

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis yang mempercepat suatu proses reaksi tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia organik (Hao *et al.*, 2006). 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, disamping 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 sintetik 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 and 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. Enzim sebagai biokatalis telah dapat diaplikasikan secara komersil untuk proses-proses industri, antara lain industri pangan, medis (diagnosis), kimia, dan farmasi (Junita, 2002). 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 :

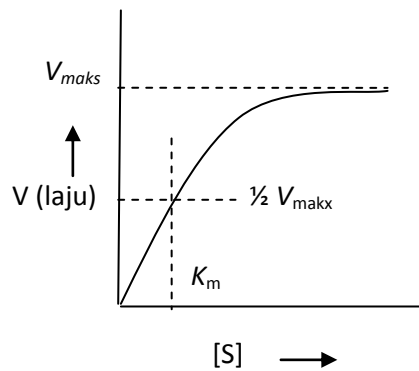
1. Konsentrasi enzim

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

2. Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi enzim tetap dan konsentrasi enzim bervariasi terdapat hubungan antara aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang terlalu rendah aktivitas katalitiknya pun rendah. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat aktivitas enzim meningkat

secara linier, kemudian secara logaritmatik dan akhirnya mencapai harga maksimum dimana penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak mempengaruhi laju reaksi enzim. Gejala ini disebut kinetika penjumlahan (Page, 1989). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan dalam Gambar 1.



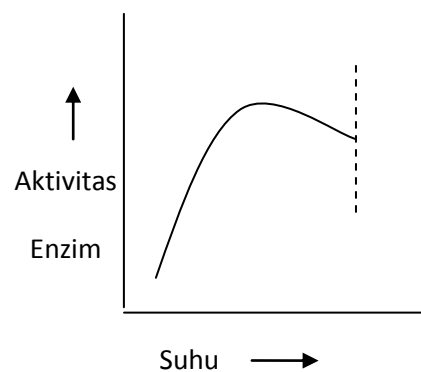
Gambar 1. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005)

3. Inhibitor

Inhibisi atau hambatan reaksi enzim adalah penurunan kecepatan reaksi enzimatik akibat adanya suatu senyawa kimia tertentu dalam larutan enzim substrat (Mara, 1999). Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor (Poedjiadi, 1994). Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1986).

4. Suhu

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

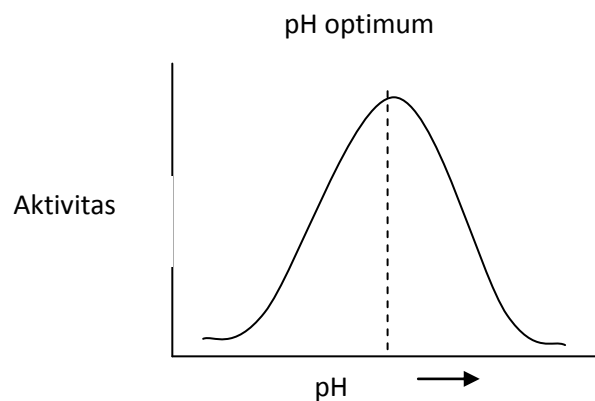


Gambar 2. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim (Shahib, 2005)

5. pH

Struktur ion enzim bergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat berbentuk ion positif dan negatif (*Zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH akan mempengaruhi efektivitas bagian aktif enzim dalam

membentuk kompleks enzim-substrat. Selain itu, pH yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Secara umum pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 3. Pada beberapa enzim memiliki aktivitas maksimum pada kisaran pH antara 4,5-8,0 (Winarno, 1989).



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

6. Kofaktor logam.

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

7. Pelarut organik.

Penggunaan pelarut dalam reaksi enzimatik memberikan keuntungan antara lain ialah kelarutan substrat-organik dan enzim lebih tinggi

dibandingkan dengan air serta meningkatkan kestabilan enzim dengan pelarut (Kwon and Rhee, 1986).

B. Enzim Protease

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease (protease serin, protease sistein/tiol, protease aspartat dan protease logam) adalah enzim yang banyak digunakan dalam industri, misalnya industri farmasi, kulit, detergen, makanan dan pengolahan limbah (Pastor *et al.*, 2001; Ward, 1985).

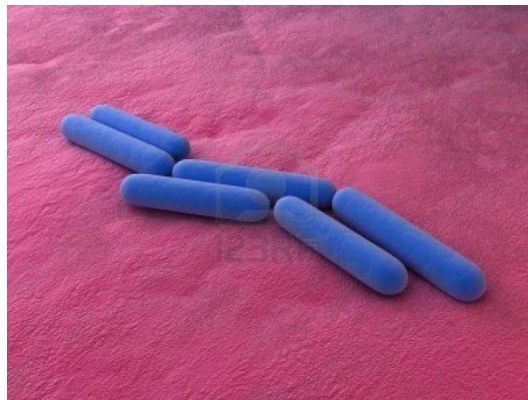
Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tanaman dan hewan (Ohta *et al.*, 1966). Protease dari bakteri merupakan jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan sumber lain, yaitu protease dari tumbuhan dan hewan. Protease bisa diisolasi dari bagian ekstrasel dan intrasel (Michael *et al.*, 1998). Bakteri penghasil protease ekstraseluler banyak diproduksi oleh spesies *Bacillus*.

C. *Bacillus subtilis*

Bacillus merupakan salah satu mikroba golongan bakteri. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* pada umumnya hidup di tanah, diantaranya adalah *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* dan kelompok *B. spaericus*.

Selain di tanah, beberapa jenis *Bacillus* juga ditemukan di lumpur dan di muara yaitu *B. firmus* dan *B. lentus*. Selain ditemukan di kedua habitat di atas, ada juga beberapa jenis *Bacillus* yang hidup di laut misalnya *B. marinus*, *B. cirroflagelosus*, *B. epiphytus* dan *B. filicolonicus* (Priest, 1993).

B. subtilis merupakan bakteri yang mempunyai spora. Sporanya berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya. Mikroorganisme ini bersifat gram positif dan bersifat aerob (Schelege and Schmidt, 1994). *B. subtilis* berbentuk batang lurus gram positif berukuran 1,5 x 4,5 μm , sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai, bergerak dan tidak bersimpai. Gambar *B. subtilis* ditunjukkan pada Gambar 4.



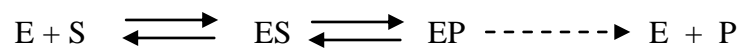
Gambar 4. *B. subtilis* (Gupte, 1990).

D. Kinetika Reaksi Enzim

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi

enzimatis. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat ini dapat divariasikan untuk mempelajari mekanisme suatu reaksi enzim, yakni bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1989).

Berdasarkan postulat Michaelis-Menten pada suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005).

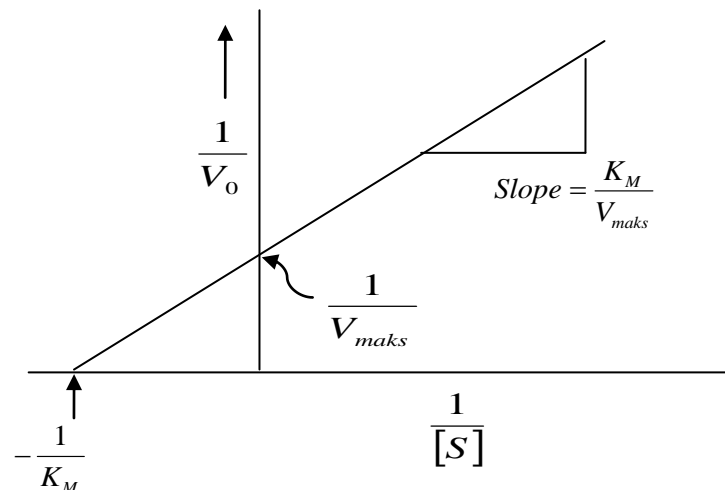


Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim substrat memiliki afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1989).

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* yang ditunjukkan dalam Gambar 5.

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\text{Persamaan Michaelis-Menten}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]} \quad \frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\text{Persamaan Lineweaver-Burk}}$$



Gambar 5. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989).

E. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Enzim dikatakan stabil apabila enzim dapat mempertahankan aktivitasnya selama proses penyimpanan dan penggunaan, selain itu enzim dapat

mempertahankan kestabilannya terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu serta pH yang ekstrim (Wiseman, 1985).

Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil (Junita, 2002). Menurut Illanes (1999), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan rekayasa protein.

1. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 2001).

Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi. Penggunaan suhu yang tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu yang tinggi ini merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi. Penggunaan enzim dalam industri umumnya dilakukan pada suhu relatif rendah, misalnya

pada suhu 50-60°C (untuk glukoamilase dan glukosa isomerase) atau lebih rendah. Penggunaan enzim pada suhu yang lebih tinggi hingga 85-100°C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan α -amilase bakterial. Oleh sebab itu, diperlukan enzim dengan stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

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

- a. Adanya pembukaan partial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern and Klibanov, 1987).

Air memegang peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakueus, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat.

Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

2. Stabilitas pH enzim

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti

suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut, pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1989).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

F. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar and Chan, 1986).

1. Sentrifugasi

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

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter) (Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam ammonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Menurut Suhartono (1989), penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan yang mengandung protein dapat menyebabkan terjadinya proses pengendapan protein. Proses pengendapan protein tersebut dipengaruhi oleh kekuatan ion dalam larutan. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*. Setelah mencapai suatu titik tertentu, dimana kandungan garam semakin tinggi, maka kelarutan protein semakin menurun dan terjadi proses pengendapan protein. Peristiwa pengendapan protein ini

disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 1989). Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion dan jika interaksi antar ion kuat, maka kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agustien and Munir, 1997).

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

3. Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein enzim. Proses dialisis secara umum dapat dilakukan dengan memasukkan larutan enzim dalam suatu kantong dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel seperti selofan. Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam bufer maka molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran. Sedangkan molekul enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantong dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. Untuk

memperkecil pengaruh ini digunakan larutan bufer dengan konsentrasi rendah di luar kantong dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993).

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).

G. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada lingkungan alkali dan ion tembaga(II) bereaksi membentuk kompleks dengan protein. Selanjutnya reagen *folin-ciocelteau* yang ditambahkan akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan merubah warna larutan dari kuning menjadi biru keunguan.

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-ciocelteau. Reagen ini bereaksi menghasilkan produk yang tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diterapkan serta biayanya relatif murah. Namun, kekurangan dari metode ini adalah sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan volume sampel dalam jumlah kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

H. Amobilisasi Enzim

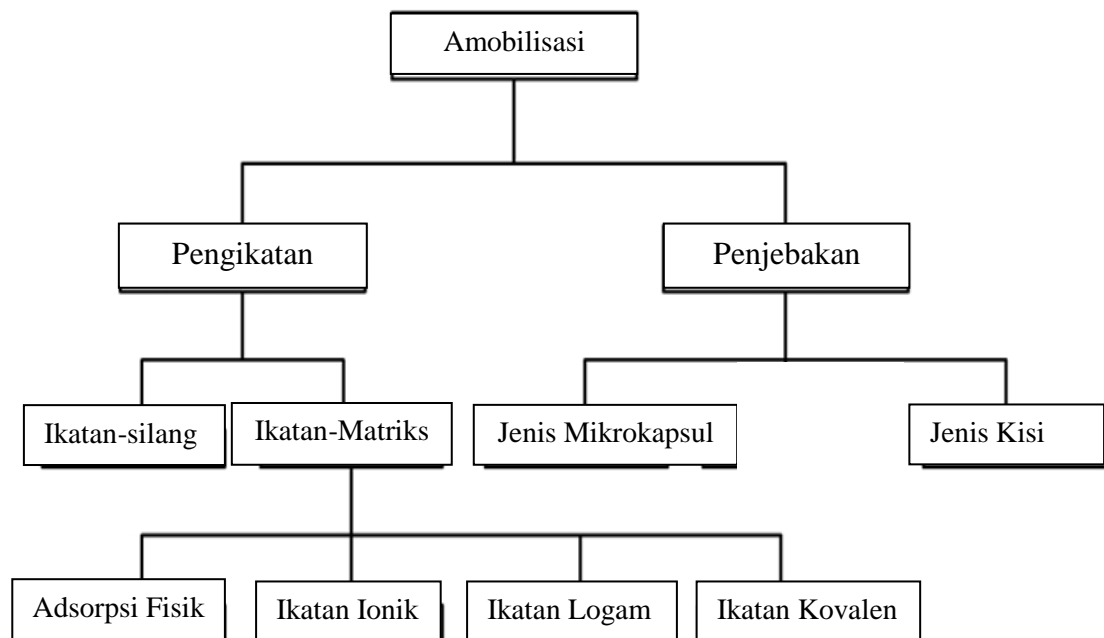
Amobilisasi enzim adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak, sehingga dapat dilakukan atau diatur kapan enzim harus bereaksi dengan substrat (Winarno, 1986).

Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri menurut Payne *et al.*, (1992) antara lain:

- 1) Dapat digunakan berulang
- 2) Dapat mengurangi biaya
- 3) Produk tidak dipengaruhi oleh enzim
- 4) Memudahkan pengendalian enzim
- 5) Tahan kondisi ekstrim

- 6) Dapat digunakan untuk uji analisis
- 7) Meningkatkan daya guna
- 8) Memungkinkan proses sinambung

Metode untuk amobilisasi enzim dapat dibagi menjadi 3 kelompok yaitu : cara fisik (penjebakan), cara kimia (pengikatan) dan kombinasi keduanya dapat dilihat pada Gambar 6 (Chibata, 1978).



Gambar 6. Skema metode amobilisasi enzim

1. Cara fisik (penjebakan)

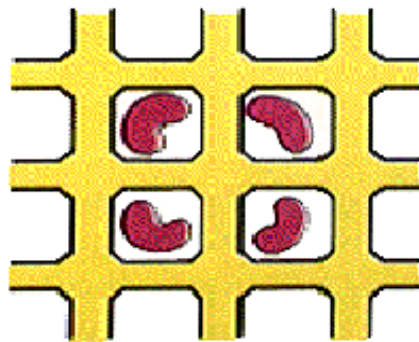
a. Teknik matriks

Enzim dapat terperangkap dalam gel matriks dengan membentuk gel dalam larutan encer yang mengandung satu macam enzim (Gambar 7).

Matriks yang banyak digunakan adalah kalsium alginat, kappa-

karagenan, resin sintetis dan poliakrilamida. Poliakrilamida terbuat dari akrilamida. Sedangkan serat yang digunakan yaitu selulosa triasetat dan polimer-polimer lainnya.

Keuntungan menggunakan teknik ini adalah secara relatif struktur alami enzim tidak mengalami gangguan fisik. Hal ini karena enzim tidak terikat dengan bahan pendukung, sehingga tidak terjadi perubahan konformasi enzim atau inaktivasi enzim. Akibatnya untuk membentuk kompleks enzim-substrat sangat kecil kemungkinannya, karena enzim tidak berada pada permukaan bahan pendukung.

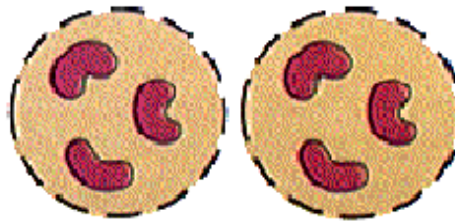


Gambar 7. Penjebakan teknik kisi (Judoamidjojo,1990)

Teknik ini merugikan karena (1) terjadi kebocoran yang kontinue karena ukuran pori-pori terlalu besar, (2) interaksi antara substrat dan enzim kurang karena jeratan gel dan (3) kehilangan aktivitas enzim karena terbentuknya zat-zat radikal bebas pada reaksi polimerisasi (Judoamidjojo, 1990).

b. Teknik mikrokapsul

Enzim juga dapat diperangkap dalam mikrokapsul (Gambar 8) yang terbuat dari nilon semipermeabel butiran yang tipis atau membran koloidon. Teknik ini merugikan karena (1) terjadi inaktif enzim selama pembentukan mikrokapsul, (2) mikrokapsul membutuhkan konsentrasi yang besar dan (3) enzim dapat bergabung dengan dinding membran (Crueger and Cruerger. 1984).



Gambar 8. Penjebakan teknik mikrokapsul (Crueger and Cruerger.1984)

2. Metode kimia

a. Teknik ikatan non-kovalen

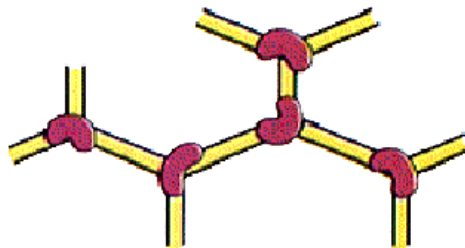
Enzim dapat diadsorpsi pada bahan pendukung seperti alumina, karbon aktif, silika gel dan lainnya. Teknik ini dapat menyebabkan kehilangan enzim oleh desorpsi, maka adsorben yang baik adalah yang dapat mengikat enzim cukup kuat dengan akibat denaturasi yang cukup kecil. Cara ini sukar dilakukan, tetapi enzim amobil yang terbentuk stabil terhadap konsentrasi substrat dan ion yang tinggi (Wirahadikusumah, 1989).



Gambar 9. Teknik ikatan non-kovalen (Wirahadikusumah, 1989)

a. Teknik ikatan silang

Dimana enzim terikat secara kovalen satu dengan lainnya oleh pengikatan yang mempunyai gugus aktif NH_3 , CNBr dan lainnya, yang membentuk struktur tiga dimensi yang tidak larut dalam air. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 10. Pembentukan ikatan intramolekuler antar molekul sering terjadi dengan dua atau lebih pereaksi seperti glutaraldehida, turunan isosianat, bisdiazobenzidina, N,N-etilen bismaleimida dan N,N-polimetil bisodoaseomida. Kerugian cara ini ketika terjadi inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Wiseman, 1985).



Gambar 10. Teknik ikatan silang (Wiseman, 1985)

b. Teknik ikatan ion

Enzim terikat dengan bahan pendukung yang mengandung residu penukar kation maupun anion dan ikatan yang terbentuk lebih kuat dibanding ikatan non-kovalen. Bahan pendukung yang dapat digunakan adalah dietilaminoetil-selulosa (DEAE-selulosa) dan karboksimetil-selulosa (CM-selulosa).

3. Kombinasi metode fisik dan kimia

Teknik ini merupakan kombinasi dari metode fisik dan kimia dalam pengikatan enzim terhadap bahan pendukung (Sebayang, 2005).

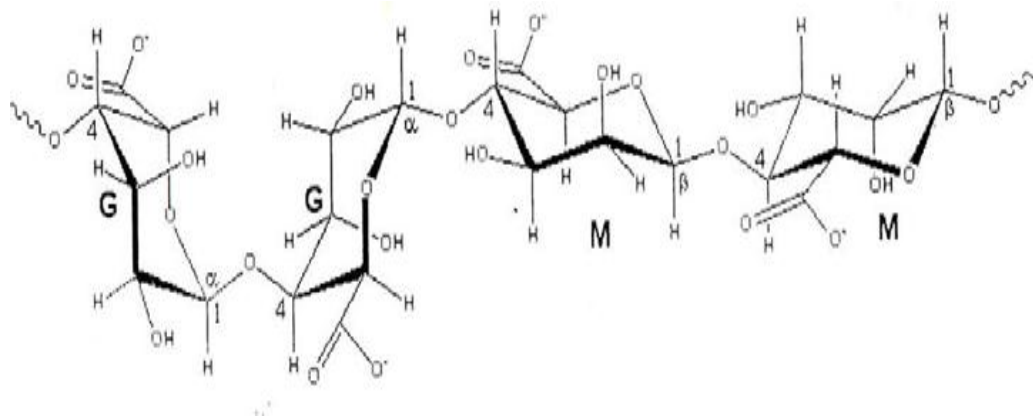
I. Kalsium Alginat

Alginat adalah polisakarida alam yang umumnya terdapat pada dinding sel dari semua spesies algae coklat (phaeophyceac). Alginat dapat diperoleh dari hasil pengendapan rumput laut dengan alkohol, pengeringan dengan alat (*drum drying*), dan pembekuan. Jenis alkohol yang dapat digunakan untuk pemurnian hanya terbatas pada metanol, etanol, dan isopropanol (Winarno, 1989). Asam alginat dalam algae coklat umumnya terdapat sebagai garam-garam kalsium, magnesium dan natrium. Asam alginat tidak larut dalam air, karenanya yang biasa digunakan dalam industri adalah natrium alginat (Robinson, 1987).

Molekul asam alginat berbentuk polimer linier tak bercabang dan disusun oleh kurang lebih 700-1000 residu asam β -D- manuronat (M) dan α -L- guluronat (G).

Asam D-manuronat memiliki ikatan diekuatorial 4C1 sedangkan asam guluronat memiliki ikatan diaksial 1C4 (Wandrey, 2005).

Rantai yang terdiri atas 3 segmen polimer yang berbeda terlihat pada Gambar 11 berikut ini :



Gambar 11. Struktur Asam Alginat (a)-G-G- (b) -G-M- (c) -M-M-
(Wandrey, 2005)

Kelarutan alginat dan kemampuannya mengikat air bergantung pada jumlah ion karboksilat, berat molekul dan pH. Kemampuan mengikat air meningkat jika jumlah ion karboksilat semakin banyak dan jumlah residu kalsium alginat kurang dari 500, sedangkan pada pH di bawah 3 terjadi pengendapan (McHugh, 2003).

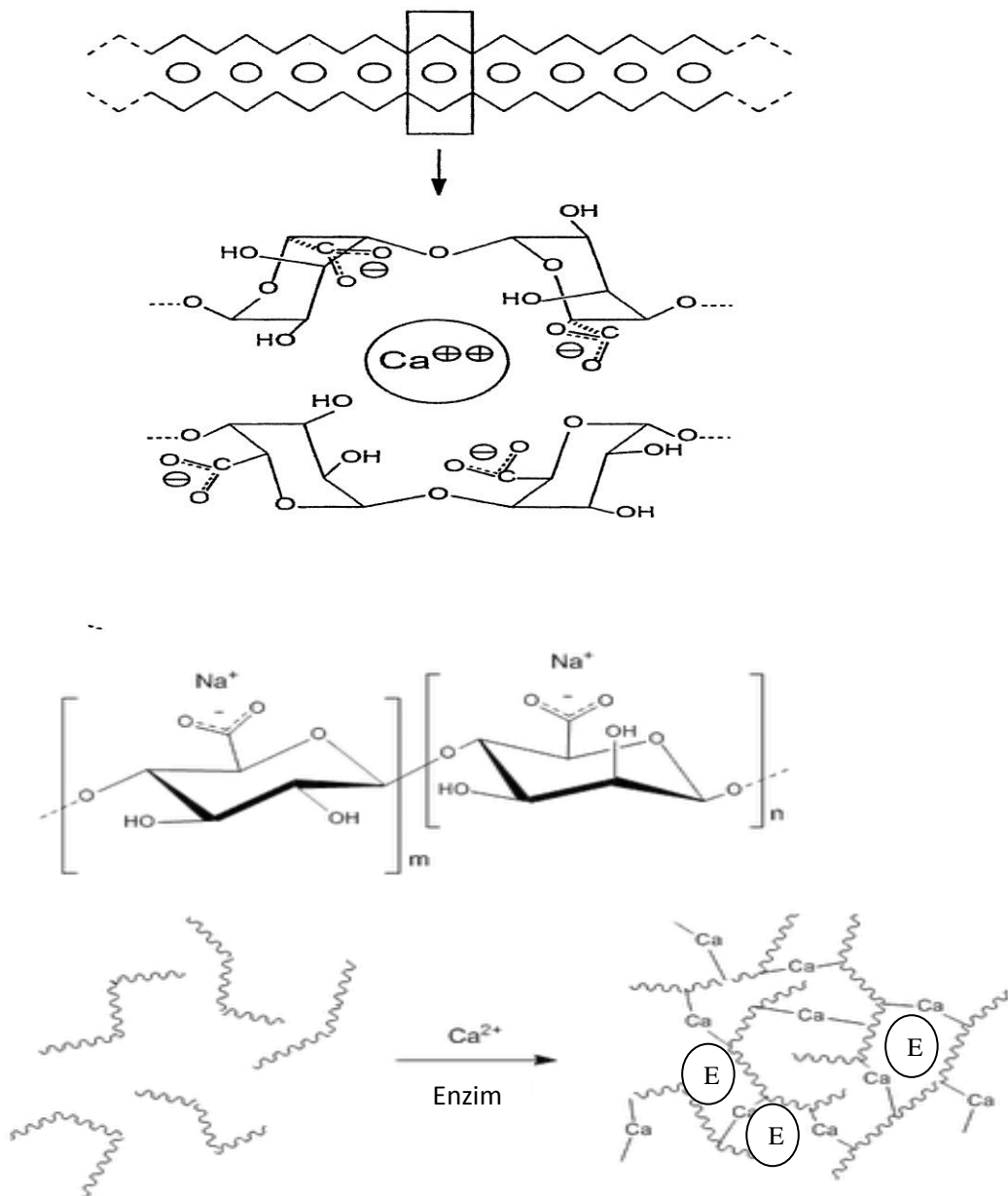
Alginat memiliki sifat-sifat utama :

- 1) Kemampuan untuk larut dalam air serta meningkatkan viskositas larutan
- 2) Kemampuan untuk membentuk gel
- 3) Kemampuan membentuk film (natrium atau kalsium alginat) dan serat (kalsium alginat) (Wandrey, 2005).

Alginat merupakan polimer dengan muatan negatif yang mempunyai viskositas tinggi, sehingga dapat membentuk gel dengan kation bivalen. Kekakuan dari gel alginat umumnya dapat dilihat dari peningkatan afinitas ionnya dalam urutan: Mn > Co > Zn > Cd > Ni > Cu > Pb > Ca > Sr > Ba. Namun, tidak semuanya dapat digunakan untuk amobilisasi enzim. Secara umum, Ca^{2+} paling sering digunakan karena rendah racun (Smidsrod, 1974).

Tahap pertama pembuatan kalsium alginat $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)_2\text{Ca}$ adalah dengan mengubah ion natrium dalam natrium alginat yang larut dalam air, dengan kation divalen khususnya kalsium dibawah kondisi alkali (Zhanjiang, 1990). Sehingga terbentuk gel kalsium alginat pada 2 blok G tersusun paralel seperti telur dalam kotak pada Gambar 12. Kekuatan dari gel yang terbentuk tergantung dari penambahan garam Ca^{2+} yang bervariasi dari satu alginat dengan alginat lainnya. Alginat dengan kandungan G yang tinggi akan lebih kuat dibandingkan dengan alginat dengan kandungan M yang tinggi. Gel kalsium alginat banyak dimanfaatkan dalam bidang biomedis sebagai bahan pembuatan kapsul, butiran, dan pembalut luka, dalam industri makanan sebagai pengental dan sebagai bahan kosmetik (Boisseson, 2004).





Gambar 12. Struktur Ca-alginat (Smidsrod, 1974).