

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Temperatur Optimum

2.1.1 Pengertian Temperatur Optimum

Temperatur optimum adalah kondisi ketika enzim memiliki aktivitas maksimal pada temperatur tertentu. Temperatur optimum berpengaruh terhadap laju reaksi enzimatik, jika reaksi tersebut dilangsungkan dalam berbagai temperatur, kurva hubungan tersebut akan menunjukkan temperatur tertentu, yang menghasilkan laju reaksi yang maksimum (Sadikin, 2012).

2.1.2 Temperatur dan Reaksi Enzimatik

Kondisi enzim dapat diketahui dalam *mendegradasi* substrat dengan melakukan uji pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim. Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada temperatur tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya temperatur hingga temperatur optimum tercapai. Reaksi enzimatik berlangsung lambat pada temperatur rendah, kenaikan temperatur akan mempercepat reaksi, hingga temperatur optimum tercapai dan reaksi enzimatik mencapai maksimum. Kenaikan temperatur melewati temperatur optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan menurunkan kecepatan reaksi enzimatik (Noviyanti, 2012).

Rendahnya reaksi enzimatik di luar temperatur optimum tidak bergantung pada temperatur yang lebih rendah atau temperatur yang lebih tinggi. Penyebab kurangnya laju reaksi enzimatik ialah kurangnya gerak termodinamik yang

menyebabkan kurangnya tumbukan antara molekul enzim dengan substrat, sedangkan pada daerah yang bertemperatur tinggi, gerak termodinamik akan lebih meningkat, sehingga benturan antar molekul niscaya akan lebih sering, dan molekul protein enzim juga mengalami denaturasi yang membuat bangun tiga dimensinya berubah secara bertahap. Makin jauh temperatur di atas optimum, makin besar perubahan struktur tiga dimensi tersebut dan makin sulit bagi substrat untuk duduk secara tepat di bagian aktif molekul enzim (Sadikin, 2012).



Gambar 2.1 Hubungan Temperatur Optimum dengan Laju Reaksi Enzim

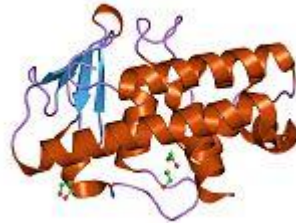
(Sadikin, 2012)

2.2 Enzim

2.2.1 Pengertian Enzim

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh (Soeka, 2014). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun (Yudi *et al.*, 2014). Setiap enzim

memiliki konformasi yang sangat tepat dan berlainan sebagai hasil dari beberapa tingkatan struktur protein (Bresnick, 2003).



Gambar 2.2 Enzim Protease

(<https://id.wikipedia.org>, 2016)

2.2.2 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Beberapa faktor memengaruhi aktivitas katalitik enzim.

1. Pada banyak reaksi, substansi nonprotein kecil diperlukan untuk melakukan aktivitas enzim yang semestinya. Substansi ini “mencetuskan” reaksi melalui ikatan ke molekul enzim dengan cara yang spesifik.
 - a. Koenzim, adalah substansi organik (misalnya, vitamin, Koenzim A, biotin, heme).
 - b. Kofaktor adalah substansi anorganik (misalnya, atom logam seng, besi, tembaga).
 - c. Holoenzim adalah bagian protein dan nonprotein enzim yang terdapat secara bersamaan

2. Setiap enzim memiliki kondisi lingkungan optimal yang disukai kebanyakan konformasi enzim yang aktif. Kondisi lingkungan yang dimaksud adalah:

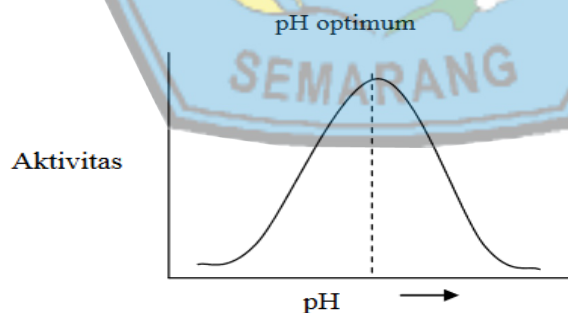
a. Temperatur

i. Pengaruh terhadap reaksi. Peningkatan temperatur yang ringan dapat mempercepat reaksi, molekul bergerak lebih cepat dan akibatnya lebih banyak berinteraksi.

ii. Denaturasi. Ketika melampaui temperatur tertentu, ikatan kimia terputus dan enzim kehilangan bentuk spesifiknya (yaitu enzim mengalami denaturasi). Denaturasi adalah perubahan permanen yang menginaktivasi enzim.

b. pH

Lingkungan yang terlalu asam atau terlalu basa dapat mendenaturasi enzim. Pada sebagian besar enzim, pH optimum adalah keadaan netral (pH 7) (Bresnick, 2003).



Gambar 2.3 Hubungan pH dengan aktivitas enzim

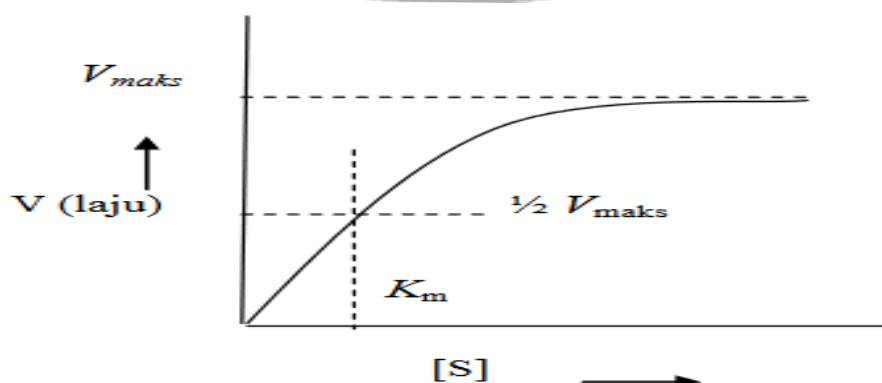
(Shahib, 2005)

c. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjadi, 2006). Laju reaksi tersebut meningkat secara linear selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Suwarso, 2015).

d. Konsentrasi substrat

Laju reaksi mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Akan tetapi setelah peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut, akan tercapai aktivitas enzim maksimum. Pada keadaan konsentrasi substrat yang berlebihan mengakibatkan terjadinya kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat yang mengakibatkan sebagian besar substrat tidak diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi enzim (Kuchel dan Gregory, 2002). Hal ini disebabkan karena pada saat konsentrasi yang sangat tinggi, seluruh bagian aktif enzim telah diduduki oleh substrat, sehingga pada saat itu laju reaksi berada dalam keadaan maksimum (Sadikin, 2012).

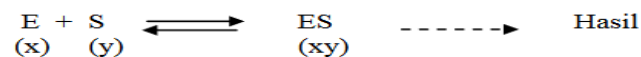


Gambar 2.4 Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005)

- e. Inhibitor adalah molekul yang terikat secara selektif pada enzim dan menghambat aktivitas enzim (Bresnick, 2003).

2.2.3 Kinetika Reaksi Enzim

Pada tahun 1913 Michelis-Menten menunjuk pada mekanisme berikut untuk menjelaskan kekuatan reaksi-reaksi enzim.



Dimana E = enzim, ES = kompleks enzim substrat, dan S = substrat, sedangkan $[S] \gg [E]$ dan $[ES]$. Transformasi persamaan Michaelis-Menten yang paling banyak digunakan adalah “double reciprocal” Lineweaver-Burk, dengan menggabung persamaan Michaelis-Menten.

Plot dari pasangan data $(1/[S]_i, 1/V_{oi})$, untuk $i = 1, \dots, n$, dengan n adalah jumlah pasangan data, akan memberikan suatu garis lurus dengan ordinat dan absis intercept $1/V_{maks}$ dan $-1/K_m$ pada gambar 2 (Suwarso, 2015).

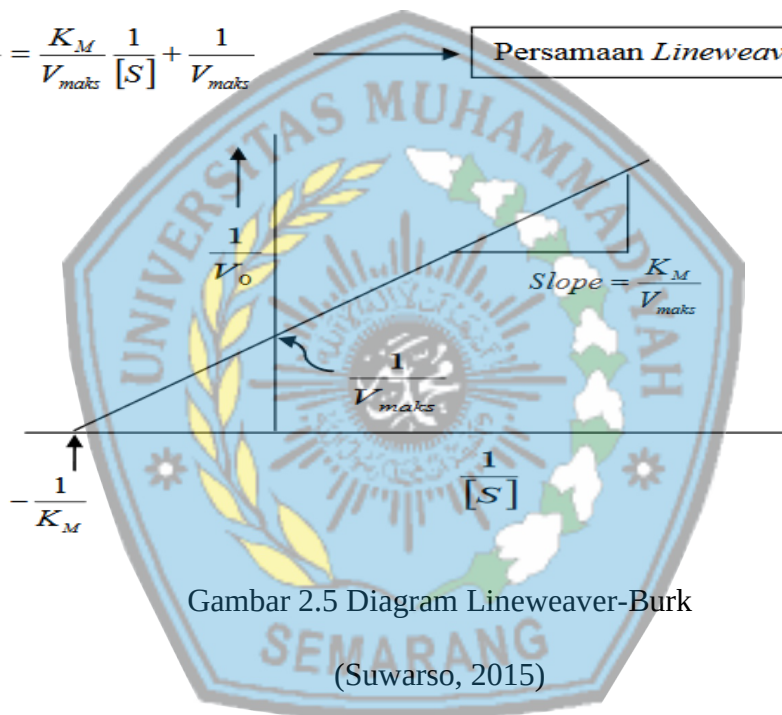
$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]}$$

→ Persamaan Michaelis-Menten

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

→ Persamaan *Lineweaver-Burk*



Gambar 2.5 Diagram Lineweaver-Burk
(Suwarso, 2015)

2.2.4 Enzim Protease

Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino. Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersial (Soedaryati, 2014).

1. Fungsi enzim protease

Enzim protease memiliki manfaat yang sangat luas, diantaranya yaitu.

- a. Dalam dunia medis, enzim protease digunakan sebagai terapi untuk pengobatan tumor, radang, kelainan darah dan pengaturan kekebalan. Selain itu, karena protein diperlukan untuk membawa kalsium yang terikat pada protein dalam darah, kekurangan protease dapat menyebabkan artritis, berkaitan dengan kekurangan kalsium. Karena kalsium diubah menjadi glukosa kekurangan protein yang dicerna tubuh akan menyebabkan dan mudah tersinggung. Protease juga mampu mencerna serpihan-serpihan yang tidak diinginkan dalam darah termasuk bakteri dan virus. Oleh karena itu, orang yang kekurangan protease kekebalannya akan menurun sehingga ia lebih rentan terhadap infeksi bakteri, virus, dan jamur (Soeka et al, 2012).
- b. Dalam bidang industri, protease juga termasuk enzim yang paling populer. Protease memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas, yang hampir mencapai 65% dari total penjualan enzim di dunia. Protease digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti farmasi, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan dan proses pengolahan limbah industri.
- c. Protease juga berfungsi dalam bidang industri detergent. Protease berfungsi untuk menghidrolisa noda protein pada pakaian sehingga kotoran yang mengandung protein seperti darah, lendir, keringat dan sebagainya akan mudah tercuci. Di samping itu kotoran lainnya yang terikat pada protein juga menjadi

lebih mudah dihilangkan. Protease yang terdapat pada detergent biasanya bekerja pada pH alkali dan temperatur yang cukup tinggi.

- d. Enzim protease juga digunakan sebagai pencuci sarang burung walet menggantikan bahan kimia hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dikenal sebagai agen pemutih (bleaching) yang bersifat alami dan aman bagi tubuh. (Soeka, 2014).

2. Sumber enzim protease

a. Tanaman

Tanaman merupakan sumber enzim protease terbesar yaitu sekitar 43,85% dari semua jenis sumber protease (Novianti et al, 2012). Tetapi penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease dibatasi oleh tersedianya tanah untuk penanaman dan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan. Disamping itu, proses produksi protease dari tumbuhan sangat memakan waktu. Protease tumbuhan yang dikenal antara lain papain, bromelain, dan keratinase (Moh. Kosim *et al.*, 2010).

b. Hewan

Hewan juga merupakan salah satu dari sumber produksi protease. Sekitar 11,05% protease berasal dari hewan (Novianti et al, 2012). Protease hewan yang paling dikenal adalah pepsin, tripsin, kimotripsin, dan rennin (Moh. Kosim *et al.*, 2010).

c. Mikroorganisme

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan tanaman dan hewan. Jumlah protease dalam mikroorganisme yaitu, pada bakteri (18,09%), jamur (15,08%), alga (7,42%) dan virus (4,41%) (Fatimah

et al., 2012). Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang banyak. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalan mikroorganisme indigenous penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim (Kosim *et al.*, 2010).

2.3 Bakteri *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis adalah bakteri berbetuk batang, Gram-positif, mempunyai spora, fakultatif anaerob, dan bergerak dengan flagella yang peritrika (Ariyadi *et al.*, 2009).

Species *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *B.cerus* dan *B. Anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri. Saat ini, *B.subtilis* dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA rekombinan (Suvanti, 2003).

1. Klasifikasi *Bacillus licheniformis*

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Class : Bacillis

Order : Bacillaceae

Genus : Bacillus

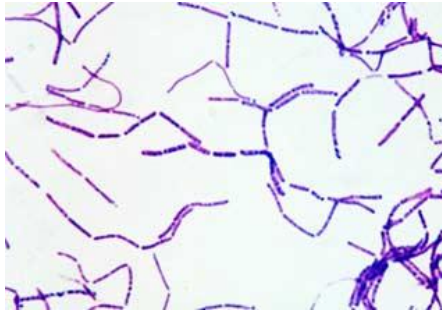
Spesies : *Bacillus licheniformis* (Magdan, 2005).

2. Karakter Bakteri *Bacillus licheniformis*

Tabel 2.1 Karakter bakteri *Bacillus licheniformis*

Karakter	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bentuk	Batang (tebal maupun tipis), rantai maupun tunggal
Gram	Positif
Sumber	tanah, air, udara dan materi tumbuhan yang terdekomposisi
Berdasarkan spora	Bakteri penghasil endospora
Respirasi	Aerob obligat
Pergerakan	Motil dengan adanya flagella
Temperatur Optimum Pertumbuhan	25-35°C
pH Optimum Pertumbuhan	7-8
Katalase	Positif

Sumber : Graumann, 2007.



Gambar 2.6 Bakteri *Bacillus licheniformis*

(Grauman, 2007)

2.4 Zymography

1. Pengertian Zymography

Zymography adalah deteksi aktifitas enzim dengan menggunakan teknik elektroforesis yang di dalam gelnya terkandung substrat enzim target. Teknik ini telah lama digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim dan aktifitasnya, terutama enzim yang termasuk dalam golongan hidrolase, secara kualitatif.

Metode Zymography didasarkan pada pemisahan protein pada gel elektroforesis baik dengan Poliakrilamid Gel Elektroforesis (native PAGE) maupun Sodium Dedosil Sulfat Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). Apabila dalam teknik Zymography yang di dalam preparasi sampelnya ada perlakuan penambahan SDS (Sodium Dedosil Sulfat), β -merkaeptanol, dan perlakuan pemanasan, maka perlakuan ini harus diminimalkan agar struktur enzim masih dapat dipertahankan dalam struktur tiga dimensinya. Ketika kondisi yang menyebabkan denaturasi protein/ enzim terjadi, maka tahap penghilangan denaturan harus dilakukan. Aktivitas enzim selanjutnya akan dideteksi sebagai zona bening pada gel melalui pewarnaan tertentu, tergantung dari jenis enzim dan sifat substrat dalam gel elektroforesis.

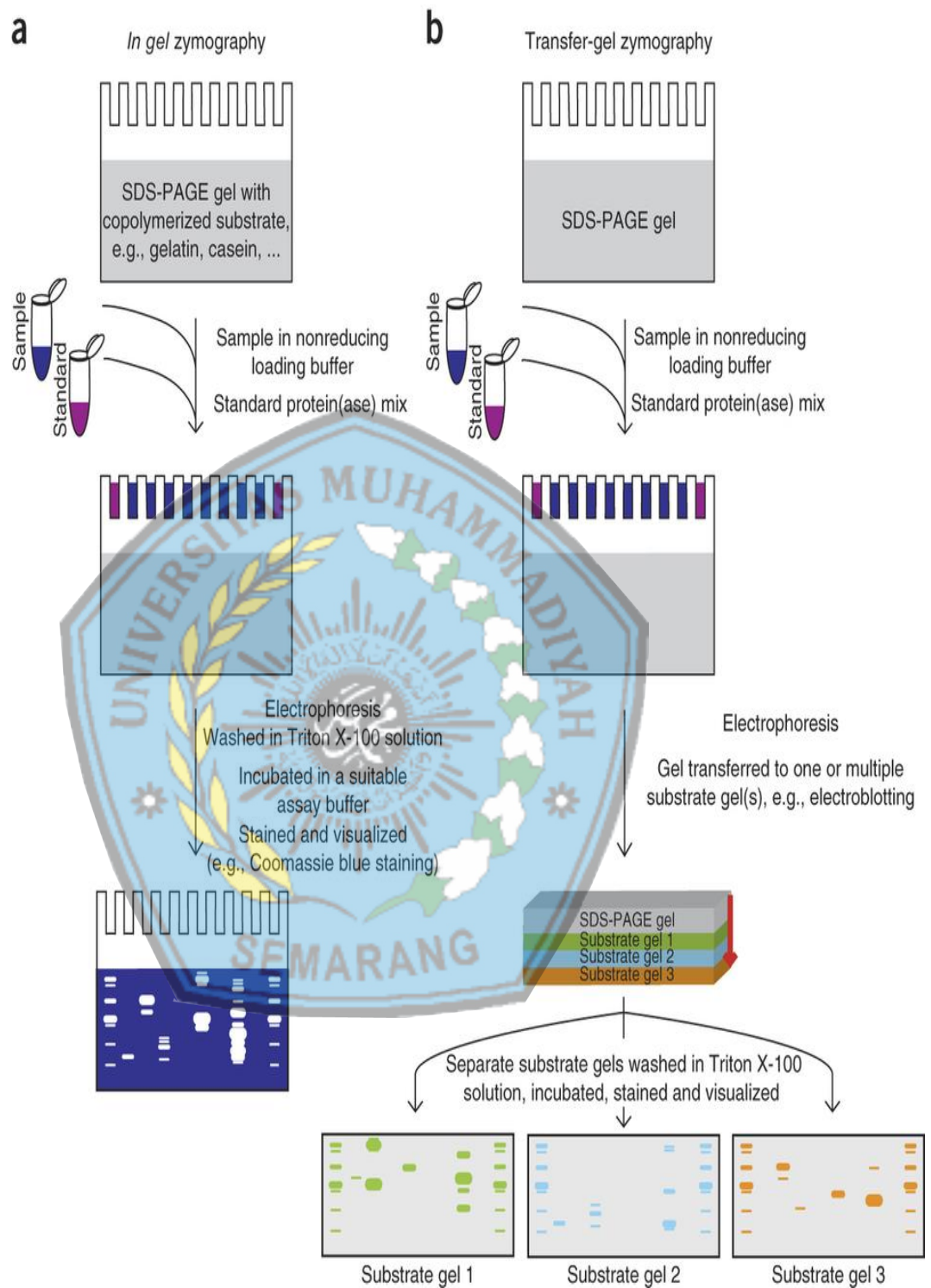
2. Prinsip Zymography

Teknik Zymography menggunakan prinsip pemisahan biomolekul berdasarkan elektroforesis baik SDS-PAGE ataupun native PAGE, dengan menambahkan substrat ke dalam gel pemisah. Kondisi yang menyebabkan protein / enzim, terdenaturasi harus diminimalkan, sehingga struktur tiga dimensi atau struktur native-nya dapat dipulihkan sehingga enzim dapat aktif kembali (renaturasi). Penambahan β -merkaeptanol atau 1,4 – ditiotreitol dan perlakuan pemanasan biasanya dihindarkan. Detergen SDS, yang merupakan komponen pada buffer sampel gel elektroforesis, akan dihilangkan dengan proses pemisahan/ elektroforesis selesai. Renaturasi ini dilakukan dengan cara merendam dan mengganti buffer yang ada pada gel elektroforesis sehingga SDS yang ada dalam gel elektroforesis dapat dihilangkan. Buffer renaturasi yang digunakan akan berbeda untuk setiap jenis enzim, demikian juga kondisi optimal proses *renaturasi* tersebut. Enzim yang telah dipulihkan strukturnya dan menjadi aktif, diinkubasi pada lingkungan optimalnya (dalam bufer dengan pH dan temperatur inkubasi yang sesuai untuk enzim) sehingga enzim mampu mendegradasi substrat dalam gel tersebut. Aktivitas enzim dalam gel akan divisualisasi sebagai zona bening sebagai hasil degradasi enzim pada substrat dalam gel dengan pewarnaan tertentu, misalnya dengan commasive blue untuk enzim protease (Ekowati, 2009).

3. Keuntungan Zymography

1. Enzimnya mampu dilihat secara visual baik dalam bentuk aktif maupun pro enzimnya.
2. Dalam bidang medis, metode ini digunakan untuk identifikasi protease dalam tumor dan kultur sel.
3. Sensitif untuk mengidentifikasi spesies enzim protease pada level pikogram.
4. Enzim mampu memecah substrat.
5. Mendeteksi enzim hidrolitik ;l berdasarkan degradasi substrat (Kleiner dan Steven 1994).

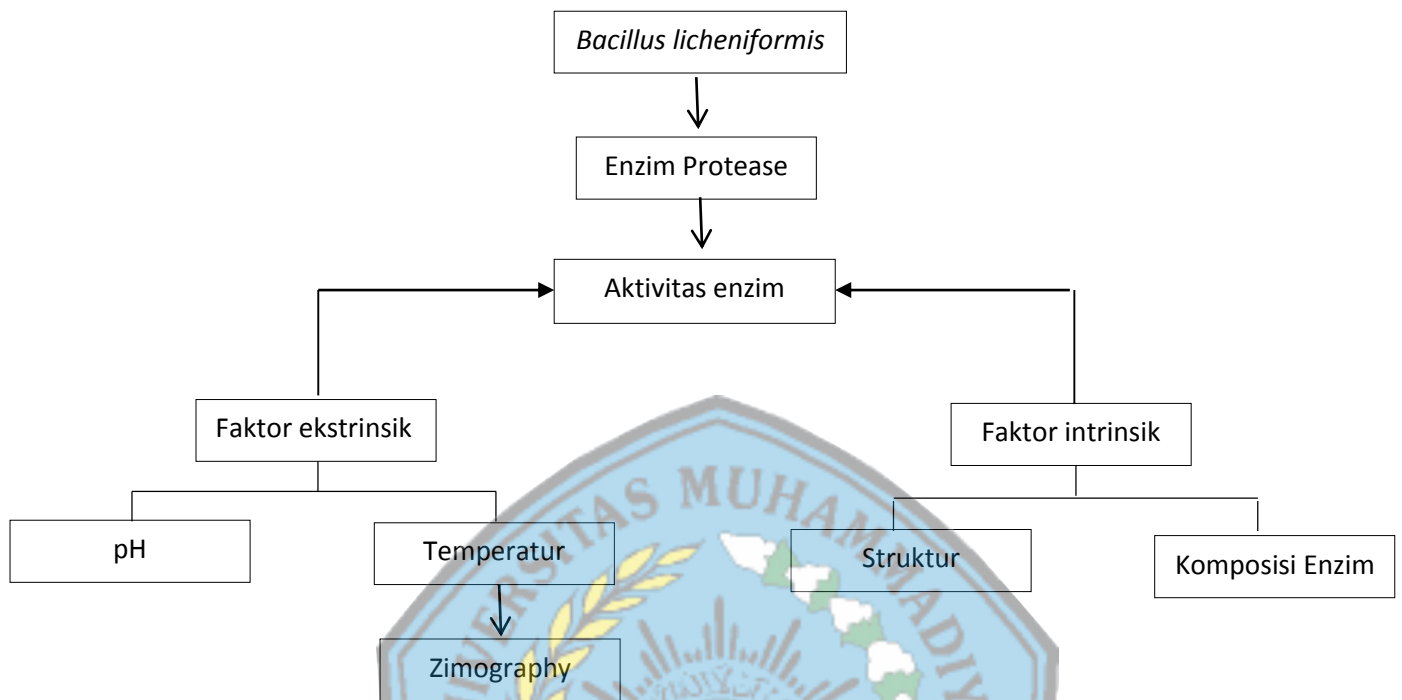




Gambar 2.7 Alur Kerja Zymography

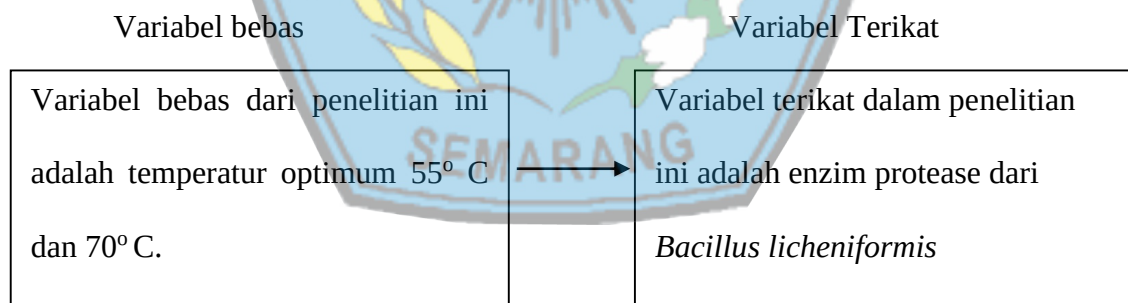
(Vandooren et al, 2013)

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.8 Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.9 Kerangka Konsep