

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Hutan Bakau

Lautan Indonesia adalah bagian dari wilayah Indopasifik yang merupakan salah satu pusat keanekaragaman biota laut terbesar di dunia. Sumber biota laut tersebut merupakan aset potensial yang dapat didayagunakan menjadi aneka produk termasuk diantaranya farmasi. Jenis biota laut di daerah tropis Indonesia diperkirakan 2-3 kali lebih besar dibandingkan dengan biota laut di daerah subtropis dan daerah beriklim dingin (Van Soest, 1994).

Hutan bakau atau disebut juga hutan mangrove adalah hutan yang tumbuh di atas rawa-rawa berair payau yang terletak pada garis pantai dan dipengaruhi oleh pasang-surut air laut. Hutan ini tumbuh khususnya di tempat-tempat di mana terjadi pelumpuran dan akumulasi bahan organik. Baik di teluk-teluk yang terlindung dari gempuran ombak, maupun di sekitar muara sungai di mana air melambat dan mengendapkan lumpur yang dibawanya dari hulu (Irwanto, 2007).

Ekosistem hutan bakau bersifat khas, baik karena adanya pelumpuran yang mengakibatkan kurangnya abrasi tanah, salinitas tanahnya yang tinggi, serta mengalami daur penggenangan oleh pasang-surut air laut. Hanya sedikit jenis tumbuhan yang bertahan hidup di tempat semacam ini, dan jenis-jenis ini keba-

nyakan bersifat khas hutan bakau karena telah melewati proses adaptasi dan evolusi. Hutan-hutan bakau menyebar luas di bagian yang cukup panas di dunia, terutama di sekeliling khatulistiwa di wilayah tropika dan sedikit di subtropika. Luas hutan bakau Indonesia antara 2,5 hingga 4,5 juta hektar, merupakan mangrove yang terluas di dunia melebihi Brazil (1,3 juta ha), Nigeria (1,1 juta ha) dan Australia (0,97 ha) (Spalding *at al.*, 1997 dalam Noor *at al.*, 1999).

## **B. Mikroorganisme**

Mikroorganisme merupakan jasad hidup yang mempunyai ukuran sangat kecil (Kusnadi *dkk.*, 2003). Setiap sel tunggal mikroorganisme memiliki kemampuan untuk melangsungkan aktivitas kehidupan antara lain dapat mengalami pertumbuhan, menghasilkan energi dan bereproduksi dengan sendirinya. Mikroorganisme memiliki fleksibilitas metabolisme yang tinggi karena mikroorganisme ini harus mempunyai kemampuan menyesuaikan diri yang besar sehingga apabila ada interaksi yang tinggi dengan lingkungan menyebabkan terjadinya konversi zat yang tinggi pula. Mikroorganisme ini juga tidak memerlukan tempat yang besar, mudah ditumbuhkan dalam media buatan, dan tingkat pembiakannya relatif cepat (Darkuni, 2001). Oleh karena aktivitasnya tersebut, maka setiap mikroorganisme memiliki peranan dalam kehidupan, baik yang merugikan maupun yang menguntungkan.

### **1. Sel**

Sel merupakan satuan struktural yang fundamental dan fungsional bagi kehidupan. Sel merupakan kerangka alamiah dari hampir semua reaksi biokimia.

Reaksi-reaksi biokimia pada sel hidup berlangsung dalam ukuran yang sangat kecil dari sel hidup atau bagiannya, dengan dinding yang rapuh dan tebalnya hanya beberapa molekul (Michael *et al.*, 2008). Terdapat dua kelas utama sel, yaitu sel prokariot dan sel eukariot (Albert *et al.*, 1994). Sel prokariot memiliki struktur yang sederhana, pertumbuhan sel yang mudah dan cepat, serta mekanisme yang relatif sederhana dalam proses reproduksi. Sel prokariot bereproduksi dengan cara aseksual yang sangat sederhana. Organisme ini tumbuh hingga ukurannya berlipat ganda, lalu membelah diri menjadi sel anak yang identik (Lehninger, 1988). Dalam keadaan optimum, sel prokariot tunggal dapat membelah diri setiap 20 menit dan karena itu dapat mencapai jumlah 5 miliar sel dalam waktu kurang dari 11 jam (Albert *et al.*, 1994). Sel eukariot merupakan divisi terbesar dari organisme yang hidup, yaitu seluruh organisme yang ada di bumi, termasuk hewan, tumbuhan, fungi, dan protozoa. Pada sel eukariot nukleus dan sitoplasma terdapat sebagai dua kompartemen yang terpisah oleh membran inti (Wolfe, 1993).

## **2. Bakteri**

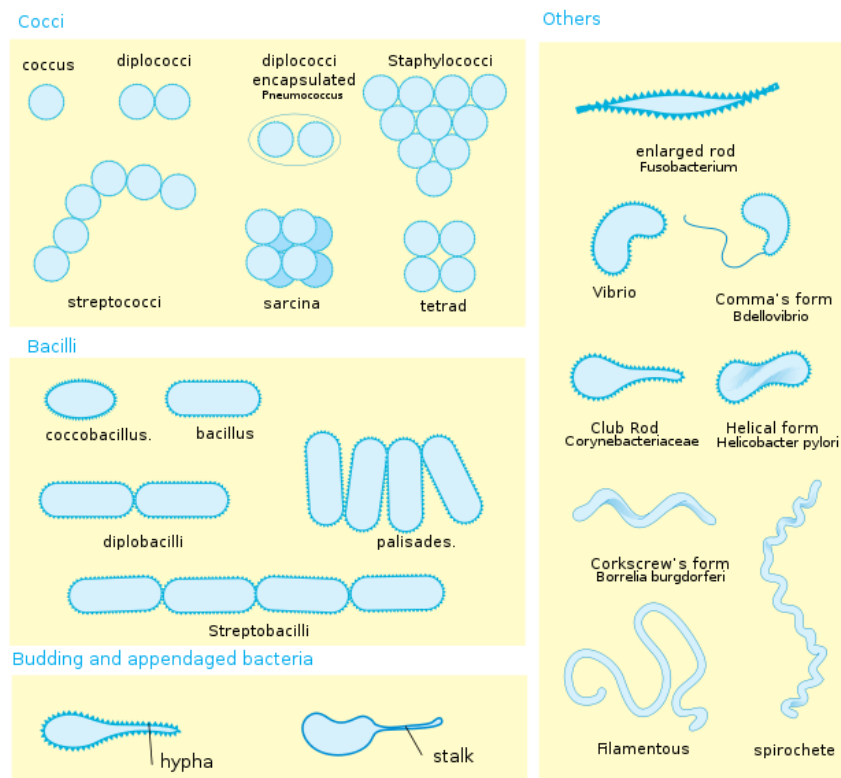
Bakteri berasal dari kata Latin *bacterium* (jamak, *bacteria*) merupakan kelompok terbesar dari organisme hidup. Bakteri berukuran sangatlah kecil (mikroskopik) dan kebanyakan uniselular (bersel tunggal), dengan struktur sel yang relatif sederhana tanpa inti sel, cytoskeleton, dan organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Bakteri adalah yang paling berkelebihan dari semua organisme. Bakteri tersebar di mana-mana seperti di tanah, air, dan dapat bersifat simbiosis dari organisme lain. Banyak patogen merupakan bakteri. Kebanyakan bakteri

biasanya hanya berukuran 0,5-5  $\mu\text{m}$ , meski ada jenis yang dapat menjangkau 0,3 mm dalam diameter (*Thiomargarita*). Bakteri umumnya memiliki dinding sel, seperti sel hewan dan jamur, tetapi dengan komposisi sangat berbeda (peptidoglikan). Bakteri berukuran sangat kecil dan dapat berkembang biak dengan cepat, cukup dengan cara membelah diri. Kemampuan bakteri untuk membelah dengan cepat memungkinkan populasi bakteri dapat segera menyesuaikan diri terhadap perubahan-perubahan dalam lingkungannya. Banyak bakteri yang bergerak menggunakan flagela, yang berbeda dalam strukturnya dari flagela kelompok lain. (Albert *et. al.*, 1994).

Bakteri merupakan prokariot, dan berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

- a. Kokus (*Coccus*) adalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola, dan mempunyai beberapa variasi sebagai berikut:
  - *Mikrococcus*, jika kecil dan tunggal
  - *Diplococcus*, jika bergandanya dua-dua
  - *Tetracoccus*, jika bergandengan empat dan membentuk bujur sangkar
  - *Sarcina*, jika bergerombol membentuk kubus
  - *Staphylococcus*, jika bergerombol
  - *Streptococcus*, jika bergandengan membentuk rantai
  
- b. Basil (*Bacillus*) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder, dan mempunyai variasi sebagai berikut:
  - *Diplobacillus*, jika bergandengan dua-dua

- *Streptobacillus*, jika bergandengan membentuk rantai
- c. Spiril (*Spirillum*) adalah bakteri yang berbentuk lengkung dan mempunyai variasi sebagai berikut:
- *Vibrio* (bentuk koma), jika lengkung kurang dari setengah lingkaran
  - *Spiral*, jika lengkung lebih dari setengah lingkaran



Gambar 1. Bentuk-bentuk sel bakteri (Davidson, 2007)

Bentuk tubuh/morfologi bakteri dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, medium dan usia. Oleh karena itu untuk membandingkan bentuk serta ukuran bakteri, kondisinya harus sama. Pada umumnya bakteri yang usianya lebih muda ukurannya relatif lebih besar daripada yang sudah tua (Michael *et al*, 2008).

Adaptasi bakteri pada lingkungan termal memiliki peranan yang sangat penting dalam penelitian dan pembelajaran teori adaptasi dalam biologi evolusioner (Crill *et al*, 1996). Temperatur merupakan kunci variabel lingkungan, karena temperatur dapat mempengaruhi pengaturan hampir seluruh laju proses fisiologis dan oleh karena itu mempengaruhi faktor-faktor biologis seperti pertumbuhan dan reproduksi (Bronikowski, 2001).

### **C. Actinomycetes**

*Actinomycetes* adalah istilah yang digunakan untuk menunjukkan organisme jenis *actinomycetales*, subdivison utama dari Prokariot, yang terdiri dari semua organisme dengan sel prokariotik. Berbeda dengan organisme yang lain (*Protista*, *Fungi*, *Plantae* dan *Animalia*) yang semua memiliki sel eukariotik.

*Actinomycetes* dibagi menjadi tiga yaitu:

- a. *Actinomyceteeae* terdiri dari dua genus: *Actinomyces* dan *Nocardia*. Beberapa spesies bersifat patogen. *A. Israeli* menyebabkan *actinomycosis* dalam manusia, *A. bovis* pada sapi.
- b. *Mycobacteriaceae* memiliki satu genus, *Mycobacterium*, yang berisi beberapa spesies patogen menyebabkan penyakit-penyakit seperti kusta dan TBC.
- c. *Streptomyceteeae* terdiri dari beberapa organisme yang ditemukan di dalam tanah. Mereka jarang patogen. Sebaliknya, beberapa spesies dari genus *Streptomyces* menghasilkan antibiotik. *Erythromycin* dihasilkan oleh *Streptomyces erythreus*, *streptomisin* oleh *S. griseus*, *aureomycin* oleh *S. Aureofaciens*, *oleandomycin* oleh *S. Antibioticus*, *spiramycin* oleh *S. Ambofaciens*.

*Actinomycetes* memiliki sifat antara bakteri dan fungi. *Actinomycetes* adalah bentuk fungi, seperti bakteri yang terbentuk panjang, benang filamen bercabang-cabang seperti yang terlihat seperti jaring laba-laba abu-abu. *Actinomycetes* adalah dekomposer utama dari bahan tanaman keras seperti kulit kayu, koran dan batang kayu.



Gambar 2. Isolat *Actinomycetes* pada media ISP-2

Pada medium cair, pertumbuhan *actinomycetes* ditandai dengan keruhnya medium dan terbentuk lapisan tipis di permukaan medium. Menurut Rao (1994), pada lempeng agar, *actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dari bakteri, dimana koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *actinomycetes* muncul perlahan dan berbubuk serta melekat erat pada permukaan agar, seperti terlihat pada Gambar 1 dimana isolat *actinomycetes* ditumbuhkan pada agar plate dalam media ISP-2. Rentang pH dan temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *actinomycetes* ini sekitar 6,5 – 8,0 dan 25 – 30°C. Namun, ada beberapa *actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55 – 65°C seperti *Thermoactinomycetes* dan *Streptomycetes*.

## **D. Enzim**

Enzim adalah biokatalis yang dihasilkan oleh jaringan yang meningkatkan laju reaksi kimia yang berlangsung di jaringan (Montgomery, 1993). Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Bekerja dengan urutan-urutan teratur, enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang mengubah kimiawi, dan yang membuat makromolekul sel (Lehninger, 1988). Berdasarkan strukturnya, enzim terdiri atas komponen yang disebut apoenzim yang berupa protein dan komponen lain yang disebut gugus prostetik yang berupa nonprotein. Gugus prostetik dibedakan menjadi koenzim dan kofaktor. Koenzim berupa gugus organik yang pada umumnya merupakan vitamin, seperti vitamin B1, B2,  $\text{NAD}^+$  (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*). Kofaktor berupa gugus anorganik yang biasanya berupa ion-ion logam, seperti  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Fe}^{2+}$ . Beberapa jenis vitamin seperti kelompok vitamin B merupakan koenzim. Jadi, enzim yang utuh tersusun atas bagian protein yang aktif yang disebut apoenzim dan koenzim, yang bersatu dan kemudian disebut holoenzim (Rahayu, 1990).

### **1. Penggolongan Enzim**

Suatu dasar penemuan dan penggolongan enzim secara sistematis telah dikemukakan oleh persetujuan Internasional. Sistem ini menempatkan semua enzim ke dalam enam kelas utama, masing-masing dengan subkelas, berdasarkan atas jenis reaksi yang dikatalisis. Klasifikasi Internasional dari enzim akan disebutkan berikut ini (Montgomery, 1993) :



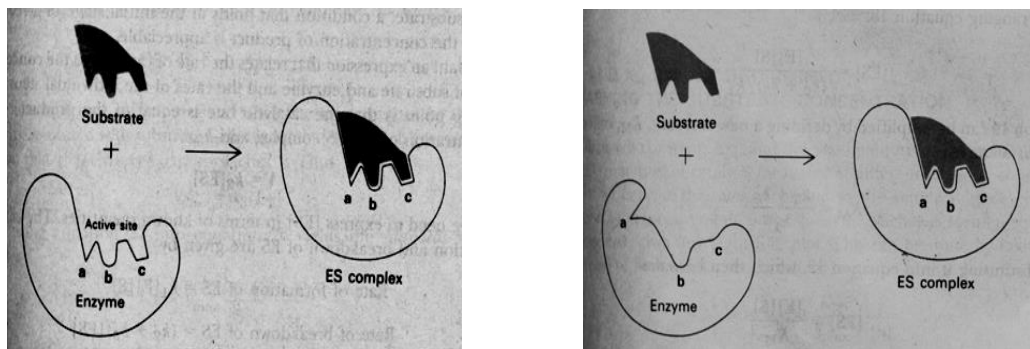
1. Oksidoreduktase, enzim-enzim yang mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi.
2. Transferase, merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi pemindahan berbagai gugus seperti amino, karboksil, karbonil, metil, asil, glikosil, atau fosforil.
3. Hidrolase, merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan atom lain sambil mengikat molekul air.
4. Liase, merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan belerang serta beberapa jenis ikatan antara karbon dengan nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida).
5. Isomerase, merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi rasemisasi isomer optik atau geometrik dan reaksi-reaksi oksidasi-reduksi intramolekular tertentu. Namun trivial dari enzim-enzim yang termasuk kelas ini antara lain adalah epimerase, rasemase, dan mutase.
6. Ligase, merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan oksigen, belerang, nitrogen, dan atom-atom lain.

## **2. Fungsi dan Cara Kerja Enzim**

Enzim adalah satu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Dimana suatu enzim dapat mempercepat reaksi  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat daripada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis.

Seperti katalis lainnya enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Saat berlangsungnya reaksi enzimatik terjadi ikatan sementara antara enzim dengan substrat (reaktan). Ikatan sementara ini bersifat labil dan hanya untuk waktu yang singkat saja. Selanjutnya ikatan enzim-substrat akan pecah menjadi enzim dan hasil akhir. Enzim yang terlepas kembali setelah reaksi dapat berfungsi lagi sebagai biokatalisator untuk reaksi yang sama. Enzim bekerja dengan dua cara, yaitu menurut Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dan Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*).



Gambar 3. Pembentukan kompleks enzim-substrat berdasarkan Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*) dan Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*).

Menurut teori kunci-gembok, terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan situs aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada

konfigurasi semula. Berbeda dengan teori kunci gembok, menurut teori kecocokan induksi reaksi antara enzim dengan substrat berlangsung karena adanya induksi substrat terhadap situs aktif enzim sedemikian rupa sehingga keduanya merupakan struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Menurut teori ini situs aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Murray, 1997).

### **3. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Reaksi Enzimatik**

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik, antara lain adalah:

#### **1. Substrat (reaktan)**

Kecepatan reaksi enzimatik umumnya dipengaruhi kadar substrat. Penambahan kadar substrat sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang tetap, akan mempercepat reaksi enzimatik sampai mencapai maksimum. Penambahan substrat selanjutnya tidak akan menambah kecepatan reaksi (Orten dan Neuhaus, 1970).

#### **2. Suhu**

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Kenaikan suhu sampai optimum akan diikuti pula oleh kenaikan kecepatan reaksi enzimatik. Kepekaan enzim terhadap suhu pada keadaan suhu melebihi optimum disebabkan terjadinya perubahan fisikokimia protein penyusun enzim. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu diatas 50 °C (Wolfe, 1993).

### 3. Kemasaman (pH)

pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Daya katalisis enzim menjadi rendah pada pH rendah maupun tinggi, karena terjadi denaturasi protein enzim. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif (+) dan negatif (-). Aktivitas enzim akan optimum kalau terdapat keseimbangan antara kedua muatan. Pada keadaan asam cenderung bermuatan positif, dan pada keadaan basa cenderung bermuatan negatif, sehingga aktivitas enzim menjadi berkurang atau bahkan menjadi tidak aktif. pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama (Orten dan Neuhaus, 1970).

### 4. Penghambat enzim (inhibitor)

Inhibitor enzim adalah zat atau senyawa yang dapat menghambat enzim. Ada beberapa cara penghambatan enzim, seperti penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (*feed back inhibitor*), dan penghambat alosterik (Wolfe, 1993).

### 5. Waktu Inkubasi

Waktu yang diperlukan oleh enzim untuk bereaksi secara optimum dengan produk tidaklah seragam, ada beberapa yang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk bereaksi (Orten dan Neuhaus, 1970).

## **E. Protein**

Protein berasal dari bahasa Yunani *protos* yang berarti "yang paling utama" merupakan senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen,

nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor (Wood. J. H *et al*, 1966). Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus.

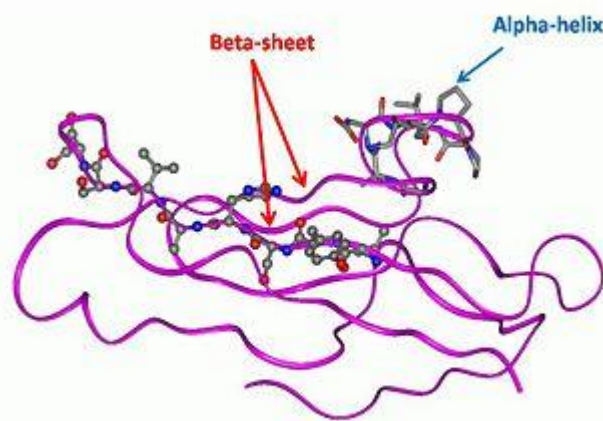
Kebanyakan protein merupakan enzim atau subunit enzim. Jenis protein lain berperan dalam fungsi struktural atau mekanis, seperti misalnya protein yang membentuk batang dan sendi sitoskeleton. Protein terlibat dalam sistem kekebalan (imun) sebagai antibodi, sistem kendali dalam bentuk hormon, sebagai komponen penyimpanan (dalam biji) dan juga dalam transportasi hara. Sebagai salah satu sumber gizi, protein berperan sebagai sumber asam amino bagi organisme yang tidak mampu membentuk asam amino tersebut (heterotrof).

Protein merupakan salah satu dari biomolekul raksasa, selain polisakarida, lipid, dan polinukleotida, yang merupakan penyusun utama makhluk hidup. Selain itu, protein merupakan salah satu molekul yang paling banyak diteliti dalam biokimia. Protein ditemukan oleh Jöns Jakob Berzelius pada tahun 1838.

Biosintesis protein alami sama dengan ekspresi genetik. Kode genetik yang dibawa DNA ditranskripsi menjadi RNA, yang berperan sebagai cetakan bagi translasi yang dilakukan ribosom. Sampai tahap ini, protein masih "mentah", hanya tersusun dari asam amino proteinogenik. Melalui mekanisme pascatranslasi, terbentuklah protein yang memiliki fungsi penuh secara biologi.

Struktur protein dapat berupa struktur primer (tingkat satu), sekunder (tingkat dua), tersier (tingkat tiga), dan kuartener (tingkat empat). Struktur primer protein merupakan urutan asam amino penyusun protein yang dihubungkan melalui ikatan peptida (amida). Sementara itu, struktur sekunder protein adalah struktur tiga

dimensi lokal dari berbagai rangkaian asam amino pada protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen. Gabungan dari aneka ragam dari struktur sekunder akan menghasilkan struktur tiga dimensi yang dinamakan struktur tersier. Struktur tersier biasanya berupa gumpalan. Beberapa molekul protein dapat berinteraksi secara fisik tanpa ikatan kovalen membentuk oligomer yang stabil (misalnya dimer, trimer, atau kuartomer) dan membentuk struktur kuartener.



Gambar 4. Struktur tersier protein. Protein ini memiliki banyak struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* yang sangat pendek

## F. Protease

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Berdasarkan *International Union of Biochemistry (IUB)* protease merupakan enzim kelas 3, hidrolase, dan subkelas 3.4, peptida hidrolase atau peptidase (Boynom dan Bond, 1989). Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase terdiri atas karboksil eksopeptidase yang memo-tong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan

amino-ekso-peptidase dari gugus amino terminal, sedang endopeptidase memecah ikatan peptida dari dalam (Bergmann, 1942; Mubarik *et al.*, 2000).

Menurut Harley (1960) dalam Winarno (1986), endopeptidase dapat dibedakan berdasarkan gugus reaktif pada sisi aktif yang terlibat dalam katalisis, menjadi:

- a. Protease serin, artinya memiliki residu dalam lokasi aktifnya.
- b. Protease Sulfhidril, artinya mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktifnya. Enzim ini dihambat oleh senyawa oksidator, senyawa yang menyebabkan suasana menjadi alkali, dan logam berat.
- c. Protease metal, yaitu protease yang keaktifannya tergantung pada adanya metal per mol enzim. Metal tersebut dapat terdiri dari Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Ni, dan sebagainya. Enzim tersebut dihambat oleh EDTA yang dapat mengkhelat metal sehingga keaktifan enzim hilang.
- d. Protease asam, yaitu enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karbonil. Keaktifannya dapat dihambat oleh p-bromofenasilbromida.

Penggunaan enzim protease dalam berbagai produk komersial semakin meluasnya sejalan dengan kemajuan dalam bidang bioteknologi. Protease dimanfaatkan dalam bidang industri antara lain dalam pengolahan pangan, penyamakan kulit, deterjen, dan pengolahan limbah cair. Aplikasi enzim protease untuk deterjen sudah dimulai sejak tahun 1959 oleh perusahaan Swiss Gebruder Schyner. Enzim ini mampu menghidrolisis kotoran yang berupa protein dan memecahnya menjadi polipeptida yang lebih larut atau asam amino. Enzim bekerjasama dengan komponen lain dalam detergen, sehingga menghasilkan cucian yang lebih bersih. Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease juga semakin meningkat namun

kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut perlu ada usaha untuk memproduksi enzim protease (Daniel, 1979; Suhartono, 2000; Thomas, 1984).

Enzim protease dapat diperoleh dari empat macam sumber, yaitu:

- a) Tumbuhan, misalnya dari pepaya.
- b) Hewan, misalnya pankreas sapi.
- c) Bakteri, misalnya *Bacillus subtilis*.
- d) Fungi, misalnya *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*.

### **G. Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Proses isolasi enzim haruslah memperhatikan letak enzim tersebut. Ada dua macam letak enzim, yaitu enzim yang berada di dalam sel yang disebut dengan intraseluler dan enzim yang berada diluar sel yang disebut ekstraseluler. Proses isolasi enzim yang berada diluar sel lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan isolasi enzim yang berada di dalam sel, hal ini dikarenakan tidak perlu memecah dinding sel untuk mengeluarkan enzimnya dan sel lebih mudah dipisahkan dari pengotornya (Gumbira, 1987). Tahap – tahap proses isolasi dan pemurniaan enzim yang paling dasar menurut Darwis dan Sukara (1990) serta Judoamijojo *et al* (1989) adalah sebagai berikut:

#### **1. Lisis Dinding Sel**

Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan enzim dari sel atau konstituen seluler. Pada proses ini diperlukan pengrusakan atau penghancuran dinding sel secara fisik, mekanik atau kimiawi. Proses lisis ini dilakukan untuk mengeluarkan enzim intra seluler dari dalam sel. Pemecahan dinding sel secara kimia dilakukan



dengan beberapa cara, antara lain dengan perlakuan senyawa anorganik seperti asam atau basa kuat yang mampu melarutkan komponen dinding sel, dengan menggunakan enzim lisozim. Pemecahan dinding sel secara mekanik atau fisik dapat dilakukan dengan cara pembekuan atau pencairan, ultrasonifikasi, dan homogenasi.

## 2. Sentrifugasi (Pemusingan)

Molekul – molekul dengan berat molekul yang besar dapat mengendap dengan cepat bila disentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Kecepatan pengendapan molekul bergantung pada beberapa faktor seperti besar molekul, bentuk molekul, dan viskositas larutan. Tetapi kecepatan pengendapan molekul tersebut sangat bergantung pada berat molekulnya.

## 3. Fraksinasi

Cara pemurnian enzim yang umum dilakukan adalah dengan proses pengendapan bertahap atau biasa disebut fraksinasi. Pengendapan protein yang sering dilakukan adalah dengan senyawa elektrolit menggunakan garam amonium sulfat,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Penambahan senyawa ini menyebabkan menurunnya kelarutan enzim tersebut, sehingga terbentuk endapan protein.

Garam amonium sulfat sering digunakan dalam pengendapan enzim dan protein, hal ini karena kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, memiliki daya pengendapan yang cukup besar, mempunyai efek penstabilan terhadap kebanyakan enzim (Soedigdo, 1988). Selain itu, garam amonium sulfat memiliki kelarutan besar dalam air, dapat diperoleh dalam bentuk yang sangat murni, dan murah (Reed *et al*, 1998). Penambahan fraksinya sebagai berikut: (0-20)% jenuh,

(20-40)% jenuh, (40-60)% jenuh, (60-80)% jenuh, (80-100)% jenuh. Pengendapan ini dikenal sebagai *salting out*.

#### 4. Dialisis

Dialisis adalah suatu proses pemisahan molekul – molekul besar dari ion – ion sederhana dengan menggunakan membran berdasarkan difusi. Proses ini terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmosa antara cairan yang ada di dalam membran dengan cairan yang ada di luar membran. Membran yang digunakan adalah kantung selofan berbentuk selang.

Proses dialisis secara garis besar adalah sebagai berikut: Sampel dimasukkan ke dalam larutan buffer. Molekul dengan berat molekul lebih kecil dari 20000 dalton dapat melewati membran, sedangkan molekul dengan berat molekul lebih besar akan tetap berada di dalam kantung selofan. Molekul –molekul kecil akan terdifusi keluar dari membran sampai tekanan osmosik antara sampel dan buffer yang digunakan telah seimbang. Sehingga buffer harus diganti beberapa kali agar semua ion dalam larutan dapat dihilangkan.