

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme prokariotik uniseluler yang mempunyai bentuk sederhana. Ukuran sel bakteri dinyatakan dalam satuan mikron. Berdasarkan bentuk selnya, bakteri dibedakan menjadi bentuk batang, bulat dan lengkung, dapat berpasangan, membentuk kelompok atau berantai^[7].

Bakteri mempunyai dinding sel yang mengandung peptidoglikan yaitu suatu polimer yang terdiri dari N-asetil glukosamin, asam N-asetilmuramat dan peptida. Selain itu juga mengandung komponen kimiawi lain seperti asam teikoat, protein, lipoprotein dan lipopolisakarida yang terikat pada peptidoglikan. Komposisi ini bervariasi pada masing-masing bakteri.

Pada bakteri gram negatif kandungan peptidoglikan lebih sedikit daripada bakteri gram positif, dan bakteri gram negatif tidak mempunyai asam teikoat^[13].

Bakteri bersifat motil atau non motil, perkembangbiakan secara vegetatif dengan pembelahan sel, beberapa ada yang membentuk spora bila lingkungan tidak memungkinkan untuk pertumbuhan sel vegetatif.

Berdasarkan atas cara untuk mendapatkan energinya, bakteri dibedakan menjadi fototrof dan kemotrof. Sedangkan berdasarkan atas sumber karbon yang dapat digunakan untuk metabolismenya, bakteri dibedakan menjadi bakteri autotrof dan heterotrof. Beberapa ada yang hidup saprofit, parasit atau patogen pada organisme lain^[8].

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 dekat temperatur maksimum. Setiap spesies bakteri tumbuh pada kisaran temperatur tertentu, atas dasar ini bakteri dapat diklasifikasikan sebagai: *psikrofil*, yang tumbuh pada suhu 0-30 °C; *mesofil*, yang tumbuh pada suhu 25-40 °C; *termofil*, yang tumbuh pada suhu 50 °C atau lebih^[13].

2.2. Metode Skreening^[15]

Banyaknya suatu enzim tertentu yang diproduksi oleh berbagai galur mikroba sangat bervariasi, karena itu sumber terbaik bagi suatu enzim tertentu harus dicari melalui prosedur skreening yang sesuai. Kultur untuk skreening dapat berasal dari koleksi kultur yang ada, atau dari isolat-isolat baru yang berasal dari sumber-sumber yang kaya akan substrat dimana enzim yang diinginkan aktif.

Pada tahap awal, skreening dilakukan dengan cara menumbuhkan kultur pada permukaan cawan yang mengandung substrat tertentu. Koloni yang dipilih untuk diuji lebih lanjut ialah koloni yang menunjukkan aktivitas enzim yang positif. Koloni yang terpilih diisolasi dan kemudian dibiakkan sebagai kultur murni dalam medium cair. Pengujian untuk seleksi lebih lanjut tertuma ditekankan pada pengujian potensi produksi enzim oleh isolat tersebut.

Bila reaksi yang diinginkan sulit dideteksi pada media padat (agar), skreening awal dapat dilakukan dengan menumbuhkan kultur dalam medium cair. Pengujian enzim dilakukan terhadap cairan kultur.

Prosedur skreening tidak hanya bertujuan menyeleksi kultur yang memproduksi enzim baru, tetapi juga ditujukan untuk memperoleh galur mikroba baru dengan potensial produksi enzim yang lebih tinggi. Pengujian untuk menentukan potensial produksi suatu galur mikroba dilakukan dengan cara menumbuhkan galur tersebut dalam berbagai komposisi medium dan kondisi pertumbuhan.

2.2.1. Pengujian Hidrolisis Gelatin^[2]

Beberapa spesies bakteri mampu menghidrolisis protein gelatin dengan mengeluarkan enzim ekstraseluler. Adanya enzim ini dapat ditunjukkan dengan menginokulasi suatu medium Nutrien Gelatin dengan bakteri yang diuji.

Dalam pengujian ini harus diperhatikan bahwa:

1. Kultur harus diinkubasi pada temperatur yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri. Untuk bakteri yang bersifat mesofilik, inkubasi biasanya pada temperatur diatas 25 °C, namun pada suhu ini gelatin sudah mulai mencair.
2. Bila diinkubasi pada suhu dibawah 25 °C bakteri tidak akan tumbuh secara optimal, sehingga kemungkinan tidak dapat terjadi pencairan protein gelatin.

Untuk mengatasi hal tersebut maka medium yang telah diinokulasi dengan bakteri dapat diinkubasi pada temperatur yang sesuai. Untuk melihat terjadinya pencairan atau tidak, medium kemudian disimpan dalam almari es selama 2 sampai 3 jam. Bila medium gelatin itu dapat memadat kembali, ini berarti tidak terjadi hidrolisis atau pencairan gelatin. Bila medium gelatin tetap mencair, ini menunjukkan terjadinya hidrolisis atau pencairan protein gelatin oleh bakteri.

Ada bakteri yang dengan cepat menghidrolisis gelatin, dan ada yang lambat, untuk itu maka setiap 18 jam sekali diamati dan kemudian selama 2 sampai 3 jam disimpan dalam lemari es. Ini dilakukan hingga 3 hari untuk mengetahui apakah protein gelatin benar-benar dapat terhidrolisis.

2.3. Kurva Pertumbuhan Mikroba

Pertumbuhan sel merupakan puncak aktivitas fisiologik yang saling mempengaruhi secara beraturan. Proses pertumbuhan ini sangat kompleks mencakup pemasukan nutrien dasar dari lingkungan ke dalam sel, konversi bahan-bahan nutrien menjadi energi dan berbagai konstituen sel yang vital serta perkembangbiakan. Pertumbuhan mikroba dapat ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel sedangkan kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimiawinya^[17].

Inokulum adalah kultur mikroba yang diinokulasikan kedalam medium fermentasi pada saat kultur mikroba tersebut berada pada fase pertumbuhan logaritmik. Tujuan utama pembuatan inokulum untuk fermentasi menggunakan

bakteri ialah menyediakan inokulum yang berada dalam keadaan aktif, sehingga dapat mempersingkat fase adaptasi pada waktu fermentasi.

Lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh volume inokulum dan kondisi fisiologinya. Untuk bakteri pembentuk spora umur inokulum juga dipengaruhi lamanya fase adaptasi. Karena itu inokulum bakteri sebaiknya diinokulasikan ke dalam medium fermentasi pada saat sel aktif melakukan metabolisme (fase pertumbuhan logaritmik). Fase adaptasi dapat dikurangi sampai serendah-rendahnya jika komposisi medium inokulum yang digunakan sama dengan komposisi medium fermentasi^[16].

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 pertumbuhan sama dengan medium sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi^[21].

b. Fase pertumbuhan awal

Pada fase ini mikroba mulai membelah diri dengan kecepatan yang rendah karena baru menyesuaikan diri^[21].

c. Fase pertumbuhan logaritmik

Pada fase ini mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH, kandungan

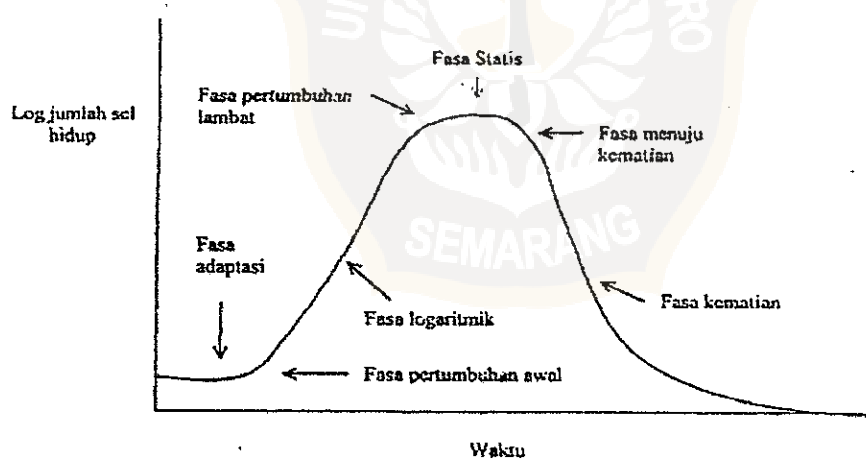
nutrien, suhu, dan kelembaban udara. Pada fase ini kultur paling sensitif terhadap lingkungan^[21].

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^[21].

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^[21].



Gambar II.1. Kurva Pertumbuhan Mikroba

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 beracun dan habisnya energi cadangan di dalam sel. Kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrisi, lingkungan dan jenis mikroba^[21].

2.4. Enzim^[25]

Kata 'enzyme' berasal dari istilah Yunani yang arti harfiahnya 'di dalam sel'. 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 efisiensi yang tinggi, spesifitas dan kerja yang selektif, sifat aktif pada keadaan 'ringan' yaitu pada suhu kamar dan pH 'normal'.

2.4.1. Klasifikasi Enzim^[25]

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

a. Oksidoreduktase

Enzim-enzim ini melaksanakan katalisis reaksi oksidasi-reduksi yaitu reaksi yang melibatkan oksidasi suatu senyawa disertai dengan reduksi senyawa lain.

b. 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.

c. Hidrolase

Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi pemecahan hidrolitik atau reaksi sebaliknya.

d. Liase

Enzim yang melaksanakan katalisis pemutusan ikatan rangkap C=C, C=O, C≡N, dan sebagainya tanpa melibatkan hidrolisis atau oksidasi-reduksi.

e. Isomerase

Enzim ini melaksanakan katalisis reaksi isomerase yang merupakan penataan kembali atom-atom yang membentuk suatu molekul.

f. 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.

2.4.2. Satuan Enzim

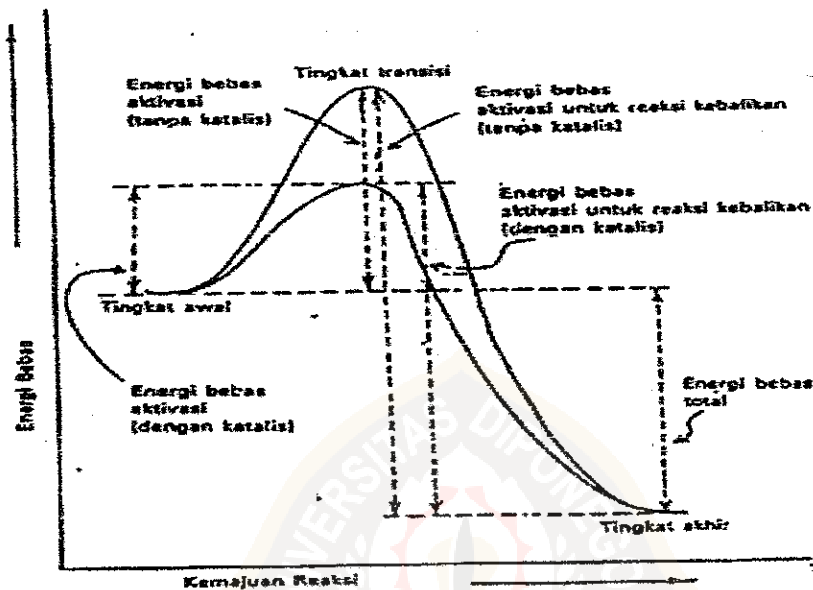
Komposisi kimia suatu enzim, baik yang masih aktif maupun yang tidak aktif adalah sama, karena itu keaktifan enzim tidak dapat ditentukan hanya dengan analisis atau penentuan komposisi kimia saja. Keaktifan kimia enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang 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 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. Istilah 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^[21].

2.4.3. Aktivitas Enzim^[25]

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 katalis

enzim. Enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia dengan cara membentuk kompleks Enzim-Substrat (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

2.4.4. Lokasi Aktif Enzim^[25]

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.

2.4.5. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim^[25]

2.4.5.1. 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.

2.4.5.2. Konsentrasi Substrat

Hasil eksperimen menunjukkan 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 walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Seluruh sisi aktif enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga penambahan substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi.

2.4.5.3. 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.

2.4.5.4. 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.

2.5. Enzim Protease^[25]

Enzim protease sebagai 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.

2.5.1. Protease Termostabil^[19]

Enzim-enzim dari makhluk ektrimofilik yang hidup pada lingkungan ektrim, umumnya bersifat lebih stabil terhadap lingkungan suhu, pH, garam, pelarut organik dan senyawa pendenaturasi. Enzim termostabil adalah model yang bermanfaat didalam teknik rekayasa menstabilkan enzim/protein. Enzim-enzim termostabil dari prokariot, golongan archaea termofilik yang hidup di lingkungan kawah gunung berapi banyak diminati pihak industri karena dapat bekerja pada lingkungan non konvensional.

Bakteri ektrim termofilik *aquaticus* YT-1 menghasilkan protease serin aqualisin I yang bersifat homolog dengan substilin dan pronase K. Suhu optimumnya ditemukan 80 °C. Protease netral *Thermus sp.* strain R 141 A yang diisolasi dari daerah geothermal Selandia Baru menunjukkan suhu optimum 90 °C. Archaea *Pyrococcus furious* yang bersifat anaerob menghasilkan protease serin pirolisin yang menunjukkan suhu optimum 115 °C, dan kisaran pH optimum 6,5-10,5. Protease termostabil serin alkalis yang dihasilkan oleh suatu *Bacillus sp.* termofilik alkalofilik menunjukkan pH optimum 12 - 13, dengan suhu optimum 85 °C.

2.6. Penentuan Aktivitas Enzim^[21]

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

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

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

dimana; A = absorbansi

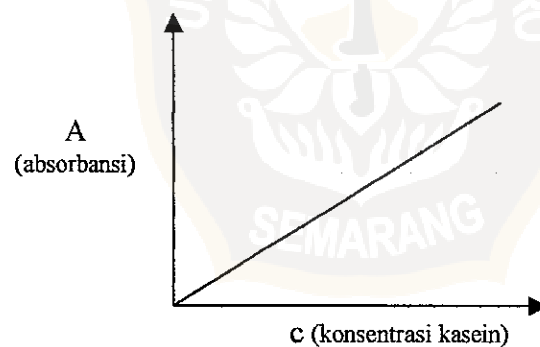
ε = koefisien ekstingsi molar substrat

b = tebal kuvet (cm)

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

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

Dalam hal ini yang diukur adalah substrat yang berkurang yaitu kasein. Dengan menggunakan kurva standar kasein, dapat dicari konsentrasi kasein yang berkurang pada reaksi enzimatik. Sumbu Y menyatakan absorbansi (A) dan sumbu X menyatakan nilai konsentrasi (c).



Gambar II.3. kurva standar kasein

Dari grafik tersebut dapat dicari rumus persamaan garisnya, yaitu:

$$Y = aX + b$$

dimana: $Y = \text{absorbansi (A)}$
 $X = \text{konsentrasi (c)}$
 $a = \text{gradien kemiringan}$
 $b = \text{intersep}$

Nilai absorbansi (A) dari kasein yang berkurang diekstrapolasikan terhadap kurva tersebut sehingga dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah didapat, nilai konsentrasi kasein dapat diketahui. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang menyebabkan berkurangnya 1 μmol kasein 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 BSA (Bovine Serum Albumin). 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.

