

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Enzim

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologik (Suhartono, 1992). Suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi kira-kira  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (Poedjiadi, 1994). Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (globular), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri dari lebih dari satu polipeptida (Wirahadikusumah, 1997) dan umumnya mempunyai berat molekul yang beraneka ragam berkisar  $10^4$ – $10^7$  kDa (Dryer, 1993).

Enzim bekerja sangat spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau nonpolar dalam struktur enzim (Fessenden, 1992). Salah satu fungsi yang paling menonjol dari protein adalah aktivitas enzim. Enzim mempunyai fungsi khusus antara lain yaitu : (1) menurunkan energi aktivasi, (2) mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya, dan (3) mengendalikan reaksi (Page, 1997).

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah enzim bersifat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, serta dapat didegradasi secara biologis (Page, 1997). Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Dalam bidang pangan misalnya amilase, glukosa-isomerase, papain dan bromelin. Sedangkan dalam bidang kesehatan contohnya amilase, lipase dan protease. Dalam banyak aplikasi bioteknologi, selulase digunakan dalam proses sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas (Busto *et al.*, 1995; Akiba *et al.*, 1995). Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Namun, secara umum enzim diisolasi dari mikroorganisme karena pertumbuhan mikroorganisme relatif lebih cepat sehingga enzim yang dihasilkan lebih banyak.

#### 1. Klasifikasi enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

- a. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
  1. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
  2. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.
- b. Berdasarkan fungsinya enzim dapat dibedakan menjadi enam kelas dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi

dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC yaitu :

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi, meliputi reaksi pemindahan elektron, hidrogen atau oksigen.
  2. Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul ke molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metil, asil, glikosil atau fosforil.
  3. Hidrolase, mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain dengan adanya penambahan air.
  4. Liase, mengkatalisis penambahan gugus fungsi dari suatu molekul tanpa melalui proses hidrolisis.
  5. Isomerase, mengkatalisis reaksi isomerisasi.
  6. Ligase, mengkatalisis reaksi penggabungan dua molekul dengan dibebaskannya molekul pirofosfat dari nukleosida trifosfat.
- c. Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu :
1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
  2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim
  3.  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 1982).

## 2. Sifat katalitik enzim

Sifat-sifat katalitik dari enzim sebagai berikut :

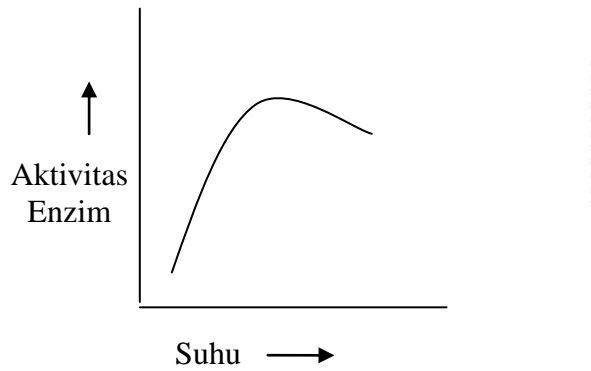
- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim berfungsi dengan selektivitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1997).

## 3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut :

### a. Suhu

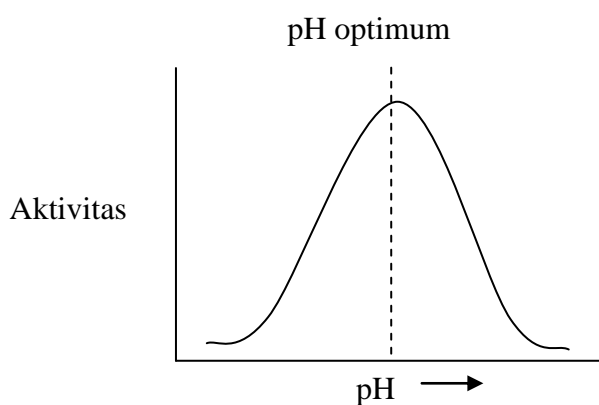
Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1988). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Pada suhu 0°C enzim tidak aktif (tidak rusak) dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay *and* Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu (Poedjiadi, 1994).

b. pH

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 aminonya, diperkirakan perubahan kereaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan (Winarno, 1986). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Page, 1997).

c. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1997). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Page, 1997).

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

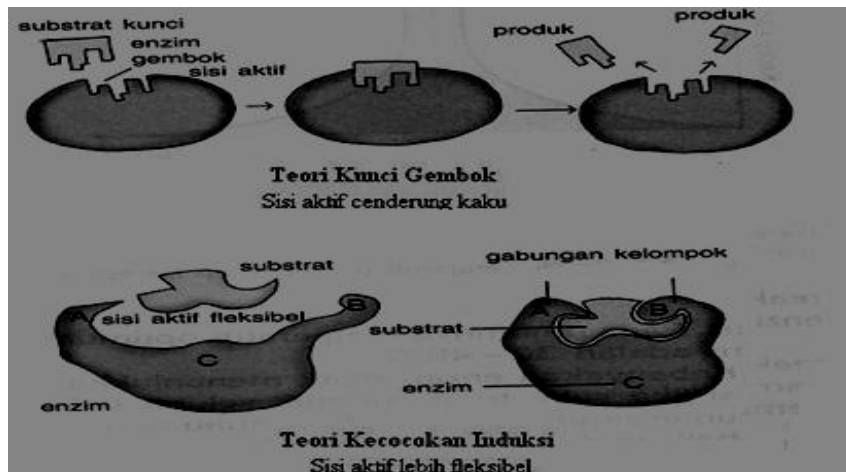
Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya.

Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu atau Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1984).

Menurut Wirahadikusumah (1997) 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, 1986).

4. Teori pembentukan enzim-substrat

Cara kerja enzim dapat dijelaskan dengan dua teori, yaitu teori kunci-gembok (*lock and key theory*) dan teori kecocokan yang terinduksi (*induced fit theory*), ditunjukkan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Teori kunci-gembok dan teori kecocokan induksi (Page, 1997).

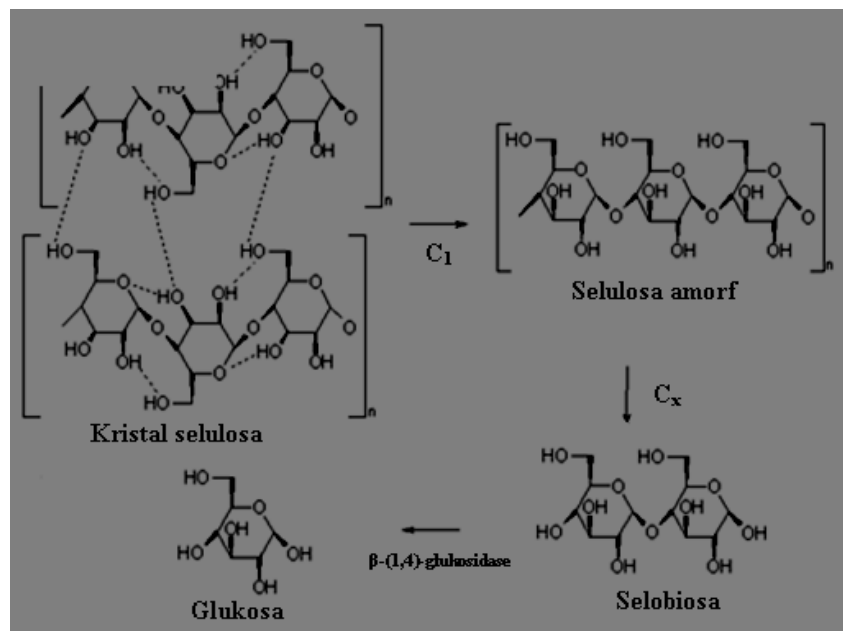
Menurut teori kunci-gembok, enzim dan substrat bergabung bersama membentuk kompleks, seperti kunci yang masuk dalam gembok. Hal ini dikarenakan adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Di dalam kompleks, substrat dapat bereaksi dengan energi aktivasi yang rendah. Setelah bereaksi, kompleks lepas dan melepaskan produk serta membebaskan enzim. Sedangkan menurut teori kecocokan yang terinduksi, sisi aktif enzim merupakan bentuk yang fleksibel. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif termodifikasi melingkupi substrat membentuk kompleks. Ketika produk dihasilkan, maka enzim akan dilepaskan dalam bentuk bebas dan dapat bereaksi kembali dengan substrat yang baru.

## B. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim terinduksi yang disintesis oleh mikroorganisme selama ditumbuhkan dalam medium selulosa (Lee dan Koo, 2001). Selulase termasuk



sistem multi-enzim yang terdiri dari tiga komponen. Untuk menghidrolisis selulosa yang tidak larut atau selulosa kristal diperlukan kerja sinergistik dari ketiga komponen enzim tersebut. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat dalam Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Lee dan Koo, 2001).

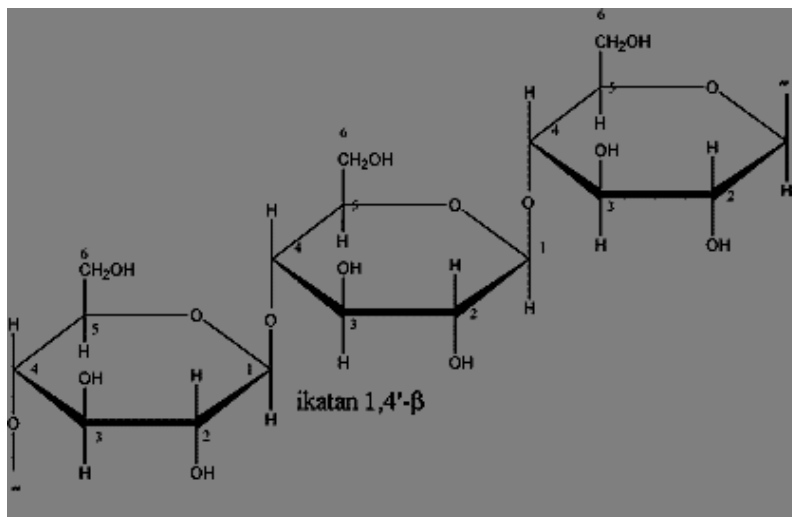
Adapun ketiga komponen enzim tersebut yaitu :

1. Ekso- $\beta$ -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor  $C_1$ . Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis selulosa dalam bentuk kristal selulosa amorf.
2. Endo- $\beta$ -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor  $C_x$ . Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis ikatan  $\beta$ -(1,4)-glukosida pada selulosa amorf menjadi selobiosa.
3.  $\beta$ -(1,4)-glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Reese, 1976).

### C. Selulosa

Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di bumi, diperkirakan sekitar  $10^{11}$  ton selulosa dibiosintesis per tahun (Fessenden, 1992). Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan glukosa yang terikat dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang (Fan *et al.*, 1982).

Rumus empiris selulosa adalah  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , dengan banyaknya satuan glukosa yang disebut derajat polimerisasi (DP), dimana jumlahnya mencapai 1.200-10.000 dan panjang molekul sekurang-kurangnya 5.000 nm. Berat molekul selulosa rata-rata sekitar 400.000 (Sjostrom, 1995). Adapun struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 6.

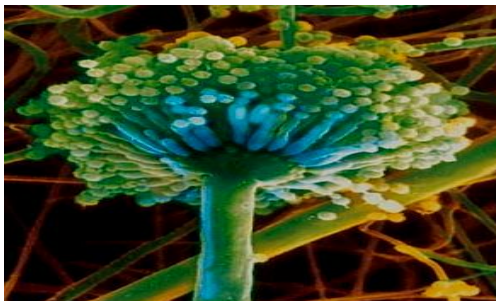


Gambar 6. Struktur selulosa (Fessenden, 1992).

Berdasarkan strukturnya, selulosa dapat saja diharapkan mempunyai kelarutan yang tinggi dalam air, akan tetapi dalam kenyataannya selulosa tidak larut dalam air, bahkan pelarut lainnya. Hal ini disebabkan oleh tingginya rigiditas rantai dan gaya rantai akibat ikatan hidrogen antara gugus –OH pada rantai berdekatan. Faktor ini dipandang sebagai penyebab tingginya kekristalan dari serat selulosa (Coward and Stark, 1991).

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

*Aspergillus niger* merupakan fungi dari filum *ascomycetes* yang berfilamen, mempunyai hifa berseptat, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Fungi ini biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan dan udara di dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada agar dekstroza kentang (PDA) 25°C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur (Rao, 1994). Gambar *Aspergillus niger* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. *Aspergillus niger* (Dwidjoseputro, 2005).

*Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C, dan suhu maksimum 45-47°C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). Dalam metabolismenya *Aspergillus niger* banyak digunakan sebagai model fermentasi karena fungi ini tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat, oleh karena itu banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan enzim selulase (Dwidjoseputro, 2005).

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

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroba selulolitik (Duff *and* Murray, 1996). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel namun bekerja di luar sel, sehingga mudah diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar *and* Chan, 1986).

#### **1. Sentrifugasi**

Sentrifugasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan enzim terlarut dalam bentuk filtrat yang jernih dan sisa-sisa sel lain serta pengotor dalam bentuk endapan yang terikat kuat pada dasar tabung. 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  $\omega$  (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter).

$$F = \omega^2 r$$

Gaya F dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, karena itu dinyatakan sebagai gaya sentrifugal relatif (RCF dengan satuan g (gravitasi)).

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

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm. Oleh sebab itu, harga rpm dikonversikan kedalam bentuk radian menggunakan persamaan:

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

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

$$\text{RCF} = (1.119 \times 10^{-5})(\text{rpm})^2 r$$

(Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).

## 2. Fraksinasi menggunakan 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 akan menyebabkan 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, 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 dengan 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 merupakan metode yang digunakan untuk memurnikan larutan protein atau enzim yang mengandung garam setelah proses fraksinasi berdasarkan pada sifat semipermeabel membran. Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan larutan enzim ke dalam kantung dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel (selofan). Selanjutnya, kantung yang berisi larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam larutan bufer sambil diputar-

putar. Selama proses tersebut, molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul protein atau enzim yang berukuran besar tetap tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan bufer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis diganti dengan larutan yang baru agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi.

Proses ini dapat dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Mc Phie, 1971 dalam Boyer 1993). 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 harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

#### **F. Pengujian Aktivitas Selulase dengan Metode Mandels**

Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat *Carboxymethyl Cellulase* (CMC) oleh enzim selulase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya .

### **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  $\text{Cu}^{2+}$  dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi  $\text{Cu}^+$  pada kondisi basa.  $\text{Cu}^+$  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 molybdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan 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. 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.

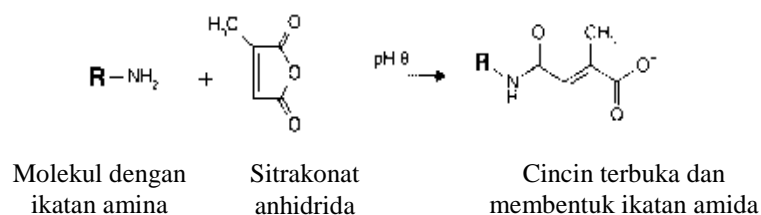
Menurut Janecek (1993), modifikasi kimia merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air.

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).

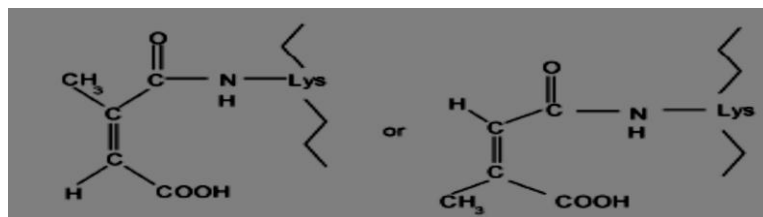
Menurut Nubarov *et al.*, (1987), hidrofisisasi permukaan enzim dapat dilakukan dengan dua cara modifikasi langsung berbagai asam amino hidrofobik yang membentuk tapak-tapak hidrofobik pada permukaan enzim dengan pereaksi hidrofilik, atau hidrofisisasi terhadap asam amino yang berada dekat dengan tapak hidrofobik sehingga tapak tersebut terlindungi dari lingkungan berair.

Dalam penelitian yang telah dilakukan oleh Khajeh *et al.*, (2004), dijelaskan bahwa senyawa sitrkonat 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 ditunjukkan dalam Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi sitrkonat anhidrida dan gugus amina (Sundari, 2011).

Reaksi modifikasi ini diawali dengan pembukaan cincin sitrkonat anhidrida dengan suasana basa pada pH 8 dan kemudian gugus karbonil dari sitrkonat anhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin. Gambar 9 menunjukkan reaksi yang terjadi antara sitrkonat dengan gugus amino suatu protein seperti yang telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2004).



Gambar 9. Modifikasi gugus amina suatu residu lisin dalam protein oleh sitrakonat anhidrida (Sundari, 2011).

## I. Kinetika Reaksi Enzim

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ). Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dimana 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  $K_M$  dan  $V_{maks}$  yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Nilai  $K_M$  yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat mantap dengan afinitas tinggi terhadap substrat,

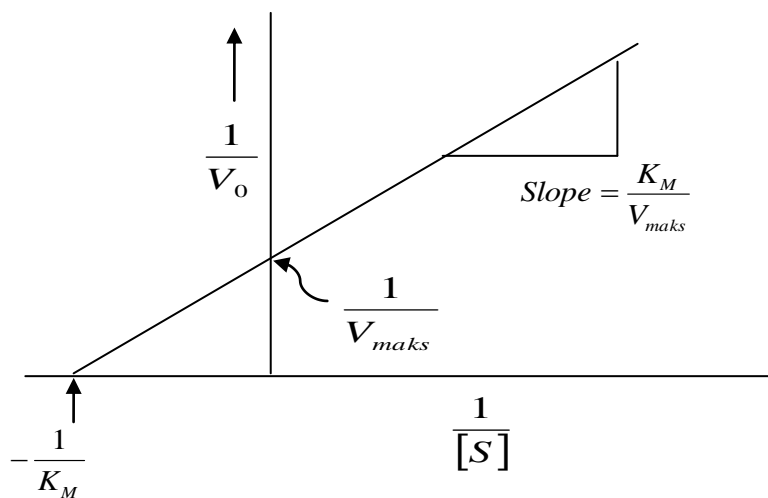
sedangkan jika nilai  $K_M$  suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1997).

Nilai  $K_M$  suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* yang ditunjukkan Gambar 9 (Page, 1997).

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

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

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



Gambar 10. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989).

## **J. 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.

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, salah satunya adalah dengan cara memodifikasi enzim menggunakan zat kimia tertentu.

### **1. Stabilitas termal enzim**

Pada suhu yang terlalu rendah stabilitas enzim tinggi, namun aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kestabilannya rendah. Kenaikan suhu akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzim, namun hanya sampai batas tertentu dan selanjutnya akan terjadi proses denaturasi protein. Daerah suhu saat stabilitas dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1997).

Dalam industri, umumnya reaksi-reaksi dilakukan pada suhu tinggi hal ini 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.

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

- a. Adanya pembukaan partial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier, 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 mikroakuos, 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

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 *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).