

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Mikroorganisme, terutama ragi, telah digunakan selama beberapa ribu tahun untuk membuat bir, minuman anggur dan beberapa produk fermentasi lain. Namun, baru pada tahun 1878 oleh Kuhne, komponen sel ragi yang bertanggung jawab terhadap fermentasi disebut sebagai *enzim* (berasal dari bahasa Yunani yang berarti *di dalam ragi*). Kurang dari dua dasawarsa berikutnya, sifat enzim yang tidak hidup dibuktikan secara jelas dengan menggunakan ekstrak ragi yang bebas sel dan ternyata ekstrak tersebut mampu mengkatalisis perubahan glukosa menjadi etanol (Fowler, 1988).

Enzim adalah biokatalisator yang diproduksi oleh jaringan hidup dan enzim meningkatkan laju reaksi. Bila enzim tidak ada maka reaksi-reaksi akan berjalan terlalu lambat untuk dapat menopang kehidupan atau reaksi-reaksi tersebut akan memerlukan kondisi-kondisi non-fisiologis. Enzim mempunyai berat molekul yang beraneka ragam berkisar $10^4 - 10^7$ KDa (Dryer, 1993). Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (*globular*), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri dari lebih dari satu polipeptida (Wirahadikusumah, 1989).

Enzim digunakan dalam sebagian besar sektor industri, terutama industri makanan. Selain itu, enzim juga digunakan dalam industri deterjen, farmasi dan tekstil. Lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, tetapi hanya 14 enzim yang diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim ini adalah hidrolase, misalnya amilase, protease, pektinase dan selulase. Enzim penting lainnya adalah glukosa isomerase dan glukosa oksidase. Alasan digunakannya enzim dalam industri adalah enzim mempunyai kelebihan antara lain :

1. Kemampuan katalitik yang tinggi, mencapai 10^9 - 10^{12} kali laju reaksi nonaktivitas enzim
2. Spesifikasi substrat yang tinggi
3. Reaksi dapat dilakukan pada kondisi yang lunak, yaitu pada tekanan dan temperatur rendah (Fowler, 1988).

Tabel A.1. Beberapa enzim yang dihasilkan mikroba dan aplikasinya (Fowler, 1988)

Enzim	Sumber	Aplikasi
Amilase	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium roquefort</i> <i>Aspergillus niger</i>	Tekstil, pelarutan pati, produksi glukosa
Penicillinase	<i>Bacillus subtilis</i>	Degradasi penisilin
Invertase	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Industri permen
Selulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma</i> sp.	Pengurang viskositas, membantu sistem pencernaan
Pektinase	<i>Aspergillus niger</i>	Klarifikasi wine dan jus buah
Protease	<i>Clostridium</i> sp.	Pelunak, membantu sitem pencernaan

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, yang merupakan pemindahan elektron, hidrogen atau oksigen.
 2. Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul ke molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metal, 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 β -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 ialah sebagai berikut:

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim berfungsi sebagai selektifitas 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, 1989).

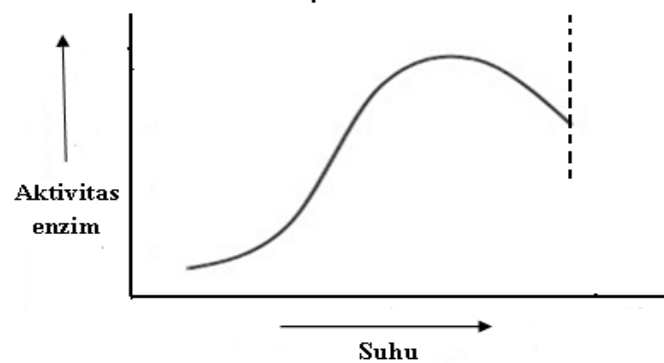
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah 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

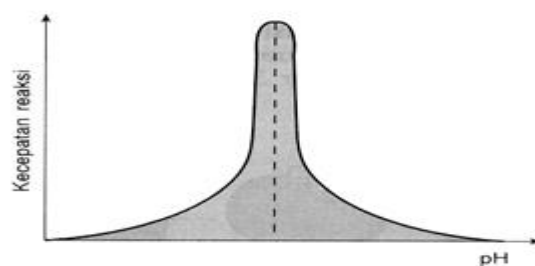
optimum (Rodwell,1987). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Pada suhu 0°C enzim tidak aktif (tidak rusak) dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.



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

b. pH

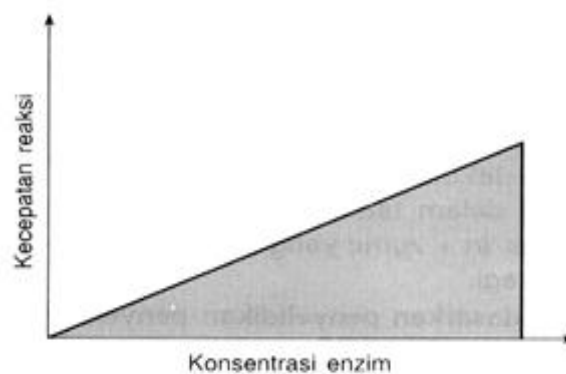
Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya, diperkirakan perubahan kereaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



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

c. Konsentrasi enzim

Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan semakin meningkat hingga pada batas konsentrasi tertentu dimana hasil hidrolisis akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim yang disebabkan penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975). 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 enzimatis 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).

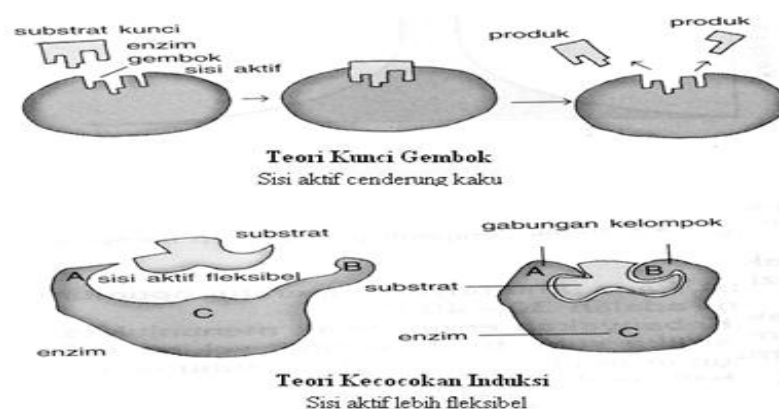
e. Aktivator dan inhibitor

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 dan 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 sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

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*), yang 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 sudah terlepas dari kompleks, enzim tidak aktif menjadi bentuk yang lepas. Sehingga, substrat yang lain kembali bereaksi dengan enzim tersebut.

B. 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 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).

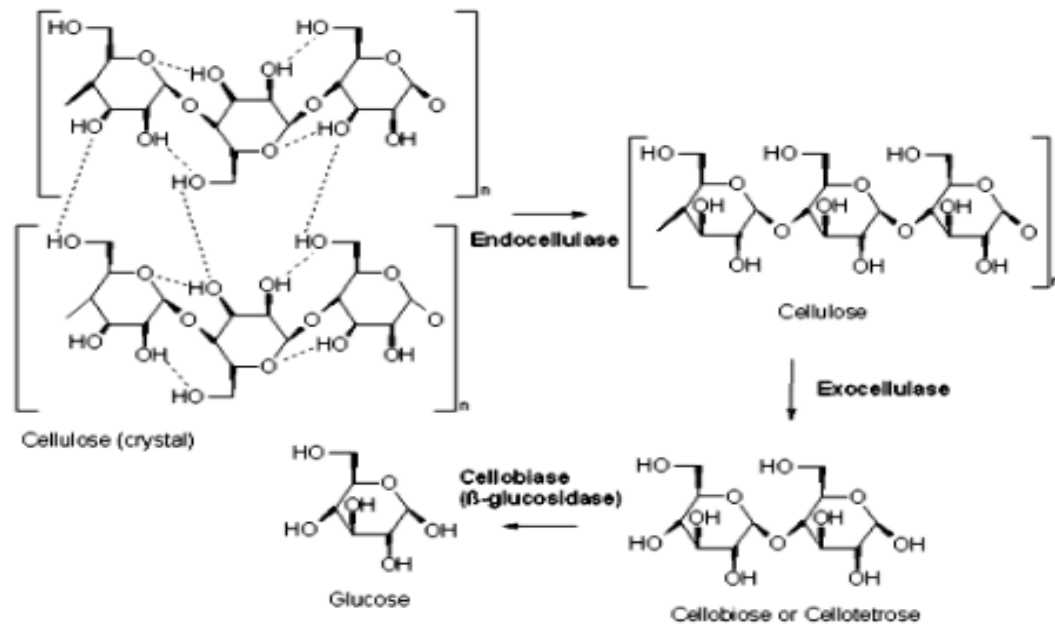
Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Hidrolisis menggunakan asam biasanya dilakukan pada temperatur tinggi. Proses ini relatif mahal karena kebutuhan energi yang cukup tinggi. Baru pada tahun 1980-an, mulai dikembangkan hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase (Gokhan, 2002).

Selulosa diproduksi oleh fungi, bakteri, tumbuhan, dan ruminansia. Produksi komersial selulase pada umumnya menggunakan jamur atau bakteri yang telah diisolasi. Meskipun banyak mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa, hanya beberapa mikroorganisme yang memproduksi selulase dalam jumlah yang signifikan yang mampu menghidrolisa kristal selulosa secara *invitro* (Ikram, 2005).

Mikroorganisme pendegradasi selulosa antara lain jamur (aerobik) dan bakteri (anaerobik). Jamur adalah mikroorganisme utama yang dapat memproduksi enzim selulase, meskipun beberapa bakteri dan *actinomycetes* juga dapat menghasilkan aktivitas selulase. Berbagai jenis jamur aerobik seperti *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa* dan *Phanerochaet chrysosporium* mampu mendegradasi selulosa dengan memproduksi enzim selulase (Damerco, 2003).

C. Enzim Selulase

Enzim yang dapat menghidrolisis ikatan $\beta(1,4)$ pada selulosa adalah selulase. Selulase adalah enzim terinduksi yang disintesis oleh mikroorganisme selama ditumbuhkan dalam medium selulosa (Lee, 2001). Selulase termasuk sistem multienzim 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 (Abdullah, 2011).

Adapun ketiga komponen enzim tersebut 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 (Reese, 1976).

Aktivitas selulase disebabkan oleh enzim non hidrolitik C_1 , hidrolisis selulosa yang telah diaktifkan dilakukan oleh enzim C_x . Menurut hipotesa ini, mikroba yang tumbuh pada selulosa kristal membentuk C_1 , sedangkan mikroba yang hanya dapat menguraikan selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat atau selulosa tersubstitusi akan kekurangan enzim C_1 , tetapi banyak menghasilkan enzim C_x (Muchtadi *et al.*, 1992).

D. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan jamur dari filum *ascomycetes* yang berfilamen, mempunyai hifa berseptat dan dapat ditemukan melimpah di alam. Menurut tinjauan umum *Aspergillus niger* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi : *Fungi imperfecti*

Sub kelas : *Hyphomyces*

Ordo : *Monoliales*

Famili : *Monoleaceae*

Genus : *Aspergillus*

Species : *Niger*

(Dwijoseputro, 1984).

Aspergillus niger dapat tumbuh optimum pada suhu 30-37°C, pH 4-6 dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C, dan bersifat aerob atau memerlukan oksigen pada proses pertumbuhannya. Jamur ini memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Jamur ini biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan dan udara di dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada agar dekstrosa 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, 1998).

Dalam metabolismenya *Aspergillus niger* dapat menghasilkan asam sitrat sehingga banyak digunakan sebagai model fermentasi karena jamur 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 beberapa enzim seperti amylase, pektinase, amiloglukosidasi, kitin deasetilase dan selulase.

Di dalam industri, *Aspergillus niger* banyak digunakan dalam proses produksi asam sitrat dan di dalam laboratorium spesies ini digunakan untuk mempelajari tentang metabolisme pada jamur dan kegiatan enzimatik. Pada penelitian ini digunakan *Aspergillus niger* karena spesies ini termasuk jamur berfilamen penghasil selulase dan *crude enzyme* secara komersial serta penanganannya mudah dan murah. Jamur ini sangat efisien dalam memproduksi enzim selulase. Ciri-ciri umum dari *Aspergillus niger* antara lain:

1. Warna konidia hitam kelam atau hitam kecoklatan dan berbentuk bulat.
2. Bersifat termofilik, tidak terganggu pertumbuhannya karena adanya peningkatan suhu.
3. Dapat hidup dalam kelembaban nisbi 80 (Indrawati, 2006).
4. Dapat menguraikan benzoat dengan hidroksilasi menggunakan enzim benzoat 4-hidroksilase menjadi 4-hidroksibenzoat.
5. Memiliki enzim 4-hidroksibenzoat hidroksilase yang dapat menghidrolisa 4-hidroksibenzoat menjadi 3,4-dihidroksi benzoat.
6. Natrium & formalin dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger*.
7. Dapat hidup dalam spons (*spons Hyrtios Proteus*).
8. Dapat merusak bahan pangan yang dikeringkan atau bahan makanan yang memiliki kadar garam tinggi.
9. Dapat mengakumulasi asam sitrat.

E. Jerami Padi

Jerami padi merupakan limbah pertanian terbesar di Indonesia. Menurut data BPS tahun 2006, luas sawah di Indonesia adalah 11,9 juta ha. Produksi per hektar bisa mencapai 12-15 ton bahan kering setiap kali panen, tergantung lokasi dan varietas tanaman. Sejauh ini, pemanfaatan jerami padi sebagai pakan ternak baru mencapai 31-39 %. Sedangkan yang dibakar atau dimanfaatkan sebagai pupuk 36-62 % dan sekitar 7-16 % digunakan untuk keperluan industri (safan.wordpress.com, 2008). Jerami mengandung lignin, selulosa dan hemiselulosa. Kandungan selulosa yang cukup besar yaitu sekitar 39 % dapat dimanfaatkan untuk memproduksi enzim selulase. Penggunaan jerami padi sebagai substrat dalam produksi enzim selulase dapat menambah nilai ekonomi pada jerami padi itu sendiri (safan.wordpress.com, 2008).

Jerami padi merupakan limbah pertanian terbesar di Indonesia. Potensi selulosa dalam jerami padi yang besar dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam produksi selulase sehingga dapat menambah nilai ekonomi pada jerami padi. Banyaknya jerami padi yang belum dimanfaatkan secara optimal mendorong para peneliti mengembangkan potensi jerami padi menjadi sesuatu yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Berikut ini adalah komponen yang ada dalam jerami padi :

Tabel A.2. Komponen jerami padi (Abdullah, 2011).

Komponen	Kandungan (%)
Selulosa	39
Hemiselulosa	27
Lignin	12
Abu	11

Pemanfaatan substrat jerami padi sebagai media fermentasi yang banyak mengandung selulosa untuk pertumbuhan mikroorganisme memiliki prospek yang cerah di masa yang akan datang, karena memberikan alternatif biaya yang lebih murah jika dibandingkan dengan pembuatan enzim dengan menggunakan bahan-bahan kimia sintetik sebagai media pertumbuhan mikroorganisme. Produksi enzim selulase dengan menggunakan substrat jerami padi yang mengandung selulosa ini juga akan menghasilkan produk-produk lain yang berguna bagi manusia seperti glukosa, etanol, protein sel tunggal dan lain-lain. Jerami padi yang merupakan limbah pertanian memiliki kandungan selulosa cukup tinggi (Juliano, 1985), memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme untuk memproduksi enzim selulase.

F. Produksi dan Isolasi Enzim Selulase

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, 1986).

Isolasi enzim selulase dapat dilakukan dengan metode sentrifugasi. 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 selama 15 menit (Scopes, 1982).

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).

G. Pemurnian Enzim Selulase

Setelah enzim selulase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

1. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam ammonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah ammonium sulfat karena (1) kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, (2) memiliki kelarutan yang besar dalam air, (3) mempunyai daya pengendapan yang besar, dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim.

Menurut Suhartono (1989), penambahan senyawa elektrolit menurunkan kelarutan protein, karena kelarutannya dipengaruhi oleh kekuatan ion.

Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*, setelah mencapai suatu titik tertentu

kelarutannya akan semakin menurun atau disebut peristiwa *salting out*. 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, 1997).

2. Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dan larutan protein atau enzim berdasarkan prinsip membran semipermeabel akibat adanya proses fraksinasi menggunakan garam pada tahap pemurnian larutan protein atau enzim. Secara umum proses dialisis adalah dengan memasukkan enzim atau larutan protein hasil fraksinasi kedalam kantong dialisis yang bersifat membran semipermeabel (kantong selofan).

Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam buffer sambil diputar-putar, maka molekul kecil yang ada di dalam larutan enzim akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul besar akan tertahan dalam kantong dialisis. Kendala ini dapat dilakukan dengan cara mengganti larutan buffer secara kontinue atau menggunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah sampai ion-ion dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Lehninger, 1982).

H. Pengujian aktivitas enzim 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 .

I. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Salah satu metode untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru.

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, triftofan dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau*. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk 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 diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

J. Amobilisasi enzim

Enzim bebas mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan, sehingga secara teknik perolehan kembali enzim yang sangat aktif dari campuran reaksi sulit dilakukan sehingga stabilitas enzim perlu ditingkatkan. Terdapat tiga cara untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu amobilisasi, modifikasi kimia dan mutagenesis langsung (Mozhaev, 1988). Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri menurut Payne *et al* (1992) dan Wang *et al* (1979) antara lain:

1. Dapat digunakan berulang
2. Dapat mengurangi biaya
3. Produk tidak dipengaruhi oleh enzim
4. Memudahkan pengendalian enzim
5. Tahan kondisi ekstrim
6. Dapat digunakan untuk uji analisis
7. Meningkatkan daya guna
8. Memungkinkan proses sinambung

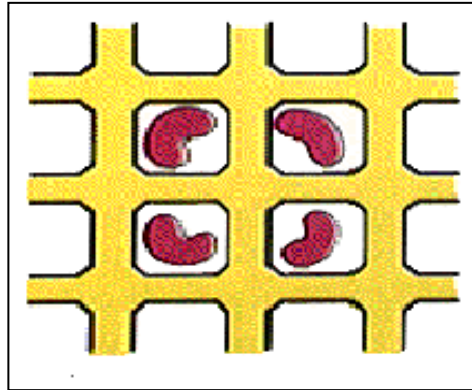
Enzim dapat di amobilisasi dengan berbagai cara antara lain : 1. Cara fisik yang meliputi teknik penjebakan mikro kapsul, 2. Cara kimia yang meliputi teknik pengikatan (absorpsi) pada bahan pendukung atau dengan teknik ikatan silang (Wirahadikusumah, 1981). Metode amobilisasi secara fisik memiliki kelebihan yaitu aktivitas dari enzim tetap tinggi (tidak terjadi perubahan konformasi enzim) dan media dapat diregenerasi (Susanto, 2003).

1. Cara fisik (penjebakan)

a. Teknik matriks

Enzim dapat terperangkap dalam gel matriks dengan membentuk gel dalam larutan encer yang mengandung satu macam enzim (Gambar 6). Matriks yang banyak digunakan adalah kalsium alginat, kappa-karagenan, resin sintesis dan poliakrilamida. Poliakrilamida terbuat dari akrilamida. Sedangkan serat yang digunakan yaitu selulosa triasetat dan polimer-polimer lainnya.

Keuntungan menggunakan teknik ini adalah secara relatif struktur alami enzim tidak mengalami gangguan fisik. Hal ini karena enzim tidak terikat dengan bahan pendukung, sehingga tidak terjadi perubahan konformasi enzim atau inaktivasi enzim. Akibatnya untuk membentuk kompleks enzim-substrat sangat kecil kemungkinannya, karena enzim tidak berada pada permukaan bahan pendukung.



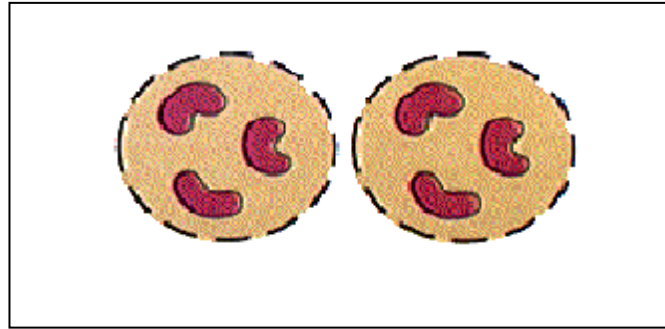
Gambar 6. Penjebakan teknik kisi (Crueger, 1984)

Teknik ini merugikan karena (1) terjadi kebocoran yang kontinue karena ukuran pori-pori terlalu besar, (2) interaksi antara substrat dan enzim kurang karena jeratan gel dan (3) kehilangan aktivitas enzim karena terbentuknya zat-zat radikal bebas pada reaksi polimerisasi (Judoamidjojo, 1990).

b. Teknik mikrokapsul

Enzim juga dapat diperangkap dalam mikrokapsul (Gambar 7) yang terbuat dari nilon semipermeabel butiran yang tipis atau membran koloidon.

Teknik ini merugikan karena (1) terjadi inaktif enzim selama pembentukan mikrokapsul, (2) mikrokapsul membutuhkan konsentrasi yang besar dan (3) enzim dapat bergabung dengan dinding membran (Crueger, 1984).

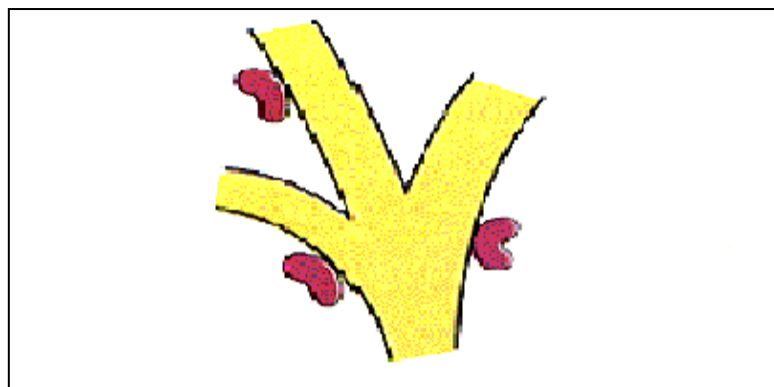


Gambar 7. Penjebakan teknik mikrokapsul (Crueger, 1984)

2. Metode kimia

a. Teknik ikatan non-kovalen

Enzim dapat diadsorpsi pada bahan pendukung seperti alumina, karbon aktif, silika gel dan lainnya. Teknik ini dapat menyebabkan kehilangan enzim oleh desorpsi, maka adsorben yang baik adalah yang dapat mengikat enzim cukup kuat dengan akibat denaturasi yang cukup kecil. Cara ini sukar dilakukan, tetapi enzim amobil yang terbentuk stabil terhadap konsentrasi substrat dan ion yang tinggi (Wirahadikusumah, 1989).

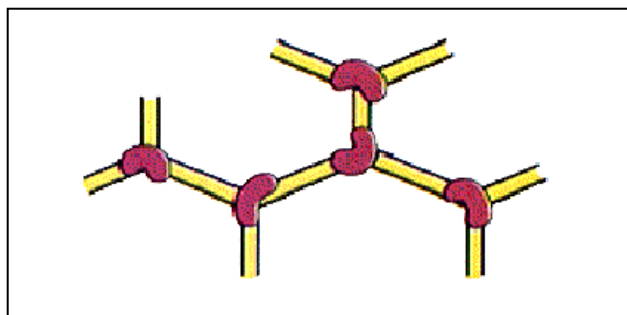


Gambar 8. Teknik ikatan non-kovalen (Wirahadikusumah, 1989)

b. Teknik ikatan silang

Dimana enzim terikat secara kovalen satu dengan lainnya oleh pengikatan yang mempunyai gugus aktif NH_3 , CNBr dan lainnya, yang membentuk struktur tiga dimensi yang tidak larut dalam air.

Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 9. Pembentukan ikatan intramolekuler antar molekul sering terjadi dengan dua atau lebih pereaksi seperti glutaraldehida, turunan isosianat, bisdiazobenzidina, N,N-etilen bismaleimida dan N,N-polimetil bisoodoaseomida. Kerugian cara ini ketika terjadi inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Wiseman, 1985).



Gambar 9. Teknik ikatan silang (Wiseman, 1985)

c. Teknik ikatan ion

Enzim terikat dengan bahan pendukung yang mengandung residu penukar kation maupun anion dan ikatan yang terbentuk lebih kuat dibanding ikatan non-kovalen. Bahan pendukung yang dapat digunakan adalah dietilaminoetil-selulosa (DEAE-selulosa) dan karboksimetil-selulosa (CM-selulosa).

Pada proses amobilisasi, jumlah enzim yang teradsorpsi dipengaruhi oleh lama

pengocokan dan konsentrasi adsorbat (enzim) (Sediawan, 2000). Lama pengocokan dan konsentrasi enzim akan mempengaruhi massa enzim yang teradsorpsi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut (Ariesta, 2009). Bentonit digunakan sebagai matriks karena bentonit mempunyai luas permukaan yang sangat besar, sehingga bentonit mempunyai kemampuan tinggi dalam mengadsorpsi dan mempunyai kapasitas penukar ion yang tinggi. Jenis Na-Bentonit dapat mengembang delapan kali lipat ukuran awalnya (Tekmira, 2005). Bentonit lebih dahulu diaktivasi menggunakan HCl agar ion Na^+ dapat ditukar dengan ion H^+ dan pengotor-pengotor yang terdapat pada bentonit dapat dihilangkan (Fikri, 2011).

K. Bentonit

Bentonit banyak dimanfaatkan dalam beberapa bidang industri, misalnya industri sabun, zat pengisi aspal, farmasi, pengisi resin, semen dan kecantikan (Zulkarnain, 1991). Bentonit adalah *clay* yang sebagian besar terdiri dari montmorillonit dengan mineral-mineral seperti kwarsa, kalsit, dolomit, feldspars dan mineral lainnya. Montmorillonit merupakan bagian dari kelompok *smectit* dengan komposisi kimia secara umum $(\text{Mg,Ca})\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Struktur montmorillonit memiliki konfigurasi 2:1 yang terdiri dari dua silikon oksida tetrahedral dan satu aluminium oksida oktahedral. Pada tetrahedral, 4 atom oksigen berikatan dengan atom silikon di ujung struktur. Empat ikatan silikon terkadang disubstitusi oleh tiga ikatan aluminium. Pada oktahedral atom aluminium berkoordinasi dengan enam atom oksigen atau gugus-gugus hidroksil yang berlokasi pada ujung oktahedron. Al_3^+ dapat digantikan oleh

Mg_2^+ , Fe_2^+ , Zn_2^+ , Ni_2^+ , Li^+ dan kation lainnya. Substitusi isomorphous dari Al_3^+ untuk Si_4^+ pada tetrahedral dan Mg_2^+ atau Zn_2^+ untuk Al_3^+ pada oktahedral menghasilkan muatan negatif pada permukaan clay. Hal ini diimbangi dengan adsorpsi kation di lapisan interlayer (Tekmira, 2005).

Adanya atom-atom yang terikat pada masing-masing lapisan struktur montmorillonit memungkinkan air atau molekul lain masuk di antara unit lapisan. Akibatnya kisi akan membesar pada arah vertikal. Selain itu, adanya pergantian atom Si oleh Al menyebabkan terjadinya penyebaran muatan negatif pada permukaan bentonit. Bagian inilah yang disebut sisi aktif (*active site*) dari bentonit dimana bagian ini dapat menyerap kation dari senyawa-senyawa organik atau dari ion-ion senyawa logam (Tekmira, 2005).

Sebelum digunakan dalam berbagai aplikasi, bentonit harus diaktifkan dan diolah terlebih dahulu. Ada dua cara yang dapat dilakukan untuk aktivasi bentonit, yaitu :

1. Secara Pemanasan

Pada proses ini, bentonit dipanaskan pada temperatur 300-350°C untuk memperluas permukaan butiran bentonit.

2. Secara Kontak Asam

Tujuan dari aktivasi kontak asam adalah untuk menukar kation Ca^+ yang ada dalam Ca-bentonit menjadi ion H^+ dan melepaskan ion Al, Fe, dan Mg dan pengotor-pengotor lainnya pada kisi-kisi struktur, sehingga secara fisik bentonit tersebut menjadi aktif. Untuk keperluan tersebut asam sulfat dan

asam klorida adalah zat kimia yang umum digunakan. Selama proses *bleaching* tersebut, Al, Fe, dan Mg larut dalam larutan, kemudian terjadi penyerapan asam ke dalam struktur bentonit, sehingga rangkaian struktur mempunyai area yang lebih luas.

Menurut Thomas, Hickey dan Stecker, atom-atom Al yang tersisa masih terkoordinasi dalam rangkaian tetrahedral dengan empat atom oksigen tersisa. Perubahan dari gugus oktahedral menjadi tetrahedral membuat kisi kristal bermuatan negatif pada permukaan kristal, sehingga dapat dinetralkan oleh ion hidrogen (Supeno, 2007).

Berikut adalah beberapa sifat umum bentonit :

1. Lunak, berbentuk kristal, bewarna pucat umumnya putih, hijau, kelabu, merah muda dalam keadaan segar dan mempunyai kilap lilin.
2. Terasa licin seperti sabun dan dapat menyerap air.

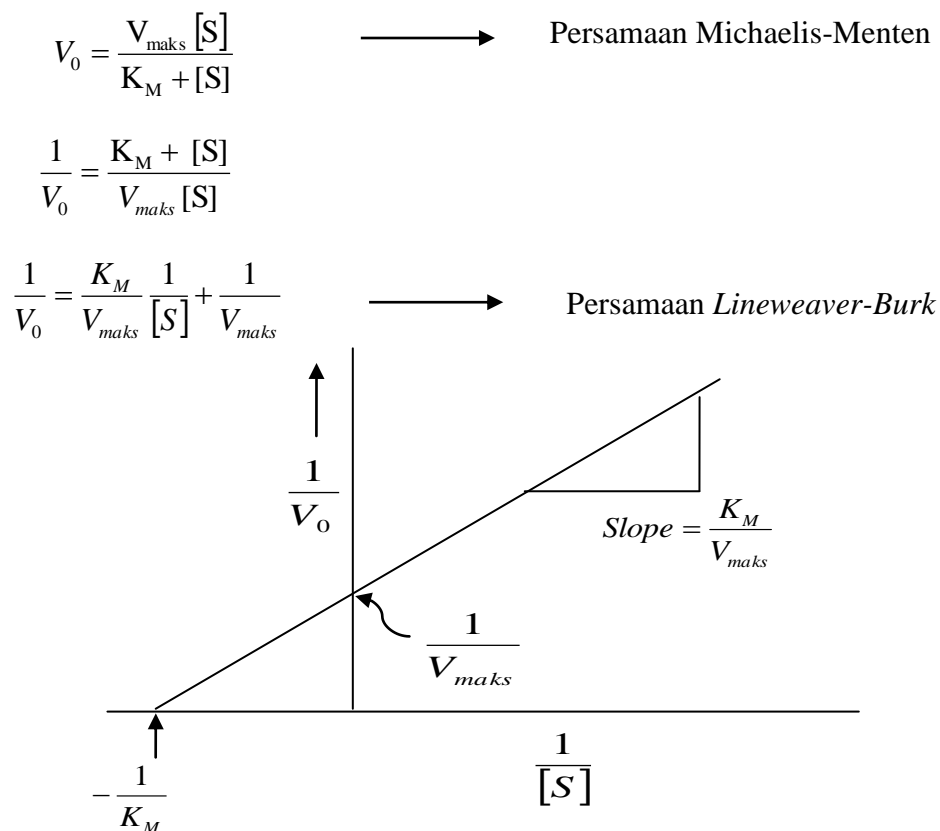
L. Kinetika reaksi enzim

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 pada Gambar 10 (Page, 1997).



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

M. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi – kondisi nonfisiologis lainnya (Wiseman, 1985). Terdapat dua cara untuk meningkatkan stabilitas enzim, yaitu stabilitas enzim alami dan stabilitas enzim tidak alami. Salah satu cara peningkatan stabilitas enzim secara tidak alami adalah amobilisasi menggunakan matriks atau bahan pendukung tertentu. Stabilitas enzim salah satunya dapat dilakukan dengan menentukan stabilitas termal enzim.

Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi yang dilakukan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu yang tinggi ini dapat menyebabkan ketidakstabilan enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi.

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).

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, 1987).