

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme-perantara dari sel (Wirahadikusumah, 2001). Dengan adanya enzim, molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk (Grisham *et al.*, 1999). Enzim tersusun atas asam-asam amino yang melipat-lipat membentuk globular, dimana substrat yang dikatalisis bisa masuk dan bersifat komplementer (Martoharsono, 2006).

Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi *and* Supriyatin, 2006). Enzim bersifat efisien dan spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu. Kespesifikannya disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar (atau nonpolar) yang terdapat dalam struktur enzim (Fessenden, 1994).

1. Klasifikasi enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

a. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok :

1. Oksidoreduktase

Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

2. Transferase

Enzim transferase adalah enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.

3. Hidrolase

Enzim hidrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.

4. Liase

Enzim liase adalah enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air.

5. Isomerase

Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.

6. Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin (Winarno, 2002).

- b. 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.
- 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 β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E. Coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 2005).

2. Sifat katalitik enzim

Sifat-sifat katalitik khas dari enzim adalah sebagai berikut :

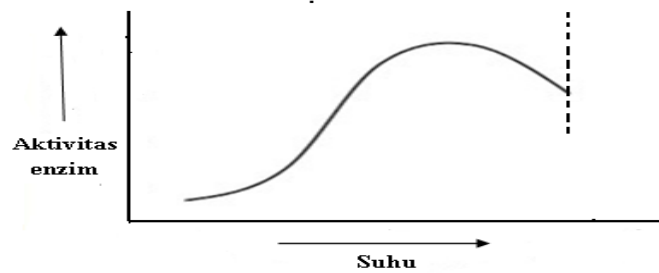
- a. Enzim meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH. Hal ini merupakan keadaan yang jarang dengan katalis-katalis lain.
- b. Enzim berfungsi dengan selektivitas atau spesifisitas bertingkat luar biasa tinggi terhadap reaktan yang dikerjakan dan jenis reaksi yang dikatalisasikan. Maka reaksi-reaksi yang bersaing dan reaksi-reaksi sampingan tidak teramati dalam katalisasi enzim.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang luar biasa dibanding dengan katalis biasa (Page, 1997).

3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

a. Suhu

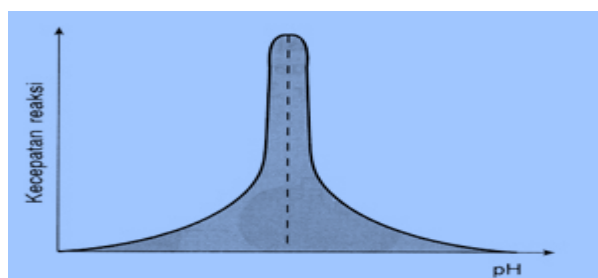
Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 2011). Suhu optimum merupakan suhu pada saat enzim memiliki aktivitas maksimum. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu yang menyebabkan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini

menyebabkan laju reaksi enzimatik menurun (Poedjiadi *and* Supriyatin, 2006). Pada suhu 0°C enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay *and* Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 2011).

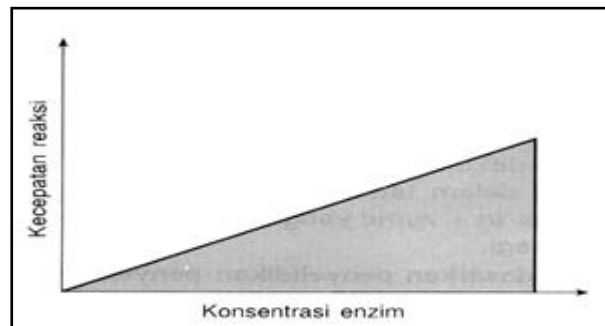
- b. pH (Derajat Keasaman) enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 2002). Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1997).



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno, 2002).

c. Konsentrasi enzim

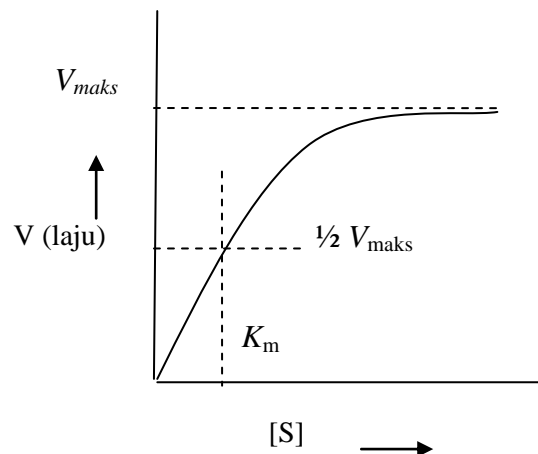
Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi *and* Supriyatin, 2006). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. 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, 2005). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005).

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, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 2006).

Menurut Wirahadikusumah (2001), 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, 2002).

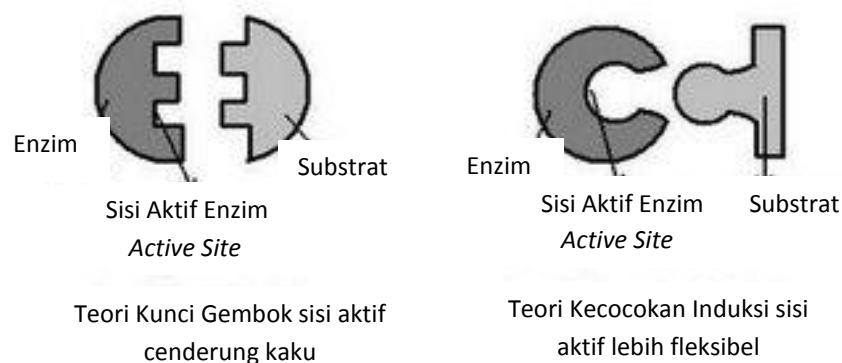
4. Teori pembentukan enzim substrat

Menurut Shahib (2005) ada dua teori pembentukan kompleks enzim substrat yaitu teori *lock and key* dan teori *induced-fit* yang dapat diilustrasikan pada Gambar 5.

a. Di mana substrat yang spesifik akan terikat pada daerah spesifik di molekul enzim yang disebut sisi aktif. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung rantai residu yang menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Kemudian produk akan bebas dari sisi aktif dengan terbebasnya enzim.

b. Teori *induced-fit* (ketetapan induksi)

Teori ini menerangkan bahwa enzim bersifat fleksibel. Dimana sebelumnya bentuk sisi aktif tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan dengan bentuk substrat.



Gambar 5. Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005).

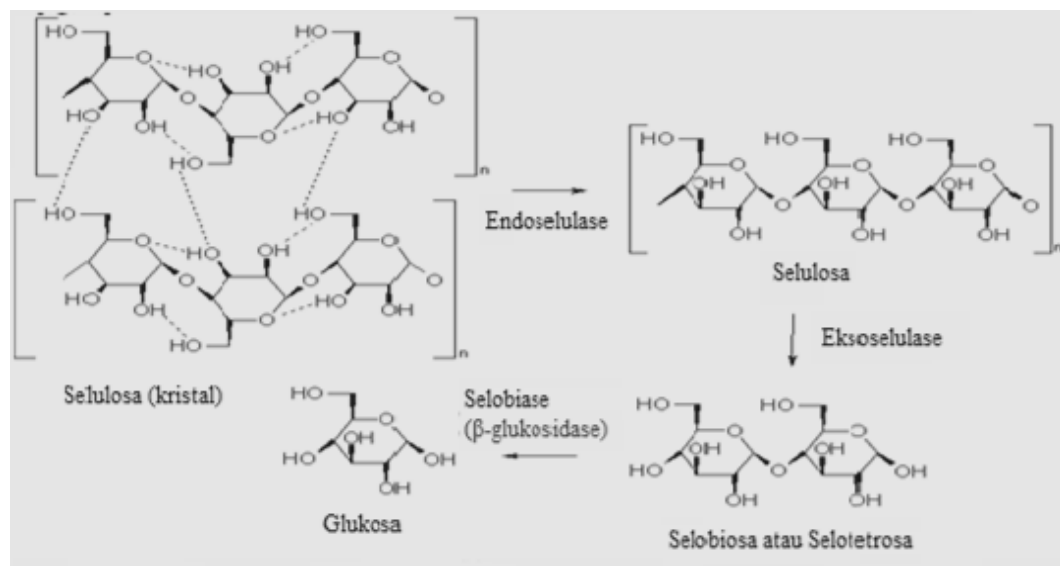
B. Enzim Selulase

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

Enzim selulase dikenal sebagai multi-enzim yang terdiri dari tiga komponen, yaitu:

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

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat dalam Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Ikram *et al.*, 2005).

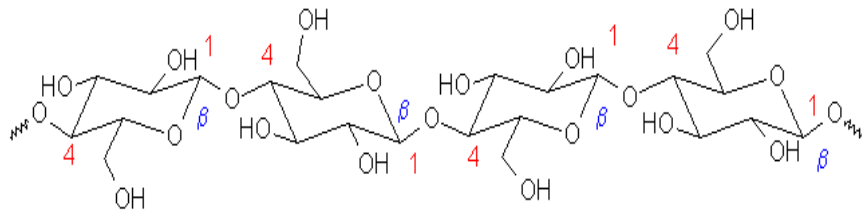
Enzim selulase dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri seperti industri sari buah, industri bir, pengolahan limbah pabrik kertas dan zat pelembut kain (Rahayu, 1991).

C. Selulosa

Selulosa merupakan biomolekul yang paling banyak ditemukan di alam dan unsur utama penyusun kerangka tumbuhan. Diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis tiap tahun. Daun kering mengandung 10-20% selulosa, kayu 50% dan kapas 90% (Koolman, 2001). Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan glukosa yang terikat dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang (Fan *et al.*, 1982).

Selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan daripada menggunakan asam. Selain tidak menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* (pH 4,8 dan suhu 50°C), proses hidrolisis secara enzimatik juga menghasilkan *yield* lebih tinggi daripada hidrolisis yang dikatalisis asam (Duff *and* Murray, 1996).

Struktur selulosa dapat digambarkan seperti pada Gambar 7.

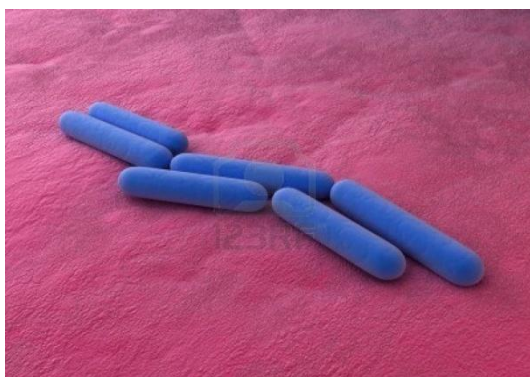


Gambar 7. Struktur selulosa (Koolman, 2001).

D. *Bacillus subtilis*

Bacillus merupakan salah satu mikroba golongan bakteri. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* pada umumnya hidup di tanah, diantaranya adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* dan kelompok *Bacillus spaericus*. Selain di tanah, beberapa jenis *Bacillus* juga ditemukan di lumpur dan di muara yaitu *Bacillus firmus* dan *Bacillus lentus*. Selain ditemukan di kedua habitat di atas, ada juga beberapa jenis *Bacillus* yang hidup di laut misalnya *Bacillus marinus*, *Bacillus cirroflagelosus*, *Bacillus epiphytus* dan *Bacillus filicolonicus* (Priest, 1993).

Bacillus subtilis merupakan bakteri yang mempunyai spora. Spora berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya. Mikroorganisme ini bersifat gram positif dan bersifat aerob (Schlegel and Schmidt, 1994). *Bacillus subtilis* berbentuk batang lurus gram positif berukuran 1,5 x 4,5 μm , sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai, bergerak dan tidak bersimpai. Gambar *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. *Bacillus subtilis* (Gupte, 2001).

E. Kinetika Reaksi Enzim

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatis. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat ini dapat divariasikan untuk mempelajari mekanisme suatu reaksi enzim, yakni bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1999).

Berdasarkan postulat Michaelis-Menten pada suatu reaksi enzimatis 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).



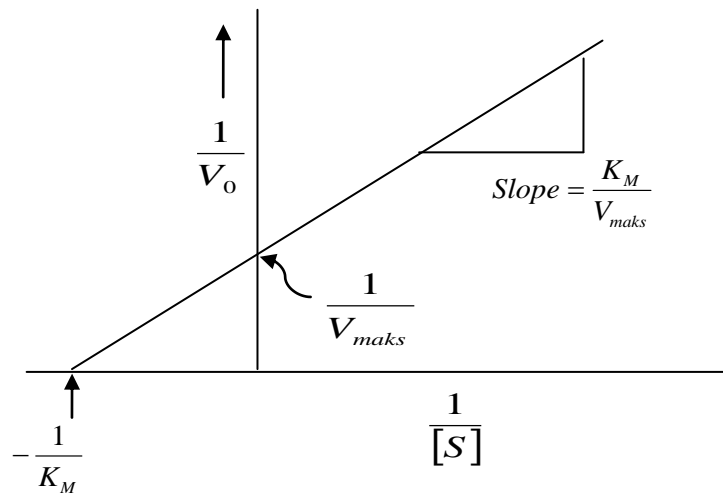
Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan *Michaelis Menten* (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim substrat memiliki 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 menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* yang ditunjukkan dalam Gambar 9.

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

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

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



Gambar 9. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1999).

F. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Enzim dikatakan stabil apabila enzim dapat mempertahankan aktivitasnya selama proses penyimpanan dan penggunaan, selain itu enzim dapat mempertahankan kestabilannya terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu serta pH yang ekstrim (Wiseman, 1985).

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 (Junita, 2002). Menurut Illanes (1999), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan rekayasa protein.

1. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 2001).

Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi. Penggunaan suhu yang tinggi 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. Penggunaan enzim dalam industri umumnya dilakukan pada suhu relatif rendah, misalnya pada suhu 50-60°C (untuk glukoamilase dan glukosa isomerase) atau lebih rendah. Penggunaan enzim pada suhu yang lebih tinggi hingga 85-100°C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan α -amilase bakterial. Oleh sebab itu, diperlukan enzim dengan stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

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

- a. Adanya pembukaan partial (partial *unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuarterner 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 mikroakueus, 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

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). 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, 2002).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

G. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi 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 enzim 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, 2005).

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini 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 normal. 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 ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter) (Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan 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 (1999), 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, maka kelarutan protein semakin menurun dan terjadi proses pengendapan protein. Peristiwa pengendapan protein ini disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 2001). 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, maka 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 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, 1987).

3. Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein enzim. Proses dialisis secara umum dapat dilakukan dengan

memasukkan larutan enzim dalam suatu kantong dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel seperti selofan. Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam bufer maka molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran. Sedangkan molekul enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantong dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan bufer dengan konsentrasi rendah di luar kantong dialisis (Lehninger, 2005). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Mc Phie, 1971 dalam Boyer, 2000).

Proses dialisis berlangsung karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, tetapi sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

H. Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels

Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan produk glukosa dimana CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebagai substratnya. Semakin tinggi absorbansi sampel semakin baik aktivitasnya.

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

Metode ini relatif sederhana dan dapat diterapkan 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).

J. Modifikasi Kimia

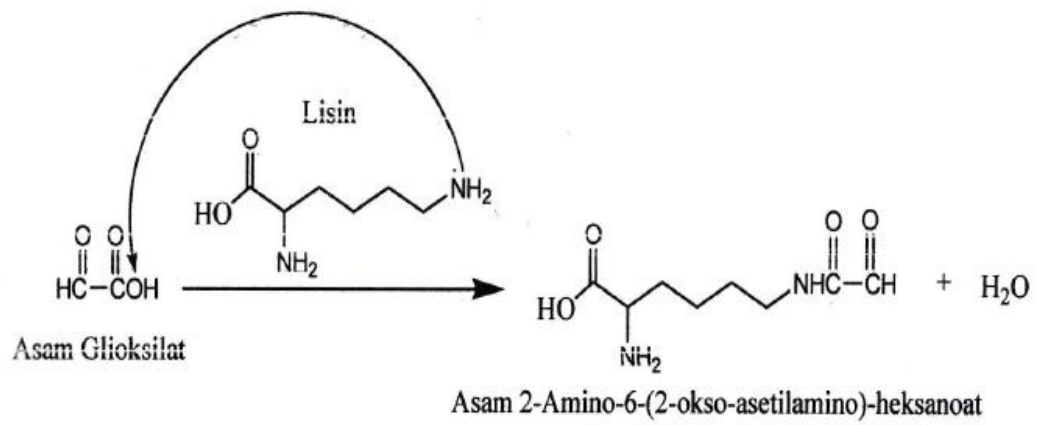
Menurut Wagen (1984), untuk mendapatkan enzim yang mempunyai kestabilan dan aktivitas tinggi pada kondisi ekstrim, dapat dilakukan isolasi langsung dari organisme yang terdapat di alam dan hidup pada kondisi tersebut (ekstrimofilik) atau dengan modifikasi kimia terhadap enzim yang berasal dari mikroorganisme yang hidup pada kondisi tidak ekstrim (mesofilik).

Beberapa cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim, yaitu amobilisasi, mutagenesis terarah dan modifikasi kimia. Menurut Janecek (1993), modifikasi kimia merupakan salah satu metode yang lebih disarankan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Hal ini dikarenakan baik amobilisasi maupun mutagenesis terarah memiliki kelemahan. Pada metode amobilisasi enzim dapat terjadinya penurunan kapasitas pengikatan maupun reaktivitas enzim akibat penghambatan transfer massa oleh matriks. Sedangkan pada metode mutagenesis terarah diperlukan informasi mengenai struktur primer dan struktur tiga dimensinya (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Keuntungan modifikasi kimia dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim adalah tidak terhalangnya interaksi antara enzim dengan substrat oleh adanya matriks yang tidak larut, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. Residu lisin yang terletak pada permukaan enzim merupakan salah satu penyebab ketidakstabilan enzim, karena ia dapat berinteraksi dengan molekul air disekitarnya (Nubarov *et al.*, 1987).

Enzim hasil modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil dapat diperoleh dengan beberapa cara diantaranya modifikasi dengan menggunakan (1) pereaksi bifungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus-gugus fungsi pada permukaan protein), (2) modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi non polar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) penambahan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambah ikatan ionik atau hidrogen) dan (4) hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukainya).

Hidrofilisasi permukaan enzim dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu modifikasi langsung berbagai asam amino hidrofobik yang membentuk tapak-tapak hidrofobik pada permukaan enzim dengan pereaksi hidrofilik atau hidrofilisasi terhadap asam amino yang berada dekat dengan tapak hidrofobik sehingga tapak tersebut terlindungi dari lingkungan berair (Mozhaev *et al.*, 1990).

Melik-Nubarov *et al.* (1987) melaporkan hidrofilisasi α -kimotripsin menggunakan asam glioksilat (AG) dengan reduktor NaBH_4 , dapat meningkatkan kestabilan enzim tersebut secara nyata. Modifikasi dilakukan pada pH 8,4 sehingga gugus amina primer pada rantai samping lisin di permukaan enzim dengan mudah bereaksi dengan asam glioksilat.



Gambar 10. Reaksi antara asam gliksilat dengan lysin