

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bakteri

Bakteri, berasal dari kata Latin *bacterium*, adalah kelompok raksasa dari organisme hidup. Ukuran bakteri sangatlah kecil (mikroskopik) dan kebanyakan uniselular, dengan struktur sel yang relatif sederhana tanpa *nucleus* (inti sel), *cytoskeleton*, dan organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Bakteri digolongkan menjadi dua, yaitu bakteri yang menguntungkan dan bakteri yang merugikan. Bakteri tersebar di tanah, air, dan sebagai simbiosis dari organisme lain. Bakteri rata-rata mengandung 40-70% protein, 13-34% asam nukleat, 10-30% lipid (angka-angka ini menunjukkan persen berat kering) (Lehninger, 1997).

#### 1. Nutrien untuk Pertumbuhan Bakteri

Organisme hidup memerlukan nutrisi untuk pertumbuhannya. Kebutuhan nutrien meliputi unsur makro esensial dan unsur mikro esensial. Unsur makro digunakan oleh mikroba dalam metabolisme sel, sedangkan unsur mikro digunakan untuk mengaktifkan enzim (Suhartono, 1989). Substansi kimia organik dan anorganik diperoleh dari lingkungan dalam berbagai macam bentuk. Nutrien diambil dari lingkungan kemudian ditransformasikan melalui membran plasma menuju sel. Di sel beberapa

nutrisi diolah menghasilkan energi yang digunakan dalam proses seluler (Lim, 1998).

Jasad renik heterotrof membutuhkan nutrien untuk kehidupan dan pertumbuhannya, yakni sebagai: (1) sumber karbon, (2) sumber nitrogen, (3) sumber energi, (4) dan faktor pertumbuhan, yakni mineral dan vitamin. Nutrien tersebut dibutuhkan untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel. Setiap jasad renik bervariasi dalam kebutuhannya akan zat-zat nutrisi tersebut.

Ada tujuh komponen utama yang dibutuhkan semua makhluk hidup, yaitu karbon, oksigen, nitrogen, hidrogen, fosfor, sulfur dan kalium. Untuk kebutuhan akan sumber karbon dipenuhi oleh adanya gula, pati, serta karbohidrat lainnya. Ada dua macam mikronutrien yakni mikronutrien organik dan mikronutrien anorganik. Zat-zat yang bertindak sebagai mikronutrien organik pada beberapa asam amino (triptofan) dan pada beberapa komponen-komponen DNA dan RNA (purin dan pirimidin). Beberapa unsur logam yang termasuk dalam mikronutrien anorganik adalah Co, Mo, Cu, Zn. Unsur logam ini sangat diperlukan untuk kehidupan sel meskipun jumlahnya sangat sedikit (Irianto, 2006).

Peran utama nutrien adalah sebagai sumber energi, bahan pembangun sel, dan sebagai akseptor elektron dalam reaksi bioenergetik (reaksi yang menghasilkan energi). Oleh karenanya bahan makanan yang diperlukan terdiri dari air, sumber energi, sumber karbon, sumber akseptor elektron, sumber mineral, faktor pertumbuhan, dan nitrogen. “Selain itu, secara

umum nutrien dalam media pembenihan harus mengandung seluruh elemen yang penting untuk sintesis biologik organisme baru (Jawetz, 2001).”

## **2. Fase Pertumbuhan Bakteri**

Suatu mikroorganisme mempunyai siklus pertumbuhan tertentu tergantung produk yang akan dihasilkan. Fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase logaritma atau fase eksponensial.

Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrien dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup.

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap.

Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya

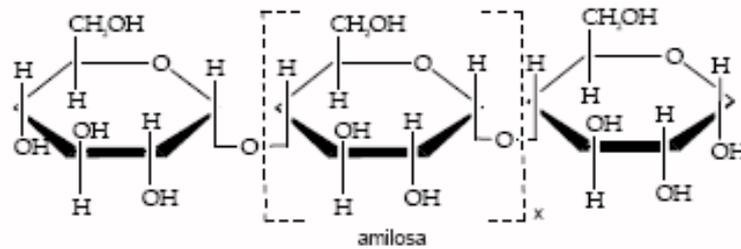
pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri (Volk dan Wheeler, 1993).

## **B. Amilum**

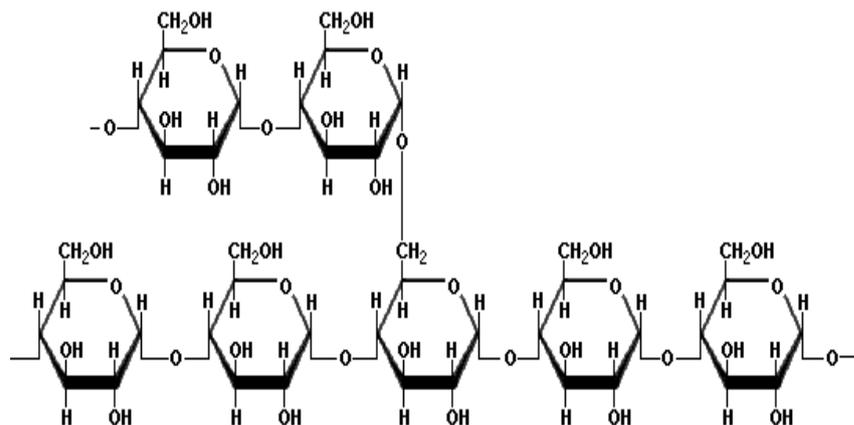
Amilum atau dalam bahasa sehari-hari disebut pati terdapat pada umbi, daun, batang dan biji-bijian (Poedjiadi, 1994). Pati  $(C_6H_{10}O_5)_n$  adalah homopolimer glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -glikosidik yang merupakan rantai gula yang panjang. Sifat berbagai macam pati tidak sama, tergantung dari panjang rantai C dan cabang rantai molekul. Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi tidak larut disebut amilopektin (Winarno, 1986).

Berbagai macam pati ditemukan di alam karena dapat disintesis oleh berbagai macam tumbuhan. Setiap macam pati memiliki bentuk partikel atau granula yang berbeda, dan secara mikroskopis dipakai untuk membedakan berbagai pati alamiah. Pati terbagi menjadi dua golongan yaitu pertama adalah amilosa (15-20%) yang merupakan rantai panjang tidak bercabang yang terdiri dari molekul-molekul  $\alpha$ -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan  $\alpha$ -1,4. Amilosa terdiri atas 250-300 unit D-glukosa yang terikat dengan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik, jadi molekulnya merupakan rantai terbuka. Kedua adalah amilopektin (80-85%) yang merupakan rantai bercabang sebanyak 20-30

molekul  $\alpha$ -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan  $\alpha$ 1,4 dan  $\alpha$ 1,6. Adanya ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik ini menyebabkan terjadinya cabang, sehingga molekul amilopektin berbentuk rantai terbuka dan bercabang (Poedjiadi, 1994). Struktur amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 1.



(A) Amilosa



(B) Amilopektin

**Gambar 1.** Struktur kimia dari (A) Amilosa dan (B) Amilopektin

Amilum dapat dihidrolisis sempurna dengan menggunakan asam sehingga menghasilkan glukosa. Hidrolisis juga dapat dilakukan dengan bantuan enzim amilase. Pada reaksi hidrolisis parsial, amilum terpecah menjadi molekul-molekul yang lebih kecil yang dikenal dengan nama dekstrin. Jadi dekstrin

adalah hasil antara pada proses hidrolisis amilum sebelum terbentuk maltosa (Poedjiadi, 1994). Untuk mengetahui adanya pati maka dilakukan pengujian dengan menggunakan larutan iodium ( $I_2$  dalam KI). Bila terdapat amilosa, polimer-polimer glukosa yang lebih besar dari 20 maka akan menghasilkan warna biru. Bila polimer-polimer glukosa kurang dari 20 maka akan menghasilkan warna merah. Dekstrin dengan polimer enam, tujuh, dan delapan akan memberikan warna coklat. Polimer yang lebih kecil dari lima tidak memberikan warna dengan iodium (Winarno, 1986).

Dalam kehidupan manusia amilum berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat, di samping itu amilum juga dapat berperan sebagai bahan aditif pada proses pengolahan makanan, misalnya sebagai penstabil dalam proses pembuatan puding. Amilum juga berperan dalam pembuatan sirup dan pemanis buatan seperti sakarin. Dalam bidang non makanan, amilum digunakan untuk bahan baku dalam proses pembuatan kertas, pakaian dari katun, industri cat, maupun untuk produksi hydrogen (Liu, 2005).

### **C. Enzim**

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologik. Sebagai protein, enzim memiliki sifat-sifat umum protein, seperti enzim terdenaturasi pada suhu tinggi atau kondisi ekstrim lainnya. Beberapa oksidator, keadaan polaritas larutan, tekanan osmotik yang abnormal juga dapat menghambat kerja enzim (Suhartono, 1989).

Menurut Page (1997), sebagai katalis enzim adalah satu-satunya dibanding dengan katalis-katalis anorganik atau organik sederhana. Sifat-sifat katalitik dari enzim termasuk hal-hal berikut:

1. Enzim meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu, dan pH. Hal ini merupakan keadaan yang jarang dengan katalis-katalis lain.
2. Enzim berfungsi dengan selektivitas dan spesifisitas bertingkat luar biasa tinggi terhadap reaktan yang dikerjakan dan jenis reaksi yang dikatalisasikan.
3. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang luar biasa dibanding dengan katalis biasa.

Peranan enzim sebagai biokatalisator dalam industri semakin meningkat seiring dengan pesatnya perkembangan industri, khususnya industri makanan, minuman, industri tekstil, industri kulit dan industri kertas. Hal ini disebabkan karena enzim bersifat sangat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik. Selain itu, enzim bekerja sangat efisien, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, dan dapat didegradasi secara biologis (Page, 1997).

Klasifikasi enzim secara internasional berdasarkan atas reaksi yang dikatalisis antara lain:

1. **Oksidoreduktase**, mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi reduksi serta sering menggunakan koenzim seperti NAD, NADP, FAD, atau lipoleat sebagai akseptor hidrogen.
2. **Transferase**, mengkatalisis berbagai jenis transfer kelompok seperti aminotransferase, karnitin asil transferase, dan transkarboksilase.
3. **Hidrolase**, mengkatalisis pembelahan ikatan antara karbon dan beberapa atom lain dengan adanya penambahan air.
4. **Liase**, mengkatalisis pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon sulfur dan karbon nitrogen tertentu.
5. **Isomerase**, mengkatalisis isomer optik dan geometrik dan oksidasi reduksi intramolekuler tertentu.
6. **Ligase**, mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dan oksigen (Lehninger, 1997).

Semua enzim adalah protein, dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim seperti protein lain, mempunyai berat molekul berkisar dari kira-kira 12.000 sampai 1 juta. Oleh karena itu, enzim berukuran amat besar dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional targetnya. Penataan tertentu pada rantai samping asam amino suatu enzim di sisi aktifnya menentukan tipe molekul yang dapat terikat dan bereaksi di situ. Biasanya ada sekitar lima rantai samping seperti itu dalam enzim apapun. Selain itu, banyak enzim yang molekul-molekul nonprotein kecil yang

terhubung dengan sisi aktif atau didekatnya. Molekul-molekul enzim ini disebut kofaktor atau koenzim (Ngili, 2009).

Beberapa enzim memerlukan kofaktor atau koenzim untuk aktivitas katalitiknya, dan enzim lain mungkin membutuhkan koenzim maupun satu atau lebih ion logam untuk aktivitas katalitiknya. Bagian haloenzim (koenzim dan ion) bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian apoenzim (protein) terdenaturasi oleh pemanasan (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

## **1. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim**

### **a. Suhu**

Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisa suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, makin meningkat pula aktivitas enzim. Secara umum, setiap peningkatan  $10^{\circ}\text{C}$  di atas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

## **b. Konsentrasi Substrat**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008). *Facilitation of proximity*, atau kemudahan berdekatan yang disebut sebagai efek keakraban, yang berarti bahwa laju reaksi antara dua molekul ditingkatkan bila dalam larutan encer keduanya dijaga dalam jarak dekat dalam sisi aktif enzim, sehingga menaikkan konsentrasi efektif reaktan (Ngili, 2009).

## **c. pH**

pH lingkungan juga berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1997).

#### d. Inhibitor

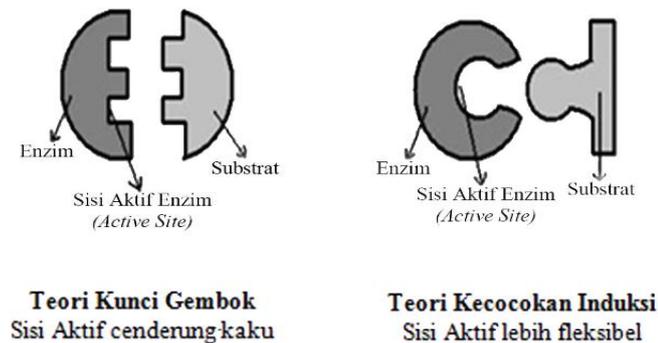
Selain suhu, pH dan konsentrasi substrat, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh ada tidaknya inhibitor. Jika terdapat pengurangan laju reaksi oleh suatu senyawa, senyawa tersebut dinamakan inhibitor.

Inhibitor dapat bersaing dengan substrat dalam berikatan dengan enzim, sehingga menghalangi substrat terikat pada tapak aktif enzim (Poedjadi dan Supriyanti, 1994). Peningkatan laju reaksi yang disebabkan oleh aktivator adalah kebalikan dari efek inhibitor.

## 2. Mekanisme Reaksi Enzim

Enzim bekerja dengan dua cara, yaitu menurut Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dan Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*).

Mekanisme kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Mekanisme kerja reaksi enzim

Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dikemukakan oleh Emil Fisher yang menyatakan bahwa kerja enzim seperti kunci dan anak kunci, melalui hidrolisis senyawa gula dengan enzim invertase. Terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim adalah karena adanya kesesuaian bentuk

ruang antara substrat dengan sisi aktif (*active site*) dari enzim. Dengan begitu sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci (*key*) dan sisi aktif (*lock*) berperan sebagai gembok. Substrat masuk ke dalam sisi aktif sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Hubungan antara enzim dan substrat membentuk ikatan yang lemah. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula.

Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*) dikemukakan oleh Daniel Koshland yang menyatakan bahwa ini sisi aktif tidak bersifat kaku tetapi lebih fleksibel. Sisi aktif secara terus menerus berubah bentuknya sesuai dengan interaksi antara enzim dan substrat. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif akan termodifikasi menyesuaikan bentuk substrat sehingga terbentuk kompleks enzim substrat. Sisi aktif akan terus berubah bentuknya sampai substrat terikat secara sepenuhnya, yang mana bentuk akhir dan muatan enzim ditentukan. Ketika substrat terikat pada enzim, sisi aktif enzim mengalami beberapa perubahan sehingga ikatan yang terbentuk antara enzim dan substrat menjadi menjadi lebih kuat. Interaksi antara enzim dan substrat disebut *Induced fit* (Shahib, 2005).

#### **D. Enzim CGT-ase**

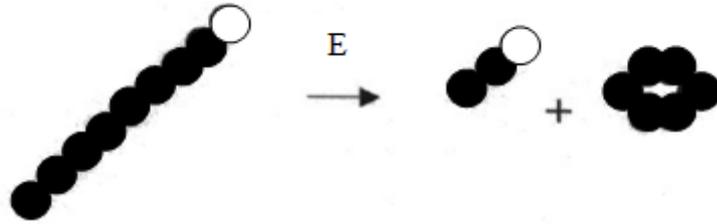
Enzim CGT-ase yaitu enzim ekstraseluler yang dapat mengubah pati menjadi siklodekstrin (Tonkova, 1998). CGT-ase diklasifikasikan menjadi tiga tipe berdasarkan jenis-jenis siklodekstrin yang dihasilkan dari ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida seperti pati, melalui reaksi transglikosilasi intramolekuler, yaitu tipe

*Bacillus macerans* yang menghasilkan  $\alpha$ -siklodekstrin, tipe *Bacillus megaterium* yang menghasilkan  $\beta$ -siklodekstrin, dan tipe *Bacillus* sp. menghasilkan  $\gamma$ -siklodekstrin (Mori *et al.*, 1994).

Enzim CGT-ase merupakan keluarga dari enzim  $\alpha$ -amilase (Leemhuis *et al.*, 2003). CGT-ase memiliki berat molekul yang bervariasi dari 60-110 kDa dan terdiri dari 700 asam amino. Sebagian memerlukan kalsium sebagai agen pelindung terhadap denaturasi panas (Bovetto *et al.*, 1992) dan CGT-ase alkalofilik optimum pada pH 9-10 (Tao, 1991). Suhu maksimal untuk bakteri yang menghasilkan enzim CGT-ase antara 40°C sampai 80°C. Sebagian besar CGT-ase diinhibisi kuat oleh  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{2+}$  (Tonkova, 1998).

Reaksi katalisis oleh enzim CGT-ase dapat terjadi secara intramolekul (siklisasi) dan antarmolekul (kopling, disproporsionasi), serta reaksi hidrolisis (Penninga, 1996). Reaksi siklisasi yaitu transfer residu gula akhir ke residu gula yang lain pada rantai oligosakarida yang sama untuk membentuk suatu senyawa siklik. Ini merupakan reaksi intramolekul dimana pati dihubungkan dengan ikatan  $\alpha$ -1,4-glukan yang dikonversi ke dalam siklodekstrin. Reaksi ini bersifat *reversible* dan cincin dapat dibuka oleh CGT-ase untuk reaksi lebih lanjut (Hedges, 1992). Siklisasi adalah reaksi utama dari CGT-ase untuk menghasilkan siklodekstrin. Produksi  $\alpha$ -siklodekstrin,  $\beta$ -siklodekstrin dan  $\gamma$ -siklodekstrin oleh enzim CGT-ase tergantung pada beberapa faktor seperti pemilihan substrat pati untuk degradasi enzim, karakteristik enzim, komposisi medium dan kondisi yang digunakan pada proses reaksi katalisis pati oleh

enzim CGT-ase (Salva *et al.*, 1997). Reaksi siklisasi enzim CGT-ase dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Reaksi siklisasi enzim CGT-ase (Van der Veen *et al.*, 2000)

### E. Stabilitas Enzim

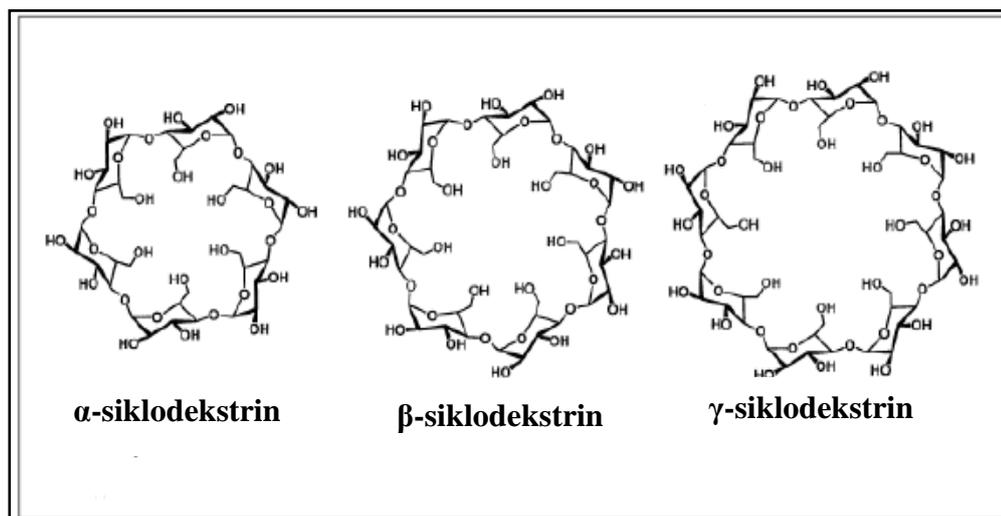
Stabilitas enzim adalah kestabilan aktivitas selama penyimpanan dan penggunaan enzim, kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu dan pH yang ekstrim atau kondisi non fisiologis lainnya (Wiseman, 1985).

### F. Siklodekstrin

Siklodekstrin adalah merupakan oligosakarida yang tersusun atas 6, 7 atau 8 unit glukosa anhidrat melalui ikatan (1-4) dengan membentuk struktur melingkar seperti kue donat. Berdasarkan jumlah unit glukosa penyusun, siklodekstrin dipilah menjadi tiga, yaitu alfa (6 unit), beta (7 unit) dan gamma (8 unit). Cincin luar struktur siklodekstrin bersifat polar (hidrofilik) sedangkan bagian dalam rongga bersifat lebih nonpolar (hidrofobik) (Szetjli, 1982). Produk siklik dapat terbentuk secara kompleks inklusi dengan senyawa anorganik maupun organik. Sifat ini menyebabkan siklodekstrin

banyak digunakan dalam berbagai industri seperti pangan, kosmetika, farmasi, agrokimia serta untuk penanganan polusi (Bender, 1977; Kaneto and Fumithasi, 1996; Szetjli, 1982).

Adapun struktur  $\alpha$ - siklodekstrin,  $\beta$ - siklodekstrin dan  $\gamma$ - siklodekstrin dapat dilihat pada Gambar 4 serta sifat-sifat siklodekstrin dapat dilihat pada Tabel 1.



**Gambar 4.** Struktur  $\alpha$ -,  $\beta$ - dan  $\gamma$ -siklodekstrin (Van der Veen *et al.*, 2000)

**Tabel 1.** Sifat-sifat siklodekstrin (Van der Veen *et al.*, 2000)

Karakteristik	Tipe Siklodekstrin		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Berat molekul (g/mol)	972	1135	1297
Monomer glukosa	6	7	8
Diameter rongga internal (Å)	5	6	8
Kelarutan dalam air (g/100mL:25°C)	14,2	1,85	23,2
Tegangan permukaan (mN/m)	71	71	71
Rentang lebur (°C)	255-260	255-265	240-245
Air kristalisasi	10,2	13-15	8-18
Molekul air dalam rongga	6	11	17

## **G. Isolasi dan Produksi Enzim**

Enzim dapat diperoleh 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 dari 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).

Produksi enzim dilakukan dengan sentrifugasi dengan memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (dibawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989) selain itu mempercepat pengendapan debris sel. Sentrifugasi akan menghasilkan filtrat yang jernih yang merupakan ekstrak kasar enzim dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan.

## **H. Pengujian Aktivitas Enzim CGT-ase**

Pada uji aktivitas, larutan pati berperan sebagai substrat untuk enzim CGT-ase. Enzim ini akan mengurai pati menjadi siklodekstrin. Proses penguraian pati menjadi siklodekstrin, berlangsung saat inkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Penghentian reaksi antara pati dengan enzim dilakukan dengan penambahan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Selanjutnya, ditambahkan larutan fenolftalein untuk mengetahui terbentuk kompleks siklodekstrin dengan fenolftalein dengan menunjukkan perubahan warna menjadi merah muda keunguan. Besarnya pengurangan pati dapat dideteksi dari menurunnya serapan larutan pada

daerah *visible* (campuran reaksi berwarna merah muda keunguan) dengan spektrofotometer *UV-Vis*. Nilai serapan yang terukur pada spektrofotometer *UV-Vis* dapat digunakan untuk menghitung besarnya aktivitas unit, satu unit enzim yang didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membentuk satu  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -siklodekstrin per menit di bawah kondisi kultur (Alves-Prado *et al.*, 2008).

## I. Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dengan metode Lowry didasarkan pada pengukuran serapan cahaya oleh ikatan kompleks yang berwarna ungu. Ini terjadi karena protein bereaksi dengan tembaga dalam lingkungan alkali yang mudah larut, dimana kompleks  $\text{Cu}^{2+}$  dengan ikatan peptida akan tereduksi menjadi  $\text{Cu}^+$ . Lalu,  $\text{Cu}^+$  akan mereduksi folin-ciocalteu yang mengikat protein sekitar pH 10. Sehingga kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat menghasilkan *heteropolymolybdenum* dari warna kuning menjadi biru. Ini disebabkan karena oksidasi gugus aromatik terkatalis Cu, sehingga menghasilkan kompleks berwarna biru dalam derajat yang berbeda tergantung pada komposisi triptofan dan tirosinnya. Karena itu, protein yang berbeda akan memberikan tingkat warna yang berbeda (Alexander and Griffith, 1993).

Metode ini merupakan metode relatif sederhana dengan biaya yang relatif murah juga. Tetapi juga mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Hal ini dapat diatasi dengan menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

## J. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang dikehendaki dari enzim lain yang tidak diinginkan. Pemurnian enzim umumnya dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu: fraksinasi dengan garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Scopes, 1987). Adapun tahapan pemurnian enzim sebagai berikut:

### 1. Fraksinasi Ammonium Sulfat

Penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat atau ammonium sulfat menimbulkan pengendapan protein, yang disebut peristiwa *salting out*. Penambahan garam ke dalam larutan enzim akan mempengaruhi kelarutan enzim. Pada konsentrasi garam rendah, kelarutan enzim dalam air bertambah, disebut dengan peristiwa "*salting in*", sedangkan pada konsentrasi tinggi kelarutan enzim akan menurun sehingga enzim akan mengendap, disebut dengan peristiwa "*salting out*". Setelah dilakukan pengendapan dengan garam ammonium sulfat dilakukan proses sentrifugasi dingin untuk memisahkan endapan garam ammonium sulfat dengan filtratnya yang kemudian endapannya di ambil dengan cara dilarutkan dengan buffer asetat (Scopes, 1982).

### 2. Ultrafiltrasi

Ultrafiltrasi adalah teknik pemisahan dengan menggunakan membran untuk menghilangkan zat terlarut dengan bobot molekul (BM) tinggi, aneka koloid, mikroba sampai padatan tersuspensi dari air lautan.

Membran semipermeabel dipakai untuk memisahkan makromolekul dari larutan. Membran ultrafiltrasi berfungsi sebagai saringan molekul.

Ultrafiltrasi memisahkan molekul terlarut berdasarkan ukuran dengan melewati larutan tersebut pada filter. Ultrafiltrasi merupakan membran permeabel kasar, tipis, dan selektif yang mampu menahan makromolekul seperti koloid, mikroorganisme, dan pirogen. Molekul yang lebih kecil seperti pelarut dan kontaminan terionisasi dapat melewati membran ultrafiltrasi sebagai filtrat. Keuntungan ultrafiltrasi secara efektif mampu menghilangkan sebagian besar partikel, pirogen, mikroorganisme, dan koloid dengan ukuran tertentu. Proses membran ultrafiltrasi merupakan upaya pemisahan dengan membran yang menggunakan gaya dorong beda tekanan yang sangat dipengaruhi oleh ukuran dan distribusi pori membran (Mallevalle, 1996). Ultrafiltrasi adalah proses pemurnian menggunakan Millipore Ultrafiltrasi System (Bedford, Massachusetts, USA) dan PLTK selulosa membran, 30 kDa (Millipore, USA). Ultrafiltrasi menghasilkan enzim yang lebih pekat dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi, aktivitas enzim CGT-ase dari isolat Alkaliphile *Bacillus Pseudocaliphilus* 20RF meningkat dua kali lipat (Torkova, 2011).