

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Ada tiga bentuk dasar sel bakteri, yaitu: batang (basil), bulat (kokus), dan lengkung (koma/vibrion). Sel-sel bakteri yang berbentuk batang dan bulat seringkali membentuk kumpulan sel. Kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel yang berbentuk batang antara lain diplobasil (berpasangan dua-dua) dan streptobasil (seperti rantai), sedangkan kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel yang berbentuk bulat antara lain diplokokus (berpasangan dua-dua), streptokokus (seperti rantai), stafilokokus (bergerombol), tetrakokus (seperti bujursangkar dengan empat sel), dan sarsina (seperti kubus dengan delapan sel)^[1].

Sebagian bakteri dapat membentuk struktur khusus yang disebut endospora. Bakteri yang mampu membentuk endospora dapat tumbuh dan bereproduksi selama banyak generasi sebagai sel vegetatif. Letak endospora di dalam sel serta ukurannya selama pembentukannya tidaklah sama bagi semua spesies. Sebagai contoh, beberapa spora adalah sentral yaitu dibentuk di tengah-tengah sel; terminal, yaitu dibentuk diujung; subterminal, yaitu dibentuk dekat ujung. Diameter spora bisa lebih besar atau lebih kecil dari diameter sel vegetatifnya^[2].

Untuk membantu mengidentifikasi dan membedakan berbagai bakteri yang serupa, banyak digunakan senyawa organik berwarna (zat pewarna) untuk mewarnai bakteri pada pemeriksaan mikroskopis. Salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dan paling luas digunakan untuk bakteri adalah pewarnaan gram. Dalam

proses ini olesan bakteri yang terfiksasi dikenai larutan-larutan: ungu kristal, iodium, alkohol, dan safranin. Bakteri yang diwarnai dibagi menjadi dua kelompok. Yang pertama adalah bakteri gram positif yang mempertahankan warna ungu kristal. Kedua adalah bakteri gram negatif yang kehilangan warna ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol, sewaktu diberi warna tandingan dengan merah safranin, tampak berwarna merah. Kedua golongan gram di atas mempunyai perbedaan pada dinding selnya, gram negatif mempunyai susunan dinding sel yang lebih rumit dibandingkan dengan gram positif^[2].

Pembiakan murni bakteri sangat penting dilakukan untuk memisahkan campuran bakteri, sehingga masing-masing spesiesnya menjadi terpisah-pisah. Teknik yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada media agar memungkinkannya tumbuh agak berjauhan dari spesies lainnya, juga memungkinkan setiap selnya berhimpun membentuk koloni, sekelompok massa sel yang dapat dilihat dengan mata telanjang. Semua sel dalam koloni itu sama, dianggap kesemuanya itu merupakan keturunan satu bakteri dan karena itu mewakili apa yang disebut biakan murni^[2]. Dalam pembiakan ini perlu dilakukan sterilisasi, pembebasan suatu bahan dari bakteri hidup. Sel-sel bakteri sudah dimatikan pada temperatur 60 °C dalam waktu 5 - 10 menit. Semakin tinggi kontaminasi maka makin banyak jumlah spora yang termos resisten, diperlukan pemanasan semakin lama. Untuk mencapai temperatur yang lebih tinggi dari titik didih air digunakan otoklaf. Proses sterilisasi dengan pemanasan lembab tergantung pada tinggi temperatur dan tidak pada besar tekanan, oleh karena itu penghilangan udara sebelum otoklaf ditutup harus dilakukan secara teliti. Udara dapat dibuang dengan mengeluarkan uap atau

dengan evakuasi. Selanjutnya yang harus diukur ialah temperatur di dalam otoklaf dan bukan tekanannya, tetapi karena lebih sederhana dan lebih pasti, pengukuran tekanan masih lazim dilakukan. Lama sterilisasi tergantung kapasitas panas wadah yang harus disterilisasikan ^[3].

Temperatur merupakan salah satu faktor dari lingkungan yang paling mempengaruhi perkembangan dan kemampuan bertahan hidup bakteri. Bakteri memiliki temperatur minimum dan maksimum yang merupakan batas pertumbuhan, serta temperatur optimum dimana terjadi pertumbuhan paling cepat. Temperatur optimum biasanya berada di dekat temperatur maksimum. Setiap spesies bakteri tumbuh pada suatu kisaran temperatur tertentu. Atas dasar ini, maka bakteri dapat diklasifikasikan sebagai: *psikrofil*, yang tumbuh pada 0 sampai 30 °C; *mesofil*, yang tumbuh pada 25 sampai 40 °C; dan *termofil*, yang tumbuh pada temperatur 50 °C atau lebih ^[2].

2.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri dalam suatu kultur melewati beberapa fase, antara lain:

a. Fase adaptasi

Adalah fase penyesuaian bakteri dengan kondisi lingkungan baru disekelilingnya. 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 bakteri mulai membelah diri dengan kecepatan yang rendah karena baru menyesuaikan diri.

c. Fase pertumbuhan logaritmik

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

d. Fase pertumbuhan lambat

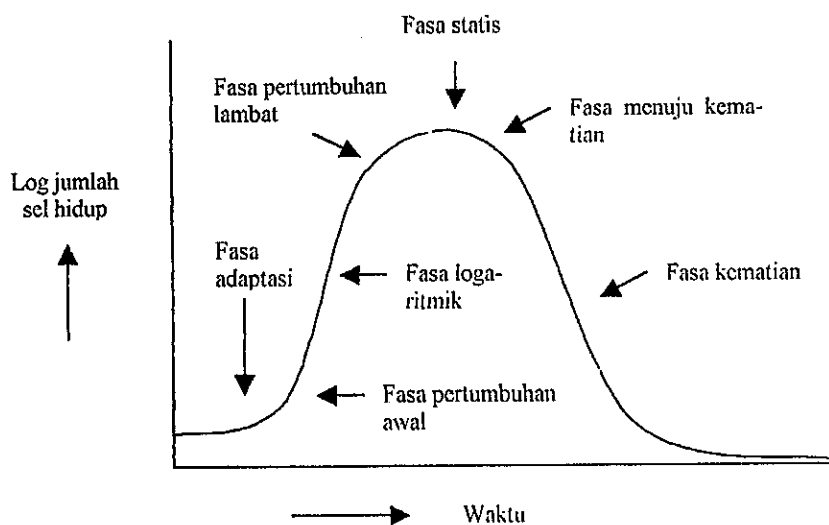
Pertumbuhan populasi bakteri diperlambat karena zat nutrisi sudah sangat berkurang dan ada hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada yang mati.

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 bakteri 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^[4].



Gambar 2.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri ^[4].

2.3. Enzim

Kata “enzyme” berasal dari istilah Yunani yang arti harfiahnya ‘di dalam’. 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, sampai 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 efisiensi yang tinggi, spesifitas dan kerja yang selektif, sifat aktif pada keadaan ‘ringan’ yaitu pada temperatur kamar dan pH ‘normal’ ^[4].

2.3.1. Klasifikasi Enzim

Menurut Commission on Enzymes of The International Union of Biochemistry, enzim dibagi dalam enam kelompok utama berdasarkan tipe reaksi yang dikatalis, yaitu :

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi reduksi.
2. Transferase, mengkatalisis pemindahan gugus tertentu.
3. Hidrolase, meningkatkan pemecahan ikatan antara karbon dengan atom lainnya dengan penambahan air.
4. Liase, mengkatalisis pemecahan karbon-karbon, karbon-sulfur, dan karbon-nitrogen.
5. Isomerase, mengkatalisis rasemisasi optik atau isomer geometrik dan reaksi oksidasi reduksi intramolekuler tertentu.
6. Ligase, mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon-karbon, karbon-sulfur, karbon-nitrogen, dan karbon-oksigen^[4].

2.3.2. Satuan Enzim

Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim adalah aktivitas enzim yang menyebabkan pembentukan sejumlah produk atau berkurangnya sejumlah substrat tiap satuan waktu dalam keadaan optimum sistem tersebut. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein. 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 dimurnikan dari protein non-enzim, sehingga

aktivitas spesifiknya akan semakin tinggi. Aktivitas spesifik enzim dapat menjadi ukuran tingkat kemurnian enzim^[4].

2.3.3. Aktivitas Enzim

Suatu reaksi kimia dapat berlangsung karena molekul-molekul reaktan pada waktu tertentu mengalami keadaan aktif, yaitu apabila energi molekul tersebut dalam keadaan energi pengaktifan. Dalam keadaan demikian ikatan kimia dalam molekul itu dapat pecah sehingga memungkinkan terbentuknya produk. Keadaan ketika molekul reaktan dalam keadaan aktif disebut keadaan transisi, sedangkan energi pengaktifan diartikan sebagai jumlah energi dalam kalori yang dibentuk oleh satu mol zat pada temperatur tertentu, untuk membawa semua molekul (dari satu mol zat) ke keadaan aktif.

Fungsi katalisator adalah mempercepat reaksi kimia dengan cara menurunkan energi bebas pengaktifan. Dalam hal ini, katalisator bergabung dengan reaktan, sedemikian rupa sehingga dihasilkan keadaan transisi yang mempunyai energi bebas lebih rendah dari pada keadaan transisi tanpa katalisator. Setelah hasil reaksi terbentuk (produk), katalisator dibebaskan kembali ke keadaan semula^[4].

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 ^[6].

2.3.5. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

2.3.5.1. Konsentrasi Enzim

Seperti pada katalis lain, kecepatan reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim ^[7].

2.3.5.2. Konsentrasi Substrat

Pada konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi, walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim hanya menampung sedikit substrat. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan bagian aktif tersebut. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar dan hal ini yang menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Dalam keadaan ini, bertambah besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi enzim substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya tidak bertambah besar ^[7].

2.3.5.3. Temperatur

Reaksi kimia dapat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dipengaruhi oleh temperatur. Pada temperatur rendah reaksi kimia lambat dan pada temperatur yang lebih tinggi reaksi lebih cepat.

Karena enzim adalah suatu protein, maka kenaikan temperatur akan menyebabkan denaturasi. Jika terjadi denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu, sehingga konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya menurun. Kenaikan temperatur sebelum terjadinya proses denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi. Kenaikan temperatur pada saat mulai terjadinya proses denaturasi akan mengurangi kecepatan reaksi. Maka temperatur yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim disebut temperatur optimum ^[7].

2.3.5.4. pH

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat bermuatan positif, negatif, atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. Pada pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Hal ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Suatu pH tertentu yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi disebut pH optimum ^[7].

2.4. Protease Mikroba

Protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi yang menyebabkan pemecahan protein. Enzim ini dalam kerjanya membutuhkan air dan dimasukkan dalam kelas hidrolase. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat kimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi. Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler dan intraseluler oleh hewan, tanaman, maupun

mikroba, serta mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme serta keteraturan proses dalam sel^[8].

Protease dapat juga mempunyai dua pengertian, yaitu proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis hidrolisa molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, sedangkan peptidase mengkatalisis hidrolisa fragmen polipeptida menjadi asam amino. Proteinase biasanya dikeluarkan oleh mikroba pada fermentasi selama pertumbuhannya, sedangkan peptidase didapatkan bila sel mengalami otolisis^[9].

Protease mikroba dibedakan menjadi enam kelompok berdasarkan spesifitas mekanisme katalitiknya. Peptidase dibedakan menjadi karboksipeptidase dan aminopeptidase, sedangkan proteinase dibedakan menjadi protease serin, protease tiol, protease asam, dan protease logam. Skema pembagian enzim yang dihasilkan mikroba dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Skema pembagian protease mikroba^[8].

P R O T E A S E	Peptidase	Karboksipeptidase Aminopeptidase	Karboksipeptidase serin Karboksipeptidase logam
	Proteinase	Protease serin Protease tiol Protease asam Protease logam	Protease alkali Protease serupa tripsin. Klostripain Protease <i>Streptococcal</i> Protease serupa pepsin Protease serupa serin Protease alkali Protease netral

Enzim yang berasal dari mikroba mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan enzim non mikrobial, yaitu: dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktivitasnya lebih mudah ditingkatkan, mutunya lebih seragam, jenis

mikroba dan lingkungannya sangat bervariasi sehingga memungkinkan untuk menghasilkan berbagai jenis enzim yang diinginkan, mikroba penghasil enzim dapat ditumbuhkan dengan cepat, pertumbuhannya mudah diatur, produk enzim yang dihasilkan dapat dicapai pada jumlah yang ekonomis untuk enzim, dan isolasi enzimnya relatif mudah ^[10].

Protease dihasilkan oleh berbagai jenis mikroba, mulai dari bakteri, kapang, dan khamir. Berbagai mikroba penghasil protease ekstraseluler dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel. 2.2. Mikroba penghasil enzim ekstraseluler ^[11].

Organisme	Tipe	pH optimum
1. Bakteri		
<i>Bacillus cereus</i>	netral	7.0
<i>Bacillus licheniformis</i>	netral	6.5 – 7.5
<i>Bacillus megaterium</i>	netral	7.0
<i>Bacillus polymixa</i>	netral	6.0 – 7.2
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	netral	6.9 – 7.2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	netral	6.5 – 7.5
<i>Bacillus thermoproteoliticus</i>	netral	7.5 – 8.0
<i>B. substilis var amyloliquefaciens</i>	netral	7.0
<i>Bacillus cereus</i>	alkali	10.5 – 10.8
<i>Bacillus licheniformis</i>	alkali	10.3 – 10.8
<i>Bacillus pumilus</i>	alkali	10.3 – 10.8
<i>Bacillus substilis</i>	alkali	10.3 – 10.8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	alkali	10.2 – 10.8
2. Kapang		
<i>Aspergillus niger</i>	asam	2.8
<i>Aspergillus oryzae</i>	asam	3.0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	netral	7.5
<i>Aspergillus sojae</i>	netral	6.5 – 7.5
<i>Aspergillus candidus</i>	alkali	10.0 – 11.0

2.5. Penentuan Aktivitas Protease

Metode yang digunakan dalam pengukuran aktivitas protease dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri. Prosedurnya berupa penentuan produk asam amino dengan analisis serapan sinar.

Dari hukum Lambert-Beer didapat; $A = \epsilon \times b \times c$

Maka, $c = \frac{A}{\epsilon \times b}$ dimana, A = absorbansi

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

b = tebal kuvet (cm)

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

Pada pengukuran ini ϵ dan b dianggap konstan dan konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi ^[12].

Dalam hal ini yang diukur adalah berkurangnya substrat. Dengan menggunakan kurva standar kasein, dapat dicari konsentrasi substrat yang berkurang pada reaksi enzimatik. Sumbu Y menyatakan nilai absorbansi (A) dan sumbu X menyatakan nilai konsentrasi (c). Dari grafik tersebut dapat dicari rumus persamaan garisnya, yaitu: $Y = aX + b$

dimana, Y = absorbansi (A)

X = konsentrasi (c)

a = gradien kemiringan

b = intersep

Nilai absorbansi dari produk hasil reaksi enzimatik diekstrapolasikan terhadap kurva standar tersebut sehingga dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah

didapat, nilai konsentrasi produk dapat diketahui. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang menyebabkan terbentuknya 1 μg produk yang dihasilkan 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 "Bovine Serum Albumine" (BSA). Nilai kadar protein digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim di mana aktivitas spesifik menunjukkan jumlah unit aktivitas per miligram protein yang menggambarkan tingkat kemurnian dari enzim tersebut ^[13].

2.6. Karakterisasi Protease

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum protease hasil isolasi. Protease yang ditemukan di berbagai sumber alam memiliki karakteristik yang berbeda-beda.

Protease dapat bekerja efektif jika karakteristik biokimiawi seperti temperatur optimum, pH optimum, waktu inkubasi optimum, pengaruh senyawa kimia dan ion, serta ketahanan panas enzim diketahui.

Untuk menentukan pH optimum enzim dilakukan reaksi enzim dengan substrat pada variasi pH, dimana pada suatu pH tertentu akan didapatkan aktivitas spesifik enzim tertinggi. Penentuan temperatur optimum dilakukan dengan cara yang sama pada kondisi pH optimum dengan berbagai variasi temperatur, sedangkan waktu inkubasi optimum didapat dengan mereaksikan substrat dengan enzim pada pH dan temperatur optimum dengan variasi waktu inkubasi ^[13].