

BAB. II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel, bekerja dengan urutan-urutan yang teratur, mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menyimpan dan mentransformasikan energi kimiawi dan membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana (Lehninger, 1982).

Sifat enzim yang sangat penting adalah tingginya efisiensi dan derajat katalitiknya terhadap substrat. Efisiensi katalitik enzim berkaitan dengan orientasi optimum gugus aktif enzim dan substrat. Orientasi keduanya sangat mendukung sehingga saat terjadi reaksi tidak memerlukan energi yang besar untuk mengatur posisi. Spesifitas enzim berkaitan dengan reaksi enzim yang sangat spesifik, satu enzim hanya akan bereaksi dengan satu substrat atau setiap enzim menyebabkan perubahan satu langkah pada substratnya (Toha, 2001).

Fungsi yang terpenting dari suatu enzim adalah kemampuannya dalam menurunkan energi aktivasi pada suatu reaksi kimiawi. Kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH serta suhu. Pada umumnya terdapat hubungan

antara konsentrasi enzim dan substrat bagi aktivitas maksimumnya, begitu juga setiap enzim berfungsi secara optimal pada pH dan suhu tertentu (Lehninger, 1982).

B. Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah molekul pati dan glikogen (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Menurut Winarno (1986), enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan enzim yaitu :

1. α -amilase (α - 1,4 glukon – 4 – glukonhidrolase), yang memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul, karenanya disebut endoamilase.
2. β -amilase (β - 1,4 glukon maltohidrolase), yang menghidrolisis unit-unit gula dari ujung molekul pati, karenanya disebut eksoamilase.
3. Glukoamilase, yang dapat memisahkan glukosa dari terminal gula non-pereduksi substrat pati.

Berdasarkan cara kerja ketiga enzim diatas, enzim α -amilase memiliki kemampuan tercepat dalam menghidrolisis molekul karbohidrat menjadi molekul yang lebih kecil. Enzim α -amilase, akan menyerang ikatan kedua dari ujung nonreduksi suatu polisakarida yang akan menghasilkan suatu disakarida yang disebut maltosa, kemudian amiloglukosidase akan menyerang ikatan terakhir pada ujung nonreduksi. Amilase dan amiloglukosidase dapat digunakan secara

bersamaan untuk memecah suatu molekul polisakarida menjadi gula sederhana. Salah satu contoh aplikasinya yaitu pada pembuatan sirup jagung.

Enzim α -amilase (3.2.1.1), dapat menghidrolisis suatu substrat polisakarida yang memiliki ikatan $\alpha - 1,4$ glukosa - glukohidrolase. Histidin, dithiothreitol dan mercaptoetanol berperan sebagai kofaktor enzim ini. Selain itu ada beberapa logam yang juga dapat berperan sebagai kofaktor antara lain Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , dan Fe^{2+} . Sedangkan Hg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , dan Ni^{2+} berperan sebagai inhibitor (Schomburg dan Salzmann, 1991).

C. Isolasi dan Pemurnian Enzim

1. Homogenisasi

Homogenisasi digunakan untuk memecah sel dan mengekstraksi enzim agar didapatkan suspensi homogen. Alat yang digunakan disebut homogenisator seperti *waring blender* yang dapat diputar dengan motor dan diatur kecepatannya. Dalam pengerjaannya perlu dijaga jangan sampai berbusa karena enzim yang terekstrak akan terdenaturasi, proses ini dilakukan pada suhu $2-4^{\circ}\text{C}$ (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

2. Sentrifugasi

Sentrifugasi 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 manual. Sel-

sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 g selama 15 menit (Scopes, 1984 dalam Walsh dan Headon, 1994).

3. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Sebagian besar enzim berada dalam bentuk cairan sel sebagai protein terlarut. Kelarutan enzim tersebut merupakan interaksi polar dengan pelarut dan gaya tolak-menolak antara molekul yang bermuatan sama (Scopes, 1984).

Pada konsentrasi rendah, ion-ion akan melingkupi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul protein tersebut (*salting in*), sehingga protein melarut (Suhartono, 1989). Semakin tinggi konsentrasi garam, maka kelarutan protein enzim akan semakin rendah (kelarutan protein enzim dalam air lebih rendah daripada kelarutan garam dalam air) yang dikenal dengan istilah *salting out*). Garam yang sering digunakan untuk mengendapkan protein dan enzim adalah amonium sulfat. Kelebihan amonium sulfat dibandingkan garam-garam yang lain yaitu mempunyai 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 murah (Scopes, 1984).

4. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang biasa digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Proses yang terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmosis antara cairan yang ada di dalam membran dan yang di luar. Prosesnya, molekul protein atau enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantung dialisis sedangkan molekul-molekul kecil seperti garam anorganik akan keluar melalui pori-pori membran. 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. Membran yang digunakan adalah selofan (Lehninger, 1982).

5. Kromatografi penukar ion

Kromatografi penukar ion adalah metode kromatografi yang paling umum digunakan untuk pemurnian protein (Bollag *et al.*, 1996).

Prinsip dasar teknik penukar ion adalah memisahkan biomolekul berdasarkan muatan ioniknya. Penukar ion terdiri atas matriks yang tidak larut dan gugus bermuatan yang terikat secara kovalen pada matriks. Gugus-gugus bermuatan berasosiasi dengan *counter ion*. *Counter ion* dapat digantikan secara reversibel oleh ion-ion lain yang bermuatan sama. Penukar ion yang bermuatan positif mempunyai *counter ion* yang bermuatan negatif, sehingga disebut penukar anion. Sedangkan penukar kation bermuatan negatif, mempunyai *counter ion* yang bermuatan positif. Protein yang terikat

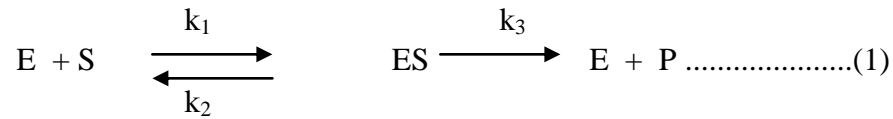
pada penukar dapat dielusi dari kolom dengan mengubah pH atau konsentrasi garam, misalnya NaCl. Penukar ion dengan matriks selulosa yang banyak digunakan dalam pemisahan adalah DEAE-selulosa dan CM-selulosa. Gugus DEAE, $-\text{OC}_2\text{H}_5\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ bermuatan positif pada pH 6,0-8,0 sehingga dapat digunakan untuk protein yang bermuatan negatif pada rentang pH tersebut. Sedangkan CM-selulosa (selulosa- OCH_2COO^-) dapat digunakan untuk pemisahan protein yang bermuatan positif pada pH 4,5 (Palmer, 1991 dalam Sariningsih, 2000).

Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode filtrasi gel adalah apabila menggunakan sampel yang banyak tidak terlalu dipengaruhi oleh tinggi kolom, sehingga efisiensi diameter kolom dapat ditingkatkan (Suhartono, 1989)

D. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi enzim adalah suatu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat, dengan mengubah-ubah konsentrasi substrat, dapat dipelajari mekanisme reaksi enzim, yakni bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim, maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1989).

Reaksi enzim :



E = Enzim ; S = Substrat ; ES = Keadaan transisi dari kompleks E dengan S ;

P = hasil reaksi (produk).

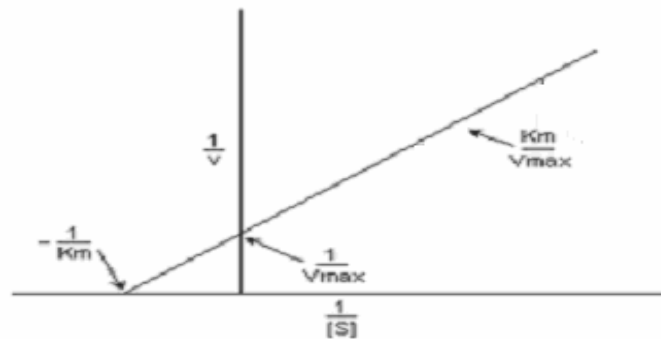
Untuk mempermudah menghitung konsentrasi substrat yang diperlukan dalam mencapai kecepatan maksimumnya, digunakan tetapan *Michaelis-Menten*. Nilai V_{maks} dan K_M (konstanta *Michaelis-Menten*) didapat dengan mengadakan percobaan penentuan kecepatan reaksi V pada perbedaan konsentrasi substrat, sehingga diperoleh :

$$V = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots(2)$$

Persamaan diatas dapat diubah menjadi :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} \dots\dots\dots(3)$$

Dengan demikian terlihat bahwa bila dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara $1/v$ dan $1/[S]$, akan terjadi garis lurus (Gambar 1.). Metode penentuan harga K_M dan V_{Maks} dengan cara ini disebut metode grafik *Lineweaver-Burk* (Poedjiadi, 1994).



Gambar 1. Kurva *Lineweaver-Burk*.

E. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa) oleh pengaruh suhu dan pH ekstrim (Wiseman, 1978 dalam Seriarty, 1991).

Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan adanya surfaktan (Eijnsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut suhu dan pH memegang peranan penting dan sangat tepat untuk dipelajari. Pada suhu tinggi kebanyakan enzim akan membuka atau inaktif, yang berarti tidak fungsional lagi. Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung melalui dua tahap, pertama adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier dan kuartener molekul enzim, dan adanya perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern dan Klibanov, 1987).

Enzim memiliki konstanta disosiasi pada gugus asam maupun basa, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan terminal aminonya. Perubahan keaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat (Winarno, 1986).

F. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah bakteri gram positif berbentuk batang yang dapat membentuk endospora, anaerobik fakultatif, ditemukan pada permukaan tanah, air, lingkungan akuatik, saluran pencernaan manusia dan hewan.

Sel *Bacillus subtilis* mempunyai ukuran panjang 2,0-8,0 μ dengan lebar 0,3-0,7 μ (Suriawiria, 1986). Bakteri ini tersusun dalam bentuk rantai dan bergerak dan berwarna keruh (Gupte, 1990).

Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 12 - 48⁰C dan pH 6,5 – 10,8. Suhu optimum untuk pertumbuhan adalah 27 – 35⁰C dengan pH 7,0 – 7,5.

Dalam taksonomi mikrobiologi, kedudukan *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut :

Divisio: Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Famili : Bacillaceae

Genus : Bacillus

Bakteri ini mampu menghasilkan enzim amilase, protease, kaseinase dan antibiotik bacitrasin. *Bacillus subtilis* juga mampu memfermentasikan glukosa menghasilkan 2,3-butanadiol dan gas CO₂ (Brock, 1979).

G. Senyawa Aditif Enzim

Senyawa aditif merupakan senyawa yang ditambahkan pada larutan enzim sehingga dapat meningkatkan stabilitas struktur protein enzim tanpa mempengaruhi interaksi kovalen pada enzim. Penggunaan senyawa aditif terbukti dapat mempertahankan konformasi enzim (Suhartono, 1989).

Salah satu senyawa aditif yang sering digunakan adalah poliol (polihidroksi alkohol), poliol yang diketahui reaktif adalah yang mengandung tiga karbon atau lebih.

Beberapa jenis poliol yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

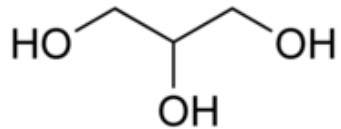
1. Gliserol

Gliserol atau dikenal juga dengan gliserin atau glisil alkohol, memiliki berat molekul sebesar 92,094 g/mol, densitas 1.261 g/cm³, titik didih 290 °C dan titik leleh 18 °C. Gliserol adalah gula alkohol yang memiliki tiga gugus hidroksil (- OH) yang bersifat hidrofilik, oleh karenanya gliserol dapat larut dalam air.

Gliserol merupakan komponen penting dalam trigliserida dan fosfolipid.

Dalam keadaan murni merupakan senyawa yang tidak berbau, tidak berwarna, higroskopis, dan berupa cairan kental yang berasa manis.

Struktur gliserol dapat dilihat pada Gambar 2.

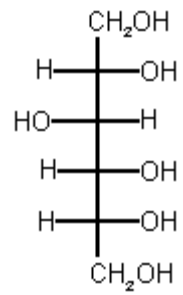


Gambar 2. Struktur gliserol

2. Sorbitol

Sorbitol juga dikenal dengan glusitol. Sorbitol memiliki berat molekul 182,17 g/mol, densitas sebesar 0,68 g/cm³, titik didih 296 °C dan titik leleh 95 °C. Sorbitol banyak ditemukan pada buah-buahan dan biji-bijian dari genus *Sorbus*. Sorbitol digunakan sebagai bahan campuran sirup obat batuk, selain itu sorbitol juga digunakan sebagai gula pengganti pada

makanan dan minuman rendah kalori. Struktur dari sorbitol dapat dilihat pada Gambar 3 :



Gambar 3. Struktur Sorbitol