BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jamur *Aspergillus oryzae*

Jamur *Aspergillus oryzae* memiliki nilai ekonomis yang besar karena banyak digunakan dalam industri fermentasi bahan makanan terutama di negara-negara Asia. Beberapa proses fermentasi yang menggunakan *Aspergillus oryzae* adalah pembuatan sake, miso, hamanoto dan tanekoji sebagai sumber enzim untuk memproduksi soyu dan pembuatan kecap. *Aspergillus oryzae* tidak menghasilkan aflatoksin seperti yang terjadi pada *Aspergillus flavus*[14].

Taksonomi *Aspergillus oryzae* adalah sebagai berikut:

Super Kingdom	: Eukaryota
Kingdom	: Mycetoceas (fungi)
Divisi	: Amastigomycetideae
Sub Divisi	: Ascomycotina
Kelas	: Ascomycetes
Sub Kelas	: Pleceomycetydeae
Bangsa	: Eurotiales
Suku	: Euroticeae
Marga	: Aspergillus
Jenis	: *Aspergillus oryzae* [2]

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Aspergillus oryzae memiliki konidiofor yang panjang dan kadang-kadang tercampur dengan miselia udara. Conidial heads berwarna kuning kehijauan dan akhirnya berubah menjadi berwarna coklat. Konidiofora berdinding kasar. Pada waktu masih muda konidia elipsoidal kamudian berubah menjadi sub globuse pada saat masak, berwarna hijau, permukaan halus, kemudian berubah menjadi berdinding kasar. Ukuran lebih besar bila dibandingkan dengan konidia *Aspergillus flavus*.[14].

Aspergillus oryzae menghasilkan proteinase yang meliputi proteinase tipe asam (aspartic), netral (metallo) dan basa (serine), berbeda dengan *Aspergillus niger* yang hanya menghasilkan proteinase tipe asam (aspartic) [2].

Ada banyak aplikasi industri dari proteinase yang dihasilkan Aspergillus walaupun penggunaannya masih relatif kecil jika dibandingkan enzim lainnya dari Aspergillus seperti glukoamilase. *Aspergillus oryzae* potensial untuk diaplikasikan dalam industri makanan seperti pengempukan daging, proteolisis protein susu atau protein kedelai untuk menghasilkan emulsifier, industri kulit, dan lain-lain[2].

2.2. Kurva Pertumbuhan Mikroba[15]

Pertumbuhan mikroba dalam suatu kultur melewati beberapa fase antara lain:

a. Fase adaptasi

Adalah fase penyesuaian mikroba dengan kondisi lingkungan baru disekelilingnya. Jumlah awal sel yang dipindah ke medium baru mempengaruhi cepat lambatnya fase adaptasi. Bila medium dan lingkungan

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

pertumbuhan sama dengan medium sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

b. Fase pertumbuhan awal

Pada fase ini mikroba mulai membelah diri dengan kecepatan yang rendah karena baru menyesuaikan diri.

c. Fase pertumbuhan logaritmik

Pada fase ini mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH, kandungan nutrien, suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini kultur paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

d. Fase pertumbuhan lambat

Pertumbuhan populasi mikroba diperlambat karena zat nutrisi sudah sangat berkurang dan ada hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada yang mati.

e. Fase pertumbuhan tetap

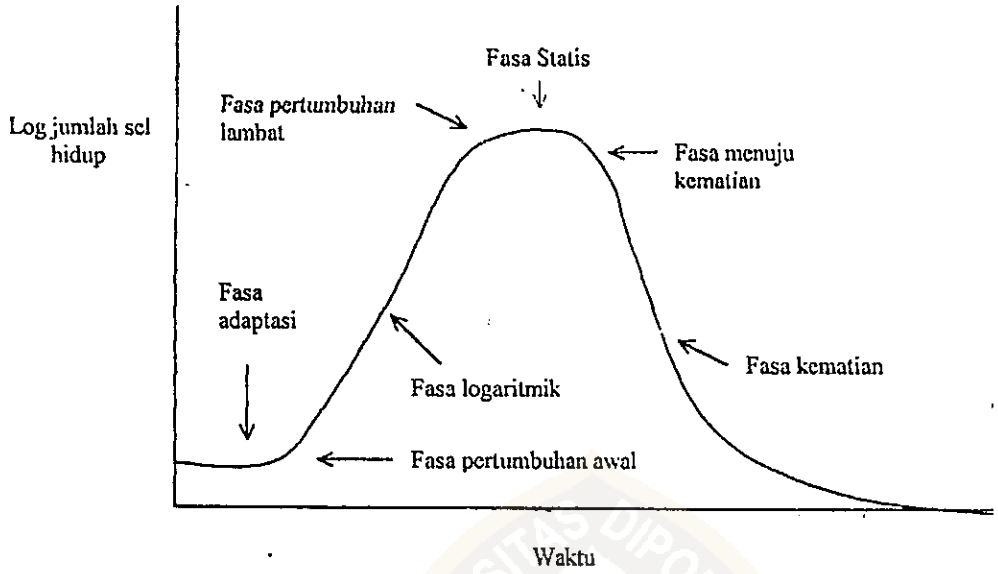
Jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan nutrisi sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik.

f. Fase menuju kematian dan fase kematian

Pada fase ini sebagian besar populasimikroba mulai mengalami kematian karena nutrien di dalam medium sudah habis, adanya zat racun dan habisnya

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

energi cadangan di dalam sel. Kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrien, lingkungan dan jenis mikroba.



Gambar II. 1. Kurva Pertumbuhan Mikroba

2. 3. Enzim

Kata '*enzyme*' berasal dari istilah Yunani yang arti harfiahnya 'di dalam sel'[16]. Enzim merupakan molekul polimer yang beragam yang dihasilkan sel hidup. Keragaman ini bukan hanya di dalam bentuk dan ukurannya, tetapi juga di dalam peranannya. Di dalam sel sumber, enzim terlibat dalam setiap reaksi biokimia, mulai dari konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel, sampai ke konversi sifat keturunan. Karena peranan yang demikian beragam inilah enzim merupakan salah satu produk alamiah yang mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi. Ditambah lagi dengan sifatnya yang cocok untuk dimanfaatkan di dalam proses industri yaitu efesiensi

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

yang tinggi, spesifisitas dan kerja yang selektif, sifat aktif pada keadaan 'ringan' yaitu pada suhu kamar dan pH'normal'[15].

2.3.1. Klasifikasi Enzim[16]

Ada berbagai cara penamaan enzim. Namun secara resmi, Commision on Enzymes of The International Union of Biochemistry (CEIUB) penamaan enzim berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis dan enzim dibagi menjadi 6 kelompok utama, yaitu:

1. Oksidoreduktase. Enzim-enzim ini melaksanakann katalisis reaksi oksidasi-reduksi yaitu reaksi yang melibatkan oksidasi suatu senyawa disertai dengan reduksi senyawa lain.
2. Transferase. Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi-reaksi yang mengalihkan suatu gugus yang mengandung C, N, P atau S dari suatu senyawa lain tanpa melibatkan oksidasi reduksi.
3. Hidrolase. Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi pemecahan hidrolitik atau reaksi sebaliknya.
4. Liase. Enzim yang melaksanakan katalisis pemutusan ikatan rangkap C=C, C=O, C≡N, dan sebagainya tanpa melibatkan hidrolisis atau oksidasi-reduksi.
5. Isomerase. Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi isomerase yang merupakan penataan kembali atom-atom yang membentuk suatu molekul.
6. Ligase. Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi-reaksi pembentukan ikatan antara dua molekul substrat yang terkait dengan pemutusan ikatan pirofosfat dalam ATP atau senyawa energi tinggi lainnya.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

2. 3. 2. Satuan Enzim

Komposisi kimia suatu enzim, baik yang masih aktif maupun yang tidak aktif adalah sama, karena itu keaktifan enzim tidak dapat ditentukan hanya dengan analisis atau penetuan komposisi kimia saja. Keaktifan enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksi tersebut. Karena itulah jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam bentuk keaktifan enzim dan dinyatakan dalam satuan atau unit enzim. Satu unit aktivitas enzim adalah besarnya aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol substrat atau produk per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum[5].

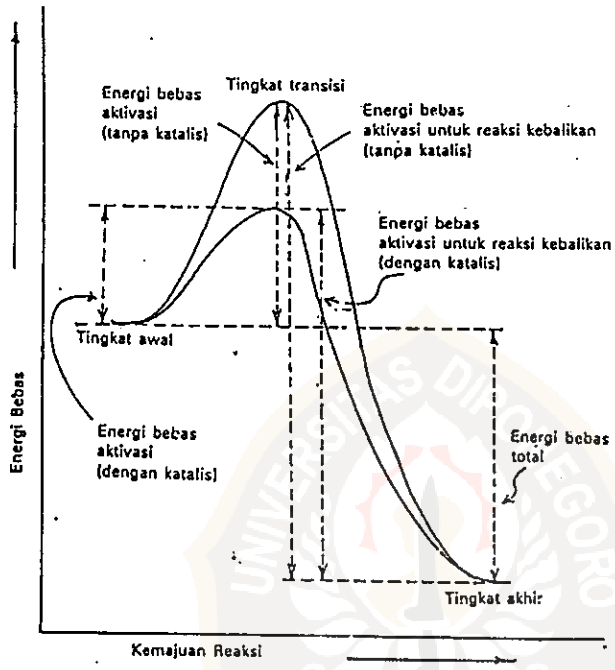
Konsentrasi enzim dinyatakan sebagai Unit per mL atau Unit per mg berat protein enzim. Istilah yang terakhir lebih dikenal sebagai satuan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim dipengaruhi oleh proses pemurnian enzim. Enzim yang masih bersifat sebagai '*crude ekstrak*' mempunyai aktivitas spesifik yang rendah. Dengan berbagai metode pemurnian protein, enzim dapat lebih dimurnikan, dipisahkan dari protein-protein non enzim, sehingga aktivitas spesifiknya akan semakin tinggi. Jadi aktivitas spesifik enzim dapat menjadi ukuran tingkat kemurnian enzim[15].

2. 3. 3. Aktivitas Enzim

Sifat-sifat istimewa yang menonjol adalah kapasitas katalitik dan spesifitas yang sangat tinggi. Pada umumnya enzim dapat mempercepat laju reaksi paling sedikit 10^6 kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

katalis. Enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia dengan cara membentuk kompleks Enzim-Subtrat (ES) dengan tergabungnya substrat dan enzim, terjadi pola reaksi yang berbeda yaitu tingkat transisi yang memiliki energi lebih rendah dibanding bila tidak ada enzim.



Gambar II. 2. Energi Aktivasi Reaksi Enzimatis

Spesifisitas aktivitas enzim adalah peranannya sebagai katalis hanya terhadap satu reaksi atau beberapa reaksi yang sejenis saja. Derajat spesifisitas enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

1. Spesifisitas stereokimia, yaitu menunjukkan kesukaan untuk mengkatalisis bentuk isomer optik tertentu
2. Spesifisitas kelompok atau fungsional, yaitu bekerja terhadap pemutusan dan pemasangan suatu ikatan yang mengikat gugus fungsional tertentu

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

3. Spesifisitas yang rendah tidak membedakan jenis substrat tetapi hanya spesifik pada ikatan yang akan dipecah
4. Spesifisitas absolut, hanya menyerang satu jenis substrat tunggal, sebagian besar enzim termasuk jenis ini[16]

2. 3. 4. Lokasi Aktif Enzim

Lokasi aktif enzim adalah bagian enzim yang dapat mengikat substrat. Lokasi aktif enzim hanya merupakan bagian yang relatif sangat kecil dari seluruh volume enzim yang merupakan bentuk tiga dimensi. Substrat yang terikat pada enzim harus memiliki susunan yang sangat teliti terhadap letak atom dalam lokasi aktif. Emil Fisher mengajukan hipotesis kunci dan gembok (*key and lock*). Ada pendapat lain yang menyatakan bahwa lokasi aktif dari beberapa enzim mempunyai bentuk konfigurasi yang tidak kaku[16].

2.3.5.Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

2.3.5.1. Konsentrasi Enzim

Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim[16].

2.3.5.2. Konsentrasi Substrat

Hasil eksperimen menunjukan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Seluruh sisi aktif enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga penambahan substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi[16].

2.3.5.3. Pengaruh Suhu

Sebagaimana umumnya reaksi kimia, reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Namun karena enzim adalah suatu protein maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi maka bagian aktif enzim akan terganggu. Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang tinggi aktivitasnya tinggi tetapi kemantapannya rendah. Daerah temperatur saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut temperatur optimum untuk enzim tersebut[16].

2.3.5.4. Pengaruh pH

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. Di samping berpengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH yang terlalu rendah atau tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim[16].

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

2.3.5.5. Pengaruh Inhibitor

Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan *irreversibel* dan *reversibel*. Hambatan *irreversibel* umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi dan modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan *reversibel* dapat berupa hambatan bersaing atau tidak bersaing. Hambatan bersaing disebabkan karena adanya molekul yang mirip dengan substrat yang dapat membentuk kompleks enzim-inhibitor pada bagian aktif enzim sehingga mengganggu pembentukan kompleks enzim-substrat. Hambatan tidak bersaing terjadi bila inhibitor bergabung dengan enzim pada suatu bagian enzim di luar bagian aktif enzim. Kompleks yang terbentuk berupa kompleks enzim-inhibitor atau enzim-substrat-inhibitor, yang keduanya bersifat inaktif[16].

2.4. Enzim Protease

Enzim pengurai protein digolongkan menjadi dua kelompok yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Enzim eksopeptidase memotong peptida dari luar, terbagi dua golongan yaitu karboksi(ekso)peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino(ekso)peptidase yang memotong peptida dari arah gugus amino terminal. Sedangkan enzim endopeptidase memotong ikatan peptida dari dalam.

Berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif, enzim pengurai protein dibagi menjadi:

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

a. Golongan protease serin, mempunyai residu serin dalam lokasi katifnya, bersifat endopeptidase. Yang termasuk enzim ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase substilin, dan lain-lain.

b. Golongan protease sulfhidril, mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktifnya. Dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Yang termasuk enzim ini adalah papain, fisin, dan bromelin.

c. Golongan protease metal, keaktifannya tergantung pada adanya metal, dihambat oleh EDTA. Yang termasuk dalam enzim ini adalah karboksipeptidase A, dan beberapa aminopeptidase.

d. Golongan protease asam, pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil. Dihambat oleh p-bromofenasilbromida. Yang termasuk dalam enzim ini adalah pepsin, renin, protease kapang, dan lain-lain. Aktif dalam pH rendah[16].

2.5. Penentuan Aktivitas Enzim

Metode yang digunakandalam pengukuran aktivitas enzim protease dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri. Prosedurnya berupa penentuan produk asam amino dengan analisis serapan sinar[15]. Dari hukum Lambert-Beer didapat:

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

maka $$c = \frac{A}{\varepsilon \times b}$$

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

dimana; A = absorbansi

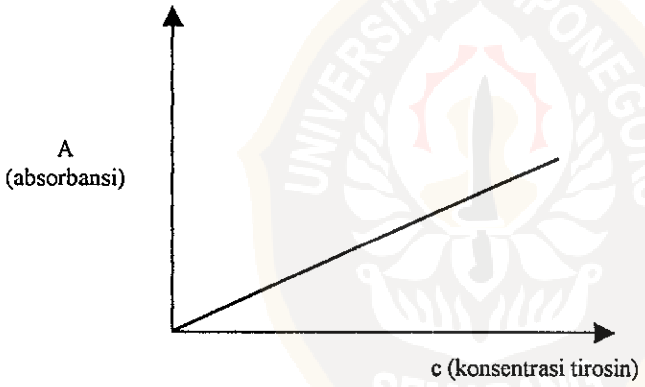
ε = koefisien ekstingsi molar produk ($cm^2/\mu mol$)

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi (μmol/mL)

Pada pengukuran ini ε dan b dianggap konstan dan konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi.

Dalam hal ini yang diukur adalah produk yang terbentuk yaitu tirosin. Dengan menggunakan kurva standar tirosin, dapat dicari konsentrasi tirosin hasil reaksi enzimatis. Sumbu Y menyatakan nilai absorbansi (A) dan sumbu X menyatakan nilai konsentrasi (c).



Gambar 3. Kurva standar tirosin

Dari grafik tersebut dapat dicari rumus persamaan garisnya, yaitu:

$$Y = aX + b$$

dimana: Y = absorbansi (A)

X = konsentrasi (c)

a = gradien kemiringan

b = intersep

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Nilai absorbansi (A) dari tirosin hasil reaksi enzimatis diektrapolasikan terhadap kurva tersebut sehingga dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah didapat, nilai konsentrasi tirosin dapat diketahui. Satu unit aktiivitas didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang menyebabkan terbentuknya 1 μmol tirosin per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum.

Metode yang sama digunakan juga dalam penentuan kadar protein. Kadar protein dihitung berdasarkan rumus persamaan garis dari kurva standar kasein. Nilai kadar protein digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim dimana aktivitas spesifik menunjukkan jumlah unit aktivitas per miligram protein yang menggambarkan tingkat kemurnian dari enzim tersebut.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)