

BAB II

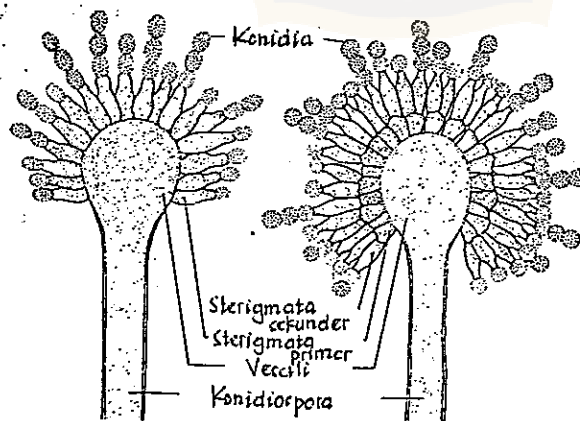
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Aspergillus niger* ^[5]

Kedudukan *Aspergillus niger* dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

- Divisio : Thallopyta
Klas : Ascomycetes
Ordo : Monoliales
Famili : Monoliaceae
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *Aspergillus niger*

Ciri-ciri spesifik *Aspergillus niger* yaitu mempunyai kepala konidia yang besar, bulat, dan berwarna hitam, coklat hitam atau ungu coklat. Konidianya kasar dan mengandung pigmen, hifa septat dan miselium bercabang. Konidiofora membengkak membentuk vesikel pada ujungnya membawa sterigmata dimana tumbuh konidia. Konidia membentuk rantai berwarna hijau, coklat atau hitam. Jamur ini tumbuh baik pada suhu kamar dan pada medium pH asam.



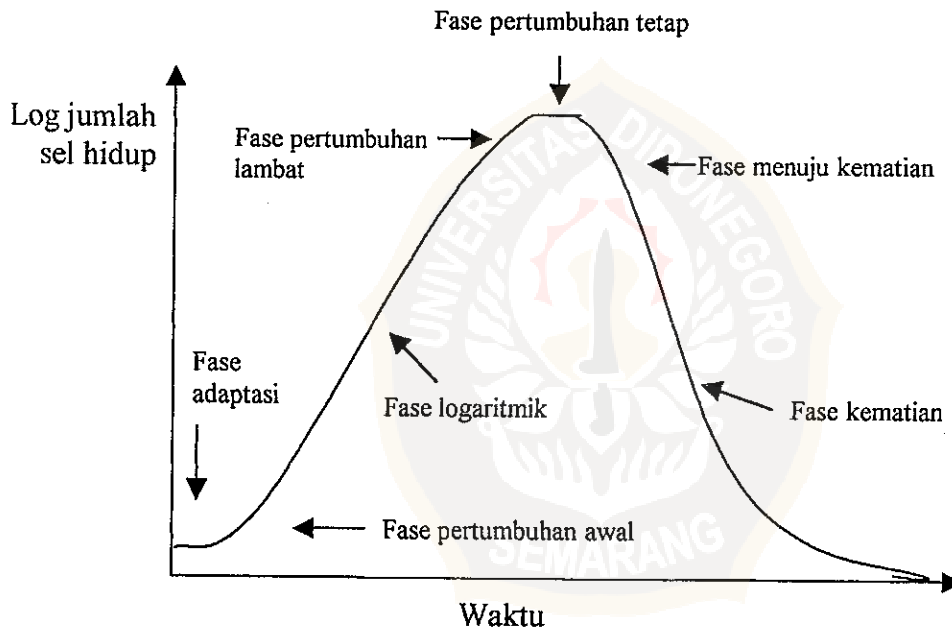
Gambar 2.1 Jamur *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan mikroorganisme yang dapat tumbuh dengan cepat dan telah digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan enzim [6].

Beberapa enzim yang telah diisolasi dari *Aspergillus niger* antara lain pektinase, α amilase, selulase, proteinase, lipase, katalase, glukosa oksidase, dan phitase [7].

2.2 Kurva Pertumbuhan Mikroba^[3]

Pertumbuhan mikroba dalam suatu kultur melewati beberapa fase yaitu:



Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan Mikroba

a. Fase Adaptasi

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

lingkungan 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 konsisten mengikuti kurva logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH, kandungan nutrisi, 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 populasi mikroba mulai mengalami kematian karena nutrisi di dalam medium sudah habis, adanya zat racun dan habisnya energi cadangan di dalam sel. Kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrisi, lingkungan dan jenis mikroba.

2.3 Enzim

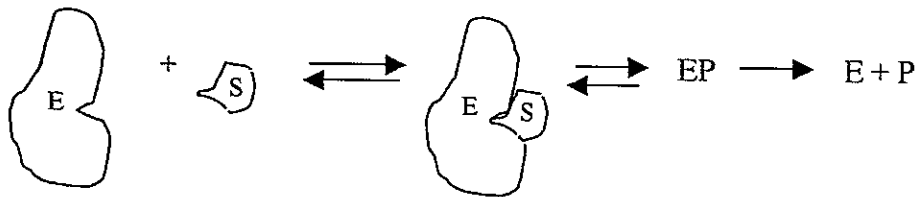
Enzim adalah biokatalisator untuk reaksi-reaksi kimia pada sistem biologi. Enzim merupakan molekul polimer yang beragam yang dihasilkan sel hidup. Keragaman ini bukan hanya di dalam bentuk dan ukurannya, tetapi juga di dalam peranannya pada setiap reaksi biokimia^[3].

Enzim bekerja spesifik terhadap reaksi kimia atau substrat tertentu. Kespesifikan enzim dibagi menjadi dua, yaitu:

1. Kespesifikan absolut, yaitu enzim hanya menyerang satu jenis substrat saja.
2. Kespesifikan golongan, dibedakan menjadi spesifitas stereoisomer dan spesifitas geometris.

Enzim terdiri dari asam amino-asam amino yang membentuk struktur tiga dimensi. Tidak semua asam amino dalam enzim berperan dalam reaksi katalisis tetapi hanya sebagian kecil saja yaitu yang berada pada sisi aktif sedangkan asam amino-asam amino yang lain berfungsi untuk menjaga agar sisi aktif tetap stabil. Sisi aktif enzim adalah bagian enzim yang dapat mengikat substrat. Enzim hanya dapat mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat apabila substrat mempunyai konformasi yang sama dengan bagian aktif enzim. Teori

pembentukan kompleks enzim-substrat dikemukakan oleh Emil Fisher dengan teorinya “lock and key” (kunci dan anak kunci). Reaksi antara enzim dengan substrat dapat berlangsung akibat adanya kesesuaian ruang antara substrat dengan bagian aktif enzim (konformasi kaku).



Gambar 2.3 Konformasi “lock and key”

Ada pendapat lain yang dikemukakan oleh Daniel Koshland dengan teorinya “induced fit”. Bentuk tempat aktif enzim menyesuaikan dengan bentuk substrat (konformasi tidak kaku) ^[8].

Untuk memperoleh enzim yang murni, maka enzim harus diisolasi dari jaringan dengan cara mengisolasi sel atau jaringan sehingga komponen sel dapat dipisah-pisahkan disesuaikan dengan lokasi enzim yang diinginkan. Untuk mengetahui jumlah enzim dalam ekstrak jaringan dapat dilakukan dengan menentukan kecepatan reaksi dimana kecepatan reaksi yang diukur sesuai dengan jumlah enzim yang ada dan dinyatakan dalam unit aktivitas. Satu unit aktivitas menyatakan aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan substrat atau pembentukan produk per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum ^[9]. Enzim yang diperoleh dari ekstrak jaringan masih merupakan enzim ekstrak kasar sehingga aktivitas spesifiknya masih rendah. Oleh karena itu perlu dilakukan pemurnian enzim untuk mendapatkan enzim yang bebas dari protein-protein non enzim sehingga diperoleh enzim dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi.

Aktivitas spesifik enzim dinyatakan sebagai konsentrasi enzim, yaitu unit aktivitas per milligram berat protein dan merupakan ukuran tingkat kemurnian enzim^[3].

2.4 Klasifikasi Enzim^[10]

Secara resmi, *Commission on Enzymes of The International Union of Biochemistry* (CEIUB) membagi enzim menjadi 6 klas berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis, yaitu :

1. *Oksidoreduktase*. Enzim ini mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi yaitu reaksi yang melibatkan oksidasi suatu senyawa disertai dengan reduksi senyawa lain.
2. *Transferase*. Enzim ini mengkatalisis reaksi pemindahan gugus atau radikal tertentu seperti gugus aldehyd dan keton, gugus asil, gugus glikosil, gugus fosfat, gugus 1-karbon dan gugus yang mengandung S.
3. *Hidrolase*. Enzim ini mengkatalisis reaksi pemecahan hidrolitik antara ikatan karbon dengan atom lainnya.
4. *Liase*. Enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan rangkap C=C, C=O, C=N, dan sebagainya tanpa melibatkan reaksi hidrolisis.
5. *Isomerase*. Enzim ini mengkatalisis rasemisasi optik atau isomer geometrik dan reaksi oksidasi reduksi intramolekuler tertentu.
6. *Ligase*. Enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan sulfur, karbon dengan nitrogen, karbon dengan oksigen dari dua molekul substrat yang terkait dengan pemutusan pirofosfat dalam ATP.

2.5 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Kerja Enzim

a. Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim ^[11].

b. Konsentrasi Substrat

Pada konsentrasi enzim yang tetap, penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Keadaan ini disebabkan karena seluruh sisi aktif enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga penambahan substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi ^[11].

c. Pengaruh Temperatur

Pada umumnya reaksi kimia, termasuk reaksi yang menggunakan katalis enzim pada suhu rendah berlangsung lambat sedangkan pada suhu tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Namun karena enzim adalah suatu protein maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi, sehingga sisi aktif enzim akan terganggu. Pada suhu yang terlalu rendah kemandapan enzim tinggi tetapi aktifitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang tinggi terjadi inaktivasi enzim karena kemandapan enzim rendah. Daerah temperatur saat kemandapan dan aktifitas enzim cukup besar disebut temperatur optimum ^[11].

d. Pengaruh pH

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektifitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim–substrat karena pengaruh protonasi dan deprotonasi dari gugus karboksil dan gugus amino. Keadaan ini menyebabkan terjadinya proses denaturasi protein enzim. Bila pH lebih rendah atau kadar H^+ meningkat, maka gugus yang bermuatan negatif terprotonasi (menetralkan muatan negatif). Sebaliknya bila pH meningkat atau konsentrasi OH^- meningkat, maka gugus yang bermuatan positif mengalami deprotonasi^[8].

2.6 Enzim Asparaginase^[1]

Enzim asparaginase disebut juga amino hidrolase asparagin yaitu enzim hidrolase yang menghidrolisis asparagin menjadi asam aspartat dan amonia. Enzim aktif ini mempunyai berat molekul (BM) 133.000, terdiri dari 4 monomer atau 4 sub unit yang identik, berupa kristal/serbuk putih, larut dalam air, aktif pada pH 5-9, rotasi spesifik 30^0 - 32^0 dan praktis tidak larut dalam metanol, aseton dan kloroform.

Asparaginase ditemukan dalam berbagai macam sumber di alam termasuk mycobakteri, ragi/yeast, mold, *Bacillus coagulans*, *Aspergillus*, *E.coli*, jaringan tumbuhan dan vertebrata^[4].

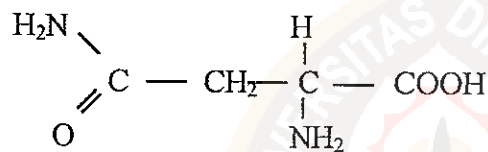
Enzim asparaginase dari *E. coli* merupakan enzim ekstraseluler dan diketahui mempunyai karakterisasi mempunyai berat molekul 141.000 dengan struktur tetrametrik, struktur primer sisi aktif Val-Gly-Ala-Met-Arg-Pro-Ser-Thr-

Ser-Met dari asam amino 111 sampai 120, aktivitas spesifik 20-50 unit/mg protein, pH optimum 8,6, suhu optimum 37 °C dan waktu inkubasi optimum 10 menit^[12].

2.7 Asparagin

Asparagin adalah salah satu asam amino non esensial yaitu asam amino yang dibutuhkan tubuh dan tubuh sendiri dapat mensintesisnya dari asam aspartat dengan menggunakan enzim sintetase asparagin sehingga tidak memerlukan asparagin dari luar^[13].

Rumus asparagin:



Sifat-sifat fisik dari isomer L pada 25 °C:

- pK₁ (COOH) : 2,02
- pK₂ (NH₃⁺) : 8,80
- titik isoelektrik : 5,41
- rotasi optik : [α]_D (H₂O) : - 5,3
[α]_D (3N HCl) : + 33,2
- kelarutan (g/100 ml H₂O) : 3,11 (28 °C)

Asparagin memberikan warna coklat dengan ninhydrin^[14,15].

2.8 Ekstraksi Enzim

Ekstraksi enzim adalah proses mengeluarkan enzim dari sel atau organ seluler. Untuk mengekstraksi enzim perlu dilakukan pemecahan dinding sel atau membran sel secara fisik, mekanik atau kimiawi berdasarkan sifat enzim tersebut, ekstraseluler atau intraseluler. Enzim ekstraseluler terdapat dalam keadaan murni pada biakan cair dan cara pemisahan dan pemurniannya tidak begitu rumit ^[16]. Proses ekstraksi sebaiknya dilakukan pada temperatur rendah untuk menjaga stabilitas enzim.

2.9 Presipitasi^[17]

Prinsipnya memisahkan protein enzim yang dikehendaki dari protein-protein lainnya. Karena enzim merupakan makromolekul yang mempunyai bentuk, ukuran dan muatan tertentu maka berdasarkan sifat-sifat ini protein dapat dimurnikan. Dengan penambahan senyawa garam elektrolit terjadi pengurangan kelarutan protein sehingga terjadi "salting out". Dengan kenaikan konsentrasi garam kelarutan menurun tetapi pada suatu titik tertentu kelarutan naik kembali.

Pada proses salting out terjadi kompetisi antara molekul-molekul protein dan ion-ion garam dalam menarik air sehingga protein mengendap. Garam elektrolit yang biasa digunakan adalah garam amonium sulfat.

2.10 Teknik Sentrifugasi^[18]

Teknik Sentrifugasi adalah suatu teknik pemisahan yang dilakukan berdasarkan sifat partikel dalam medan gaya sentrifugal. Partikel yang berbeda berat jenis, ukuran dan bentuk akan mengendap pada kecepatan yang berbeda.

Kecepatan pengendapan tergantung dari gaya sentrifugal yang mengenai partikel searah dengan jari-jari radial ke arah luar (menjauhi sumbu).

Prinsip sentrifugasi dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\varphi = \frac{d^2(\rho_s - \rho_c)g}{18\pi} \times \frac{\omega^2 r V}{S_g}$$

dimana φ = hasil bagi seluruh pemisahan partikel sempurna

d = diameter partikel

ρ_s = densitas partikel

ρ_c = densitas cairan

π = viskositas kinematik

ω = kecepatan angular

r = radius rotasi

V = volume total cairan dalam sentrifugasi

g = gaya gravitasi

S_g = lapisan sedimentasi cairan

2.11 Dialisis^[18]

Dialisis digunakan untuk memisahkan partikel-partikel besar dari partikel-partikel kecil dengan menggunakan membran semipermeabel berdasarkan sifat difusi. Partikel-partikel kecil pada konsentrasi tinggi yang berada dalam selofan akan keluar menuju larutan dengan konsentrasi rendah di luar selofan sehingga terjadi kesetimbangan.

Kecepatan dialisis tergantung pada beberapa faktor, yaitu:

1. Porositas dan ketebalan membran
2. Pelarut yang digunakan
3. Larutan makromolekul yang dipisahkan
4. Kondisi fisik

Jika larutan makromolekul seperti protein dipisahkan dari larutan garam dengan membran semipermeabel, protein tidak dapat melewati membran, tetapi konterion yang kecil dapat melakukannya. Jika dialisis dilakukan dengan air distilasi maka akan terjadi perubahan pH. Untuk menghindari terjadinya perubahan pH, dialisis dilakukan dengan larutan buffer yang disesuaikan konsentrasinya.

2.12 Spektrofotometri UV-Vis^[17]

Hukum yang digunakan untuk mengukur serapan suatu cuplikan adalah Hukum Lambert- Beer yaitu :

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

dimana:

T = Transmittansi

A = Absorbansi

a = koefisien absorpsivitas ($\text{Lt gr}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = tebal cuvet (cm)

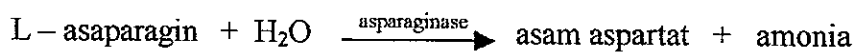
c = konsentrasi (gram/Lt)

Dengan mengetahui absorbansinya, maka dapat diketahui konsentrasi sampel.

2.13 Penentuan Aktivitas Enzim Asparaginase^[19]

Setiap tahap isolasi enzim perlu dilakukan uji aktivitas agar kita dapat mengikuti perubahan aktivitas enzim, di samping itu juga dilakukan penentuan kadar protein terhadap semua fraksi sehingga dapat dihitung aktivitas spesifiknya.

Prinsip dasar penetapan aktivitas enzim adalah terbentuknya produk atau berkurangnya substrat dalam suatu reaksi enzimatik. Aktivitas asparaginase ditentukan oleh terbentuknya amonia dari penguraian asparagin oleh asparaginase membentuk asam aspartat dan amonia.



Satu unit aktivitas enzim asparaginase dapat didefinisikan sebagai banyaknya μmol produk (amonia) yang terbentuk dari substratnya (asparagin) per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimal enzim tersebut. Amonia yang terbentuk diidentifikasi dengan penambahan reagen Nessler membentuk warna kuning-coklat. Selanjutnya warna yang terbentuk dibaca absorbannya pada panjang gelombang optimum dari amonium sulfat. Aktivitas enzim diketahui dengan mengekstrapolasikan terhadap kurva standar amonium sulfat. Untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim, perlu ditentukan aktivitas spesifik dari enzim tersebut dimana aktivitas spesifik menunjukkan jumlah unit aktivitas enzim per mg protein. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry dan dihitung berdasarkan rumus persamaan garis dari kurva standar kasein.