proses industri, antara lain industri pangan, medis (diagnosis), kimia dan farmasi (Junita, 2002). Untuk dapat digunakan dalam industri, enzim harus memiliki kondisi yang dibutuhkan dalam proses industri, seperti kestabilan pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrim (Goddete *et al*, 1993). 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). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1997).

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).

3. 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).

4. 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 mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH antara 4,5 – 8,0 (Winarno, 1982).

5. 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 dan enzim tidak mempunyai fungsi katalitik lagi disebut inhibisi kompetitif. Jika inhibitor terikat pada

sisi lain enzim sehingga memperlambat kerja enzim, disebut inhibisi nonkompetitif. Sedangkan inhibitor yang tidak menghalangi terbentuknya kompleks enzim–substrat, tetapi menghalangi reaksi selanjutnya, disebut inhibisi unkompetitif.

6. Waktu inkubasi

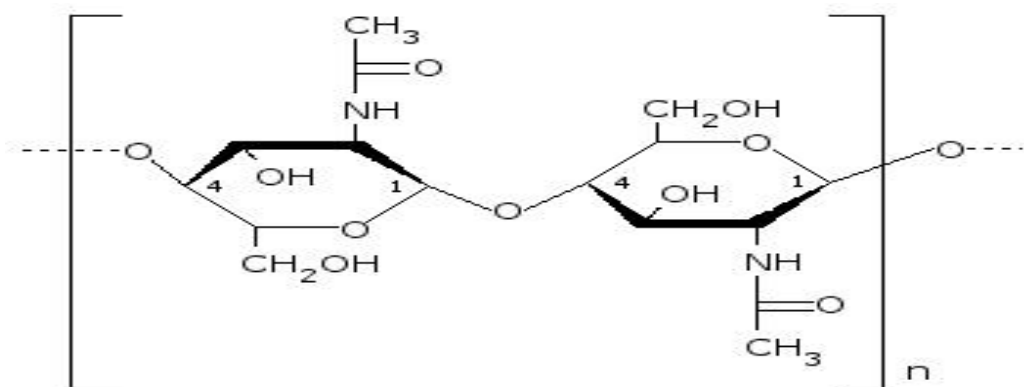
Setiap enzim membutuhkan waktu inkubasi tertentu untuk dapat bereaksi secara optimum dengan substrat hingga menghasilkan produk.

C. Kitin

Kitin adalah polisakarida struktural yang digunakan untuk menyusun eksoskeleton dari artropoda (serangga, laba-laba, krustase dan hewan-hewan lain sejenis). Kitin tergolong homopolisakarida linear yang tersusun atas residu N-asetilglukosamin pada rantai beta dan memiliki monomer berupa molekul glukosa dengan cabang yang mengandung nitrogen. Kitin murni mirip dengan kulit, namun akan mengeras ketika dilapisi dengan garam kalsium karbonat. Kitin membentuk serat mirip selulosa yang tidak dapat dicerna oleh vertebrata. Kitin merupakan polimer yang paling melimpah di laut. Sedangkan pada kelimpahan di muka bumi, kitin menempati posisi kedua setelah selulosa. Hal ini karena kitin dapat ditemukan di berbagai organisme eukariotik termasuk serangga, moluska, krustase, fungi, alga, dan protista.

Selain terdapat pada antropoda, kitin juga terdapat pada cendawan yaitu komponen struktural utamanya dinding sel khamir dan cendawan berfilamen.

Jumlah kitin pada khamir dan cendawan berfilamen cukup jauh berbeda. Kitin pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* mencapai 1-2% dari bobot kering dinding sel, sedangkan proporsi pada cendawan berfilamen bervariasi antara 10-30% dari bobot kering dinding sel (Hirano, 1986). Gambar .2 di bawah adalah struktur kitin.

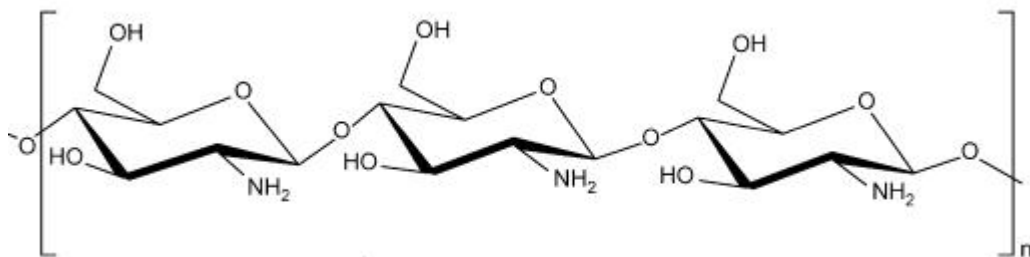


D. Kitosan

Kitosan merupakan produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin. Kitosan mempunyai rumus molekul $(C_6H_{11}NO_4)_n$. Pertama kali kitosan dibuat dari kitin dengan pencampuran kitin dan KOH pada 180°C oleh Hoppe-Seyler tahun 1984. Kitosan yang dihasilkan tersebut larut dalam larutan asam asetat. Selain itu, Muzzarelli (2000) melaporkan bahwa

kitosan juga larut dalam asam format, asetat, sitrat, piruvat dan laktat, tidak larut dalam air, larutan basa kuat, asam sulfat, beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dimetilformamida dan dimetilsulfoksida, dan sedikit larut dalam asam klorida, asam nitrat dan 0,5% asam fosfat .

Kitosan merupakan senyawa turunan kitin yaitu β -(1,4)-glukosamin (2-amino-2-deoksi-D-glukosa) dan memiliki bobot molekul berkisar $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Da lebih rendah dari bobot molekul kitin yaitu $1,036 \times 10^6 - 2,5 \times 10^6$ Da (Peter, 1995). Kitosan banyak terdapat pada dinding sel jamur terutama pada ordo *Murocales* yang sebagian besar penyusun komponen dinding selnya adalah kitosan dan pada *Saccharomyces cerevisiae*, kitosan merupakan penyusun utama pada askapora. (Chaplin, 1990). Gambar.3 merupakan struktur kitosan.



Kitosan banyak digunakan di berbagai bidang. Sebagai bahan pendukung pengikat enzim, penggunaan kitosan terbesar yaitu pada bidang industri makanan, farmasi dan kosmetik. Pemanfaatan kitosan sebagai bahan pendukung dikarenakan kitosan mempunyai kelebihan diantaranya merupakan senyawa biopolimer yang dapat terdegradasi dan tidak mencemari lingkungan, tidak bersifat toksik.

E. Kitin Deasetilase

Kitin deasetilase termasuk kelompok enzim–enzim kitinolitik, mengkatalisis reaksi hidrolisis gugus asetamido dari residu N-asetil-D-glikosamin dari kitin.

Penamaan dari komisi enzim untuk enzim ini adalah E.C.3.5.1.41, menunjukkan karakteristik enzim sebagai hidrolase yang bertindak pada ikatan karbon–nitrogen yang bukan ikatan peptida, pada amida linier (Tsigos *et al.*, 2000).

Kitin deasetilase merupakan glikoprotein yang disekresikan ke daerah periplasma atau ke dalam media pembiakan (Martinou *et al.*, 1995). Kitin deasetilase memiliki aktivitas optimum pada suhu sekitar 50°C pada pH yang beragam, bergantung pada mikroorganismenya. Umpamanya, kitin deasetilase yang berasal dari *M. rouxii* optimum pada pH sekitar 4,5 (Kafetzopoulos, 1993), sedangkan yang berasal dari *Aspergillus nidulans* optimum pada pH 7,0 (Alfonso *et al.*, 1995). Enzim lain yang aktivitasnya sama ialah lisozim yang terdapat dalam putih telur (Kurita *et al.*, 2000).

Enzim pendeasetilasi kitin, bekerja mengkatalisis perubahan kitin menjadi kitosan, sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi kitosan melalui proses enzimatik. Pembuatan kitosan dengan menggunakan kitin deasetilase sangat menguntungkan sebab dapat menghasilkan molekul kitosan dengan derajat deasetilase yang lebih seragam dibandingkan dengan proses kimia biasa (Tokuyasu *et al.*, 1996).

Pembelajaran mengenai deasetilase kitin secara enzimatik dapat diawali dengan pengamatan proses perubahan kitin menjadi kitosan pada mikroba. Kandungan kitin dalam jamur atau bakteri sangat rendah, sehingga bahan tersebut saat ini belum lazim digunakan sebagai sumber kitin. Namun, penggunaan kitin dan kitosan dari dinding sel jamur atau fungi sebenarnya sangat berpotensi jika kultivasinya dilakukan dengan baik. Hal tersebut, disebabkan oleh laju

pertumbuhan mikroorganisme yang cepat, bahkan biomassa jamur dapat meningkat 2 kali lipat hanya dalam waktu 1-3 jam (Synowiecki dan Al-Khateeb, 2003).

Pada fungi, kitin deasetilase mempunyai dua peran biologis penting, yaitu dalam pembentukan dinding sel dan dalam interaksi fungi dengan tanaman. Dalam pembentukan dinding sel, kitin deasetilase bekerja berurutan dengan kitin sintase. Kitin sintase mempolimerasi gugus N-asetil-D-glukosamin dan kitin deasetilase memotong ikatan asetamido pada kitin. Disebabkan oleh peran inilah, kitin deasetilase pada fungi ditemukan pada permukaan bagian dalam dinding sel, yaitu di daerah periplasma (Tsigos *et al.*, 2000).

F. Sistem Fermentasi Padat

Fermentasi berasal dari kata latin “*fervere*” yang berarti mendidih yang menunjukkan adanya aktivitas pada ekstrak buah-buahan atau larutan malt biji-bijian. Kelihatan seperti mendidih karena terbentuknya gelembung-gelembung CO₂ akibat dari proses katabolisme secara anaerobik dari gula yang ada dalam ekstrak (M. Saban Tanyildizi *et al.*, 2007). . Fermentasi merupakan suatu reaksi reduksi-oksidasi dalam sistem biologi yang menghasilkan energi. Fermentasi dibagi menjadi 3, yakni:

1. Fermentasi permukaan
2. Sistem fermentasi cair
3. Sistem fermentasi padat

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode sistem fermentasi padat. Sistem fermentasi padat umumnya diidentikkan dengan pertumbuhan mikroorganisme dalam partikel pada substrat dalam berbagai variasi kadar air. Substrat padat bertindak sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral, dan faktor-faktor penunjang pertumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menyerap air, untuk pertumbuhan mikroba (M. Saban Tanyildizi *et al.*, 2007).

Mikroorganisme yang tumbuh melalui sistem fermentasi padat berada pada kondisi pertumbuhan di bawah habitat alaminya, mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan enzim dan metabolisme yang lebih efisien dibandingkan dengan sistem fermentasi cair. Sistem fermentasi padat memiliki lebih banyak manfaat dibandingkan dengan sistem fermentasi cair, diantaranya tingkat produktivitasnya tinggi, tekniknya sederhana, biaya investasi rendah, kebutuhan energi rendah, jumlah air yang dibuang sedikit, recovery produknya lebih baik, dan busa yang terbentuk sedikit. Sistem fermentasi padat ini dilaporkan lebih cocok digunakan di negara-negara berkembang. Manfaat lain dari sistem fermentasi padat adalah murah dan substratnya mudah didapat, seperti produk pertanian dan industri makanan (M. Saban Tanyildizi dkk, 2007). Enzim yang melalui proses sistem fermentasi padat baik yang belum dimurnikan atau yang dimurnikan secara parsial dapat diaplikasikan di industri (seperti pektinase digunakan untuk klarifikasi jus buah, alpha amilase untuk sakarifikasi pati). Murahnya harga residu pertanian dan agro-industri merupakan salah satu sumber yang kaya akan energi yang dapat digunakan sebagai substrat dalam sistem fermentasi padat. Fakta menunjukkan bahwa residu ini merupakan salah satu reservoir campuran karbon terbaik yang ada di alam. Dalam sistem fermentasi padat, substrat padat tidak hanya menyediakan nutrisi bagi kultur tetapi juga sebagai tempat penyimpanan air untuk sel mikroba (M. Saban Tanyildizi dkk, 2007). Komposisi dan konsentrasi dari media dan kondisi fermentasi sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan produksi enzim ekstraseluler dari mikroorganisme. Biaya dan ketersediaan substrat merupakan faktor yang penting untuk dipertimbangkan, dan karena itulah pemilihan substrat padat memegang peranan penting dalam menentukan efisiensi

pada proses sistem fermentasi padat. Untuk biaya analisa awal, kira-kira 60 dan 50% untuk biaya medium fermentasi dan pengaturan proses *down-stream*.

Sehingga dapat diketahui bahwa sistem fermentasi padat cocok untuk pengembangan fungi dan tidak cocok untuk proses kultur bakteri karena membutuhkan air yang lebih banyak (M. Saban Tanyildizi dkk, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan fungi :

a. Konsentrasi substrat

Substrat merupakan sumber nutrisi utama bagi fungi. Nutrien-nutrien baru dapat dimanfaatkan sesudah fungi mengekskresi enzim-enzim ekstraselular yang dapat mengurai senyawa-senyawa kompleks dari substrat tersebut menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Indrawati Gandjar, 2006).

b. Sumber nitrogen

Bahan yang banyak sebagai sumber nitrogen adalah ammonium nitrat, ammonium sulfat, dan urea. Nitrogen diperlukan dalam proses fermentasi karena dapat mempengaruhi aktivitas dari *Aspergillus section Nigri* (Narasimha G *et al.*, 2006).

c. Fosfat

Kebutuhan fosfat dalam proses pertumbuhan fungi tidak banyak dijelaskan tetapi keseimbangan antara mangan, seng, dan fosfat merupakan salah satu faktor penentu dalam beberapa kasus dimana terjadi kontaminasi ion logam

tertentu maka adanya fosfat dapat memberikan keuntungan (Indrawati Gandjar, 2006).

d. Magnesium

Magnesium berfungsi sebagai kofaktor dalam mengatur jumlah enzim yang terlibat dalam reaksi. Dalam sel konsentrasi optimal dari penambahan magnesium adalah 0,002-0,0025% (Indrawati Gandjar, 2006).

e. Aerasi

Dalam media fermentasi padat, aerasi diatur dengan cara memperhatikan pori-pori bahan yang difermentasikan (Indrawati Gandjar, 2006). Aerasi berfungsi untuk mempertahankan kondisi aerobik untuk desorpsi CO₂, mengatur temperatur substrat, dan mengatur kadar air (Prior *et al.*, 1980). Aerasi yang diberikan juga membantu menghilangkan sebagian panas yang dihasilkan sehingga temperatur dapat dipertahankan pada temperatur optimal untuk produksi enzim (Abdul Aziz Darwis *et al.*, 1995).

Tingkat aerasi optimal yang diberikan dipengaruhi oleh sifat mikroorganisme yang digunakan. Tingkat O₂ yang dibutuhkan untuk sintesis produk, jumlah panas metabolik yang harus dihilangkan dari bahan, ketebalan lapisan substrat, tingkat CO₂, dan metabolit-metabolit lain yang mudah menguap harus dihilangkan, dan tingkat ruang udara yang tersedia di dalam substrat (Lonsane *et al.*, 1985).

f. pH

pH substrat sangat penting untuk pertumbuhan fungi, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai suatu substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu.

Umumnya fungi menyukai pH di bawah 7. Jenis-jenis khamir tertentu bahkan tumbuh pada pH yang cukup rendah, yaitu pH 4,5 – 5,5. Pengaturan pH sangat penting dalam industri agar fungi yang ditumbuhkan menghasilkan produk yang optimal, misalnya pada produksi asam sitrat, produksi enzim, produksi antibiotik, dan juga untuk mencegah pembusukan bahan pangan (Indrawati Gandjar, 2006).

g. Temperatur inkubasi

Berdasarkan kisaran suhu lingkungan yang baik untuk pertumbuhan, fungi dapat dikelompokkan sebagai fungi psikrofil, mesofil, dan termofil. Pengetahuan tentang kisaran temperatur pertumbuhan suatu fungi sangat penting, terutama bila isolat-isolat tertentu akan digunakan di industri. Misalnya, fungi yang termofil atau termotoleran (*Candida tropicalis*, *Paecilomyces variotii*, dan *Mucor miehei*), dapat memberikan produk yang optimal meskipun terjadi peningkatan temperatur, karena metabolisme fungsinya, sehingga industri tidak memerlukan penambahan alat pendingin (Indrawati Gandjar, 2006).

h. Waktu fermentasi

Pada awal fermentasi aktivitas enzim masih sangat rendah. Aktivitas enzim akan meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi dan menurun pada hari ke-10. Hal ini mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme yang mengalami beberapa fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian (Abdul Aziz Darwis *et al.*, 1995). Organisme pembentuk spora biasanya memproduksi enzim pada fase pasca eksponensial. Jadi dapat diduga bahwa pada saat aktivitas enzim yang dihasilkan tinggi, maka kapang telah

berada pada fase tersebut (Suhartono, 1989). Pada temperatur 31°C aktivitas tertinggi diperoleh setelah hari ke-5 fermentasi, akan tetapi pada hari ke-6 mengalami penurunan aktivitas enzim dan pada hari ke-8 mengalami kenaikan kembali (Abdul Aziz Darwis *et al.*, 1995).

G. Isolasi , Pemurnian Enzim, dan Uji Kadar Protein

1. Isolasi enzim

Produksi enzim dari mikroba menunjukkan berbagai keuntungan dibandingkan dengan produksi dari sumber non-mikroba. Produksi enzim mikroba dapat ditingkatkan pada skala besar dalam ruang yang relatif terbatas. Teknik budidaya mikroba memang lebih canggih dibandingkan dengan produksi enzim dari hewan atau tanaman. (Suhartono, 1989).

Produksi enzim dari mikroba menunjukkan sifat dan ciri lain. Mikroba dalam hal ini sengaja ditenakkan untuk menghasilkan produk enzim. Teknologi pertumbuhan dan faktor lingkungan yang mempengaruhi enzim akan memberikan produk paling baik. Pengetahuan akan kebutuhan nutrisi tertentu, formulasi media, pH, suhu, kemungkinan adanya penghambatan, penambahan senyawa pemacu dan faktor-faktor lain bagi mikroba spesifik, besar artinya dalam meningkatkan mutu produk maupun kuantitasnya (Suhartono, 1989). Isolasi kultur adalah suatu kegiatan pemisahan suatu kultur mikroorganisme khas dari campuran biakan beberapa jenis mikroorganisme yang terdapat di alam, sedangkan kultivasi merupakan pertumbuhan populasi mikrobial pada lingkungan buatan, yakni suatu medium kultur dalam kondisi tertentu (Said, 1989).

Untuk mendapatkan produk enzim yang baik dan terpisah dari partikel-partikel pengotor lainnya yang akan mempengaruhi aktivitas enzim yang bersangkutan, maka metode pemisahan dilakukan pada produk sehingga akan didapatkan enzim yang memiliki tingkat kemurnian tinggi.

Metode pemisahan produk-produk biologis yang ideal meliputi empat tahap yaitu : (1) pemisahan bahan-bahan yang tidak dapat larut, dilakukan dengan cara filtrasi atau sentrifugasi; (2) isolasi produk, dilakukan dengan cara presipitasi, kromatografi, elektroforesis, maupun ultrafiltrasi; (4) polishing/tahap pembentukan produk, dilakukan dengan cara kristalisasi dan pengeringan.

Proses sentrifugasi digunakan untuk memisahkan campuran padat cair atau cair-cair. Bahan-bahan yang dimasukkan ke dalam alat diputar dengan kecepatan tinggi sehingga terkena pengaruh gaya sentrifugal, akibatnya butiran-butiran padat tertinggal pada dinding sekitar alat (Vollrath, 1984).

2. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Sebagian besar enzim berada dalam cairan sel sebagai protein terlarut. Enzim larut dalam larutan garam dengan konsentrasi 0,15 - 0,20 M dan pH netral. Kelarutan enzim tersebut merupakan hasil interaksi polar dengan pelarut dan gaya tolak-menolak antara molekul yang bermuatan sama. Penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat, atau amonium sulfat menimbulkan pengendapan protein yang disebut *salting out*. Pengendapan ini terjadi karena 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 hidrofobitasnya tinggi akan mengendap lebih dahulu, sedangkan protein yang memiliki sedikit residu non polar akan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang paling tinggi (Walsh dan Headon, 1994).

3. Dialisis

Dialisis merupakan suatu metode yang telah lama digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Metode ini berdasarkan pada sifat semipermeabel membran yang dapat menahan molekul-molekul kecil seperti garam. Proses dialisis berlangsung karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat bergantung pada temperatur dan viskositas larutan. Meskipun temperatur tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada temperatur 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

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 ini 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 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 kontinu sampai ion - ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993).

4. Penentuan kadar protein

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 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. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana 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.

H. Analisis Mutu Kitosan

1. Derajat Deasetilasi

Derajat deasetilasi kitosan dapat diukur dengan berbagai metode dan yang paling lazim digunakan adalah metode garis dasar spektroskopi IR transformasi Fourier (FTIR). Nilai yang digunakan untuk menghitung derajat deasetilasi sangat bergantung pada nisbah pita serapan yang digunakan untuk menghitungnya. Tiga nisbah yang diajukan adalah A1655/A2867, A1550/A2878, dan A1655/A3450. Dua nisbah pertama memberikn keakuratan pada % N asetilasi rendah, sedangkan A1655/A3450 lebih akurat pada % N asetilasi tinggi.

Penentuan DD dengan menggunakan spektroskopi FTIR dilakukan dengan cara sebagai berikut : kitosan dibuat menjadi pelet dengan KBr hingga membentuk suatu lapisan tipis transparan. Selanjutnya, serapan diukur dengan FTIR. Misalnya, Kitin yang terdeasetilasi sempurna (100%) menghasilkan nilai A1655 = 1,33. Dengan diperolehnya perbandingan absorbansi antara bilangan gelombang 1655 cm⁻¹ (serapan pita amida I) dan 3450 cm⁻¹ (serapan gugus hidroksil), maka % DD kitosan dapat dihitung sebagai berikut :

$$\% \text{ DD} = 1 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right] \times 100\%$$