

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kubis bunga (*Brassica oleracea* var *botrytis* Lam)⁽⁹⁾

Kubis bunga atau disebut pula kol bunga merupakan salah satu anggota famili kubis dengan nama latin *Brassica oleracea* Var *botrytis* Lam. Sesuai namanya, bagian yang dimanfaatkan memang bunganya yang tersusun dari rangkaian bunga kecil bertangkai pendek, berwarna putih atau kuning, padat dan berdaging tebal.

Kubis bunga membutuhkan tanah yang subur dan cukup mendapat air, tetapi tidak tergenang. Jenis tanah yang sesuai adalah tanah berpasir dan ber-pH antara 5,5 - 6,5. Selain itu kubis bunga menyukai daerah bersuhu antara 20 –25 °C. Varietas unggul dari kubis bunga yang banyak ditanam di daerah tropis adalah Farmers Early no. 2. Tanamannya berukuran sedang dan agak terbuka, tahan panas dan mempunyai adaptasi yang luas. Bunganya putih, padat dengan berat sekitar 1,3 Kg dan dipanen setelah 55 hari penanaman.

Apabila kubis bunga akan disimpan, sebaiknya dimasukkan ke dalam ruang pendingin bersuhu 0 °C. Di dalam ruang pendingin ini, kesegarannya dapat dipertahankan hingga 30 hari. Ruang pendingin bersuhu kurang dari 5 °C hanya dapat mempertahankan kesegaran kurang dari 12 hari. Kandungan gizi dalam bermacam-macam varietas kubis tertera dalam tabel berikut:

Tabel II.1 Komposisi zat gizi kubis per 100 gram bahan⁽⁴⁾

Varietas	Air (%)	Protein (g)	Vitamin A (SI)	Kalsium (mg)	Serat (g)
Kubis Savoy	92,0	2,4	200	43	0,8
Kubis Bunga	91,0	2,7	60	25	1,0
Kubis Putih	92,4	1,3	130	49	0,8
Kubis Merah	90,2	2,0	40	42	1,0

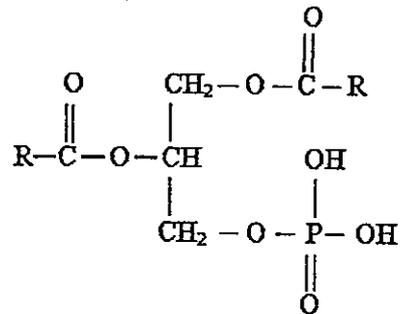
2.2 Fosfolipida⁽⁵⁾

Fosfolipida utama yang ditemukan pada membran sel adalah fosfogliserida, yang mengandung dua molekul asam lemak yang berikatan dengan gugus hidroksil pertama dan kedua pada gliserol. Gugus hidroksil yang ketiga pada gliserol membentuk ikatan ester dengan asam fosfat. Selain itu, fosfogliserida mengandung molekul alkohol kedua yang juga berikatan ester dengan asam fosfat. Karenanya, gugus alkohol kedua ini terletak pada kepala polar dari molekul fosfogliserida.

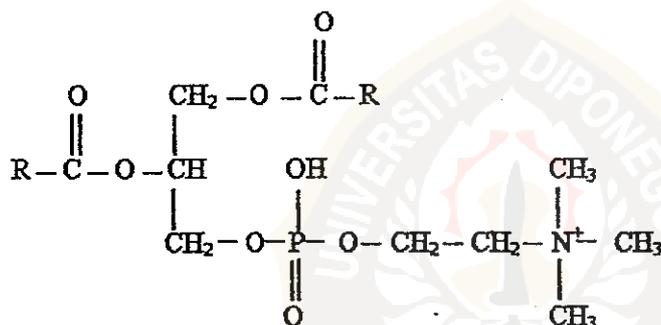
Terdapat beberapa jenis kelas fosfogliserida yang berbeda dalam gugus alkohol pada bagian kepala polar. Jenis fosfogliserida yang berbeda dinamakan menurut jenis alkohol pada kepala yang bersifat polar. Senyawa induk fosfogliserida adalah asam fosfatidat yang tidak memiliki kepala alkohol. Fosfogliserida yang paling banyak adalah fosfatidiletanolamin dan fosfatidilkolin, yang berturut-turut mengandung alkohol etanolamin dan kolin pada bagian kepala polar. Fosfogliserida lain adalah fosfatidilserin dan fosfatidilinositol.

Semua fosfogliserida mempunyai muatan negatif pada gugus fosfat. Jadi fosfogliserida mempunyai dua jenis gugus yang berbeda, yaitu gugus hidrofilik pada bagian kepala yang bersifat polar dan ekor hidrofobik yang bersifat non polar.

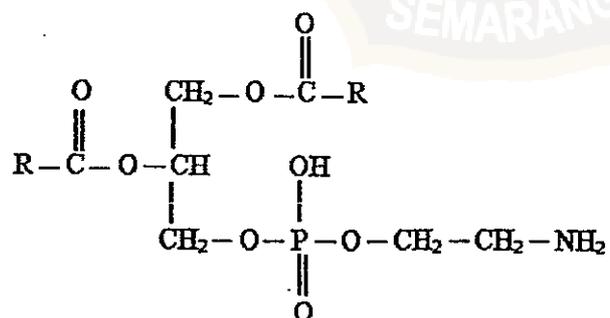
Senyawa ini karenanya bersifat amfipatik. Fosfogliserida yang umum dijumpai adalah sebagai berikut:



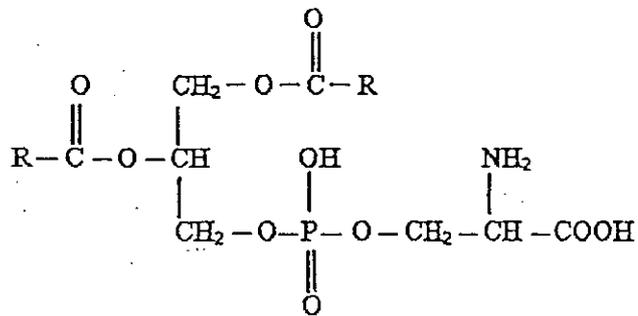
Gambar II. 1 L - α - Asam Fosfatidat



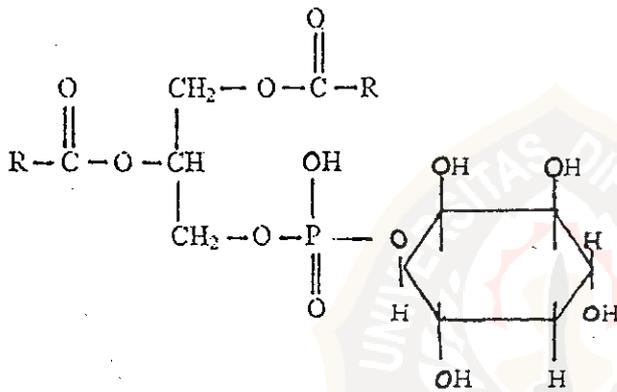
Gambar II. 2 Struktur fosfatidilkolin



Gambar II. 3 Struktur fosfatidiletanolamin



Gambar II.4 Struktur fosfatidilserine



Gambar II.5 Struktur fosfatidilinositol

2.3 Enzim⁽⁵⁾

Enzim merupakan protein dan mempunyai fungsi sebagai biokatalisator dalam reaksi-reaksi biokimia. Enzim seperti halnya protein mempunyai berat molekul antara 12000 sampai lebih dari 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran sangat besar dibandingkan dengan substratnya.

2.3.1 Komponen penyusun enzim⁽⁵⁾

Berdasarkan hasil penelitian para ahli biokimia ternyata diketahui bahwa banyak enzim yang mempunyai gugus bukan protein sehingga dapat dikatakan enzim

merupakan protein majemuk. Enzim terdiri atas bagian protein (apoenzim) dan suatu gugus bukan protein (kofaktor). Kompleks antara apoenzim dan kofaktor disebut holoenzim. Kofaktor ada yang terikat kuat pada protein dan ada pula yang tidak begitu kuat ikatannya. Gugus yang terikat kuat pada bagian protein disebut gugus prostetik, sedangkan gugus yang tidak begitu kuat ikatannya atau yang mudah dipisahkan secara dialisis disebut koenzim.

2.3.2 Klasifikasi enzim ⁽⁵⁾

International Union of Biochemistry mengklasifikasikan enzim berdasar jenis reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Atas dasar reaksi yang dikatalisis, enzim dibagi menjadi enam golongan yaitu: oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase.

2.3.3 Mekanisme kerja enzim ⁽⁵⁾

Karena enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat maka tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat disebut bagian aktif. Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat menampung substrat. Hubungan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang bersifat antara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi.

Terdapat dua teori yang menerangkan mekanisme pengikatan substrat oleh enzim. Pertama, teori kunci dan anak kunci (*lock and key*) yang menyatakan bahwa bentuk ruang dari konformasi bagian aktif enzim adalah sedemikian rupa sehingga molekul substrat dengan bentuk yang khusus pula yang akan dapat masuk pada bagian aktif seperti sepasang kunci dan anak kunci. Kedua, teori *induced fit* yang

menyatakan bahwa perubahan konformasi molekul enzim terjadi untuk menyesuaikan dirinya dengan bentuk molekul substrat. Jadi kompleks yang terjadi antara substrat dan enzim itu disebabkan oleh induksi substrat terhadap konformasi enzim.

2.3.4 Penentuan aktivitas enzim ⁽⁶⁾

Pada umumnya konsentrasi enzim hasil isolasi cukup rendah, sehingga pengukuran produk berdasarkan pada absorbansi. Dari rumus Lambert-Beer didapatkan bahwa:

$$A = \epsilon b c$$

Bila ϵ = koefisien ekstingsi molar produk ($\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi produk ($\mu\text{mol} / \text{mL}$)

maka:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot b} (\mu\text{mol} / \text{mL})$$

Bila aktivitas diuji dalam campuran:

$$\frac{c}{t} = \frac{A}{t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot b} (\mu\text{mol} / \text{mL} \cdot \text{menit})$$

Dan bila volume sampel adalah v dan volume total adalah V , maka:

$$\frac{c}{t} = \frac{A}{t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot b} \times \frac{V}{v} (\mu\text{mol} / \text{mL} \cdot \text{menit} \text{ atau } U / \text{mL})$$

Satu aktivitas unit enzim didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang dapat mengubah 1 μmol substrat atau membentuk 1 μmol produk pada kondisi

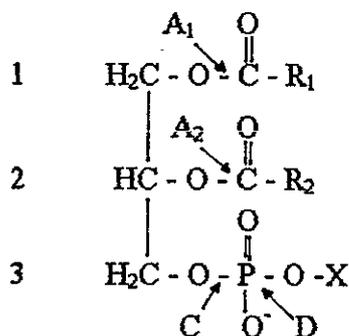
percobaan. Sedangkan aktivitas spesifik enzim yaitu unit aktivitas per kadar protein enzim (C_e = kadar protein enzim dalam mg/mL), sehingga :

$$\frac{c}{t} = \frac{A}{t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot b \cdot C_e} \times \frac{V}{v} (U/mg)$$

2.4 Enzim fosfolipase⁽⁷⁾

Enzim ini disebut juga lesitinase karena lesitin merupakan substrat yang paling umum dikenal. Enzim fosfolipase merupakan enzim hidrolase yang bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis pada fosfolipida. Perbedaan berbagai macam enzim fosfolipase didasarkan atas letak pemutusan ikatan ester yang berbeda dari suatu fosfolipida. Fosfolipase A untuk enzim yang memutuskan satu ikatan pada ester asam lemak. Terdapat dua macam fosfolipase A yaitu : fosfolipase A_1 untuk enzim yang memutuskan ikatan ester asam lemak pada posisi pertama dan fosfolipase A_2 untuk pemutusan ikatan ester asam lemak pada posisi kedua. Fosfolipase C untuk enzim yang memutuskan ikatan ester digliserida dan gugus fosfat. Sedangkan fosfolipase D adalah enzim yang memutuskan ikatan ester gugus fosfat dan basa

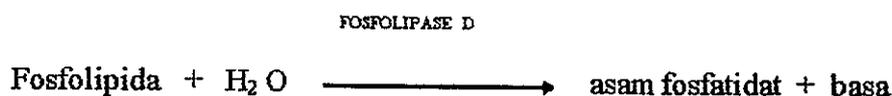
Posisi



Gambar II. 6 Lokasi penyerangan enzim fosfolipase pada fosfolipida

2.5 Enzim fosfolipase D⁽²⁾

Enzim fosfolipase D adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisa fosfolipida menjadi asam fosfatidat dan basa. Secara umum reaksinya sebagai berikut:



Enzim ini pertama kali diisolasi oleh Hanahan dan Caihoff tahun 1947 dari kubis savoy. Kemudian ditemukan di beberapa tanaman seperti : bayam, gula bit, kacang, dan biji kapas. Selain itu ditemukan pula pada alga *Porphyridium cruentum*, bakteri *Haemophilus parainfluenzae*, dan mamalia.

Aktivitas fosfolipase D dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

a. Derajat Keasaman (pH).

Derajat keasaman optimum fosfolipase D bervariasi tergantung dari sumber enzim. Derajat keasaman optimum fosfolipase D dari bayam dan gula bit adalah 4,7, sedangkan kubis dan wortel berkisar antara 5,6 - 5,8. Untuk fosfolipase D dari *Haemophilus parainfluenzae* pH optimum 7,5 - 8,0 dan alga *Porphyridium cruentum* sekitar 7,0.

b. Temperatur

Fosfolipase D mampu tidak terdenaturasi oleh pemanasan pada suhu 55 °C selama 5 menit, tetapi pada suhu yang lebih tinggi enzim menjadi tidak stabil.

c. Inhibitor dan Aktivator

Fosfolipase D diinhibisi oleh EDTA, senyawa amfipatik kationik, basa (kolin dan etanolamin). Sedangkan senyawa amfipatik anionik, asam fosfatidat, ion - ion logam (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+}) merupakan aktivator. Selain itu

penambahan pelarut organik seperti : eter, keton, dan ester dapat merangsang hidrolisa fosfolipida oleh fosfolipase D.

2.6 Teknik Sentrifugasi ⁽⁸⁾

Teknik sentrifugasi adalah suatu teknik pemisahan berdasarkan sifat partikel dalam medan gaya sentrifugal. Partikel dengan berat jenis, ukuran, dan bentuk yang berbeda akan mengendap searah dengan gaya sentrifugal, dengan kecepatan yang berbeda. Bila partikel yang bergerak dalam medan sentrifugal memiliki massa = m dan percepatan sentrifugal adalah a , maka gaya sentrifugal dirumuskan sebagai:

$$F_s = m \cdot a$$

Kecepatan sentrifugal (a) berhubungan dengan kecepatan sudut (ω) yaitu kecepatan rotor untuk bergerak mengelilingi satu kali putaran (2π) per menit, sehingga :

$$F_s = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

r adalah jari- jari dari pusat rotor ke kedudukan partikel.

Gaya sentrifugal sering pula dinyatakan secara relatif dengan gaya gravitasi bumi (F_g) sebagai Relatif Centrifugal Field (RCF).

$$RCF = \frac{F_s}{F_g} = \frac{m \cdot \omega^2 \cdot r}{m \cdot g} = \omega^2 r \times g^{-1}$$

Untuk partikel yang berbentuk bulat ternyata kecepatan pengendapan tidak tergantung dari gaya sentrifugal saja, tetapi tergantung dari berat jenis, viskositas dan ukuran partikel. Hal ini disebabkan karena pada medan sentrifugal ada pengaruh gaya gesek. Bila kecepatan partikel cukup tinggi maka gaya gesek sama

dengan gaya yang diterapkan, maka:

$$F_s = V \cdot f$$

f merupakan koefisien gesek yang memberikan keterangan mengenai ukuran dan bentuk partikel, dari persamaan Stokes diperoleh

$$f = 6\pi\eta r$$

Dengan η sebagai koefisien viskositas dan r sebagai jari-jari partikel.

Koefisien gesekan dari partikel bulat dapat dinyatakan sebagai jari-jari bola yang sama volumenya. Untuk koefisien viskositas η dari cairan ditentukan dengan penentuan laju pengendapan bola yang diketahui rapat massanya. Gaya yang menyebabkan bola mengendap pada fluida sama dengan massa efektifnya kali percepatan gravitasi. Massa efektif adalah massa bola dikurangi massa fluida yang dipindahkan. Bila bola mempunyai rapat massa ρ dan rapat massa medium ρ_0 , gaya yang menyebabkan gesek adalah $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 (\rho - \rho_0)g$, di mana g adalah percepatan gravitasi. Bila laju pengendapan dari bola dalam cairan tetap, maka kecepatan yang memperlambat sama dengan gaya akibat gravitasi, sehingga

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot (\rho - \rho_0)g = 6 \pi \eta r \cdot V$$

$$V = \frac{2r^2 \cdot (\rho - \rho_0)g}{9\eta}$$

Dari persamaan Stokes dapat dilihat bahwa:

1. Kecepatan sedimentasi partikel sebanding dengan ukuran partikel
2. Kecepatan sedimentasi partikel sebanding dengan perbedaan berat jenis antara partikel dan cairan
3. Kecepatan sedimentasi partikel menurun dengan kenaikan viskositas cairan.

2.7 Presipitasi

Pengendapan protein dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh penambahan garam tersebut pada kelarutan protein. Proses ini dipengaruhi oleh konsentrasi dan jumlah muatan pada tiap ion dalam larutan. Dalam proses ini, garam divalen seperti: $MgCl_2$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ lebih efektif daripada garam monovalen seperti $NaCl$, NH_4Cl , dan KCl . Bila konsentrasi garam netral yang ditambahkan tersebut dinaikkan terus, maka kelarutan protein menjadi berkurang, sampai pada konsentrasi tertentu protein akan mengendap, efek ini disebut salting out. Cara salting out ini dapat dipakai untuk pemisahan protein dalam campuran, karena tiap jenis protein mempunyai respon yang berbeda pula terhadap konsentrasi garam netral[®].

Garam $(NH_4)_2SO_4$ merupakan garam yang umum digunakan untuk pengendapan enzim. Garam ini memiliki beberapa kelebihan diantaranya kelarutannya yang tinggi di dalam air dan tidak mengganggu fungsi dan bentuk enzim. Penambahan garam kristal $(NH_4)_2SO_4$ ke dalam larutan enzim harus dilakukan secara perlahan – lahan. Konsentrasi garam $(NH_4)_2SO_4$ dinyatakan sebagai % kejenuhan, sebagai contoh 18 % $(NH_4)_2SO_4$ adalah 18 % jenuh setara dengan 9,6 g / 100 mL. Untuk menghitung gram amonium sulfat yang harus ditambahkan ke dalam larutan enzim dengan kejenuhan S_1 % sehingga diperoleh kejenuhan akhir S_2 % dapat dihitung dengan rumus[®]:

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}$$

Dari rumus tersebut telah dibuat suatu tabel (lampiran 8) tentang penambahan amonium sulfat pada kejenuhan tertentu sehingga memudahkan dalam melakukan perhitungan untuk penambahan amonium sulfat pada fraksi berikutnya.

2.8 Dialisis⁽¹⁰⁾

Dialisis merupakan metode pemurnian suatu biomolekul menggunakan membran semipermeabel. Membran hanya dapat dilewati molekul kecil tetapi menahan molekul besar. Membran yang digunakan biasanya berupa selofan atau kantong dialisis. Proses yang terjadi pada dialisis adalah difusi yaitu suatu perpindahan molekul-molekul dari larutan yang berkonsentrasi tinggi ke rendah. Suatu campuran molekul besar dan kecil ditempatkan dalam sebuah kantong dialisis yang dimasukkan dalam suatu pelarut. Untuk mempercepat proses dialisis biasanya dilakukan pengadukan. Molekul kecil dapat melewati membran menuju cairan diluarnya hingga kesetimbangan tercapai. Selama proses dialisis suhu diatur sedemikian rupa sehingga adanya pengadukan tidak akan menaikkan suhu.

2.9 Spektrofotometer UV-Vis ⁽¹¹⁾

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis berdasarkan besarnya energi atau intensitas sinar yang diserap oleh molekul. Besarnya intensitas sinar yang diserap oleh molekul digunakan sebagai dasar untuk analisis kuantitatif dan dinyatakan dalam persamaan Lambert-Beer berikut:

$$-\log T = A = a b c$$

T = transmitasi

A = absorbansi

c = konsentrasi

a = absorbtivitas

b = tebal media

Bila a dan b diketahui, penentuan absorbansi dapat dilakukan untuk menghitung konsentrasi yang belum diketahui.