

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Enzim

Enzim merupakan biokatalisator yang sangat efektif yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, reaksi ini tanpa enzim akan berlangsung lambat (Lehninger, 2005). Mikroorganisme terutama ragi, telah digunakan selama beberapa ribu tahun untuk membuat bir, minuman anggur, dan beberapa produk fermentasi lain. Namun, baru pada tahun 1878, oleh Kuhne, komponen sel ragi yang bertanggung jawab terhadap fermentasi disebut sebagai *enzim* (berasal dari bahasa Yunani yang berarti di dalam ragi). Kurang dari dua dasawarsa berikutnya, sifat enzim yang tidak hidup dibuktikan secara jelas dengan menggunakan ekstrak ragi yang bebas sel, ternyata ekstrak tersebut mampu mengkatalisis perubahan glukosa menjadi etanol (Ahmad, 2007).

Enzim merupakan katalis seluler, hal itulah yang membuat reaksi biokimia dapat berlanjut berkali-kali lebih cepat. Selain mampu meningkatkan reaksi, enzim memiliki dua sifat lain sebagai katalis sejati. Pertama, enzim tidak diubah oleh reaksi yang dikatalisnya, kedua walaupun mempercepat reaksi, enzim tidak mengubah kedudukan normal dari kesetimbangan kimia. Dengan kata lain, enzim dapat membantu mempercepat pembentukan produk, tetapi

akhirnya jumlah produk tetap sama dengan produk yang diperoleh tanpa enzim (Sidkey, 2011).

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi sehingga mempercepat proses reaksi. Percepatan reaksi terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim substrat yang bersifat sementara kemudian terurai membentuk enzim bebas dan produknya (Lehninger, 2005).

Enzim digunakan dalam sebagian besar sektor industri, terutama industri makanan. Selain itu, enzim juga digunakan dalam industri deterjen, farmasi, dan tekstil. Lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, tetapi hanya 14 enzim yang diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim ini adalah hidrolase, misalnya amilase, protease, pektinase, dan selulase. Enzim penting lainnya adalah glukosa isomerase dan glukosa oksidase. Alasan digunakannya enzim dalam industri adalah enzim mempunyai kelebihan antara lain:

- a. Spesifikasi substrat yang tinggi
- b. Reaksi dapat dilakukan pada kondisi yang lunak, yaitu pada tekanan dan temperatur rendah.

Sistem produksi mikrobial dapat diperoleh di bawah kontrol tertutup dan level/tingkat enzim, sehingga produktivitas enzim dapat dimanipulasi secara lingkungan dan genetika, juga metode pengayakan untuk sistem mikrobial cukup sederhana. Kebanyakan enzim mikroba yang digunakan secara komersial adalah ekstraseluler, yaitu enzim yang diproduksi dalam sel

kemudian dikeluarkan atau berdifusi keluar sehingga memungkinkan untuk direcovery. Seleksi organisme produser adalah kunci dalam pengembangan proses sistem mikrobial. Berikut ini hal-hal yang perlu diperhatikan dalam memilih mikroorganisme.

- a. Sumber organisme stabil.
- b. Mudah tumbuh dan berkembang biak sehingga biaya produksi rendah.
- c. Produktivitas enzim tinggi.
- d. Tidak mengeluarkan racun.

Dari semua hal tersebut, yang paling penting adalah stabilitas strain dan produktivitas enzim yang tinggi. Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologis. Semua enzim murni yang telah diamati sampai saat ini adalah protein. Aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana, sampai ke reaksi yang sangat rumit (Murray, 2000).

Enzim memiliki keunggulan sifat, antara lain mempunyai aktivitas yang tinggi, efektif, spesifik dan ramah lingkungan, sedangkan pendapat lain menyebutkan, enzim memiliki sifat yang khas, yaitu sangat aktif walaupun konsentrasinya amat rendah, sangat selektif dan bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*), yaitu tanpa temperatur atau tekanan tinggi dan tanpa logam yang umumnya beracun. Hal inilah yang menyebabkan reaksi yang

dikatalisis secara enzimatik menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalis kimia ( Rosi, 2010).

Ada tiga sumber enzim, yaitu dari hewan, tumbuhan, dan sel mikroba. Dahulu hewan dan tumbuhan merupakan sumber enzim tradisional, namun dengan berkembangnya ilmu bioteknologi, masa depan terletak pada sistem mikrobial. Tak dapat dipungkiri bahwa sebagian besar sumber enzim dalam skala industri adalah mikroorganisme (Tabel 1) (Lehninger, 2005).

**Tabel 1.** Sumber mikroba dan beberapa penggunaan enzim komersial

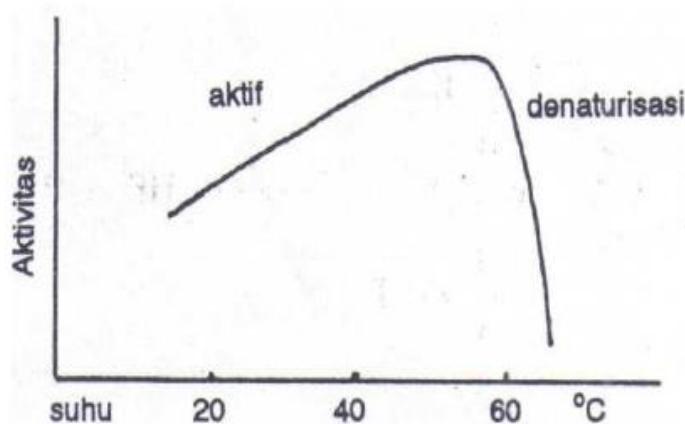
Enzim	Sumber Mikroba	Penggunaan
Alkohol dehidrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pengujian Alkohol
A-amilase	<i>Aspergillus oryzae, A. niger, Bacillus subtilis</i>	Digunakan luas dalam industri makanan
Amiloglukosidase	<i>A. niger, A.oryzae, Bacillus coagulanes</i>	Produksi glukosa dari sirup jagung
Asparaginase	<i>Penicillium camemberti, A.niger, P.Vitale</i>	Pengobatan penyakit leukemia getah bening akut
Katalase	<i>Micrococcus lysodeiktilikus</i>	Pemisahan hidrogen yang digunakan dalam banyak proses.
Selulase	<i>Trichoderma viridae</i>	Pembuatan sayur-sayuran yang didehidrasi, “ <i>drain cleaner</i> ”
Glukosa isomerase	<i>B.coagulanes, Streptomyces phacochromogens S.cerevisiae, S.carisbergensis</i>	Produksi fruktosa dari sirup buah-buahan dan produk lain
Invertase	<i>A.niger, Geotrichum candidum, Rhizopus arrhizus</i>	Pembuatan cokelat lunak
Lipase	<i>A.niger, A.oryzae</i>	Memperbaiki wangi dalam es krim, keju, cokelat. Klasifikasi sari buah-buahan, fermentasi buah kopi

Pemanfaatan enzim dalam bidang industri harus memperhatikan faktor penting yang sangat mempengaruhi efisiensi dan efektivitas dari enzim yang digunakan. Faktor-faktor tersebut mempengaruhi pembentukan aktivitas

kerja suatu enzim. Apabila faktor tersebut berada dalam kondisi yang optimum, maka kerja enzim juga akan maksimal (Rosi, 2000).

### 1. Pengaruh Temperatur

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 hidup pada suhu tinggi.



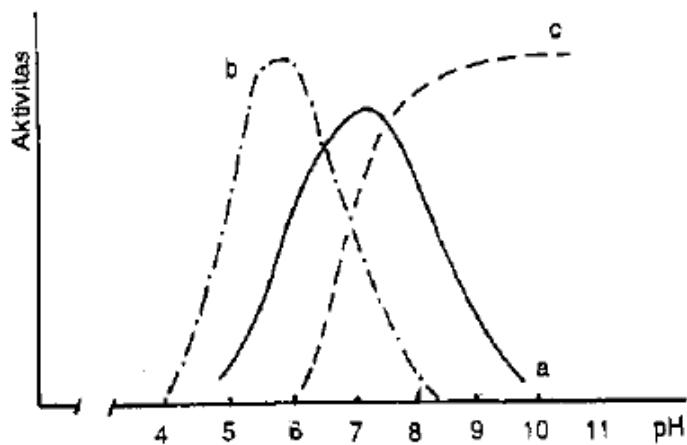
**Gambar 1.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzimatik (Scopes, 2002).

Aktivitas enzimatik diukur pada berbagai suhu (sebagai contoh 15°C - 40°C). Pada umumnya, semakin tinggi temperatur semakin tinggi laju reaksi baik yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim. Namun demikian, enzim merupakan senyawa protein yang sangat peka terhadap perubahan temperatur, dan jika dilihat dari Gambar 1, semakin tinggi temperatur akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Pada temperatur rendah, laju inaktivasi enzim berjalan lambat dan sangat kecil, sehingga boleh

diabaikan. Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatis dilakukan pada temperatur ruangan. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30°C dan denaturasi dimulai pada temperatur 50°C (Nisa, 2013).

## 2. Pengaruh Derajat Keasaman

Umumnya enzim bersifat amfolidisosiatik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Perubahan enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat, serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Biasanya enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5-8,0. Enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Disekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Dalam hal ini, enzim yang sama sering kali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim tersebut (Bintang, 2010). Hubungan antara aktivitas enzimatik dengan pH secara umum ditunjukan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Bintang, 2010).

### 3. Pengaruh Kadar air

Kadar air dari bahan sangat mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Kadar air bebas yang rendah mengakibatkan difusi enzim atau substrat, akibatnya hidrolisis hanya akan terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan enzim. Misalnya pada kadar air 20% atau kira-kira bahan mengandung 4% air bebas, amilase hanya menghasilkan produk hidrolisis glukosa dan maltosa. Pada kadar air yang lebih tinggi, selain glukosa dan maltosa terbentuk juga dekstrin (Winarno, 1986).

Dalam sistem reaksi enzim, kadar air mutlak bukan merupakan faktor yang penting, tetapi aktivitas enzim lebih banyak dipengaruhi oleh *water activity* ( $A_w$ ) bahan, dan dapat juga dipengaruhi kelembaban udara disekitarnya. Pada  $A_w$  rendah hanya sebagian kecil substrat terlarut dalam air bebas. Setelah substrat tersebut habis dihidrolisis, maka reaksinya terhenti. Dengan meningkatkan kelembaban udara, jumlah air bebas akan

meningkat dan dapat melarutkan substrat sehingga reaksi dimulai kembali (Winarno, 1986).

#### 4. Pengaruh Kadar Garam

Kadar elektrolit yang tinggi umumnya mempengaruhi kelarutan protein, karena itu sering digunakan untuk melarutkan beberapa jenis protein. Peristiwa tersebut sering disebut istilah *salting in*. Sebaliknya beberapa jenis larutan garam lain dapat digunakan untuk membuat protein enzim menjadi tidak larut. Proses ini disebut dengan istilah *salting out*, yang dapat dimanfaatkan untuk mengisolasi enzim. Garam Amonium sulfat sering digunakan untuk fraksinasi dan isolasi enzim karena sifat kelarutannya dalam air yang tinggi dan tidak mengganggu bentuk dan fungsi enzim (Scopes, 2002).

#### 5. Aktivitas dan Kadar Protein Enzim

Suatu enzim, baik yang masih aktif maupun tidak aktif memiliki komposisi yang sama. Dengan demikian, aktivitas enzim tidak hanya ditentukan berdasarkan komposisi kimianya saja. Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksinya. Dengan demikian jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam satuan atau unit enzim. Selain itu bila membaca harga satuan enzim, perlu diketahui kondisi reaksi yang digunakan pada saat proses berlangsung. Penilaian jumlah satuan suatu enzim dapat saja berbeda, terutama bila produk yang dihasilkannya berbeda (Rosi, 2000).

Berbagai cara dan ukuran dalam menentukan satuan enzim mengakibatkan penentuan satuan enzim tidak seragam. Karena itu perlu distandardkan agar dapat diutarakan dalam pengertian yang seragam dan dalam bahasa yang sama. *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* mengusulkan suatu definisi untuk satuan enzim sebagai berikut, satu satuan (unit) dari suatu enzim adalah jumlah enzim tersebut yang mampu mengkatalis perubahan  $1\mu\text{mol}$  substrat per menit pada kondisi tertentu. Bila ternyata substratnya merupakan senyawa polimer seperti protein atau pektin, maka istilah  $1\mu\text{mol}$  substrat diganti dengan 1 mikro ekuivalen gugus penting senyawa tersebut (Rosi, 2000).

Kandungan protein di dalam enzim sangat berpengaruh terhadap daya katalitik enzim tersebut. Pada umumnya dengan meningkatnya kadar protein dalam suatu enzim, maka daya katalitiknya akan meningkat. Salah satu metode dapat digunakan dalam menentukan kadar protein adalah metode Lowry (Scopes, 2002).

## **B. Enzim $\alpha$ -amilase**

Enzim adalah katalisator organik (biokatalisator) yang dihasilkan oleh sel. Enzim berfungsi seperti katalisator anorganik, yaitu untuk mempercepat reaksi kimia tanpa mempengaruhi keseimbangan reaksi. Enzim invertase dipakai untuk menghidrolisis sukrosa menjadi gula invert. Laktase dibutuhkan dalam hidrolisis digestif laktosa pada susu. Hidrolisis selulosa menjadi glukosa, yang biasa disebut sakarifikasi, memakai selulase sebagai

katalisnya. Sementara untuk menghasilkan maltodekstrin dipakai enzim  $\alpha$ -amilase (Winarno, 1986).

Enzim  $\alpha$ -amilase adalah enzim yang mempunyai banyak fungsi dalam kehidupan. Enzim  $\alpha$  – amilase terdapat pada tumbuhan, jaringan mamalia, jaringan mikroba. Dapat juga diisolasi dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis*. Enzim  $\alpha$ -amilase adalah endo-enzim yang bekerja memutus ikatan  $\alpha$ -1,4-D-glukosa secara spesifik di bagian dalam molekul baik pada amilosa maupun amilopektin. Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase menyebabkan pati terputus-putus dengan rantai sepanjang 6-10 unit glukosa. Banyaknya hidrolisis ikatan glukosida dari pati biasanya dijelaskan dengan *dextrose equivalent* (DE). Glukosa murni mempunyai DE 100 dan pati mempunyai DE sebesar 0 (Janecek, 1993).

Cara kerja enzim  $\alpha$  - amilase terjadi melalui dua tahap, yaitu : tahap pertama, degradasi amilosa menjadi maltosa dan amiltrotriososa, degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas yang cepat pula. Tahap kedua, relatif sangat lambat yaitu pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir. Kedua tahap tersebut merupakan kerja enzim  $\alpha$  - amilase pada molekul amilosa. Enzim  $\alpha$  – amilase menghidrolisis amilosa lebih cepat dibanding hidrolisisnya terhadap amilopektin (Pandey, 2000).

Perbedaan waktu hidrolisis akan menyebabkan jumlah pati yang termodifikasi juga berbeda. Makin lama waktu hidrolisis makin besar persentase pati yang berubah menjadi gula pereduksi. Hal ini dapat dilihat

dari harga DE yang semakin tinggi. Konsentrasi katalis juga dapat berpengaruh pada harga DE dari produk yang dihasilkan. Makin tinggi konsentrasi katalis, dalam hal ini adalah enzim, makin banyak gula pereduksi yang terbentuk. Hal ini berarti harga DE akan semakin tinggi. Meskipun demikian, penentuan konsentrasi katalis memiliki batas optimum. Jika melebihi batas tersebut, hidrolisis akan terhambat. Pada umumnya Pada proses hidrolisis pati, terdapat tiga tahapan dalam mengkonversi pati yaitu tahap gelatinisasi, likuifikasi dan sakarifikasi. Tahap gelatinisasi merupakan tahap pembentukan suspensi kental dari butir pati, tahap likuifikasi yaitu hidrolisis pati parsial yang ditandai dengan menurunnya viskositas, sedangkan sakarifikasi merupakan proses lebih lanjut dari hidrolisis untuk menghasilkan glukosa (Suhartono, 1989).

### **C. Fungi**

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan fungi :

#### 1. Konsentrasi substrat

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

#### 2. 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 *A. niger*. Pada proses

fermentasi untuk menghasilkan enzim selulase sumber nitrogen yang optimal adalah urea (Narasimha dkk. 2011).

### 3. 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 terjadi kontaminasi ion logam tertentu (Gandjar, 2006).

### 4. 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% (Gandjar, 2006).

### 5. Aerasi

Dalam media fermentasi padat, aerasi diatur dengan cara memperhatikan pori-pori bahan yang difermentasikan. Aerasi berfungsi untuk mempertahankan kondisi aerobik untuk desorpsi  $\text{CO}_2$ , mengatur temperatur substrat, dan mengatur kadar air (Gandjar, 2006).

Aerasi yang diberikan juga membantu menghilangkan sebagian panas yang dihasilkan sehingga temperatur dapat dipertahankan pada temperatur optimal untuk produksi enzim. Tingkat aerasi optimal yang diberikan dipengaruhi oleh sifat mikroorganisme yang digunakan. Tingkat  $\text{O}_2$  yang dibutuhkan untuk sintesis produk, jumlah panas metabolismik yang harus dihilangkan dari bahan, ketebalan lapisan substrat, tingkat  $\text{CO}_2$ , dan

metabolit-metabolit lain yang mudah menguap harus dihilangkan, dan tingkat ruang udara yang tersedia di dalam substrat (Suhartono, 1989).

#### 6. Derajat Keasaman (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 menyenangi 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 (Gandjar, 2006).

#### 7. 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 funginya, sehingga industri tidak memerlukan penambahan alat pendingin (Gandjar, 2006).

## 8. 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. 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. Pada temperatur 31°C aktivitas tertinggi diperoleh setelah hari ke-4 fermentasi, akan tetapi pada hari ke-6 mengalami penurunan aktivitas dan pada hari ke-8 mengalami kenaikan kembali (Sivaramakrishnan, 2006).

## 9. *Moisture Content*

*Moisture content* merupakan faktor penting dalam proses sistem fermentasi padat karena variabel ini dapat berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme, biosintesis, dan sekresi enzim. *Moisture content* yang rendah menyebabkan berkurangnya kelarutan nutrien di dalam substrat, derajat pertumbuhan rendah, dan tegangan air tinggi. Sedangkan level *moisture content* yang lebih tinggi dapat menyebabkan berkurangnya *yield* enzim yang dihasilkan karena dapat mereduksi porositas (jarak interpartikel) pada matriks padatan, sehingga

menghalangi transfer oksigen. *Moisture content* yang optimal untuk pertumbuhan *A. niger* adalah 85% (Inggrid, 2012).

#### **D. *Aspergillus niger***

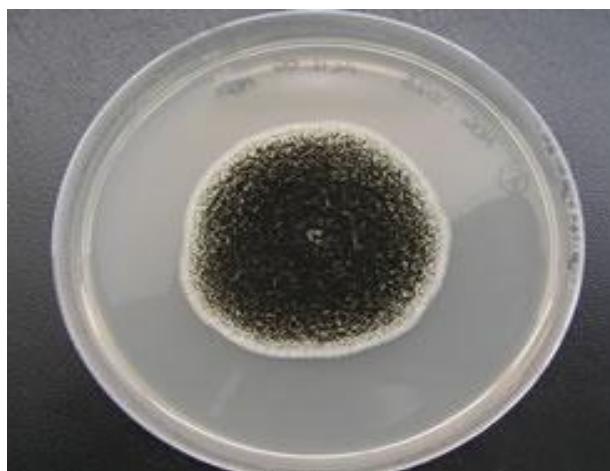
*Aspergillus niger* merupakan fungi dari ascomycota yang berfilamen, mempunyai hifa, bercabang-cabang dan bersekat, berwarna terang atau tidak berwarna, dan ditemukan melimpah di alam. Fungi diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruanagan. *A. niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C. Proses pertumbuhan fungi ini adalah secara aerobic, *A. niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal, berwarna coklat gelap (Esser, 2002).

*A. niger* dapat tumbuh dengan cepat sehingga banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase amiloglukosida dan selulosa (Broekhuijsen *et al.*, 1993; Okada, 1985). *A. niger* mampu mensintesis asam sitrat dalam medium fermentasi ekstraseluler dengan konsentrasi yang cukup tinggi, jika dibiakkan dalam media yang kadar garamnya rendah dan mengandung gula sebagai sumber karbon (Hang *et al.*, 1977; Ji *et al.*, 1992).

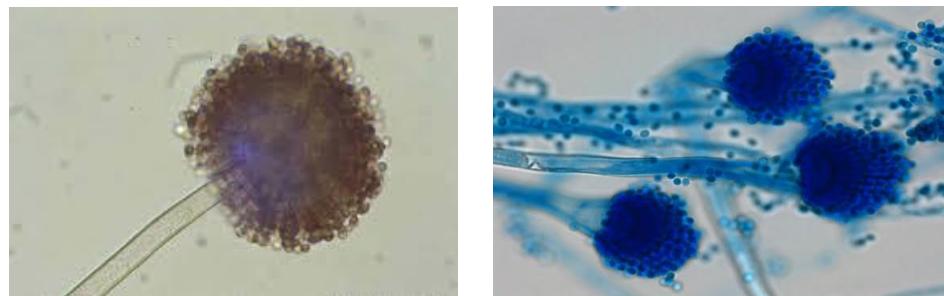
*A. niger* adalah jamur yang termasuk genus *Aspergillus*, family *Moniliceae*, ordo *Moniliales* dan subdivisi *Deuteromycotyna* dari kelas fungi *imperfecti*. *Aspergillus sp.* adalah jenis jamur yang mempunyai hifa yang berspora. Hifa yang terletak pada bagian terendam pada substrat berfungsi sebagai penyerap

unsur hara dan yang menghadap permukaan berfungsi sebagai alat reproduksi.

*A. niger* biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan dan udara dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) 25°C atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam (Gambar 3). Kepala konidia berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur (Gambar 4). Suhu optimum pertumbuhannya adalah 35-37°C dengan suhu minimum 6-8°C dan suku maksimum 45-47°C. Dalam proses pertumbuhannya *A. niger* memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). Selain itu *A. niger* juga membutuhkan mineral dalam pertumbuhannya seperti  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , urea,  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Rosi, 2000).



**Gambar 3.** *A. niger* pada media mall ekstrak agar (Mozhaev, 1984)



**Gambar 4.** Konidiaspora *A. niger* (Mozhaev, 1984)

Pertumbuhan *A. niger* dan pertumbuhan produk dipengaruhi oleh beberapa faktor:

1. Temperatur

Temperatur berpengaruh langsung pada kecepatan pertumbuhan mikroorganisme, kecepatan sintesa enzim dan kecepatan. Jamur pada umumnya tidak tahan terhadap temperatur tinggi, temperatur terlalu tinggi dapat mengakibatkan proses pengeringan protein yang menyebabkan kematian sel, sedangkan temperatur yang terlalu rendah akan mengurangi aktifitas enzim hingga pertumbuhan mikroorganisme terganggu.

Pembentukan enzim ekstraselular akan lebih baik pada temperatur yang lebih rendah dari temperatur optimum pertumbuhan. Hal ini terjadi karena energi yang diperoleh dari respirasi lebih banyak digunakan untuk melakukan pembentukan spora daripada miselium. Pembentukan miselium akan mempengaruhi jumlah enzim yang dihasilkan jamur. Selain itu, semakin tinggi temperatur, sistem enzim satu persatu akan menjadi tidak aktif sehingga pertumbuhan menjadi tidak stabil. Pada temperatur yang lebih rendah, proses metabolisme akan berjalan lambat

dan membantu mengurangi penghambatan sintesa enzim yang dikenal dengan istilah "represi katabolitik" (Esser, 2002).

## 2. Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH media adalah salah satu faktor yang penting untuk pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk fermentasi. Jamur umumnya lebih toleran terhadap suasana asam sampai netral yaitu pada pH sekitar 3 sampai 7. *A. niger* mempunyai kisaran pH untuk tumbuh cukup luas yaitu 2,8 – 8,8. Sedangkan pH optimumnya tergantung pada produk yang diharapkan. Pada umumnya enzim ekstraselular dihasilkan paling banyak pada pH pertumbuhan yang mendekati pH aktivitas maksimum enzim yang bersangkutan.

## 3. Zat makanan (nutrien)

Karbon adalah sumber nutrien utama yang diperlukan dalam pertumbuhan jamur. *A. niger* akan tumbuh dengan baik jika menggunakan glukosa, fruktosa, maltosa, sukrosa, xylosa dan manosa sebagai sumber karbonnya. Nutrien lain yang cukup memegang peranan penting adalah unsur nitrogen. Selama fase pertumbuhan, jamur menggunakan nitrogen dengan cepat dan pada periode ini enzim mulai terdapat di dalam media.

Kecepatan pertumbuhan jamur yang menggunakan sumber nitrogen anorganik lebih rendah daripada campuran asam-asam amino atau sumber nitrogen kompleks lainnya sebagai sumber nitrogen organik. Campuran asam-asam amino berpengaruh cukup besar terhadap

pertumbuhan jamur dan pembentukan enzim. Sumber nitrogen anorganik biasanya berasal dari garam amonium, nitrat atau gas amonia. Sedangkan sumber nitrogen organik biasanya berasal dari senyawa organik seperti ekstrak khamir, hidrolisat kasein, whey, *corn steep liquor*, dan senyawa nitrogen komplek lainnya seperti limbah pengolahan kedelai dan ikan. Sumber nitrogen yang paling baik adalah *yeast extract*. Mineral merupakan nutrien lain yang dibutuhkan mikroorganisme. Media untuk pertumbuhan pada umumnya memerlukan magnesium (Mg), Fosfor (P), kalium (K), sulfur (S), kalsium (Ca) dan khlor (Cl) sebagai komponen "essensial"nya. Unsur-unsur ditambahkan dalam bentuk garamnya dengan konsentrasi yang tepat (Esser, 2002).

*A. niger* dalam pertumbuhannya berhubungan dengan zat makanan (nutrien) yang terkandung dalam medium fermentasi. Molekul-molekul sederhana seperti glukosa yang terlarut dalam air yang terkandung pada sekeliling hifa, dapat langsung diserap oleh hifa. Senyawa-senyawa polimer seperti selulosa, pati dan protein harus diuraikan terlebih dahulu menjadi molekul yang lebih sederhana oleh *A. niger*. Selanjutnya molekul-molekul sederhana tersebut diserap ke dalam sel dan digunakan sebagai substrat oleh enzim intraselular (Gandjar, 2006).

## **E. Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Untuk mendapatkan enzim yang diinginkan, perlu adanya pemurnian yang bertujuan menghilangkan protein-protein yang terkandung dalam enzim yang

kemungkinan akan menjadi faktor pengganggu (MacGregor, 1976). Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler adalah enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan enzim intraseluler, pada enzim intraseluler diperlukan pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim dari dalam sel dan dipisahkan dari bahan-bahan pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Swaroop, 2010).

### 1. Sentrifugasi

Tujuan sentrifugasi adalah untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernataan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung yang kemudian dipisahkan secara manual (Scopes, 1982).

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada pernyataan bahwa setiap partikel pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar ( $F$ ). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut  $\omega$  (radian/detik) dan radius pertukarannya (centimeter).

$$F = \omega^2 r$$

Gaya  $F$  dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, karena itu dinyatakan sebagai gaya sentrifugal relatif.

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

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm. Oleh sebab itu, harga rpm dikoversikan ke dalam bentuk radian menggunakan persamaan

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

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

$$RCF = (1,119 \times 10^{-5})(rpm)^2 r$$

(Bintang, 2010)

## 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. Garam yang biasa digunakan untuk mengendapkan protein dan enzim adalah garam amonium sulfat. Kelebihan amonium sulfat dibandingkan dengan garam lain yaitu memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH, dan harganya yang terjangkau (Scopes, 2002).

## 3. Dialisis

Salah satu prosedur tertua dalam pemurnian dan karakterisasi bimolekul adalah dialisis. Metode ini didasarkan pada sifat semipermeabel membran yang dapat menahan molekul – molekul besar, tapi dapat meloloskan molekul-molekul kecil seperti garam. Proses ini berlangsung

karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis dilakukan pada ruangan dingin (Boyer, 2012).

Pada proses dialisis, terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih rendah daripada sampel akan berganti dengan larutan buffer. Difusi garam dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradient konsentrasi. Penghentian dialisis dilakukan apabila tercapai keadaan kesetimbangan, yaitu keadaan konsentrasi bahan yang dapat mengalami dialisis adalah sama, antara di luar dengan di dalam kantong selofan (Lehninger, 1995).

Secara umum proses dialisis berlangsung sebagai berikut, larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam kantong dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel (selofan). Jika kantung yang berisi larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam larutan buffer, maka molekul kecil yang ada dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul yang berukuran besar akan tetap tertahan pada kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantong dialisis (Lehninger, 1995).

## **F. Pengujian Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dapat diukur berdasarkan atas degradasi amilum, yaitu dari penurunan kadar amilum yang larut, kadar dekstrin yang terbentuk atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Substrat yang hilang dapat diukur dengan pengukuran derajat pewarnaan iodin terhadap substrat (Fuwa, 1954). Pati bereaksi secara kimiawi dengan iodium, reaksi ini dapat terlihat sebagai warna biru-kehitaman. Warna biru-kehitaman ini terjadi apabila molekul iodium masuk kedalam bagian yang kosong pada molekul yang amilum (amilosa) terbentuk spiral. Proses iodiniasi zat amilum menghasilkan molekul yang menghasilkan molekul yang mengabsorbsi semua warna kecuali warna biru. Bila zat pati ini diuraikan menjadi maltose ataupun glukosa, maka warna biru ini tidak akan terjadi karena tidak terbentuk spiral pada molekul pati/amilum (Lay, 1994).

## **G. Penentuan Kadar Protein**

Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (protein tidak hilang selama proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Salah satu metode untuk menentukan kadar protein adalah Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan terjadi pengikatan protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen folin menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru (Lowry, 1951).

Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks  $\text{Cu}^{2+}$  dengan ikatan peptide yang akan tereduksi menjadi  $\text{Cu}^+$  pada kondisi basa.  $\text{Cu}^{2+}$  dan rantai samping tirosin, triftofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen folin-ciocalteau. Reagen bereaksi menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molybdenum atau *tungesteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triftofan dan tirosinnya (Scopes, 2002).

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini memiliki kelemahan yakni sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya, digunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi. Selain metode *Lowry*, metode lain yang dapat digunakan untuk penentuan kadar protein adalah metode Biuret, *Smith* dan *Bradford* (Scopes, 2002).

## **H. Modifikasi Kimia**

Menurut Mozhaev dan Martinek (1984), ada tiga cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu, amobilisasi, modifikasi kimia dan mutagenesis terarah. Modifikasi kimia merupakan metode yang lebih disukai untuk mendapatkan enzim yang stabil. Hal ini dikarenakan dalam amobilisasi enzim, terjadi penghambatan transfer massa oleh matriks pengamobil sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kapasitas pengikatan maupun reaktivitas enzim. Sedangkan mutagenesis terarah

memerlukan informasi yang lengkap mengenai struktur primer dan struktur tiga dimensi enzim tersebut.

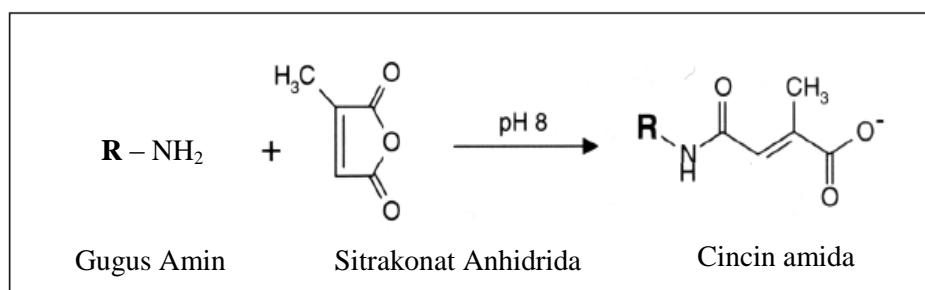
Menurut Janecek (1993), modifikasi kimia merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Keunggulan dari metode modifikasi kimia dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim adalah : (1) interaksi antara enzim dengan substrat tidak terhalangi oleh adanya matriks yang tidak larut, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. (2) Pada proses amobil, mekanisme kerja enzim yang digunakan dalam bidang klinik selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari membran seluler, kemungkinan berubah karena keberadaan matriks pendukung (Nubarov *et al.*, 1987).

Untuk mendapatkan enzim hasil modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil menurut Mozhaev *et al.*, (1990), adalah dengan melakukan : (1) modifikasi dengan menggunakan pereaksi bifungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus-gugus fungsi pada permukaan protein), (2) modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi nonpolar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) penambahan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambah ikatan ionik atau hidrogen), (4) hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukainya).

Menurut Nubarov *et al.*, (1987), hidrofilisasi permukaan enzim dapat dilakukan dengan dua cara modifikasi langsung berbagai asam amino hidrofobik yang membentuk tapak-tapak hidrofobik pada permukaan enzim

dengan pereaksi hidrofilik, atau hidrofilisasi terhadap asam amino yang berada dekat dengan tapak hidrofobik sehingga tapak tersebut terlindungi dari lingkungan berair.

Dalam penelitian yang telah dilakukan oleh Khajeh *et al.*, (2004), dijelaskan bahwa senyawa sitrakonat anhidrida merupakan reagen spesifik yang digunakan untuk memblok gugus amino pada residu lisin. Modifikator ini menghasilkan dua produk ikatan peptida yang dibentuk dari kedua gugus karbonil pada struktur molekulnya yang dapat dilihat dari Gambar 5.



**Gambar 5.** Reaksi sitrakonat anhidrida dan gugus amina (Khajeh, 20004)

Reaksi modifikasi ini diawali dengan pembukaan cincin sitrakonat anhidrida dengan suasana basa pada pH 8 dan kemudian gugus karbonil dari sitrakonat anhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin. Gambar 6 menunjukkan reaksi yang terjadi antara sitrakonat dengan gugus amino suatu protein seperti yang telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2004).