

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Mengenai Enzim

Enzim adalah suatu katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologis (Nurhalim, 1992). Enzim dapat mempercepat reaksi kimia, sedang enzim sendiri tidak mengalami perubahan. Jumlah enzim sebelum dan sesudah reaksi adalah tetap.

Semua enzim yang telah dikenal adalah protein. Suatu enzim dalam bentuk aktif tersusun atas protein yang disebut apoenzim dan bagian lain yang terdiri dari ion atau molekul-molekul dari jenis lain yang disebut koenzim. Gabungan dari keduanya disebut holoenzim (Manitto, 1992).

Enzim diberi nama dengan berbagai cara dan sistem, baik secara tradisional, sistematik resmi, nama perdagangan, nama sehari-hari, maupun nama berdasarkan spesifikasi enzim tersebut.

Pada tahun 1961, *International Union of Biochemistry (IUB)* membagi enzim menjadi enam kelas, yaitu : (Manitto, 1992)

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi reduksi
2. Transferase, mengkatalisis pemindahan gugus atom dari suatu donor ke suatu aseptor.
3. Hidrolase, meningkatkan pemecahan ikatan

antara karbon dengan atom lainnya dengan penambahan air.

4. Liase, meningkatkan terjadinya pemisahan suatu gugus atom dari substrat, sehingga terbentuk ikatan rangkap, atau penambahan suatu gugus atom pada suatu ikatan rangkap.
5. Isomerase, enzim yang merubah substrat menjadi isomernya.
6. Ligase atau sintetase, mengkatalisis persatuan dua molekul dengan cara memecahkan ikatan pirofosfat dalam ATP atau trifosfat lain.

Berdasarkan atas pembentukannya, enzim dibagi menjadi dua, yaitu enzim adaptif dan enzim konstitutif. Enzim adaptif (inducible enzyme) pembentukannya dirangsang oleh substrat, sedang enzim konstitutif pembentukannya tidak dirangsang oleh substrat.

Enzim meningkatkan laju reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Dalam upaya menurunkan energi aktivasi, enzim membentuk kompleks dengan zat yang bereaksi tersebut. Walaupun demikian enzim mempunyai kespesifikan yang tinggi baik dalam jenis reaksi maupun substratnya.

Aktivitas spesifik enzim dinyatakan sebagai jumlah satuan enzim per miligram rotein enzim. Sedang

satu satuan (unit) dari suatu enzim adalah jumlah enzim tersebut yang mampu mengkatalisis perubahan satu μmol substrat per menit pada kondisi tertentu (Winarno, 1983).

1. Enzim α -amilase

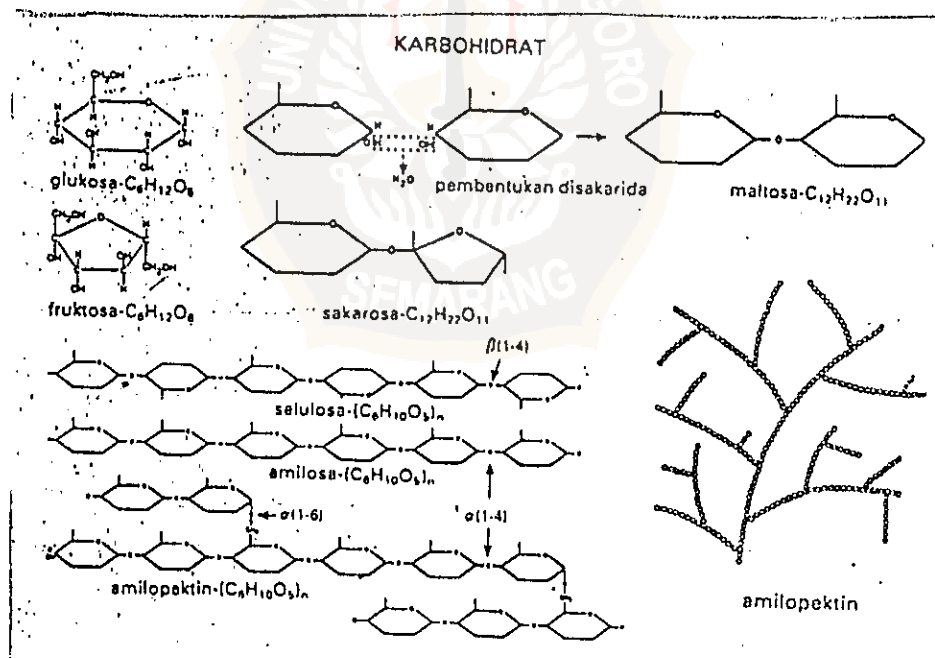
Enzim α -amilase berdasarkan nomenklatur bernama 1,4- α -glukan-glukahidrolase dan mempunyai nomor kode EC 3.2.1.1. (Winarno, 1983). Dalam perdagangan dikenal dengan merk aquazim atau thermamil (Gumbira, 1987).

Enzim α -amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia, dan mikrobial. Enzim α -amilase murni dapat diperoleh dari beberapa sumber, misalnya malt (barley), ludah manusia, dan pankreas. Dapat juga diisolasi dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis* (Winarno, 1983).

Enzim α -amilase merupakan endoenzim karena memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul (Crueger, 1984). Cara kerja enzim α -amilase terjadi melalui dua tahap. Pertama degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat pula. Yang kedua, relatif sangat lambat yaitu pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan caranya tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim

α -amilase pada molekul amilosa saja. Kerja enzim α -amilase pada amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa, dan berbagai jenis α -limit dekstrin, yaitu oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan α -1,4 (Winarno, 1983).

Berat molekul enzim α -amilase sekitar 50 ribu. Setiap molekul mengandung satu ion Ca^{++} . Aktivitas enzim ini optimal pada pH 5 - 7 (Borriss, 1987). Suhu yang optimal untuk enzim ini berbeda-beda dari tiap organisme. Enzim α -amilase dari pankreas optimal pada suhu 50°C , *Bacillus subtilis* pada 60°C , *B. licheniformis* pada 90°C (Kuswanto, 1988).



Gambar 1. Hanya ikatan (α -1,4) diantara kesatuan glukosa oleh pengaruh α -amilase dapat diurai (Winarno, 1983).

Enzim α -amilase banyak digunakan dalam bidang industri. Adapun industri yang menggunakan enzim α -amilase antara lain industri pati, alkohol, sirup, kertas, tekstil, gula, dan industri sabun detergen (Crueger, 1984).

Isolasi dan porcine (pemurnian enzim) dilakukan berdasarkan fraksinasi dengan garam, juga dengan penggunaan panas selektif (biasanya 70°C selama 15 menit). Kemudian dilakukan pencampuran glikogen sehingga terjadi kompleks enzim-glikogen (Winarno, 1983).

Unit aktivitas enzim α -amilase dianalisa menurut metode Bernfold (1955 dalam Gumbira Said, 1987) yaitu pengujian aktivitas dengan substrat larutan pati satu persen. Aktivitas enzim α -amilase juga dapat ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati terlarut atau dari kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodium terhadap substrat. Disamping itu, keaktifan enzim α -amilase juga dapat dinyatakan dalam berbagai cara, misalnya dengan pengukuran viskositas dan jumlah pereduksi yang terbentuk (Winarno, 1983).

Aktivitas enzim α -amilase dinyatakan dalam satuan unit per mililiter cairan enzim. Satu unit aktivitas setara dengan satu mikromol maltosa yang dihasilkan dari perlakuan enzim terhadap larutan pati satu persen selama satu menit (Gumbira, 1983).

2. Enzim α -amilase pada mikrobia

Enzim α -amilase pada mikrobia bersifat ekstraseluler dan bekerja secara endoenzim (Crueger, 1984). Enzim ini pada mikrobia berperan mengkatalisis pemecahan karbohidrat menjadi molekul yang lebih sederhana di luar sel, sehingga molekul tersebut dapat masuk ke dalam sel melalui membran sel (Stainier, Adelberg, Ingrham, 1984).

Enzim ekstraseluler kebanyakan dapat diinduksi. Hal ini disebabkan substrat makromolekul tidak dapat memasuki sel, sehingga sintesis enzim harus diserahkan pada penginduksi. Substrat yang tipikal untuk proses induksi pada enzim α -amilase adalah pati atau dekstrin (Gumbira, 1987).

Kebanyakan enzim ekstraseluler tunduk pada represi katabolit. Karena itu sintesis enzim ekstraseluler tertekan jika dilingkungan tersebut terdapat energi dan sumber karbon yang dapat larut dan yang dapat dimetabolisme secara cepat (Stainier dkk, 1984). Menurut Borriss (1987)

represi katabolit enzim α -amilase adalah fruktosa, glukosa, maltosa, gliserol, asetat, dan suksinat.

Enzim α -amilase dari mikrobia dapat berasal dari bakteri maupun jamur. Menurut Crueger (1984) bakteri yang dapat menghasilkan enzim α -amilase adalah *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. caldolyticus*, *B. acidocaldarius*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Proteus sp.*, *Thermomonospora sp.*, dan *Serratia sp.*

Enzim α -amilase dari jamur dapat diperoleh dari beberapa genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Candida*, *Neurospora*, dan *Rhizopus*.

Berat molekul enzim α -amilase yang dihasilkan oleh beberapa mikrobia berbeda-beda. Hal ini dapat ditunjukkan pada Tabel berikut :

Tabel 01. Berat molekul enzim α -amilase dari beberapa mikrobia.

Mikrobia	Berat molekul $\times 10^3$
<i>Aspergillus oryzae</i>	51 - 52
<i>A. niger</i>	58 - 61
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	68
<i>B. amyloliquefaciens</i>	49
<i>B. subtilis</i>	24 - 100
<i>Thermomonospora curvata</i>	62

Fogarty dan Kelleey, (1979 dalam Crueger, 1984).

Dinegara-negara yang sudah maju, enzim biasanya diproduksi dengan persyaratan, khususnya bagi enzim yang diproduksi dari mikrobia. Mikrobia yang dipilih dari jenis yang tidak memproduksi racun. Mikrobia penghasil enzim α -amilase yang memenuhi syarat antara lain *Bacillus subtilis*. Sedang enzim α -amilase dari *Bacillus cereus* masih belum diijinkan karena mikrobia ini dekat hubungannya dengan *Bacillus anthracis* (Winarno, 1983).

B. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis mempunyai ciri-ciri, antara lain berbentuk batang, panjang 4-5 μ , lebar 1- 1,25 μ , memiliki flagel, bersifat gram positif, dan memiliki endospora. Goresan pada nutrien agar merupakan koloni yang tipis berwarna putih abu-abu. Pada biakan cair menghasilkan selaput permukaan yang tipis dan membentuk endapan (Bibiana, 1992).

Klasifikasi *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut :

Divisio : *Protophyta*

Class : *Schizomycetes*

Ordo : *Eubacteriales*

Famili : *Bacillaceae*

Genus : *Bacillus*

Spesies : *Bacillus subtilis*

(Holt dan Krieg, 1984).

Bacillus subtilis mudah ditumbuhkan, mempunyai kerapatan yang tinggi, dapat menggunakan faktor tumbuh yang tidak mahal, dapat menghasilkan endospora yang tahan terhadap panas, dan tidak menghasilkan racun. Enzim α -amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* mudah diisolasi dan mempunyai kestabilan yang tinggi terhadap panas (Winarno, 1983).

C. Media Fermentasi

1. Media pertumbuhan mikrobia

Media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang dipakai untuk menumbuhkan mikrobia. Media yang diketahui komposisinya secara terinci disebut media sintetik (Bibiana dan Hastowo, 1992).

Mikrobia ototrof dapat tumbuh pada media sederhana, oleh karena mikrobia ini mempunyai kemampuan mensintesis bahan anorganik menjadi karbohidrat, protein, asam nukleat, lipida, dan vitamin. Sedang mikrobia heterotrof menggunakan media non sintetik. Sering digunakan bahan mentah seperti pepton, ekstrak daging, ekstrak ragi, sehingga media tersebut dapat digunakan oleh berbagai jenis mikrobia (Bibiana dan Hastowo, 1992).

Media fermentasi untuk memproduksi enzim α -amilase dapat dibuat dari bahan yang tidak mahal, tetapi mendukung pertumbuhan mikrobia dengan baik. Biasanya digunakan bahan makanan

dengan baik. Biasanya digunakan bahan makanan berprotein dikombinasikan dengan bahan-bahan yang terdiri dari tepung, biji padi, dan jagung atau bahan-bahan yang terdiri dari karbohidrat seperti laktosa, sukrosa, atau hasil hidrolisis pati. Garam-garam amonium nitrit juga ditambahkan untuk sumber nitrogen. Komposisi media harus seimbang sehingga pH media tidak melebihi batas yang diharapkan selama fermentasi terus berlangsung. Hal ini dapat berlangsung dengan penambahan sistem buffer.

2. Bekatul sebagai media fermentasi

Bekatul adalah hasil samping penggilingan padi yang terdiri dari lapisan dedak sebelah dalam dengan sebagian lembaga dan sebagian kecil endosperma yang bertepung. Adapun komposisi kimiawi dari bekatul adalah sebagai berikut :

Tabel 02. Komposisi kimiawi bekatul

Komposisi	Banyaknya (%)	Komposisi	Banyaknya (j/g kering)
H ₂ O	8,4-14,7	Kalsium	510 - 842
Protein	9,8-15,4	Klor	510 - 970
Lemak	7,7-22,4	Besi	140 - 316
Abu	7,1-20,6	Mangan	406 - 877
Nitrogen	34,2-46,1	Magnesium	9770-12300
Serat Kasar	5,7-20,9	Fosfor	24760-28680
Pentosan	8,7-11,4	Kalium	17700-22700
Selulosa	5,0-12,3	Silika	12200-16300
		Natrium	230 - 290
		Seng	80
		Aluminium	53,5 - 369

Selain itu bekatul jug mengandung vitamin B (Samsudin, Halim, dan Amudarmo, 1984).

Bekatul dapat diperoleh dipasar dengan harga murah. Selama ini pemanfaatan bekatul dalam bidang industri belum terlalu banyak dan biasanya hanya digunakan sebagai pakan ternak.

Bekatul dapat dijadikan sebagai bahan media fermentasi untuk memproduksi enzim α -amilase. Hal ini didukung oleh Arfianti dan Wijanarka (1982) yang meneliti pemanfaatan bekatul sebagai media produksi enzim amilase.

D. Pertumbuhan Mikrobial

Bakteri berkembang biak dengan cara pembelahan diri yang disebut pembelahan biner, yaitu perkembangbiakan dari satu sel induk menjadi dua sel anak.

Untuk mengikuti jalannya pertumbuhan, maka perlu ditentukan pengukuran kuantitatif. Pertumbuhan eksponensial biasanya seimbang sehingga setiap sifat biomas dapat diukur untuk menentukan kecepatan tumbuh (Stanier dkk, 1984). Analisis pertumbuhan bakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu membandingkan jumlah sel, berat kering, konsentrasi protein atau nitrogen, dan kekeruhan (Bibiana dan Hastowo, 1992).

Dalam pertumbuhannya mikrobial dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Adapun faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikrobial antara lain nutrisi, suhu, pH, waktu, kadar oksigen, tekanan osmosis, dan bahan-bahan kimia.

1. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan

Pada umumnya bakteri tumbuh pada suhu diatas 35°C . Setiap spesies mempunyai batasan suhu maksimum, optimum, dan minimum untuk pertumbuhan. Menurut suhu optimumnya bakteri dapat dikelompokkan sebagai berikut :

- a. Psikrofil, yaitu bakteri yang hidup optimum pada suhu $5^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$.
- b. Mesofil, yaitu bakteri yang dapat hidup optimum pada suhu $15^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$.
- c. Termofil, yaitu bakteri yang dapat hidup optimum pada suhu $50^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$.

Selain itu juga terdapat bakteri yang mampu hidup bukan pada suhu optimumnya. Kelompok bakteri ini disebut psikrodurik bagi yang tahan terhadap suhu dingin, dan termodurik atau termotoleran yang tahan terhadap suhu panas (Bibiana dan Hastowo, 1992).

Suhu berpengaruh terhadap kerja enzim. makin tinggi suhu, maka aktivitas enzim juga makin besar samapi pada batas suhu tertentu. Apabila suhu terlalu tinggi maka enzim akan didenaturasi sehingga sel akan mati. Tingkat ketahanan denaturasi protein beberapa bakteri karena pengaruh suhu berbeda-beda. Hal ini dapat dilihat pada Tabel berikut :

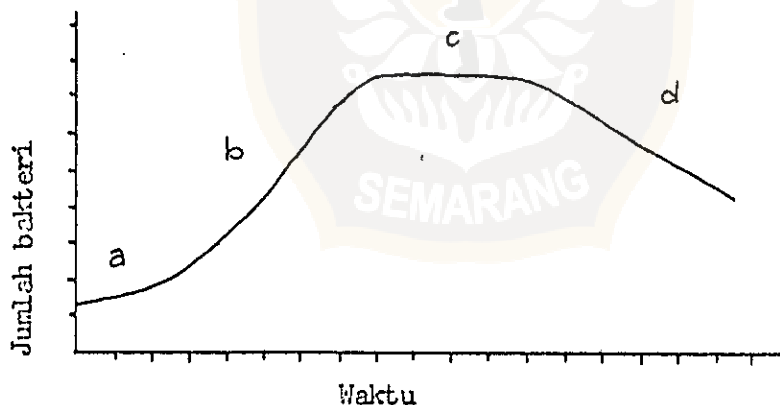
Tabel 03. Ketahanan protein sitoplasmik dari bakteri mesofil dan termofil pada 60°C.

Organisme	Tingkatan suhu	% Protein yang didenaturasi
<i>Proteus vulgaris</i>	Mesofil	55
<i>Escherichia coli</i>	Mesofil	55
<i>Bacillus megaterium</i>	Mesofil	58
<i>B. subtilis</i>	Mesofil	57
<i>B. stearothermophilus</i>	Termofil	3
<i>Bacillus sp</i> (PurdueCD)	Termofil	0
<i>Bacillus sp</i> (11330)	Termofil	4
<i>Bacillus sp</i> (Nebraska)	Termofil	0

(Koffler dan Gale, 1957 dalam Stainier, 1984).

2. Pengaruh waktu terhadap pertumbuhan

Pertumbuhan suatu bakteri di dalam suatu pembenihan dapat diikuti dengan cara menghitung jumlah sel bakteri pada waktu-waktu tertentu. Hasil perhitungan yang diperoleh apabila dihubungkan dengan waktu, akan diperoleh suatu grafik atau kurva pertumbuhan.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri

Keterangan :

- a. Fase lambat (lag phase)
- b. Fase log (log phase)
- c. Fase tetap (stationary phase)
- d. Fase menurun (decline or death phase)

(Buckle, Edawari, Fleet, dan wooton, 1987).

E. Isolasi dan Pemurnian Enzim

1. Pemilihan bahan

Bahan baku sebagai sumber enzim perlu tersedia dalam keadaan yang cukup sebelum dimulai proses isolasi. Sumber enzim ada yang berasal dari tumbuhan, jaringan mamalia, dan mikrobial (Winarno, 1983).

Selain macam bahan juga perlu diperhatikan macam jaringan dalam satu tanaman atau hewan. Umur organisme juga harus diperhatikan. Pada umumnya makin tua umur organisme, makin berkurang pula jumlah enzim yang terdapat didalamnya.

2. Ekstraksi enzim dari bahan

Ekstraksi enzim dari sumber yang berupa jaringan lunak perlu terlebih dulu dihomogenasi untuk memecah membran, sedang pada sumber enzim yang berupa jaringan yang kuat dibubuhkan terlebih dulu dengan blender. Lumatan yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan menggunakan larutan penyangga (Price dan Stevens, 1982).

Ekstraksi enzim dari sel mikrobial dilakukan dengan sentrifugasi. Pada enzim intraseluler diperoleh dari sel, sedang pada enzim ekstraseluler diambil dari mediumnya (Price dan Stevens, 1982).

Pada ekstraksi sebaiknya digunakan ruang dingin yang bersuhu 4°C. Pada keadaan ini diharapkan semua kegiatan hidup bisa dihambat sehingga enzim yang terdapat di dalamnya tidak mengalami perubahan dan dalam keadaan yang mantap.

3. Pemurnian enzim

Enzim adalah protein, oleh karena itu pemurnian enzim tidak lain adalah pemurnian protein. Oleh karena tujuan pemurnian adalah untuk mengetahui sifat-sifat enzim secara individual, maka perlulah enzim ini dipisahkan dengan enzim yang lain. Hal ini berarti bahwa antara enzim yang lain perlu diketahui perbedaan sifatnya.

Pemisahan protein yang didasarkan atas beda sifat tersebut dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu presipitasi, adsorpsi, kromatografi, filtrasi, ultrasentrifugasi, dan elektroforesis.

