

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. ENZIM

Enzim merupakan biokatalisator yang sangat efektif yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, dimana reaksi ini tanpa enzim akan berlangsung lambat (Lehninger, 1995). Sifat-sifat istimewa enzim adalah kapasitas katalitik dan spesifisitasnya yang sangat tinggi. Selain itu enzim mempunyai peran dalam transformasi berbagai jenis energi (Winarno, 1986). Enzim disusun oleh untaian asam amino yang panjang dan antar asam amino dihubungkan dengan ikatan peptida (Judoamidjojo dkk., 1992). Fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk mempercepat proses biokimia yang terjadi didalam sel maupun di luar sel (Poedjiadi, 1994). Kelebihan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalis sintetik lainnya antara lain: (1) enzim mempunyai spesifitas tinggi, (2) enzim bekerja secara spesifik, (3) tidak terbentuk produk samping yang tidak diinginkan, (4) mempunyai produktivitas yang tinggi, (5) produk akhir umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin, 2004).

Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam dua golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim disebut juga enzim intraseluler,

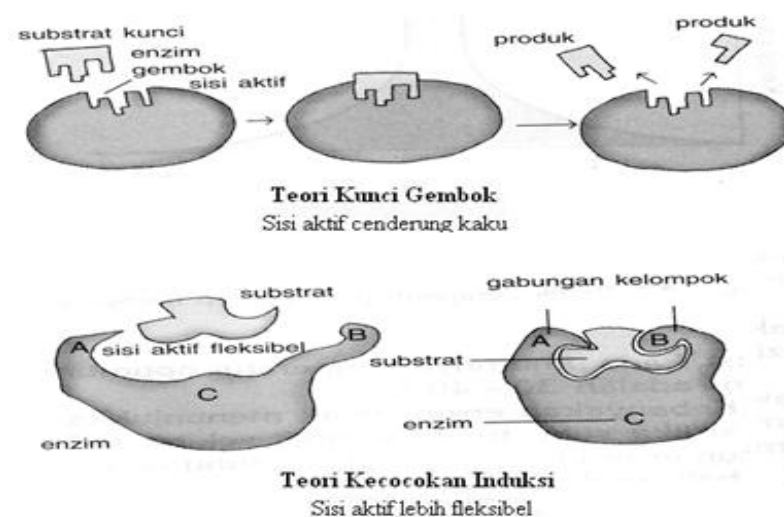
dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya (Soedigdo, 1988)

Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Kurnia, 2010).

1. Mekanisme reaksi enzim

Terikatnya substrat pada sisi aktif enzim menyebabkan berubahnya keadaan substrat sehingga berada dalam keadaan transisi dan akibatnya molekul substrat mengalami perubahan konformasi transisi yang diperlukan agar dapat diubah menjadi produk. Beberapa ion logam yang merupakan kofaktor juga membantu terjadinya ikatan substrat dengan enzim (Wheeler, 1994). Jika enzim telah melakukan pembentukan ikatan antara enzim dengan substrat dengan membentuk molekul kompleks enzim substrat, pembentukan molekul ini sangat dipengaruhi oleh bentuk sisi aktif enzim dan kespesifikan substrat.

Menurut Shahib (2005) ada dua teori yang mendukung dalam penjelasan pembentukan kompleks enzim substrat, teori pertama yang diajukan oleh Fisher yaitu teori Kunci dan Gembok / “*Lock and Key*” yang menjelaskan bahwa adanya kespesifikan enzim terhadap substrat tertentu yang bentuknya sesuai dengan sisi aktif enzim. Teori kedua adalah teori yang diajukan oleh Koshland yaitu teori “*Induced Fit*” yang menjelaskan bahwa substrat akan menginduksi suatu perubahan bentuk sisi aktif enzim sehingga dapat dengan mudah berikatan seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Teori “*Lock and Key*” dan “*Induced Fit*” (Shahib, 2005)

2. Penggolongan Enzim

Penamaan dan klasifikasi enzim secara sistematis, telah dikemukakan oleh suatu badan internasional yaitu CEIUB (*Commission on enzymes of the International Union of Biochemistry*). Dalam sistem ini enzim dibagi menjadi enam golongan utama.

Klasifikasi enzim secara internasional meliputi: nama golongan dan macam reaksi yang dikatalisisnya (Wirahadikusumah, 1989). Menurut Poedjadi (1994), enzim yang dibagi kedalam enam golongan tersebut digolongkan berdasarkan pada jenis reaksi yang dikatalisis, keenam golongan enzim tersebut yaitu :

a. Oksido-reduktase

Enzim yang berperan dalam reaksi oksidasi-reduksi. Enzim yang termasuk dalam golongan ini ada dua yaitu dehidrogenase dan oksidase. Contoh enzim dehidrogenase yaitu : alkohol dehidrogenase dan glutamat dehidrogenase. Contoh enzim oksidase yaitu : glukosa oksidase dan glisin oksidase

b. Transferase

Enzim yang berperan dalam reaksi pemindahan gugus tertentu. Contoh enzim yang termasuk golongan ini adalah metiltransferase, hidroksimetiltransferase dan aminotransferase.

c. Hidrolase

Enzim yang berperan dalam reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis enzim hidrolase, yaitu jenis yang memecah ikatan ester, memecah glikosida, dan yang memecah ikatan peptida. Contoh enzim hidrolase yaitu esterase, lipase, amilase, aminopeptidase, karboksiptidase, pepsin, tripsin, dan kimotripsin.

d. Liase

Enzim yang termasuk golongan ini mempunyai peranan penting didalam reaksi pemisahan suatu gugus dari suatu substrat (bukan cara hidrolisis)

atau sebaliknya. Contoh enzim golongan ini yaitu: dekarboksilase, aldolase, dan hidratase.

e. Isomerase

Enzim yang termasuk dalam golongan ini bekerja pada reaksi perubahan intramolekular misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa.

Contoh : ribulosafosfat epimerase, dan glukosafosfat isomerase.

f. Ligase

Enzim yang berperan pada reaksi penggabungan dua molekul, oleh karenanya enzim-enzim tersebut juga dinamakan *sintetase*. Ikatan yang terbentuk adalah ikatan C-O, C-S, C-N, atau C-C. Contoh: glutamin dan piruvat karboksilase.

3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas Enzim

a. Temperatur

Suhu inkubasi sangat mempengaruhi kerja dari enzim, suhu inkubasi yang lebih tinggi dari suhu optimum kerja enzim dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi sisi aktif enzim yang disebabkan adanya denaturasi protein enzim (Arbianto, 1989). Sebagian besar enzim terdenaturasi pada suhu diatas 50 °C (Wolfe, 1993). Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Pada suhu 0°C enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay and Sugyo, 1992).

b. pH (Derajat Keasaman)

pH (Derajat Keasaman) enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989). Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1989).

c. Konsentrasi Enzim

Kecepatan laju reaksi enzimatik berhubungan langsung antara konsentrasi enzim dengan substrat (Orten and Neuhaus, 1970). Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik, laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

d. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982).

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi

enzimatis. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono dan Soeharsono, 1997).

Menurut Wirahadikusumah (2001) 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 berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Winarno, 1989).

B. Kinetika reaksi enzimatik

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Mekanisme reaksi enzimatik untuk sebuah substrat tunggal. Enzim (E) mengikat substrat (S) dan menghasilkan produk (P).

Kinetika enzim menginvestigasi bagaimana enzim mengikat substrat dengan mengubahnya menjadi produk. (Shahib, 2005).

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Pada konsentrasi substrat yang amat rendah, kecepatan reaksi pun amat rendah, tetapi, kecepatan ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Pada batas kecepatan maksimum (V_{maks}), enzim menjadi jenuh oleh substratnya, dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1990).

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).

Michaelis dan Menten mendefinisikan suatu tetapan, yang dinyatakan sebagai K_M yang bermanfaat dalam menyatakan hubungan yang tepat di antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik. Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Nilai K_M merupakan unsur kunci di dalam persamaan Michaelis-Menten dan bersifat khas bagi setiap enzim dengan menggunakan substrat tertentu yang spesifik pada kondisi pH dan temperatur tertentu (Kurnia, 2010).

Persamaan Michaelis-Menten secara matematika dinyatakan dalam persamaan berikut ini :

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_M + [S]}$$

V_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat $[S]$

V_{maks} = kecepatan maksimum

K_m = tetapan Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu

Persamaan tersebut merupakan persamaan kecepatan bagi suatu reaksi enzimatik satu substrat, merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal (V_0), kecepatan maksimum (V_{maks}) dan konsentrasi substrat awal yang dihubungkan melalui tetapan Michaelis-Menten (K_m)

Persamaan yang diturunkan oleh Michaelis dan Menten, berawal dari hipotesis dasar bahwa tahap pembatas kecepatan di dalam reaksi enzimatik adalah tahap penguraian kompleks ES, menjadi produk dan enzim bebas. Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar bagi semua aspek kinetika kerja enzim (Lehninger, 1990).

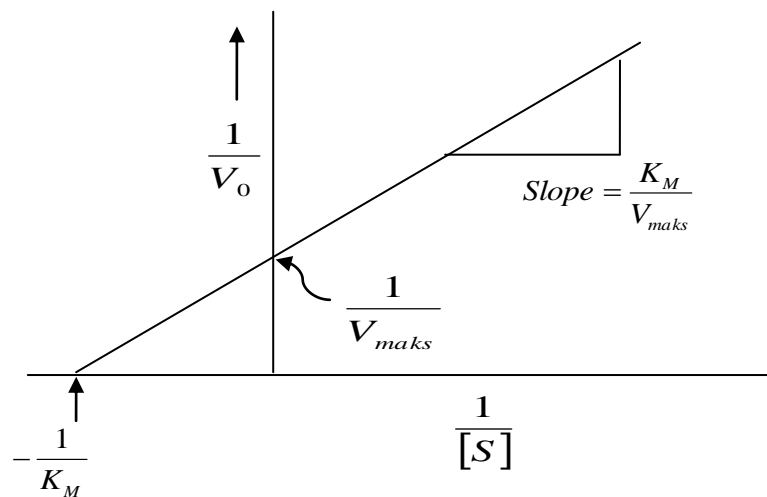
Persamaan Michaelis-Menten dapat ditransformasi secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih umum digunakan untuk memetakan data percobaan. Transformasi yang umum digunakan adalah dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, sehingga diperoleh hubungan :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]}$$

Persamaan ini disederhanakan menjadi :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Persamaan ini dikenal dengan persamaan Lineweaver-Burk. Bagi enzim-enzim yang mengikuti hubungan Michaelis-Menten secara benar, pemetaan $1/v_0$ terhadap $1/[S]$ menghasilkan garis lurus (Gambar 2). Garis ini akan memiliki sudut k_m/v_{maks} , perpotongan garis terhadap sumbu y sebesar $1/v_{maks}$ (pada sumbu $1/v_0$) dan perpotongan $-1/k_m$ pada sumbu $1/[S]$ (Lehninger, 1990).



Gambar 2. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989)

C. Stabilitas Enzim

Menurut Kazan et al., (1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi –kondisi nonfisiologis lainnya.

Dalam melakukan aktivitasnya, enzim dipengaruhi oleh lingkungan. Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim sehingga menjadi masalah yang sering dihadapi dalam industri. Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa), pengaruh temperatur dan pH

ekstrim. Terdapat dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil. Menurut Saktiwansyah (2001), peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara imobilisasi enzim, modifikasi kimia, *protein engineering*, dan memperlakukan enzim pada kondisi air yang terbatas (dalam pelarut organik).

1. Pengaruh Temperatur Tinggi (Stabilitas Termal)

Enzim merupakan makromolekul yang peka terhadap lingkungannya. Dengan demikian harus ditangani dengan sangat hati-hati agar sifat-sifatnya dapat dipertahankan, kecuali enzim termostabil yang dapat aktif pada suhu tinggi. Umumnya, semakin tinggi temperatur, semakin naik laju reaksi baik yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim. Namun demikian, enzim merupakan senyawa protein yang sangat peka terhadap perubahan temperatur. Semakin tinggi temperatur akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatis dilakukan pada temperatur kamar. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30°C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45°C (Winarno, 1989).

2. Pengaruh pH (Stabilitas terhadap pH)

Umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat, serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Pada umumnya enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Dalam hal ini, enzim yang sama sering kali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim (Mangunwidjaja, 1994).

D. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas berasal dari bahasa Yunani yaitu *pseudo* berarti palsu dan *monas* berarti satu unit. *Pseudomonas sp* merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon. Keberhasilan penggunaan bakteri *Pseudomonas* dalam upaya bioremediasi lingkungan akibat pencemaran hidrokarbon membutuhkan pemahaman tentang mekanisme interaksi antara bakteri *Pseudomonas sp.* dengan senyawa hidrokarbon. Klasifikasi *Pseudomonas* berdasar pada homologi rRNA atau DNA dan sifat pertumbuhannya. Spesies-spesies *Pseudomonas* : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*. (Boyd, 1995).

a. Karakteristik *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa berbentuk batang dengan ukuran sekitar 0,6 x 2 µm. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek. *P. aeruginosa* termasuk bakteri gram negatif. Strain sel *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan pada Gambar 3. Bakteri ini bersifat aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak mampu memfermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain, tidak berspora, tidak mempunyai selubung (*sheat*) dan mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak (Sari, 2005).

b. Klasifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>



Gambar 3. Gram strain sel *Pseudomonas aeruginosa* (Jawetz *et al.*, 2001).

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam kelas Gamma proteobacteria, merupakan bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit pada hewan dan manusia. *Pseudomonas aeruginosa* dapat tumbuh di air suling dan akan tumbuh dengan baik dengan adanya unsur Nitrogen dan Karbon. *P. aeruginosa* dijumpai melimpah dalam air dan tanah. *P. aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagella polar sehingga bakteri ini bersifat motil, berukuran sekitar 0,5-1,0 μm .

Bakteri aerob ini mensekresikan beberapa jenis pigmen, di antaranya pyocyanin (hijau-biru), fluorescein (kuning-hijau) dan pyorubin (merah-cokelat). Bakteri ini dapat tumbuh tanpa oksigen jika tersedia NO_3 sebagai akseptor elektron (Jawetz *et al.*, 2001)

P. aeruginosa mampu tumbuh di lingkungan yang mengandung oli dan bahan bakar minyak lainnya. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek. Suhu optimum untuk pertumbuhan *P. aeruginosa* adalah 35 °C, tetapi dapat juga tumbuh pada suhu 42°C. *P. aeruginosa* mudah tumbuh pada berbagai media pembiakan karena kebutuhan nutrisinya sangat sederhana.

Bakteri *P. aeruginosa* mempunyai sifat patogen yaitu, menyebabkan penyakit terlokalisasi dan sistemik, menyebabkan infeksi kronis pada pasien dengan fibrosis kistik dan merupakan penyebab utama kematian. dan resisten terhadap banyak antibiotik dan agen kemoterapi karena resistansi intrinsik mereka.

Ketika bakteri ini ditumbuhkan pada media yang sesuai, bakteri ini akan menghasilkan pigmen nonfluoresen berwarna kebiruan, piosianin. Beberapa strain *Pseudomonas* juga mampu menghasilkan pigmen fluoresen berwarna hijau, yaitu pioverdin. *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi katalase, oksidase, dan amonia dari arginin. Bakteri ini dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya (Strohl, 2001).

E. Enzim Lipase.

Enzim lipase atau asilgliserol hidrolase (E.C 3.1.1.3) merupakan enzim yang dapat menghidrolisis rantai panjang trigliserida. Keterangan dari kode enzim ini adalah : 3 *Hydrolases*, 1 *Acting on ester bonds*, 1 *Carboxylic-ester hydrolases*, 3 *triacylglycerol lipase* (Bornscheuer, 1995). Enzim lipase termasuk dalam enzim induktif yang sangat dipengaruhi oleh adanya konsentrasi minyak atau lemak didalam substrat. Enzim lipase adalah enzim hidrolase yang berperan sebagai biokatalis dalam menghidrolisis lemak mono-, di-, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Winarno, 1986)

Selain enzim lipase termolabil, berbagai laporan penelitian mengungkapkan bahwa enzim lipase termostabil diproduksi dari bakteri termofilik, misalnya *Bacillus thermotenulatus* (Schmid *et al.*, 1997), *Bacillus thermotenulatus* menghasilkan dua jenis lipase yaitu lipase BTL 1 dan BTL 2. Gen lipase BTL 2 telah diklon dan urutan nukleotida serta sifat-sifat enzimnya telah diketahui (Schmid *et al.*, 1998).

Enzim lipase sebagai biokatalisator mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan katalisator alkali diantaranya: bekerja secara spesifik, aktivitas katalitik enzim yang tinggi dan kemampuannya bekerja pada suhu yang relatif rendah sekitar 30°C, katalisator alkali bekerja pada suhu (220-250) °C. Suhu yang tinggi menghasilkan produk berwarna coklat (gelap) dan bau tidak diinginkan (Noureddini, 2004).

1. Karakteristik Enzim Lipase yang dihasilkan oleh Mikroba

Salah satu karakteristik utama dari lipase, yaitu enzim ini dapat bekerja pada lapisan antar muka karena adanya perbedaan kepolaran antara lipase dengan substrat yang dikatalisisnya. Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya berupa senyawa non polar, sehingga lipase bekerja pada bagian antar muka antara fasa yang larut dalam air dan fasa minyak dari substratnya (Seniwati dkk., 2010). Aktivasi pada lapisan antar muka dari lipase ini akan meningkat ketika substrat yang tersedia berada dalam bentuk emulsinya.

Sebagai akibat dari karakteristik ini, maka kinetika dari lipase tidak mengikuti aturan klasik model Michaelis-Menten (Jaeger *et al.*, 1994).

Substrat dan produk yang dihasilkan dari katalitik lipase ini terkadang bersifat tidak dapat larut dengan baik dalam media air. Hal ini membuat enzim dapat dengan mudah dipisahkan dari substrat dan produknya.

Pada umumnya enzim bersifat tidak stabil dalam pelarut organik dan dapat terdenaturasi atau hilang aktifitas katalitiknya. Akan tetapi lipase dapat stabil dan tetap aktif dalam suatu pelarut organik tanpa adanya penambahan

senyawa penstabil. Jenis substrat dari lipase juga terkadang tidak dapat larut atau bersifat sedikit larut dalam media air. Karena itu, dalam fenomena seperti ini digunakan suatu pelarut organik atau larutan organik-air sebagai media reaksi. Karena lipase tetap memiliki kemampuan katalitiknya dalam suatu pelarut organik, membuat lipase banyak diaplikasikan dalam bidang bioteknologi (Jaeger *et al.*, 1994).

Lipase yang dihasilkan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah lama waktu inkubasi. Lama waktu inkubasi mempengaruhi jumlah lipase yang dihasilkan. Kemampuan bakteri dalam menghasilkan lipase telah ditemukan dengan lama waktu inkubasi dari beberapa jam sampai beberapa hari.

Pabai *et al* (1996) melaporkan bahwa *Pseudomonas spp.*, *P. fragi*, dan *P. fluorescens BW 96CC* mampu menghasilkan lipase hingga mencapai maksimum setelah inkubasi antara 72 dan 96 jam. Lipase bakteri adalah glikoprotein, tetapi beberapa lipase bakteri ekstraseluler adalah lipoprotein.

Menurut Winkler *et al* (1986) bahwa produksi enzim pada sebagian besar bakteri dipengaruhi oleh polisakarida tertentu. Sebagian besar lipase bakteri dilaporkan sejauh ini konstitutif dan tidak spesifik dalam spesifisitas substrat dan lipase bakteri sedikit thermostabil.

Lipase yang dimurnikan dari *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Pseudomonas aeruginosa* monomer dengan berat molekul 33 kDa, 45 kDa, dan 29 kDa. Lipase ini dihambat oleh Zn^{2+} , Fe^{2+} , dan Al^{3+} dan activator oleh Ca^{2+} . Gen lipase dari *P. fragi* telah dikloning dan *sequenced*.

Karakterisasi enzim lipase berbeda – beda. Enzim ekstraseluler utama yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* adalah golongan hidrolase, termasuk protease alkali elastase, fosfolipase dan lipase (Tielen *et al.*, 2010).

2. Aktivitas Enzim Lipase

Unit enzim (U) dinyatakan sebagai jumlah enzim yang melakukan katalisis sehingga terjadi perubahan satu *mikromol* (1×10^{-6} mol) substrat per menit. Sedangkan aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim permiligram protein. Aktivitas spesifik biasanya mencerminkan kemurnian enzim. Selama pemurnian, aktivitas spesifik enzim meningkat dan tetap jika enzim sudah menjadi murni. Aktivitas enzim lipase yang dapat mengkatalisis pemutusan ikatan ester disebut aktivitas hidrolisis lipid (lipolisis). Aktivitas hidrolisis lipid dapat maksimal jika teradsorpsi pada bidang pertemuan (*interface*) air minyak (Lehninger, 1995).

F. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi enzim perlu memperhatikan tujuan serta bentuk isolat enzim yang diinginkan. Dalam melakukan pengisolasian enzim perlu diperhatikan letak

Untuk keperluan penelitian dan analisis, hasil isolasi enzim tidak diperlukan dalam jumlah banyak, tetapi mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi.

Isolasinya memerlukan teknologi isolasi enzim yang mempunyai sifat dan aktivitas maksimum (Suhartono, 1989). Dalam melakukan pengisolasian enzim perlu diperhatikan letak / lokasi enzim pada organisme. Menurut lokasinya, enzim dapat bersifat ekstraselluler yaitu enzim yang disekresikan oleh organisme dan bekerja di luar sel organisme.

Ekstraksi enzim ekstraselluler lebih mudah dibandingkan enzim intraselluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel / lisis dinding sel, dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Chan and Pelezar, 1989).

Tahapan proses pengisolasian dan pemurnian enzim secara umum menurut Judoamijojo dkk (1992) adalah sebagai berikut :

1. Pemecahan dinding sel / Lisis dinding sel

Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan enzim dari sel atau konstituen seluler. Pada proses ini perlu diperhatikan kerusakan atau penghancuran dinding sel secara fisik, mekanik, atau kimia.

2. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan suatu cara pemisahan yang berdasarkan kepada perbedaan kecepatan sedimentasi dari partikel-partikel molekul yang disebabkan oleh adanya gaya sentrifugal. Cara ini terutama digunakan untuk memisahkan endapan yang sukar disaring dengan saringan biasa (filter),

dimana zat terlarut dapat dipisahkan dengan cepat menuju pusat medan sentrifugal. Dalam hal ini partikel-partikel mula-mula yang terdistribusi secara merata di dalam larutan, pada suatu kecepatan perputaran tertentu akan bergerak meninggalkan larutan induknya dan bila partikel-partikel terlarut tersebut lebih besar dari partikel pelarut, maka akan memisah dan terjadi pengendapan. Sebaliknya partikel-partikel yang memiliki berat jenis lebih kecil dari pelarutnya, akan terapung di permukaan. Pada saat kesetimbangan tercapai, dimana konsentrasi zat terlarut di bagian atas lebih kecil dari pada konsentrasi bagian bawahnya, maka pada saat itulah terjadi pengendapan. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh and Headon, 1994).

3. Fraksinasi

Pemurnian enzim pada dasarnya bergantung pada beberapa variabel diantaranya: pH, suhu, komposisi pelarut dan sifat dari protein itu sendiri (ukuran, kelarutan, muatan dan bentuknya). Fraksinasi protein dengan menggunakan garam, berdasarkan atas kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan air, interaksi ionik dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Dalam hal ini fenomena kelarutan protein ada dua macam yaitu *salting in* dan *salting out*. *Salting in* adalah peristiwa dimana dengan penambahan garam konsentrasi rendah pada larutan protein dalam air, akan menurunkan koefisien aktivitas sehingga kelarutan protein akan bertambah (Wirahadikusumah, 2001)

Bila konsentrasi garam dinaikkan sehingga kekuatan ion bertambah besar, maka interaksi ion dari garam dengan air akan bertambah, hal ini akan menyebabkan interaksi antara protein dengan air menurun. Proses ini disebut *salting out*. *Salting out* sangat tergantung pada hidrofobilitas protein.

Peningkatan konsentrasi garam yang ditambahkan secara bertahap, akan mengendapkan protein secara bertahap pula, sehingga dapat digunakan untuk pemurnian protein. Pada peristiwa *salting out* akan terjadi pengendapan protein, dimulai dari kelarutan yang lebih kecil. Ammonium sulfat adalah salah satu jenis garam yang paling banyak digunakan untuk mengendapkan protein enzim. Peningkatan kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion dan jika interaksi antar ion kuat, maka kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agustien dan Munir, 1997).

Beberapa keuntungan menggunakan garam Ammonium sulfat adalah (a) Dalam keadaan jenuh molaritasnya cukup tinggi sehingga dapat mengendapkan sebagian besar protein; (b) Panas pelarutannya rendah, sehingga panas yang dihasilkannya mudah hilang; (c) Pada larutan jenuhnya (4,04 M pada 20 °C) memiliki kerapatan sekitar 1,235 gram per cm³, yang tidak cukup besar mengganggu sedimentasi sebagian besar protein yang mengendap karena sentrifugasi; (d) Larutan Ammonium sulfat yang pekat mencegah atau membatasi pertumbuhan bakteri, (e) Dalam larutan Ammonium sulfat sebagian besar protein terlindungi dari denaturasi.

Berdasarkan keuntungan terakhir ini, seringkali protein murni disimpan sebagai suspensi dalam larutan Ammonium sulfat pekat (Scopes, 1982)

Perlakuan penambahan ammonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, pembagian fraksinya sebagai berikut:

(0-20)%jenuh, (20-40)%jenuh, (40-60)%jenuh, (60-80)%jenuh, (80-100)%jenuh (Soedigdo, 1988).

4. Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam-garam dari larutan protein.

Pada proses dialisis diperlukan suatu membran yang bersifat semipermeabel, dapat menahan zat-zat molekul besar tetapi melewatkan zat-zat molekul kecil.

Adapun membran yang dipakai pada umumnya adalah kantong selofan dengan ukuran ketebalan dan panjang yang berbeda-beda. Permeabilitas suatu kantong selofan tergantung pada ukuran dan juga pada praperlakuan yang dilakukan (Stryer, 2007).

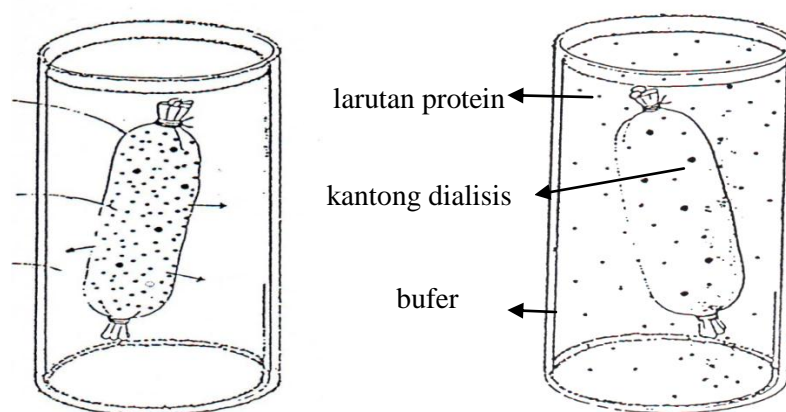
Permeabilitas suatu kantong membran tidak tergantung pada lamanya dialisis.

Jika suatu molekul tidak dapat melalui selaput maka selamanya ia tidak akan lewat walaupun waktu dialisisnya diperpanjang. Kondisi lain yang perlu diperhatikan dalam melakukan dialisis adalah pelarut. Secara umum dikatakan bahwa kecepatan dialisis maksimal jika menggunakan akuades.

Pada hal suatu larutan ditentukan oleh pH dan kekuatan ionisasi zat terlarut yang diperlukan untuk menstabilisasikan kondisi biomolekul dalam larutan tersebut. Proses dialisis yang menyebabkan masuknya air ke kantong

membran adalah tekanan osmotik, oleh karena itu selalu diusahakan supaya volume kantong selofan setelah tercapai kesetimbangan masih normal, tidak mengalami kerusakan akibat tekanan osmotik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4 (Stryer, 2007)

Sebaliknya dapat terjadi, misalnya jika biomolekul yang keluar meninggalkan kantong selofan lebih cepat, sehingga kantong selofan menjadi kempes. Sebagai contoh dari 200 mL isi kantong selofan jika dibiarkan satu malam dapat bertambah volumenya menjadi beberapa mililiter lagi. 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, tetapi sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).



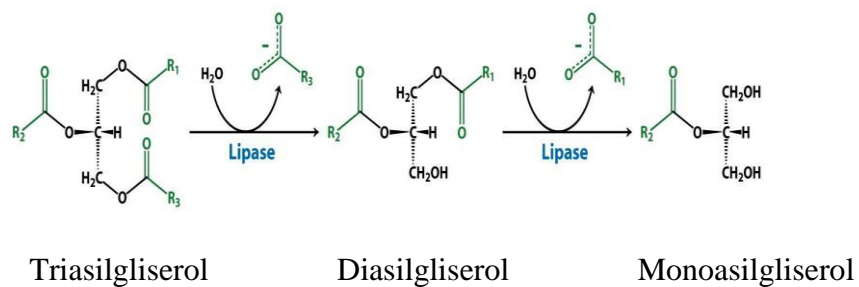
Gambar 4. Pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul dengan dialisis (Stryer, 2007).

Cara-cara untuk mempercepat pergerakan molekul:

- a. Membuat luas permukaan membran sebesar mungkin, antara lain dengan menambah panjang tabung (kantong).
- b. Mengubah lapisan larutan yang berhubungan langsung dengan membran secara terus menerus dengan mengaduk pelarut.
- c. Mengganti pelarut pada selang waktu tertentu

G. Pengujian aktivitas enzim lipase metode *Titrimetri*

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan mengukur pembentukan asam lemak bebas menggunakan titrasi dengan larutan basa berkonsentrasi rendah dan mengasumsikan bahwa jumlah basa titrasi sama dengan jumlah asam lemak bebas yang terhidrolisis oleh lipase (Gambar 5). Untuk menandakan akhir titrasi digunakan indikator *fenolftalein* yang akan memberikan perubahan warna dari tidak berwana menjadi warna merah muda. Nilai aktivitas lipase dihitung berdasarkan selisih volume titran sampel dengan standar. Sebelum dilakukan titrasi campuran enzim dan substrat terlebih dahulu diinkubasi, setelah itu reaksi enzim dihentikan dengan penambahan larutan campuran aseton dan etanol (1:1). Campuran ini berfungsi untuk menghidrolisis protein enzim lipase sehingga reaksi enzim akan terhenti disebabkan rusaknya protein (Pereira *et al.*, 2001).



Gambar 5. Reaksi hidrolisis triasilgliserol oleh lipase (L. Stryer 2007)

Metode ini banyak digunakan karena kemudahan dan keakuratannya. Pada metode *titrimetri* untuk mengukur aktivitas lipase digunakan minyak zaitun sebagai substrat (Gupta *et al.*, 2013).

H. Penentuan kadar protein dengan metode *Lowry*

Metode *Lowry* merupakan pengembangan dari metode *Biuret*. Dalam metode ini terlibat dua reaksi. Awalnya, kompleks Cu(II)-protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu*, kompleks *phosphomolibdat-phosphotungstat*, menghasilkan *heteropoly-molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu *tryptophan* dan *tyrosine*-nya.

Keuntungan metode *Lowry* adalah lebih sensitif (100 kali) daripada metode *Biuret* sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya

berkisar pada konsentrasi 0,01 mg/mL. Namun metode *Lowry* lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya (Lowry *et al.*, 1951).

Beberapa zat yang bisa mengganggu penetapan kadar protein dengan metode *Lowry* ini, diantaranya buffer, asam nuklet, gula atau karbohidrat, deterjen, gliserol, Tricine, EDTA, Tris, senyawa-senyawa kalium, sulfhidril, disulfida, fenolat, asam urat, guanin, *xanthine*, magnesium, dan kalsium. Interferensi agen-agen ini dapat diminimalkan dengan menghilangkan interferensi tersebut. Oleh karena itu dianjurkan untuk menggunakan blanko untuk mengoreksi absorbansi. Interferensi yang disebabkan oleh deterjen, sukrosa dan EDTA dapat dieliminasi dengan penambahan SDS atau melakukan preparasi sampel dengan pengendapan protein (Lowry *et al.*, 1951).

Metode *Lowry-Folin* hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur molekul peptida panjang. Prinsip kerja metode *Lowry* adalah reduksi Cu^{2+} (reagen *Lowry B*) menjadi Cu^+ oleh *tirosin*, *triptofan*, dan *sistein* yang terdapat dalam protein. Ion Cu^+ bersama dengan *fosfotungstat* dan *fosfomolibdat* (reagen *Lowry D*) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya (Lowry *et al.*, 1951).

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).

I. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim merupakan suatu proses dimana pergerakan molekul enzim dalam ruang tempat reaksi ditahan sedemikian rupa sehingga terbentuk sistem enzim yang aktif dan tidak larut dalam air. Dalam amobilisasi enzim, pengikatan enzim pada suatu karier haruslah terjadi tanpa adanya kerusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim tersebut, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terganggu oleh proses ini. Amobilisasi enzim diketahui memiliki beberapa keunggulan diantaranya stabilitas enzim dan enzim dapat digunakan berulang-ulang. Aktivitas dan stabilitas enzim dipengaruhi oleh metoda amobilisasi, jenis enzim maupun jenis matrik yang digunakan (Wirahadikusumah, 1981).

Enzim dapat diamobilisasi dengan menggunakan beberapa cara, diantaranya adalah : (1) cara fisik, yang meliputi teknik penjebakan (encapsulationn gel lattice formation) atau teknik pembungkusan dengan membran; (2) cara kimia, yang meliputi teknik pengikatan (adsorpsi) pada bahan pendukung melalui ikatan-ikatan ionik, kovalen atau polar, atau dengan teknik ikatan silang; (3) cara penggumpalan sel atau enzim; (4) kombinasi dari cara-cara sebelumnya seperti, cara adsorpsi kemudian cross linking. Metode amobilisasi secara fisik memiliki

kelebihan yaitu aktivitas dari enzim tetap tinggi (tidak terjadi perubahan konformasi enzim) dan media dapat diregenerasi (Susanto, 2003).

Aktivitas enzim amobil ditentukan oleh bahan pendukung yang digunakan. Pada proses amobilisasi, jumlah enzim yang teradsorpsi dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi adsorbat / enzim (Sediawan, 2000).

Lama pengocokan dan konsentrasi enzim akan mempengaruhi massa enzim yang teradsorpsi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut (Ariesta, 2009).

Adsorpsi secara fisik merupakan metode yang relatif mudah dilakukan. Adsorben yang umum digunakan dari berbagai bahan organik dan anorganik seperti alumina (aminosilase, amilase), selulosa (selulase), tanah liat (katalase), kaca (urease) hidroksilapatit (NAD pirofosforilase), karbon dan berbagai macam bahan silika (amilase).

Adsorpsi terjadi karena gaya Van der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik diantara molekul enzim dan molekul penyangga dicampurkan pada kondisi lingkungan yang sesuai, selama waktu tertentu. Enzim terikat oleh bahan dengan ukuran fisik yang lebih besar sehingga dapat dipisahkan dari enzim bebas dengan cara filtrasi dan sentrifugasi (Suhartono, 1989).

Pengikatan terhadap enzim bersifat reversibel, sehingga enzim yang teradsorpsi mungkin mengalami desorpsi dengan adanya substrat atau menaikkan kekuatan

ion (Gupta *et al.*, 2013) . Terdapat tiga cara untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu amobilisasi, modifikasi kimia dan mutagenesis langsung (Mozhaev *et al.*, 1988).

Keuntungan penggunaan enzim yang telah diamobi diantaranya adalah :

1. Sistem enzim yang telah diamobil dapat digunakan berulang-ulang
2. Memungkinkan proses pengoperasian secara berkesinambungan
3. Dapat meminimalkan terjadinya pencampuran antara hasil reaksi dengan residu
4. Memudahkan pengendalian kondisi reaksi
5. Dapat meningkatkan stabilitas enzim.

Selain keuntungan amobilisasi enzim juga mempunyai kekurangan yaitu dapat menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim untuk beberapa kasus serta terjadi pergeseran pH dan suhu optimum dari enzim (Payne *et al.*1992).

1. Sifat-sifat enzim amobil

Berbagai jenis perubahan kimia fisika enzim terjadi selama proses imobilisasi dilakukan, bergantung pada jenis metode yang digunakan. Akibat dari proses amobilisasi yang merugikan adalah turunnya aktivitas spesifik enzim; sedangkan manfaat yang menyebabkan metode ini berkembang adalah meningkatnya stabilitas enzim dan daya tahannya terhadap kondisi lingkungan ekstrim seperti pH dan suhu. Amobilisasi menyebabkan enzim yang telah berubah ini bersifat lebih tahan lama dan dapat dipakai berulang-ulang (Deepali *et al.*, 2013).

Pada umumnya masa aktif enzim amobil melebihi masa aktif enzim terlarut. Apabila substrat atau produk yang dihasilkan sensitif terhadap pH, maka teknologi amobilisasi memungkinkan memilih polimer pengikat yang sesuai, sehingga kisaran pH optimum enzim amobil sesuai dengan stabilitas substrat maupun produknya. Perubahan konformasi molekul enzim yang menimbulkan perubahan stereokimiawi dan muatan total pada sisi aktif enzim akan mengubah daya katalitik enzim terhadap substratnya. Hal ini tercermin pada perubahan beberapa parameter kinetika enzim. Konstanta kinetika enzim amobil biasanya berubah dari bentuk aslinya (Kavardi *et al.*, 2012).

Amobilisasi dapat meningkatkan atau menurunkan nilai K_M enzim. Penurunan K_M mencerminkan reaksi yang lebih cepat dibandingkan dengan reaksi pada enzim bebas. Penurunan K_M enzim terjadi apabila muatan polimer penyangga dan muatan substrat terjadi tarik menarik elektrostatik diantara polimer penyangga dan substrat yang akan membantu meningkatkan konsentrasi substrat di sekitar enzim amobil.

Peningkatan K_M oleh proses amobilisasi berimplikasi bahwa konsentrasi substrat yang lebih tinggi diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi yang sama pada enzim bebas. Perubahan konformasi pada molekul enzim dapat meningkatkan K_M , karena menurunnya daya gabung antara enzim dan substrat. Perubahan kimiawi pada proses amobilisasi yang diakibatkan oleh teknik pengikatan kovalen biasanya menyebabkan peningkatan K_M . Ukuran partikel enzim amobil yang

terlalu besar dapat meningkatkan harga K_M enzim amobil. Hal ini berkaitan dengan pengaruh difusi substrat (Suhartono, 1989).

J. BENTONIT

Bentonit mempunyai bentuk berupa partikel butiran halus berwarna kuning muda, putih dan abu-abu dengan massa jenis 2,2 – 2,7 g/L dan massa molekul relatif besar 549,07 g/mol. Bentonit termasuk jenis mineral yang banyak mengandung *montmorillonit* memiliki struktur mineral lempung liat jenis TOT (2:1) artinya struktur lembarannya disusun oleh dua lapisan *Tetrahedral* (T) dan satu lapisan *Oktahedral* (O). Bentonit termasuk mineral clay golongan *smektit dioktahedral* yang mengandung sekitar 80 % *montmorillonit* dan sisanya antara lain kaolin, illite, gipsum, feldspar, abu vulkanik, pasir kuarsa dan *montmorillonit* yang berada diantara dua lapisan tetrahedral. Bentonit sering diaplikasikan pada berbagai bidang diantaranya industri logam, pertanian, makanan dan minuman, farmasi, lingkungan dan katalis karena bentonit memiliki sifat sebagai penukar kation. Kation yang terserap didaerah interlayer disebut kation interlayer /exchangeable cations (Lambe and Whitman, 1979).

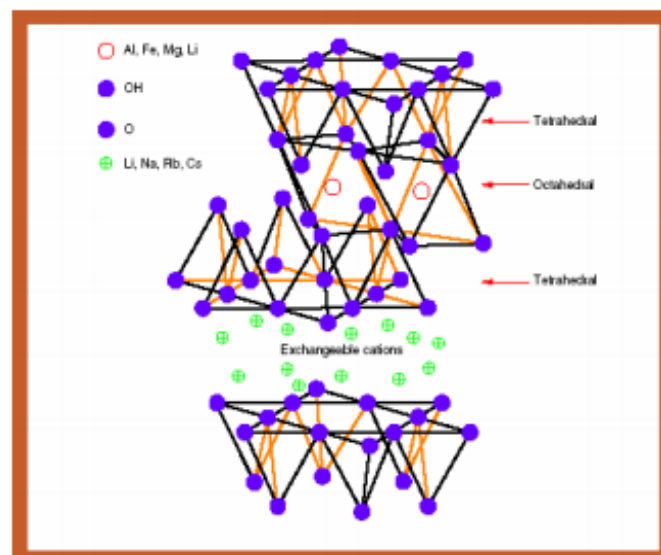
a. Struktur Bentonit

Bentonit merupakan sumber daya mineral yang melimpah terdapat di Indonesia. Mineral bentonit memiliki diameter kurang dari 2 mikrometer yang terdiri dari berbagai macam *phyllosilicate* yang mengandung silika, aluminium oksida dan hidroksida yang mengikat air. Struktur bentonit terdiri

dari 3 layer yang tersusun dari 2 layer silika tetrahedral dan satu sentral octahedral (Gambar 6). Diantara lapisan octahedral dan tetrahedral terdapat kation monovalent maupun bivalent, seperti Na^+ , Ca^{2+} dan Mg^{2+} (Cheetam, 1992)

Montmorillonit merupakan penyusun terbesar bentonit yaitu sebesar 85%.

Rumus kimia bentonit adalah $(\text{Mg}, \text{Ca})_x \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot y\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ dengan nilai n sekitar 8 dan x, y adalah nilai perbandingan antara Al_2O_3 dan SiO_2 . Penyusun lainnya yaitu campuran kristobalit, feldspar, kalsit, gypsum, kaolinit, plagioklas, illit (Katti and Katti, 2001)



Gambar 6. Struktur *Montmorillonit* / Bentonit (Holtz and Kovacs, 1981)

b. Pembagian tipe bentonit

Bentonit dibagi menjadi dua yaitu *Swelling* dan *Non Swelling* (Gambar 7):

1. Tipe Wyoming (Na-bentonit – *Swelling bentonite*)

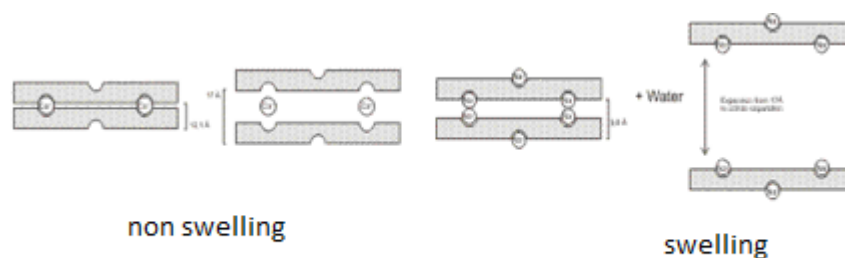
Na bentonit memiliki daya mengembang hingga delapan kali apabila dicelupkan ke dalam air, dan tetap terdispersi beberapa waktu di dalam

air. Dalam keadaan kering berwarna putih atau cream, pada keadaan basah dan terkena sinar matahari akan berwarna mengkilap.

Perbandingan soda dan kapur tinggi, suspensi koloidal mempunyai pH: 8,5-9,8, tidak dapat diaktifkan, posisi pertukaran diduduki oleh ion-ion sodium (Na^+). Penggunaan yang utama adalah untuk lumpur (bor) pembilas dalam kegiatan pemboran, pembuatan pellet biji besi, penyumbat kebocoran bendungan/kolam.

2. Mg, Ca-bentonit – (*non swelling bentonite*)

Tipe bentonit ini kurang mengembang apabila dicelupkan ke dalam air, dan tetap terdispersi di dalam air, tetapi secara alami atau setelah diaktifkan mempunyai sifat menghisap yang baik. Perbandingan kandungan Natrium dan Calsium rendah, suspensi koloidal memiliki pH: 4-7. Posisi pertukaran ion lebih banyak diduduki oleh ion-ion kalsium dan magnesium. Dalam keadaan kering bersifat *rapid slaking*, berwarna abu-abu, biru, kuning, merah dan coklat. Penggunaan bentonit dalam proses pemurnian minyak goreng perlu aktivasi terlebih dahulu.



Gambar 7. Tipe Bentonit : *non swelling* dan *swelling*
(Katti and Katti , 2001)

c. Pengaktifan bentonit

Bentonit mempunyai struktur berlapis dengan kemampuan mengembang (*swelling*) dan memiliki kation-kation yang dapat ditukarkan (Katti and Katti 2001). Meskipun lempung bentonit sangat berguna untuk adsorpsi, namun kemampuan adsorpsinya terbatas (Cool *et al.*, 1988). Kelemahan tersebut dapat diatasi melalui proses aktivasi menggunakan asam (HCl, H₂SO₄ dan HNO₃) sehingga dihasilkan lempung dengan kemampuan adsorpsi yang lebih tinggi (Kumar and Jasra, 1995).

Aktivasi bentonit menggunakan asam akan menghasilkan bentonit dengan situs aktif lebih besar dan keasamaan permukaan yang lebih besar, sehingga akan dihasilkan bentonit dengan kemampuan adsorpsi yang lebih tinggi dibandingkan sebelum diaktivasi (Komadel, 2003).

Ada dua cara untuk mengaktivasi bentonit yaitu :

1. Pengaktifan secara kimia

Pengaktifan secara kimia dilakukan dengan mencampurkan bentonit dengan H₂SO₄ 5 N (1 gram bentonit : 10 ml asam) ke dalam *beaker glass*. Aktivasi ini dilakukan di *waterbatch* selama dua jam pada suhu 700 °C. Bentonit disaring, dicuci dengan air panas sampai pH air pencuci netral. Kemudian dikeringkan di oven pada suhu 105 °C sampai beratnya konstan. Tujuan dari aktivasi kontak asam adalah untuk menukar kation Ca²⁺ yang ada dalam Ca-bentonit menjadi ion H⁺ dan melepaskan ion Al, Fe, dan Mg dan pengotor-pengotor lainnya pada

kisi-kisi struktur, sehingga secara fisik bentonit tersebut menjadi aktif.

Untuk keperluan tersebut asam sulfat dan asam klorida adalah zat kimia yang umum digunakan. Selama proses *bleaching* tersebut, Al, Fe, dan Mg larut dalam larutan, kemudian terjadi penyerapan asam ke dalam struktur bentonit, sehingga rangkaian struktur mempunyai area yang lebih luas.

2. Pengaktifan secara fisika

Pengaktifan fisika dilakukan dengan memanaskan bentonit di-*furnace* pada suhu 400 °C selama 6 jam untuk memperluas permukaan butiran bentonit (Adel dan Haerudin, 2003). Perubahan dari gugus oktahedral menjadi tetrahedral membuat kisi kristal bermuatan negatif pada permukaan kristal, sehingga dapat dinetralkan oleh ion hidrogen (Supeno, 2003)

Berikut adalah beberapa sifat umum bentonit :

1. Lunak, berbentuk kristal, bewarna pucat umumnya putih, hijau, kelabu, merah muda dalam keadaan segar dan mempunyai kilap lilin.
2. Terasa licin seperti sabun dan dapat menyerap air.