



# Teknologi Enzim

R. Susanti  
Fidia Fibriana

## **TEKNOLOGI ENZIM**

oleh: R. Susanti & Fidia Fibrina

Hak Cipta @ 2017 pada penulis.

Editor : Aditya Ari C.  
Setter : Gerson Dullosa  
Desain Cover : Dany  
Korektor : Dian Arum

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, baik secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam atau dengan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari penulis.

Penerbit: CV ANDI OFFSET ( Penerbit ANDI )  
Jl. Beo 38-40, Telp. (0274) 561881 (Hunting), Fax. (0274)  
588282 Yogyakarta 55281

Percetakan: ANDI OFFSET  
Jl. Beo 38-40, Telp. (0274) 561881 (Hunting), Fax. (0274)  
588282 Yogyakarta 55281

### **Perpustakaan Nasional: Katalog dalam Terbitan ( KDT)**

*Susanti, R.*

**Teknologi Enzim / R. Susanti**

– Ed. I. – Yogyakarta: Andi,

26 - 25 - 24 - 23 - 22 - 21 - 20 - 19 - 18 - 17

xiv + 210 hlm; 16 x 23 Cm.

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ISBN: 978-979-29-6276-5

I. Judul

1. Enzymes

2. Fibrina, Fidia

**DDC'23: 572.7**

# **TEKNOLOGI ENZIM**

**R. Susanti**

**Fidia Fibriana**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Universitas Negeri Semarang**

## ABSTRAK

Enzim adalah benda tak hidup yang diproduksi oleh sel hidup yang menyusun sebagian besar total protein dalam sel. Enzim berfungsi sebagai biokatalisator yaitu mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa ikut terlibat dalam reaksi tersebut. Sifat enzim adalah spesifik terhadap substratnya sehingga reaksi kimia yang terjadi akan menghasilkan produk sesuai dengan spesifisitas enzim dengan substrat. Enzim sangat bermanfaat untuk diaplikasikan dalam bidang pangan, kesehatan, farmasi, energi alternatif, dan lain sebagainya. Kebutuhan akan enzim dalam kehidupan sehari-hari menuntut adanya produksi enzim secara komersial. Enzim dapat diproduksi secara komersial dengan memanfaatkan sumber yang ada di alam, meliputi sumber dari hewan, tumbuhan, jamur, alga, maupun mikroorganisme. Pemanfaatan enzim dan produksinya dari sumber alam harus didasarkan oleh berbagai pertimbangan meliputi ketersediaan sumber, jumlah enzim yang akan diperoleh dan diproduksi, aktivitas enzim, kemampuan enzim untuk diimobilisasi, serta efisiensi biaya produksi. Pengetahuan tentang teknologi enzim sangat diperlukan sebelum melakukan penelitian, produksi enzim secara komersial, serta aplikasinya dalam dunia industri.

Pengetahuan tentang teknologi enzim dapat dipelajari melalui artikel-artikel hasil penelitian yang diterbitkan di jurnal-jurnal ilmiah dalam dan luar negeri. Selain itu, pengetahuan dasar tentang teknologi enzim dapat dipelajari melalui ke-17 bab yang ada di buku ini yang meliputi: (1) Pengantar Teknologi Enzim, (2) Klasifikasi dan Tatanama Enzim, (3) Struktur Kimia Enzim, (4) Sintesis Protein, (5) Pengaturan Sintesis Enzim, (6) Katalisis Enzim, (7) Produksi Enzim dan Peningkatan Kualitas Strain, (8) Enzim Karbohidrase, (9) Selulase dan Xilanase, (10) Lipase, (11) Protease, (12) Pektinase, (13) Transglutaminase, (14) Glukosa Isomerase, (15) Prinsip Imobilisasi Enzim, (16) Pemanfaatan Enzim untuk Diagnosa dan Analisis, dan (17) Biosensor.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah swt atas anugerah-Nya sehingga buku berjudul “Teknologi Enzim” ini dapat terselesaikan. Buku ini disusun untuk memenuhi kebutuhan mahasiswa dari berbagai jurusan, seperti Biologi, Pertanian, Peternakan, Kehutanan, Farmasi, Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, Kimia, dan Teknik Kimia serta program studi lain yang berkaitan dengan Ilmu Pengetahuan Alam. Buku ini berturut-turut berisi (1) **Pengantar Teknologi Enzim**, (2) **Klasifikasi dan Tatanama Enzim**, (3) **Struktur Kimia Enzim**, (4) **Sintesis Protein**, (5) **Pengaturan Sintesis Enzim**, (6) **Katalisis Enzim**, (7) **Produksi Enzim dan Peningkatan Kualitas Strain**, (8) **Enzim Penghidrolisis Karbohidrat**, (9) **Selulase dan Xilanase** (10) **Lipase**, (11) **Protease**, (12) **Pektinase**, (13) **Transglutaminase**, (14) **Glukosa Isomerase**, (15) **Prinsip Imobilisasi Enzim**, dan (16) **Pemanfaatan Enzim untuk Diagnosa dan Analisis**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan buku ini. Semoga buku ini bermanfaat bagi dunia pendidikan dan penelitian berbasis enzim di Indonesia. Kritik dan saran demi kesempurnaan buku ini sangat penulis harapkan.

Semarang, Agustus 2016

## **PRAKATA**

Puji syukur ke hadirat Allah swt atas anugerah dan karunia-Nya sehingga buku berjudul “Teknologi Enzim” ini dapat diselesaikan. Indonesia merupakan Negara megabiodiversitas dengan kekayaan alam yang berlimpah. Kekayaan alam meliputi kekayaan spesies hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme merupakan sumber enzim yang sangat potensial untuk digali dan dikembangkan. Guna menggali potensi sumber enzim di alam Indonesia diperlukan pengetahuan yang baik mengenai teknologi enzim. Sumber referensi berbahasa Indonesia mengenai teknologi enzim masih sangat minim ditemukan. Oleh karena itu, buku ini disusun untuk memenuhi kebutuhan mahasiswa dari berbagai jurusan, seperti Biologi, Pertanian, Peternakan, Kehutanan, Farmasi, Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, Kimia, dan Teknik Kimia serta program studi lain yang berkaitan dengan Ilmu Pengetahuan Alam. Selain itu, buku ini juga dapat digunakan oleh pelaku industri khususnya yang memanfaatkan enzim dalam proses industrinya. Buku ini berturut-turut berisi tentang (1) Pengantar Teknologi Enzim, (2) Klasifikasi dan Tatanama Enzim, (3) Struktur Kimia Enzim, (4) Sintesis Protein, (5) Pengaturan Sintesis Enzim, (6) Katalisis Enzim, (7) Produksi Enzim dan Peningkatan Kualitas Strain, (8) Enzim Penghidrolisis Karbohidrat, (9) Selulase dan Xilanase (10) Lipase, (11) Protease, (12) Pektinase, (13) Transglutaminase, (14) Glukosa Isomerase, (15) Prinsip Imobilisasi Enzim, dan (16) Pemanfaatan Enzim untuk Diagnosa dan Analisis.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian buku ini. Semoga bantuan yang diberikan menjadi amalan baik yang bermanfaat bagi semua. Semoga buku ini bermanfaat bagi dunia pendidikan dan penelitian berbasis enzim di Indonesia. Tiada gading yang tak retak. Kami menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam buku ini, untuk itu, kritik dan saran demi kesempurnaan buku ini sangat penulis harapkan.

Semarang, Agustus 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Hal</b>
Halaman sampul/ <i>cover</i> .....	i
Identitas .....	ii
Abstrak .....	iii
Kata Pengantar .....	iv
Daftar Isi .....	v
Daftar Gambar.....	vi
Daftar Tabel .....	ix
BAB I Pengantar Teknologi Enzim .....	1
BAB II Klasifikasi dan Tatanama Enzim.....	6
BAB III Struktur Kimia Enzim.....	13
BAB IV Sintesis Protein .....	24
BAB V Pengaturan Sintesis Enzim .....	34
BAB VI Katalisis Enzim.....	42
BAB VII Produksi Enzim dan Peningkatan Kualitas Strain .....	59
BAB VIII Enzim Karbohidrase.....	66
BAB IX Selulase dan Xilanase .....	71
BAB X Lipase.....	76
BAB XI Protease.....	81
BAB XII Pektinase.....	91
BAB XIII Transglutaminase.....	97
BAB XIV Glukosa Isomerase.....	99
BAB XV Prinsip Imobilisasi Enzim.....	104
BAB XVI Pemanfaatan Enzim untuk Diagnosa dan Analisis .....	113
BAB XVII Biosensor .....	117
Daftar Pustaka .....	120
Glosarium.....	165
Indeks .....	169
Biodata Penulis .....	181

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Hal</b>
Gambar 1. Reaksi oksidasi glukosa oleh dua enzim yang berbeda.....	10
Gambar 2. Struktur dasar asam amino .....	19
Gambar 3. Reaksi pembentukan ikatan peptide.....	19
Gambar 4. Residu asam amino pada rantai polipeptida.....	20
Gambar 5. Struktur primer protein.....	20
Gambar 6. Struktur alpha heliks protein .....	23
Gambar 7. Struktur lembar $\beta$ protein .....	24
Gambar 8. Struktur tersier ribonuklease .....	24
Gambar 9. Contoh struktur kuarterner protein (haemoglobin) .....	25
Gambar 10. Jembatan hidrogen pada pasanganbasa komplementer.....	33
Gambar 11. Alur besar dan kecil pada struktur DNA dobel heliks .....	34
Gambar 12. Struktur jepit rambut molekul RNA.....	36
Gambar 13. Struktur tRNA .....	37
Gambar 14. Diagram sandi genetik.....	41
Gambar 15. Sintesis protein dan transport hasil sintesis protein di dalam sel .....	52
Gambar 16. Laju kecepatan reaksi hidrolisis glikosida menggunakan katalis intramolekuler dan enzim $\beta$ -galaktosidase .....	53
Gambar 17. Stereoselektivitas dalam reaksi hidrolisis enzimatik.....	55
Gambar 18. Stereospesifisitas dalam reaksi hidrolisis enzimatik .....	57
Gambar 19. A. Gambaran teori lock and key, B. Model lock and key pada proses Ikatan enzim alkohol dehidrogenase dengan substrat etanol.....	60
Gambar 20. A. Teori induced fit, B. Perubahan konformasi sisi aktif enzim supaya substrat dapat berikatan sempurna dengan enzim. ....	61
Gambar 21. Profil energi bebas dalam reaksi konversi substrat (S) menjadi produk (P) yang ikatalisis oleh enzim.....	64
Gambar 22. Mekanisme transfer grup fosforil yang dibantu enzim nukleosida monofosfat (NMP) kinase .....	65
Gambar 23. Mekanisme aksi enzim asetilkolin esterase.....	66

Gambar 24. Mekanisme kerja enzim asetoasetat dekarboksilase, menggambarkan adanya intermediet Schiff base.....	67
Gambar 25. Aktivitas katalitik sebuah metaloenzim yang memiliki ion $Zn^{2+}$ pada sisi aktifnya .....	68
Gambar 26. Mekanisme distorsi molekul/ regangan ikatan enzim-substrat .....	70
Gambar 27. Perbandingan produksi enzim yang berasal dari berbagai sumber ...	75
Gambar 28. Struktur amilosa dan amilopektin beserta enzim yang berperan memotong ikatan dalam struktur polisakarida tersebut.....	84
Gambar 29. Perubahan pati menjadi glukosa dengan bantuan enzim amylase dan maltase .....	84
Gambar 30. Struktur kimia CD- $\alpha$ , $\beta$ dan $\gamma$ (i) serta ilustrasi molekul CD (ii) A: diameter eksternal, B: diameter internal.....	85
Gambar 31. Mekanisme kerja enzim lactase dalam memecah lactose menjadi glukosa dan galaktosa .....	86
Gambar 32. Mekanisme aksi enzim invertase dalam memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa .....	86
Gambar 33. Struktur molekul rafinosa, stakhiosa dan verbaskosa .....	88
Gambar 34. Struktur molekul dekstran .....	88
Gambar 35. Struktur komponen penyusun lignoselulosa .....	89
Gambar 36. Struktur molekul lignin .....	90
Gambar 37. Struktur selulosa.....	90
Gambar 38. Struktur molekul hemiselulosa.....	91
Gambar 39. Struktur molekul xilan.....	92
Gambar 40. Ketiga jenis reaksi dikatalisis oleh selulase .....	93
Gambar 41. Hidrolisis trigliserida oleh enzim lipase.....	96
Gambar 42. Respresentasi diagramatik yang menunjukkan komponen utama dari molekul lipase.....	96
Gambar 43. Reaksi-reaksi yang dimediasi oleh lipase .....	98
Gambar 44. Aktivitas protease memecah protein/ polipeptida .....	101
Gambar 45. Distribusi penjualan enzim.....	102
Gambar 46. Struktur pektin.....	113

Gambar 47. Jenis enzim untuk mencerna pektin. ....	116
Gambar 48. Mekanisme aksi enzim pektin esterase, poligalakturonase, dan pektin liase .....	117
Gambar 49. Pektinase dalam proses ekstraksi dan klarifikasi jus buah.....	119
Gambar 50. Reaksi yang dikatalisis enzim transglutaminase, asam glutamate dan proses deamidasi yang dibantu oleh TGase .....	120
Gambar 51. Reaksi polimerisasi isomer xilosa dan glukosa yang dikatalisis oleh enzim xilosa isomerase .....	123
Gambar 52. Proses produksi sirup fruktosa dalam reaktor dengan memanfaatkan enzim glukosa isomerase .....	127
Gambar 53. Langkah krusial dalam proses konversi pati menjadi fruktosa dengan bantuan enzim. ....	128
Gambar 54. Detail proses produksi fruktosa dari pati.....	129
Gambar 55. Metode imobilisasi enzim .....	133
Gambar 56. Klasifikasi teknik imobilisasi enzim .....	133
Gambar 57. Faktor-faktor yang perlu dicermati dalam proses imobilisasi enzim .....	134
Gambar 58. Teknik imobilisasi enzim secara cross-linking .....	135
Gambar 59. Metode adsorpsi fisik .....	136
Gambar 60. Ionik antara enzim dengan matriks penukar ion .....	136
Gambar 61. Ikatan kovalen antara enzim dengan matriks binding.....	137
Gambar 62. Interaksi antara gugus hidroksil karier dengan gugus amin enzim .	137
Gambar 63. Metode imobilisasi tipe kisi, enzim tidak terikat pada matriks.....	138
Gambar 64. Penjeraban enzim dalam matriks gel poliakrilamid .....	138
Gambar 65. Mikrokapsulasi enzim dalam matriks/ membran .....	139
Gambar 66. A. Reaktor curah, B. Reaktor CSTR .....	140
Gambar 67. Packed-bed fixed reactor (PFR) .....	141
Gambar 68. A. Reaktor PFR, B. Reaktor RPCR.....	141
Gambar 69. Elemen dari biosensor .....	149

## DAFTAR TABEL

	<b>Hal</b>
Tabel 1. Contoh nama trivial enzim .....	8
Tabel 2. Contoh penamaan enzim dan permasalahannya .....	9
Tabel 3. Pembagian kelas enzim berdasarkan International Union of Biochemistry (IUB) .....	13
Tabel 4. Tata tulis asam amino .....	21
Tabel 5. Koenzim pemindah gugus dan gugus yang dipindahkan .....	28
Tabel 6. Contoh ion logam pada aktivitas enzim .....	30
Tabel 7. Beberapa variasi struktur DNA .....	35
Tabel 8. Enzim yang melibatkan peran ion logam dalam proses katalisisnya. ..	68
Tabel 9. Enzim dan sumbernya .....	77
Tabel 10. Kondisi lingkungan yang berbeda-beda antar mikroorganisme .....	81
Tabel 11. Aplikasi enzim lipase dalam dunia industri.....	100
Tabel 12. Letak situs pemotongan enzim protease pada ikatan peptide.....	103
Tabel 13. Kelas dan situs aktif eksopeptidases.....	104
Tabel 14. Produsen protease komersial dan aplikasi protease.....	111
Tabel 15. Struktur berbagai jenis molekul pektin.....	114
Tabel 16. Aplikasi enzim pektinase.....	118
Tabel 17. Aplikasi enzim transglutaminase.....	122
Tabel 18. Tingkatan rasa manis pada beberapa jenis gula.....	124
Tabel 19. Glukosa isomerase yang telah diproduksi dan dikomersialkan.....	125
Tabel 20. Keuntungan dan kerugian dari menggunakan enzim amobil untuk mengkatalisis reaksi.....	131
Tabel 21. Aplikasi dan kegunaan biosensor .....	148

## **BAB I**

### **Pengantar Teknologi Enzim**

Aktivitas sel hidup dapat dibandingkan dengan kegiatan pabrik kimia yang sangat efisien. Sel makhluk hidup dengan ukuran sangat kecil, baik sel eukariot maupun prokariot, dianggap sebagai suatu pabrik kimia yang sangat rumit. Meskipun rumit, reaksi berjalan selangkah demi selangkah secara teratur dan terarah serta bersifat khas/spesifik. Berbeda dengan mesin reaktor kimia buatan yang biasanya hanya menjalankan satu reaksi saja, suatu sel mampu menjalankan ratusan bahkan ribuan macam reaksi sekaligus. Enzim adalah pekerja dalam pabrik/reaktor sel ini. Di dalam sel, enzim bekerja untuk memudahkan ribuan reaksi kimia yang memungkinkan sel untuk hidup, memperbaiki dan membuang produk limbahnya, serta berkembang biak. Ketika enzim bekerja dengan semestinya, maka proses biokimia dalam sel akan berlangsung secara tepat. Jika terjadi malfungsi pada enzim maka akan menyebabkan keabnormalan sel. Seperti pada kasus penderita fenilketonuria, yaitu gangguan metabolisme fenilalanin sehingga menyebabkan akumulasi secara berlebihan asam amino fenilalanin dalam darah. Akumulasi fenilalanin ini disebabkan adanya gangguan pada enzim PheOH (*Phenylalanine Hydroxylase*, EC 1.14.16.1) yang mengkatalisis hidroksilasi rantai aromatik pada fenilalanin untuk membentuk tirosin. Enzim-enzim di dalam sel tidak tersebar secara merata, namun mengelompok di berbagai organel sel. Bergantung kepada jenis dan fungsi hayatinya, enzim dapat berada pada dinding atau membran sel, sitoplasma, membran mitokondria, matrik mitokondria, atau pada organel lain seperti inti sel, retikulum endoplasma, dan lisosom. Dengan teknik imunohistokimia atau sitokimia diketahui bahwa enzim-enzim yang berhubungan dengan reaksi oksidasi-reduksi bahan makanan sebagian besar terdapat di mitokondria. Enzim-enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis, sebagian besar terdapat di lisosom. Enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis asam nukleat, proses replikasi, transkripsi dan translasi protein terutama terdapat di inti sel.

Enzim adalah benda tak hidup yang diproduksi oleh sel hidup. Enzim menyusun sebagian besar total protein dalam sel. Suatu sel dapat memuat 2000 jenis molekul enzim. Enzim berfungsi sebagai biokatalisator yaitu mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa ikut terlibat dalam reaksi tersebut. Maksudnya, enzim tidak ikut berubah menjadi produk tetapi akan kembali ke bentuk asalnya setelah reaksi kimia selesai. Enzim mengubah molekul substrat menjadi hasil reaksi (produk) yang molekulnya berbeda dari substrat. Enzim merupakan katalisator (protein katalitik) untuk reaksi-reaksi kimia di dalam sistem biologi. Sebagai katalis, enzim memiliki ciri khas yaitu (1) bersifat tidak diubah oleh reaksi yang dikatalisnya, (2) enzim tidak mengubah kedudukan normal dari kesetimbangan kimia, meskipun enzim mempercepat reaksi.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi substrat, pH, suhu, dan inhibitor (penghambat). Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim dan stabilitas merupakan sifat penting enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan, penggunaan, dan kestabilan terhadap senyawa tertentu (asam, basa) serta pengaruh temperatur dan pH ekstrim.

Sebagai molekul bebas terlarut air, enzim sulit dipisahkan dari substrat dan produknya. Immobilisasi enzim merupakan salah satu upaya untuk menjadikan enzim pada kondisi tak bergerak yang tidak larut. Immobilisasi enzim dapat dilakukan dengan (1) pengikatan enzim secara kovalen pada permukaan bahan yang tidak larut air, (2) pengikatan silang dengan bahan yang cocok untuk menghasilkan partikel yang baru, (3) penjebakan di dalam suatu matrik atau gel yang permeabel terhadap enzim, substrat, dan produk, (4) enkapsulasi, dan (5) dengan absorpsi pada zat pendukung. Keuntungan immobilisasi enzim adalah (1) Memungkinkan penggunaan kembali enzim yang sudah pernah digunakan, (2) Ideal untuk proses berkelanjutan (*continuous process*), (3) Memungkinkan kontrol yang lebih akurat pada proses katalisis, (4) Meningkatkan stabilitas enzim, dan (5) Memungkinkan pengembangan sistem reaksi multienzim.

## **Penggunaan enzim dalam industri**

Daya katalis enzim telah dimanfaatkan manusia sejak jaman prasejarah. Fermentasi gula buah menjadi alkohol oleh enzim khamir telah lama ditemukan. Yogurt, makanan kuno yang sekarang populer, dibuat melalui kerja enzim dari berbagai bakteri, terutama *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Lactobacillus acidophilus*. Membuat bir dari biji-bijian, membuat adonan roti dengan khamir, serta memfermentasi air kelapa menjadi cuka adalah penerapan lain dari daya katalis enzim.

Saat ini, enzim banyak digunakan di bidang industri, terutama industri bioteknologi. Dalam bidang bioteknologi, baik konvensional maupun mutakhir, pengetahuan dan penggunaan enzim merupakan syarat mutlak. Dalam bioteknologi tradisional, seperti industri makanan tingkat rumah tangga, pengetahuan empiris tentang enzim diwariskan secara turun-temurun dan biasanya bercampur dengan pengetahuan empiris tentang penggunaan praktis mikroorganisme, yang secara umum disebut ragi. Selain industri bioteknologi, enzim juga dipakai secara luas dalam industri tekstil dan kertas. Dalam bidang teknologi lingkungan, enzim juga digunakan dalam pengolahan air limbah dan sampah, terutama sampah organik.

Kemampuan enzim yang unik dan spesifik semakin banyak digunakan dalam proses industri, yang secara kolektif dikenal dengan istilah teknologi enzim. Teknologi enzim mencakup produksi, isolasi, purifikasi, penggunaan enzim terlarut, enzim ter-immobilisasi dan penggunaan enzim dalam skala yang lebih luas melalui sistem reaktor. Peranan teknologi enzim berkontribusi pada pemecahan beberapa masalah, misalnya produksi makanan, produksi energi, dan peningkatan kualitas lingkungan. Ilmu dasar dari teknologi enzim adalah biokimia tetapi diterangkan lebih luas dengan mikrobiologi, kimia, proses dan alat teknologi yang mendukung keberadaan sains.

Pada industri pangan, baik produk pangan tradisional maupun modern, peranan enzim sangatlah penting. Sebagai contoh, sebelum dikenal teknologi modern, pemanfaatan enzim sudah dilakukan masyarakat dengan tidak sengaja. Sebelum peran enzim diketahui, peningkatan mutu daging dilakukan dengan cara

mengistirahatkan hewan sebelum dipotong, membunuhnya tanpa trauma, dan melayukan daging beberapa jam atau hari. Saat ini telah diketahui bahwa pada saat hewan diistirahatkan sebelum dipotong, merupakan suatu cara untuk menjamin ketersediaan glikogen sebagai substrat dari kerja enzim *post mortem*. Proses glikolisis *post mortem* dan protease dalam proses konversi otot menjadi daging sangat penting untuk proses selanjutnya dan dapat memperbaiki mutu daging. Banyak produk pangan lain yang didesain dengan mengembangkan kerja enzim secara tidak langsung, seperti produk yogurt, tempe, kecap, tape, sosis, dan lain-lainnya.

Aktivitas enzim yang dimanfaatkan dalam produksi pangan secara endogen berasal dari tanaman, hewan, maupun mikroorganisme. Aktivitas enzim endogen dapat dimanipulasi melalui optimasi terhadap kondisi kerja enzim (pH dan suhu) atau meningkatkan ekspresi enzim dengan teknik rekayasa genetika. Karena keterbatasan penggunaan teknik manipulasi tersebut, maka berkembang suatu ide untuk menambahkan enzim dari sumber lain (enzim eksogen). Pemanfaatan dan manipulasi kerja enzim telah pula digunakan untuk mendesain produk pangan fungsional.

Ada beberapa enzim digunakan secara umum dalam industri pangan. Pada pengolahan keju, enzim protease digunakan untuk memecah misel kasein sehingga terbentuk *curd*. Enzim  $\alpha$ -amilase digunakan dalam industri hidrolisis pati, bir, roti, dan deterjen. Dalam industri hidrolisis pati,  $\alpha$ -amilase digunakan untuk mencairkan pati yang tergelatinasi. Enzim tersebut berfungsi menurunkan viskositas pati dan menghidrolisisnya menjadi maltodekstrin. Enzim  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -glukanohidrolase) menghidrolisis ikatan internal glikosidik  $\alpha$ -1,4. Enzim  $\alpha$ -amiloglukosidase (1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolase atau glukoamilase) dari cendawan digunakan dalam produksi sirup glukosa yang setara dengan dekstrosa sebesar 95-97%. Enzim tersebut memiliki aktivitas *exoacting* yaitu melepaskan glukosa dari ujung pereduksi maltodekstrin. Enzim  $\alpha$ -amilase dari cendawan termotabil *Aspergillus niger* dan *A. oryzae* digunakan untuk produksi sirup maltosa. Produk dari enzim cendawan tersebut adalah maltosa, serta sejumlah kecil dekstrin dan glukosa. Berdasarkan alasan ekonomi,  $\alpha$ -amilase cendawan

sering digunakan bersamaan dengan amiloglukosidase untuk menghasilkan sirup campuran yang setara dengan dekstran sebesar 60%. Sirup campuran yang dihasilkan dapat digunakan sebagai substrat murah dalam industri bir dan proses fermentasi lainnya.

Enzim isomerase digunakan untuk mengubah glukosa menjadi fruktosa (pemanis alami yang paling manis) dalam industri sirup jagung. Isomerisasi ini menggunakan enzim xilosa isomerase. Dalam industri modern, penggunaan xilosa isomerase dilakukan dalam reaktor *fixed-bed* dalam bentuk ter-imbobilisasi. Xilosa isomerase yang sering digunakan berasal dari *B. coagulans*, *Streptomyces albus*, *Arthrobacter* spp., dan *Actinoplanes missouriensis*. Enzim pektinase dan laktase merupakan dua karbohidrase penting yang juga digunakan dalam industri. Pektinase digunakan untuk menjernihkan jus buah. Laktase digunakan pada industri keju untuk memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa.

Meskipun kemajuan besar telah dicapai dalam aplikasi enzim selama dekade terakhir ini, namun pengetahuan tentang fisiologi, metabolisme, enzimologi, dan genetika dari mikrobia penghasil enzim masih terbatas. Oleh karena itu, masih diperlukan penelitian mendalam tentang sifat-sifat molekuler enzim dan gen-gennya untuk dapat memahami bagaimana enzim-enzim tersebut menjalankan fungsinya pada suhu tinggi, bahkan pada suhu di atas 100 °C.

### **Penggunaan enzim untuk diagnosis**

Enzim dapat digunakan pada teknik diagnosis, yaitu (1) enzim sebagai penanda/marka diagnosa, (2) enzim sebagai reagensia diagnosis, dan (3) enzim sebagai penanda pembantu reagen. Prinsip enzim sebagai penanda diagnosis kerusakan jaringan, bahwa secara teoritis enzim intrasel seharusnya tidak terdapat pada ekstrasel dalam jumlah banyak. Namun secara normal selalu ada sejumlah kecil enzim intrasel di ekstrasel, akibat sel yang mati atau pecah. Apabila jumlah enzim intrasel ini berada di ekstrasel dalam jumlah bermakna, dapat diperkirakan terjadi banyak sel yang bocor atau mati akibat membrannya pecah. Peningkatan jumlah enzim alanin aminotransferase (ALT) atau SGPT (*serum glutamic pyruvic transferase*) (normal 1-55 U/L) dalam darah menunjukkan adanya gangguan fungsi jaringan hati. Karena enzim tersebut sangat khas dihasilkan hati.

Sebaliknya, enzim kolin esterase yang diproduksi sel hati dilepas ke darah dalam jumlah cukup besar, jika terjadi penurunan menunjukkan adanya kerusakan sel hati. Contoh lain adalah peningkatan enzim alkalin fosfatase menunjukkan adanya penyumbatan saluran empedu, peningkatan enzim gamma glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) menunjukkan penyakit hati disertai penyumbatan empedu. Peningkatan lipase dan amilase menunjukkan kerusakan sel pancreas. Enzim superoksida dismutase (SOD) dan glutathion peroksidase (GPx) untuk menunjukkan status antioksidan.

Penggunaan enzim sebagai bahan pencari penanda, dilakukan jika senyawa penanda yang ditargetkan jumlahnya sangat kecil (di bawah limit deteksi dengan metode kimia yang ada), sehingga perlu dilakukan pengukuran secara enzimatis. Contoh mikroorganisme penghasil enzim untuk reagen adalah *Aspergillus nigræ* (glukosa oksidase), *Cryptococcus* sp. (glukosa dehidrogenase), kacang-kacangan *jack bean* (urease), *Candida utilis* dan *Arthobacter globiformis* (uricase), *Pseudomonas fluorescens* (kolesterol oksidase) dan *Saccharomyces cerevisiae* (alkohol dehidrogenase).

### **Keuntungan dan kerugian menggunakan enzim**

Penggunaan enzim dalam industri pangan dilakukan karena enzim merupakan alat ideal untuk memanipulasi bahan-bahan biologis. Beberapa keuntungan penggunaan enzim dalam pengolahan pangan adalah aman terhadap kesehatan karena bahan alami, mengkatalisis reaksi yang sangat spesifik tanpa efek samping, aktif pada konsentrasi yang rendah, dapat diinaktivasi, dan dapat digunakan sebagai indikator kesesuaian proses pengolahan. Walaupun demikian, dari ribuan enzim yang ditemukan ahli biokimia, hanya sebagian kecil enzim dapat dimanfaatkan dalam industri pangan. Hal ini disebabkan oleh ketidaksesuaian kondisi reaksi enzim, ketidakstabilan enzim selama pengolahan, atau karena biaya yang terlalu mahal untuk menggunakan enzim dalam pengolahan pangan.

Salah satu pertimbangan enzim dalam industri pangan, adalah pemanfaatan enzim tersebut dapat memberikan keuntungan secara komersial. Enzim bermanfaat pada konversi bahan baku menjadi bahan yang lebih mudah

diolah. Selain untuk pengolahan yang lebih efisien dan aman, enzim dalam industri pangan dapat dimanfaatkan untuk mendesain produk pangan yang lebih mudah dicerna saat dikonsumsi. Degradasi makromolekul menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah diserap di dalam saluran pencernaan sangat diperlukan oleh orang yang bermasalah dengan produksi enzim-enzim pencernaan.

Keterlibatan enzim dalam pengolahan pangan tidak semua menguntungkan. **Enzim yang merugikan** dapat menyebabkan kerusakan pangan seperti pembusukan, perubahan flavor, warna, tekstur dan kandungan gizi pangan. Dalam pengolahan pangan, inaktivasi enzim yang tidak menguntungkan tersebut perlu dilakukan. Namun beberapa enzim alami pada makanan apabila dikonsumsi segar dapat membantu kerja pencernaan dan kerja pankreas. Bahan pangan yang melalui pemasakan (pemanasan) akan menginaktifkan enzim-enzim alami pada makanan segar. Konsumsi makanan yang dimasak dalam waktu lama, akan menyebabkan kekurangan enzim secara kronis (*chronic enzyme deficiency*) yang memberi kecenderungan pada penyakit kanker.

## BAB II

### Klasifikasi dan Tatanama Enzim

Pada awalnya, penamaan enzim tidak memiliki tata cara tertentu. Enzim diberi nama sesuai dengan kehendak penemunya, yaitu dengan mempertimbangkan sedikit atau banyak ciri dari enzim tersebut. Hal ini menyebabkan penamaan enzim dan istilah umum untuk biokatalis menjadi bermacam-macam. Pasteur menggunakan istilah ferment, sedangkan Kuhne menggunakan istilah dari bahasa Yunani, yaitu enzim.

Tidak adanya pegangan/panduan dasar penamaan enzim, muncullah nama trivial (nama umum), yang beberapa diantaranya masih digunakan hingga sekarang. Contoh nama trivial dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Contoh nama trivial enzim

No	Nama enzim	Keterangan
1	Pepsin	Dari bahasa Yunani “pepsis” (berarti pencernaan) ditambah “in”
2	Ptialin	Dari bahasa Yunani “ptualon” yang berarti liur atau dahak
3	Tripsin (trypsine)	Dari bahasa Yunani “thrupsis” yang berarti melunakkan, karena mampu melunakkan daging

Permasalahan mulai muncul dengan penamaan emulsin. Emulsin pada awalnya dikira berhubungan dengan enzim memecah lemak dalam suatu emulsi. Padahal yang dimaksud adalah enzim pemecah ikatan glikosida yang pahit pada senyawa amigdalin yang terdapat pada biji amandel. Beberapa kesulitan lain mulai muncul dengan semakin banyaknya jenis enzim yang ditemukan, sementara tidak ada acuan baku penamaannya. Penamaan berdasarkan nama organ atau organisme penghasilnya, juga menimbulkan keraguan/pemasalahan (Tabel 2).

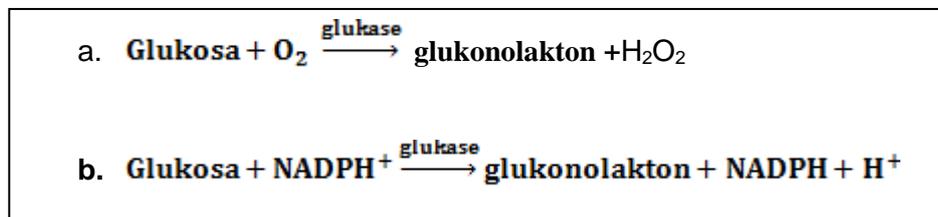
Tabel 2. Contoh penamaan enzim dan permasalahannya

No	Enzim	Permasalahan
1	Pankreatin menggantikan tripsin: dari organ pankreas	Enzim yang terdapat pada pankreas ada 3 jenis, masing-masing memecah substrat yang berbeda. Jadi tidak mungkin semua dinamai pankreatin.
2	Papain: protease dari getah pepaya	Tidak hanya enzim papain yang terdapat pada pepaya
3	Ricine: dari Ricinus	Tidak hanya enzim ricine yang terdapat pada Ricinus
4	Ficine: dari Ficus	Tidak hanya enzim ficine yang terdapat pada ficus
5	Bromelain: protease dari buah nanas. Nanas termasuk tanaman Bromeliaceae	Tidak hanya enzim bromelain yang terdapat pada nanas, bahkan pada tanaman bromeliaceae

Pada tahun 1898, Duclaux memberi nama enzim dengan penambahan –ase pada kata dasar nama enzim, misalnya amilase, lipase, isomerase, dan lain-lain. Penamaan dengan penambahan –in mulai ditinggalkan, kecuali beberapa yang sudah dikenal seperti tripsin, pepsin, fisin, risin, papain, dan beberapa enzim pemecah protein berasal dari tanaman.

#### **Penamaan berdasarkan substrat**

Penamaan enzim berdasar substrat, yang menjadi akar/dasar kata enzim adalah substrat dan ditambah akhiran –ase. Seperti enzim urease, lipase, protease, amilase, berturut-turut mengubah urea, lemak, protein dan amilum. Sistem penamaan ini tidak akan menimbulkan masalah jika jenis reaksi yang dialami oleh substrat tersebut hanya satu macam. Namun penamaan sistem ini menimbulkan masalah jika substratnya sama, dikatalisis oleh enzim yang berbeda dengan reaksi yang berbeda pula Contohnya adalah reaksi oksidasi glukosa oleh dua enzim yang berbeda (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi oksidasi glukosa oleh dua enzim yang berbeda

Pada reaksi pertama (1a) dikatalisis oleh enzim yang dihasilkan kapang *Aspergillus niger*, sementara pada reaksi kedua (1b) dikatalisis oleh enzim dalam sel darah merah manusia. Walaupun hasil akhir dari kedua reaksi tersebut menghasilkan produk yang sama, yaitu glukonolaktan, namun hasil sampingnya berbeda. Menjadi jelas bahwa 2 jenis enzim yang berbeda mengkatalisis substrat yang sama, menghasilkan produk langsung yang sama, namun produk samping yang berbeda, tidak mungkin diberi nama yang sama. Hal inilah yang menyebabkan sistem penamaan semata-mata berdasarkan substrat tidak dapat dipertahankan.

### **Penamaan berdasarkan jenis ikatan kimia substrat**

Tata nama enzim berdasar jenis ikatan kimia substrat, menjadikan jenis ikatan substrat sebagai akar/dasar kata enzim, kemudian ditambah akhiran –ase. Contohnya adalah peptidase, esterase, fosfatase, glikosidase dan nukleotidase, berturut-turut memecah/membentuk ikatan peptida, ester, fosfat, glikosida dan nukleotida. Namun secara umum, cukup banyak dikenal enzim dengan nama yang didasarkan jenis ikatan substratnya. Enzim peptidase misalnya, dikenal beberapa macam dengan spesifikasi yang berbeda-beda, yaitu aminopeptidase, karboksipeptidase dan dipeptidase. Demikian pula esterase, dikenal beberapa diantaranya asetil kolin esterase. Fosfatase diantaranya juga dikenal fosfatase alkali dan fosfatase asam. Nama-nama enzim tersebut sering dipakai dalam komunikasi ilmiah sehari-hari, meskipun tidak memiliki pembedaan kemampuan yang tajam. Tata nama ini tidak menjelaskan apakah ikatan kimia substrat yang dikatalisis tersebut dipecah atau dibentuk. Meskipun demikian, menjadi “kesepakatan umum” bahwa semua enzim tersebut mengkatalisis reaksi

pemecahan ikatan kimia substrat. Karena itulah, penamaan ini tidak dapat diaplikasikan pada enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi.

### **Penamaan berdasarkan jenis reaksi**

Pada tata nama enzim berdasar jenis reaksi, yang menjadi akar/dasar kata enzim adalah jenis reaksi ditambah akhiran *-ase*. Contohnya enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi glukosa pada Gambar 1. Nama enzim yang lebih deskriptif pada reaksi pertama (aa) adalah glukosa oksidase, sementara pada reaksi (1b) adalah glukosa dehidrogenase. Dengan cara yang sama, suatu enzim pemindah gugus dinamai transferase. Jika yang dipindahkan gugus  $-NH_2$  enzimnya disebut amino transferase atau sering disebut transaminase. Sistem penamaan berdasarkan jenis reaksi ini lebih deskriptif dan informatif. Berdasarkan asas penamaan ini, seharusnya enzim esterase, glikosidase, dan peptidase disebut hidrolase, karena enzim-enzim itu menghidrolisis ikatan kimia kovalen spesifik tersebut. Namun nama hidrolase tidak dipakai secara luas, sehingga nama generik seperti peptidase, esterase, fosfatase, dan lain-lain, tetap dipakai.

### **Pengklasifikasian enzim**

Pada saat ini, telah dikenal kurang lebih 2000 jenis enzim. Dengan semakin banyaknya jenis enzim yang ditemukan, tidak mungkin memberi nama enzim berdasarkan substrat atau jenis reaksinya. Untuk mengatasi hal tersebut, dikembangkanlah sistem klasifikasi/penggolongan. Suatu sistem penggolongan yang tepat dan deskriptif haruslah didasarkan pada suatu tata nama yang tepat pula. Pada uraian sistem penamaan tersebut di atas, terlihat bahwa penamaan yang kurang tepat akan memberikan hasil yang kurang memuaskan.

Berdasarkan perkembangannya, ada beberapa penggolongan enzim. Pada tahun 1933, Baldwin menggolongkan enzim berdasarkan jenis reaksi kimianya ke dalam 4 kelompok. Kelompok pertama adalah golongan hidrolase dan enzim yang melakukan hidrasi dan dehidrasi. Kelompok kedua adalah enzim pemindahan dan isomerisasi. Kelompok ketiga adalah oksidase, dan kelompok keempat adalah dehidrogenase. Klasifikasi Baldwin belum menghasilkan tata nama yang deskriptif dan informatif, terlihat bahwa pada kelompok pertama terdapat enzim yang bukan/tidak melakukan hidrolase.

Pada tahun 1958, dua enzimolog Dixon dan Webb mengklasifikasikan enzim berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis ke dalam 3 kelompok. Kelompok A adalah kelompok enzim yang melakukan hidrolisis, kelompok B mengkatalisis pemindahan gugus, serta kelompok C adalah enzim lain selain kelompok A dan B. Klasifikasi Dixon dan Webb belum menghasilkan tata nama yang deskriptif dan informatif, serta tidak adanya ketegasan pengelompokan dengan adanya kelompok “lain-lain”.

Menyadari pentingnya klasifikasi dan tata nama enzim, pada tahun 1955 *International Union of Biochemistry* (IUB) bekerja sama dengan *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) membentuk komisi pakar untuk mengklasifikasikan enzim. Dasar pengklasifikasian yang dilakukan komisi pakar IUB adalah jenis reaksi. Komisi ini mengelompokkan semua jenis enzim yang ada ke dalam 6 kelas (Tabel 3). Keenam kelas disusun dalam urutan tertentu dan diberi nomor yang tetap dan tidak boleh diubah-ubah. Keenam kelompok/kelas utama enzim tersebut adalah oksidoreduktase (kelompok 1), transferase (kelompok 2), hidrolase (kelompok 3), liase (kelompok 4), isomerase (kelompok 5) dan ligase (kelompok 6).

- 1. Oksidoreduktase** mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi, dan biasanya menggunakan koenzim NAD, NADP, FAD, Lipoat atau Koenzim Q. Termasuk golongan enzim oksidoreduktase adalah **dehidrogenase, oksidase, peroksidase, reduktase, hidroksilase dan oksigenase.**
- 2. Transferase** adalah enzim yang mengkatalisis pemindahan gugus tertentu seperti gugus 1-karbon, aldehyd dan keton, asil, glikosil, fosfat atau gugus yang mengandung S. Termasuk dalam kelompok enzim transferase adalah enzim **aminotransferase, asil karnitin transferase, transkarboksilase, transaldolase dan transketolase, glukokinase dan piruvat kinase.**
- 3. Hidrolase** adalah enzim yang mengkatalisis peningkatan pemecahan ikatan antara karbon dengan atom lainnya melalui penambahan molekul air. Termasuk kelompok enzim hidrolase adalah enzim **esterase, amidase, peptidase, fosfatase, dan glikosidase.**

4. **Liase** adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan karbon-karbon, karbon-sulfur, dan karbon-nitrogen. Termasuk kelompok enzim liase adalah enzim **dekarboksilase, aldolase, sintase, hidrase atau dehidratase, deaminase, nukleotida siklase.**
5. **Isomerase** adalah enzim yang mengkatalisis raseminasi optik atau isomer geometrik dan reaksi oksidasi reduksi intramolekuler tertentu. Termasuk kelompok enzim isomerase adalah enzim **epimerase, rasemase, mutase dan isomerase.**
6. **Ligase** adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan sulfur, karbon dengan nitrogen, serta karbon dengan oksigen. Untuk membentuk ikatan tersebut diperlukan energi ATP. Termasuk kelompok enzim ligase adalah enzim **sintetase dan karboksilase.**

Tabel 3. Pembagian kelas enzim berdasarkan *International Union of Biochemistry* (IUB)

Kelompok dan sub kelompok Enzim	Contoh
1. Oksidoreduktase: mengkatalisis reaksi oksidasi - reduksi 1.1. Pada CH-OH 1.2. Pada C=O 1.3. Pada C=C	Dehidrogenase Oksidase Reduktase Peroksidase Katalase Oksigenase Hidroksilase
2. Transferase: reaksi transfer grup/gugus 2.1. Gugus C1 2.2. Gugus aldehida atau keton 2.3. Gugus asil 2.4. Gugus glikosil	Transaldolase Transketolase Asil, metil, glikosil dan fosforiltransferase Kinase Fosfomutase

<p>3. Hidrolase: reaksi pemecahan ikatan antara karbon dengan atom lainnya melalui penambahan molekul air</p> <p>3.1. Ikatan ester</p> <p>3.2. Ikatan glikosida</p> <p>3.3. Ikatan eter</p> <p>3.4. Ikatan peptida</p> <p>3.5. Ikatan amida</p>	<p>Esterase</p> <p>Amidase</p> <p>Peptidase</p> <p>Fosfatase</p> <p>Glikosidase</p> <p>Fosfatase</p> <p>Tiolase</p> <p>Fosfolipase</p> <p>Deaminase</p> <p>Ribonuklease</p>
<p>4. Liase: reaksi pemecahan karbon-karbon, karbon-sulfur, dan karbon-nitrogen</p> <p>4.1. C-C</p> <p>4.2. C-O</p>	<p>Dekarboksilase</p> <p>Aldolase</p> <p>Sintase</p> <p>Hidrase</p> <p>Dehidratase</p> <p>Liase</p>
<p>5. Isomerase: reaksi isomerisasi</p> <p>5.1. Rasemasi</p> <p>5.2. Cis-Trans isomerisasi</p> <p>5.3. Oksidoreduktase intra molekuler</p>	<p>Rasemase</p> <p>Isomerase</p> <p>Mutase</p> <p>Epimerase</p>
<p>6. Ligase: reaksi pembentukan ikatan</p> <p>6.1. C-O</p> <p>6.2. C-S</p> <p>6.3. C-N</p> <p>6.4. C-C</p>	<p>Sintetase</p> <p>Karboksilase.</p>

Penggolongan enzim secara internasional tersebut dilakukan secara sistematis. Berdasarkan klasifikasi tersebut, suatu enzim diberi nama dengan menggabungkan sistem penomoran dengan nomor sandi sistematis (*enzyme code*: EC) dan nama yang ditulis dengan nama tertentu. Tata nama bersistem untuk enzim, serupa dengan sistem IUPAC dalam tata nama senyawa organik. Setiap

enzim ditulis dengan empat digit angka (nomor EC) dalam suatu katalog enzim. Angka pertama menunjukkan keanggotaan pada salah satu dari enam kelompok utama, dan dua angka berikutnya menunjukkan sub-kelompok dan sub-sub kelompok. Sementara angka terakhir adalah nomor enzim yang bersangkutan pada sub-sub kelompok atau nama khusus enzim (jika ada). Nama enzim ditulis dengan 2 kata, kata pertama adalah nama substrat, dan kata kedua salah satu dari 6 jenis reaksi yang dikatalisis dan berakhiran -ase. Misalnya enzim alkohol dehidrogenase bernomor EC 1.1.1.1 (artinya digit ke-1 : kelas oksidoreduktase, digit ke-2: sub kelompok gugus CH-OH sebagai donor elektron, digit ke-3: sub-sub kelompok NAD<sup>+</sup> sebagai akseptor, dan digit ke-4: nama khusus yang telah dikenal).

Tata nama IUB mampu membedakan satu jenis enzim dengan lainnya, serta memberikan kejelasan reaksi yang dikatalisis. Tata nama juga mempermudah penamaan enzim yang baru ditemukan. Penamaan dengan 4 digit tidak memungkinkan 2 enzim berbeda memiliki nomor yang sama. Meskipun demikian, penamaan menurut IUB ini cukup panjang untuk ditulis dan cukup rumit untuk diingat dan digunakan dalam komunikasi lisan. Hal inilah yang menyebabkan sejumlah enzim lebih diingat dengan nama generiknya, seperti laktat dehidrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), dan lain-lain.

Tata nama IUB juga memiliki kelemahan. Enzim pepsin, tripsin, kimotripsin, elastase, papain, bromelain dan sejenisnya, tidak dapat dinomori selengkap enzim lain. Nama substrat enzim ini juga tidak spesifik, karena memecah seluruh protein asal memiliki residu asam amino tertentu. Enzim ini hanya dapat diberi nomor 3 saja. Tata nama IUB juga belum mampu mengklasifikasikan dan menamai isozim, yaitu enzim-enzim dengan struktur yang berbeda tetapi mengkatalisis reaksi yang sama. Contohnya enzim LDH memiliki 5 bentuk isozim yang terdapat pada jaringan yang berbeda-beda. Kelima jenis LDH ini mengkatalisis reaksi yang sama, serta substrat dan koenzim yang sama pula.

### **Pengklasifikasian enzim berdasarkan biosintesis dan tempat bekerjanya**

Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah jumlah enzim dalam sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon. Contoh enzim konstitutif adalah enzim  $\alpha$ -amilase, contoh enzim induktif adalah enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa.

Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim (enzim intraseluler), dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan dari sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya.

Semua jenis klasifikasi dan tata nama enzim yang telah diuraikan di atas memiliki kekurangan dan kelebihan masing-masing. Namun, klasifikasi dan tata nama berdasarkan IUB-lah yang paling banyak dipakai di buku-buku dan jurnal-jurnal ilmiah. Penggunaan nama trivial lebih banyak digunakan pada bidang industri atau aplikasi di masyarakat secara umum.

### **BAB III**

#### **Struktur Kimia Enzim**

Meskipun tidak semua enzim merupakan protein, namun sebagian besar enzim adalah protein yang tersusun atas asam-asam amino. Kemampuan enzim untuk mengkatalisis suatu reaksi erat hubungannya dengan **struktur tersier atau kuartener** dari molekul protein penyusunnya. Faktor lingkungan yang mempengaruhi struktur protein juga mempengaruhi aktivitas enzim. Struktur enzim tidak sederhana, dengan beraneka pilinan, lipatan atau konformasi. Hal ini bukan saja memberikan keunikan enzim, tetapi juga menimbulkan tapak aktif yang khas. Rantai polipeptida yang melipat-lipat tersebut membentuk sebuah gumpalan yang dinamakan **globula**, oleh karena itu enzim termasuk dalam golongan **protein globular**.

Tidak jarang satu jenis enzim terdiri dari beberapa rantai polipeptida yang masing-masing membentuk gumpalan (dinamakan subunit). Subunit yang satu dengan lainnya berikatan melalui **ikatan non-kovalen**. Kemantapan bangun enzim seperti halnya pada protein lainnya disebabkan oleh ikatan silang **jembatan disulfida** dan gaya-gaya lain seperti **ikatan van der Waals** dan gaya tarik/tolak elektrostatis. Ikatan atau interaksi di dalam keseluruhan molekul ialah interaksi elektrostatis, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, maupun gaya van der Waals dapat dipengaruhi oleh lingkungan dan pada keadaan ekstrim bahkan dapat mengubah konformasi enzim secara keseluruhan, dan menurunkan aktivitasnya. Apabila ikatan itu putus maka aktivitas enzim menurun bahkan tidak aktif sama sekali. Salah satu contoh adalah enzim ribonuklease, merupakan protein globular, terdiri dari tiga rantai polipeptida (**struktur tersier**) yang dihubungkan melalui ikatan disulfida.

Enzim yang paling kecil memiliki berat molekul 10-15 kDa, yang berukuran sedang sekitar 100 kDa seperti laktat dehidrogenase. Enzim yang terbesar adalah glutamin sintase yang tersusun 12 subunit dengan ukuran lebih dari 500 kDa. Meskipun demikian, ada enzim yang strukturnya bukan protein, yaitu asam ribonukleat (RNA). RNA jelas bukan merupakan protein, tetapi RNA

tertentu akan memperlihatkan aktivitas katalitik yang sangat spesifik bagi substrat tertentu. RNA yang memenuhi semua kriteria klasik untuk didefinisikan sebagai enzim, disebut ribozim. Meskipun substrat yang dikatalisis oleh ribozim hanya terbatas pada ikatan fosfodiester RNA, spesifitas kerjanya sepenuhnya sebanding dengan kerja enzim yang klasik. Ribozim mengatalisis reaksi trans esterifikasi dan akhirnya reaksi hidrolisis ikatan fosfodiester dalam molekul RNA, yang diperlancar oleh gugus OH.

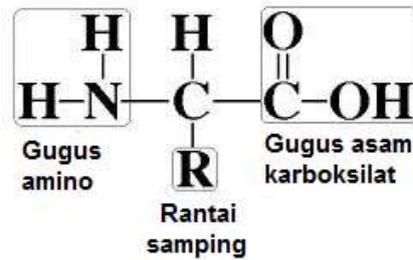
Berdasarkan uraian di atas, struktur enzim (kecuali ribozim) memiliki kesamaan dengan struktur protein. Dengan demikian, struktur enzim dapat dipelajari dengan mempelajari struktur protein. Terdapat 4 macam struktur enzim yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener.

### **Struktur primer**

Struktur primer protein adalah urutan asam-asam amino yang membentuk rantai polipeptida. Struktur ini merupakan sekuen/urutan asam amino, yang dihubungkan ikatan peptida, membentuk rantai polipeptida. Sekuen asam amino menentukan struktur molekul yang lain. Satu perubahan dalam struktur primer dapat menyebabkan perubahan biologi yang signifikan dalam struktur maupun fungsinya. Jika terdapat beberapa sistein (sistein) dalam sekuen asam amino, sistein-sistein (C-C) tersebut sering bereaksi membentuk ikatan disulfida. Bentuk C-C ini merupakan bagian dari struktur primer.

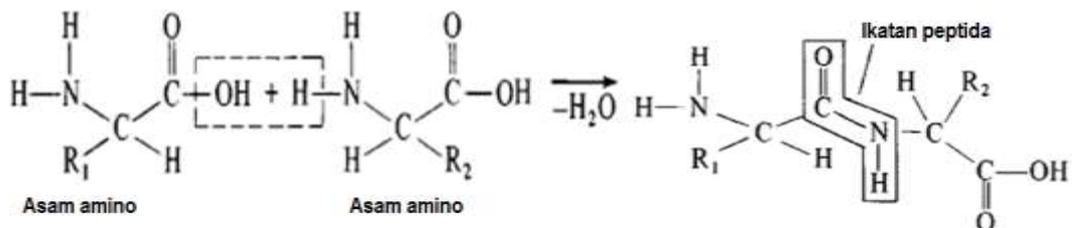
Struktur sekunder, tersier dan kuartener sebagian besar protein terbentuk secara spontan setelah sintesis. Kemungkinan informasi untuk konformasi protein yang aktif secara biologik, disandikan di dalam urutan asam aminonya. Dalam keadaan fisiologik, pelipatan protein menguntungkan struktur alamiah (*native*) protein. Jika protein kehilangan konformasi alamiahnya disebut denaturasi protein. Denaturasi terjadi jika nilai pH terlalu ekstrim, suhu ekstrim, atau penambahan pelarut organik seperti detergen dan substansi lainnya. Konformasi protein distabilkan dengan bantuan interaksi, seperti jembatan hidrogen, jembatan disulfida, interaksi elektrostatik dan pembentukan kompleks dengan ion logam. Faktor lain yang sangat penting dalam stabilisasi konformasi protein adalah efek hidrofobik.

Asam amino adalah senyawa yang memiliki 2 gugus fungsi yaitu gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dan gugus karboksilat (-COOH) yang terikat secara kovalen pada atom karbon. Dua gugus lainnya pada karbon adalah hidrogen dan gugus R yang merupakan rantai samping asam amino (Gambar 2).



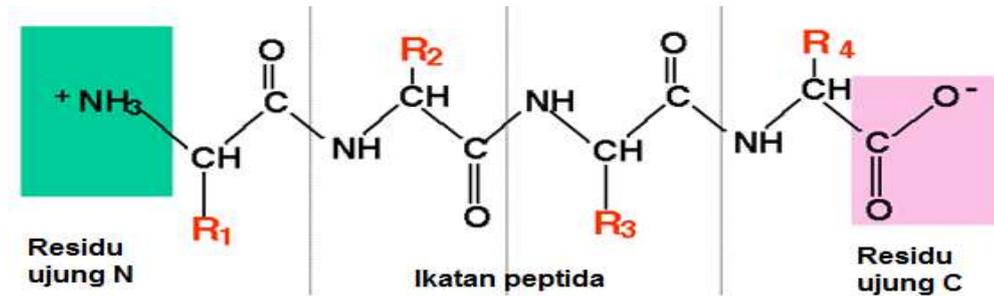
Gambar 2. Struktur dasar asam amino

Asam amino dihubungkan dengan asam amino lain melalui ikatan peptida, membentuk protein. Ikatan peptida dibentuk dari gabungan antara gugus amino dari satu asam amino dengan gugus karboksil dari asam amino lainnya, melalui ikatan amida (Gambar 3).



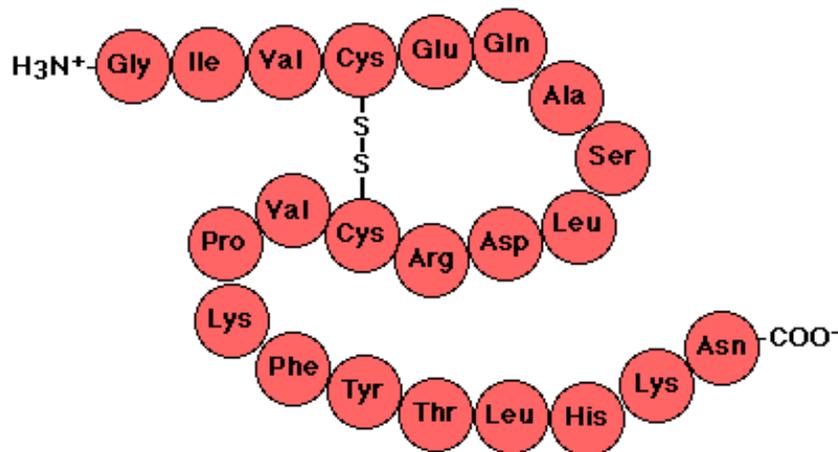
Gambar 3. Reaksi pembentukan ikatan peptida

Semua asam amino yang terikat dalam peptida dinamakan residu asam amino. Residu asam amino pada salah satu ujung rantai yang memiliki gugus amino bebas disebut residu ujung N, dan residu dengan ujung karboksilat bebas disebut residu ujung C (Gambar 4). Semua peptida yang memiliki lebih dari sepuluh residu asam amino disebut polipeptida.



Gambar 4. Residu asam amino pada rantai polipeptida

Struktur peptida ditulis dengan urutan nama asam amino dari kiri (ujung N) ke kanan (ujung C). Penyebutan asam amino dapat ditulis secara lengkap (bahasa Inggris atau bahasa Indonesia) sesuai bahasa yang digunakan, atau menggunakan 3 huruf pertama (dari ejaan bahasa Inggris), atau singkatan satu huruf (kapital) (Tabel 4). Contoh struktur primer protein tersaji pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur primer protein (pramudibel.blogspot.com)

Tabel 4. Tata tulis asam amino

No	Nama asam amino	Penyebutan dalam bahasa Indonesia	Singkatan 3 huruf	Singkatan 1 huruf
1	<b>Glycine</b>	Glisina/Glisin	Gly	G
2	<b>Alanine</b>	Alanina/Alanin	Ala	A
3	<b>Valine</b>	Valina/Valin	Val	V
4	<b>Leucine</b>	Leusina/Leusin	Leu	L
5	<b>Isoleucine</b>	Isoleusina/Isoleusin	Ile	I
6	<b>Proline</b>	Prolina/Prolin	Pro	P
7	<b>Serine</b>	Serina/Serin	Ser	S
8	<b>Threonine</b>	Treonina/Treonin	Thr	T
9	<b>Phenylalanine</b>	Fenilalanina/Fenilalanin	Phe	F
10	<b>Tyrosine</b>	Tirosina/Tirosin	Tyr	Y
11	<b>Tryptophane</b>	Triptofan	Trp	W
12	<b>Aspartate</b>	Aspartat	Asp	D
13	<b>Glutamate</b>	Glutamat	Glu	E
14	<b>Asparagine</b>	Asparagina/Asparagin	Asn	N
15	<b>Glutamine</b>	Glutamina/Glutamin	Gln	Q
16	<b>Lysine</b>	Lisin	Lys	K
17	<b>Arginine</b>	Arginina/Arginin	Arg	R
18	<b>Histidine</b>	Histidina/Histidin	His	H
19	<b>Cysteine</b>	Sisteina/Sistein	Cys	C
20	<b>Metionine</b>	Metionina/Metionin	Met	M

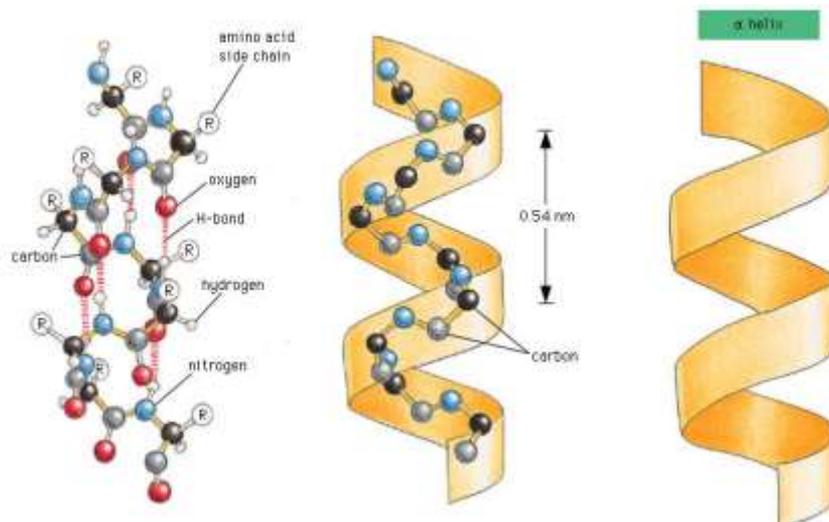
### Struktur sekunder

Struktur sekunder protein adalah daerah pada rantai polipeptida yang terstabilisasi dengan jembatan H (hidrogen) dan membentuk konformasi yang terdefinisi. Ikatan hidrogen terbentuk diantara atom-atom di sepanjang tulang punggung (*backbone*) rantai polipeptida. Interaksi intermolekul, melalui rantai samping asam amino membentuk pola lipatan dari rangka protein menghasilkan

pola tiga dimensi berulang. Pada sebagian besar protein globular, struktur heliks- $\alpha$  (atau  $\alpha$ -*helix*) dan lembar bergelombang  $\beta$  (atau  $\beta$ -*sheet*) dijumpai berdampingan. Disamping itu, terdapat juga daerah yang tidak beraturan (sulur/pilinan acak) atau *random coil* dari rantai peptida.

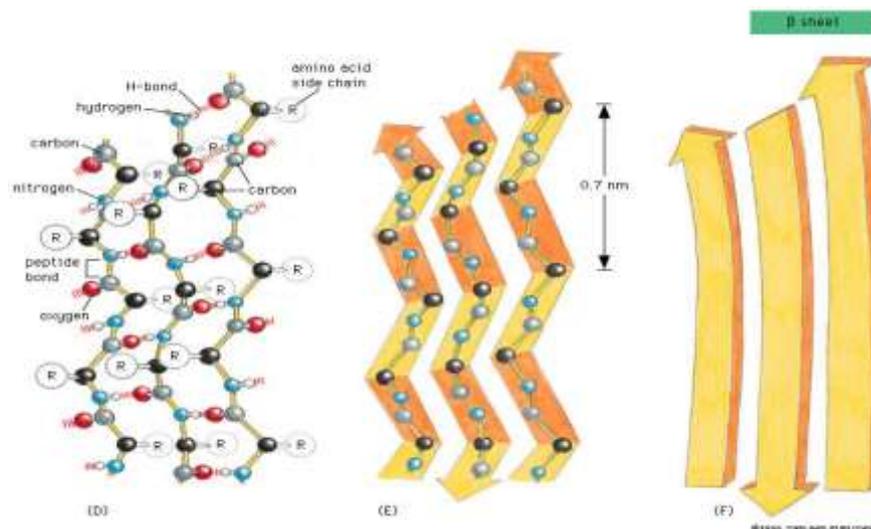
Alpha helix ( $\alpha$ -Heliks) yang berputar ke kanan ( $\alpha$ R), merupakan struktur sekunder yang paling banyak dijumpai pada protein. Pada struktur alpha heliks rantai peptida menggulung seperti sulur. Pada setiap putaran sulur, kurang-lebih terdiri 3,6 rantai asam amino. Jarak terkecil antara dua titik yang ekuivalen pada kedua rantai adalah 0,54 nm. Alpha heliks distabilkan oleh jembatan hidrogen yang hampir lurus antara gugus NH dan CO dari dua residu asam amino yang terpisah satu sama lain sebanyak empat residu. Pada alpha heliks yang lebih panjang, sebagian besar dari mata rantai asam amino ikut ambil bagian pada dua jembatan H. Sementara alpha heliks yang berputar ke kiri ( $\alpha$ L) tidak pernah dijumpai di alam. Struktur ini merupakan bayangan cermin heliks  $\alpha$ R.

Bentuk heliks lain ditemukan pada kolagen (komponen matriks jaringan ikat). Heliks kolagen ini adalah heliks yang berputar ke kiri, dengan jarak antara dua mata rantai sebesar 0,96 nm dan 3,3 rantai asam amino setiap putaran. Heliks kolagen lebih terjal dari heliks- $\alpha$ . Namun, pada heliks kolagen tidak mungkin dijumpai jembatan hidrogen. Struktur heliks kolagen distabilkan oleh gabungan dari 3 heliks bersama-sama menjadi satu heliks tiga sepilin (tripel heliks kolagen) yang berputar ke kanan. Struktur alpha heliks protein tersaji pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur alpha heliks protein

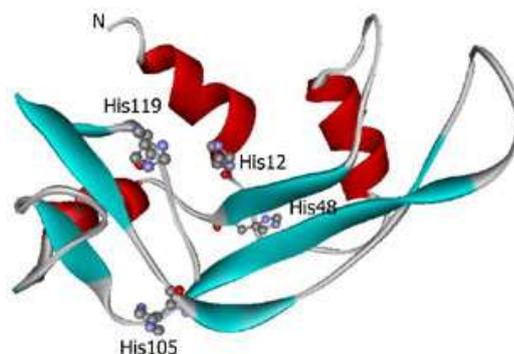
Konformasi struktur sekunder lainnya adalah struktur lembar bergelombang, dengan bidang peptida seperti lembaran kertas yang dilipat-lipat secara teratur. Jembatan hidrogen hanya terbentuk antara rantai-rantai yang berdampingan. Bila kedua rantai peptida berada dalam arah yang berlawanan, dikenal lembar bergelombang antiparalel. Jika kedua rantai peptida berjalan searah, dikenal lembar bergelombang paralel. Bila rantai peptida berubah arah, sering ditemukan suatu struktur yang dikenal dengan Pada struktur ini, keempat rantai asam amino diatur sedemikian rupa sehingga arah jalan yang seharusnya dari rantai peptida dibalik  $180^\circ$  ke arah yang berlawanan. Ada dua tipe dari lembaran  $\beta$ , yaitu tipe I dan II. Keduanya distabilkan oleh jembatan hidrogen. Struktur lembar- $\beta$ .protein tersaji pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur lembar  $\beta$  protein

### Struktur tersier

Konformasi tiga dimensi dari suatu protein yang terlipat dan aktif secara biologis, dikenal sebagai struktur tersier. Struktur tersier protein terbentuk karena terjadinya pelipatan (*folding*) rantai  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, maupun *random coil* suatu polipeptida, membentuk globular, yang struktur tiga dimensinya lebih rumit daripada protein tersebut. Interaksi intra molekuler seperti ikatan hidrogen, ikatan ion, van der Waals, dan ikatan hidrofobik turut menentukan orientasi struktur tiga dimensi dari protein. Beberapa protein telah dapat ditentukan strukturnya, misalnya haemoglobin, mioglobin, lisozim, ribonuklease dan kimotripsinogen. Contoh struktur tersier ribonuklease tersaji pada Gambar 8.



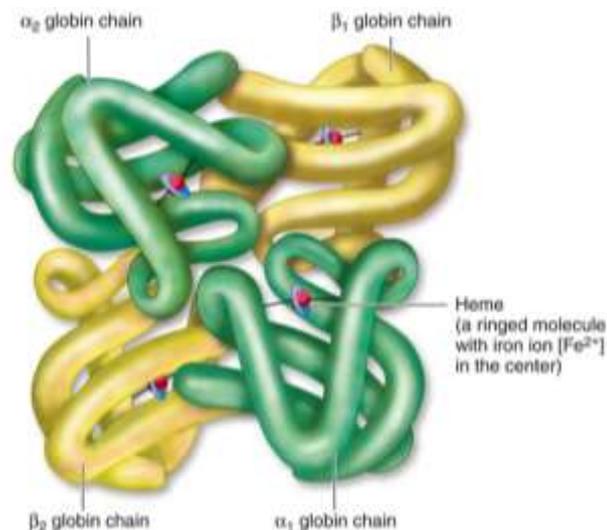
Gambar 8. Struktur tersier ribonuklease

(<http://www.chm.bris.ac.uk/polyketide/nmr.htm>)

## Struktur kuartener

Beberapa protein tersusun lebih dari satu rantai polipeptida. Struktur kuartener protein menggambarkan subunit-subunit yang berbeda dipak atau dihimpun bersama-sama membentuk struktur protein. Beberapa molekul protein dapat berinteraksi secara fisik tanpa ikatan kovalen membentuk oligomer yang stabil (misalnya dimer, trimer, atau kuartomer) dan struktur kuartener.

Kemantapan struktur kuartener suatu protein oligomer disebabkan oleh interaksi dan ikatan non-kovalen yang lemah antara masing-masing sub bagiannya. Kemampuan untuk berhimpun diri dari beberapa sub bagian ini merupakan ciri struktur kuartener suatu protein oligomer. Struktur kuartener yang terkenal adalah enzim Rubisco. Sementara, protein kuarternern yang paling banyak dipelajari adalah molekul haemoglobin manusia. Haemoglobin tersusun 4 subunit, dua rantai polipeptida  $\alpha$  dan dua rantai polipeptida  $\beta$ . Gambaran struktur kuarternern terlihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Contoh struktur kuarternern protein (haemoglobin)

Struktur protein dapat diketahui dengan kristalografi sinar-X ataupun spektroskopi NMR (*Nuclear magnetic resonance*). Namun, kedua metode tersebut sangat memakan waktu dan relatif mahal. Metode prediksi struktur protein yang ada saat ini dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok, yaitu metode pemodelan

protein komparatif dan metode pemodelan *de novo*. Pemodelan protein komparatif (*comparative protein modelling*) dapat meramalkan struktur protein berdasarkan struktur protein lain yang telah diketahui. Salah satu penerapan metode ini adalah homologi modelling, yaitu prediksi struktur tersier protein berdasarkan atas kesamaan struktur primer protein.

Prediksi struktur protein dengan pendekatan *de novo* atau *ab initio*, struktur protein ditentukan dari sekuen primernya tanpa membandingkan dengan struktur protein lain. Terdapat banyak kemungkinan dalam pendekatan ini, misalnya dengan menirukan proses pelipatan (*folding*) protein dari sekuen primernya menjadi struktur tersiernya (misalnya dengan simulasi dinamika molekuler), atau dengan optimasi global fungsi energi protein.

Selain kedua model tersebut di atas, prediksi struktur protein dapat ditelusuri dengan ilmu bioinformatika. Meskipun hanya memiliki tingkat akurasi 70-75%, namun akurasi struktur dua dan tiga dimensi protein akan semakin meningkat seiring dengan semakin banyaknya penelitian di bidang bioinformatika. Prediksi struktur protein berasal dari sekuen asam amino yang tersedia di situs GenBank. Struktur 3D (tiga dimensi protein) dapat ditelusuri atau diketahui dengan menu-menu pilihan di website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yaitu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### **Komponen lain dari Enzim**

Seperti diungkap sebelumnya, komponen utama penyusun enzim adalah protein. Meskipun ada beberapa enzim hanya terdiri dari protein saja, seperti pepsin dan tripsin, tetapi sebagian besar enzim memerlukan komponen selain protein. Enzim yang mempunyai gugus bukan protein, termasuk golongan protein majemuk. Enzim semacam ini (holoenzim) terdiri atas protein (apoenzim) dan suatu gugus bukan protein. Sebagai contoh enzim katalase, terdiri atas protein dan feriprotorfirin. Ada juga enzim yang terdiri atas protein dan logam, misalnya askorbat oksidase adalah protein yang mengikat tembaga. Bagian yang bukan protein dari suatu enzim, namun penting untuk aktivitas katalitik enzim disebut kofaktor. Kofaktor terbagi menjadi 3 macam, yaitu gugus prostetik, koenzim dan ion metal.

**Gugus prostetik** adalah senyawa organik yang berikatan kuat dengan apoenzim, dan selama reaksi berlangsung tidak akan dilepaskan, sulit terurai. Contoh gugus prostetik adalah heme dan FAD. Heme merupakan gugus prostetik yang terikat permanen pada tapak aktif dari enzim peroksidase dan katalase. Flavin adenin dinukleotide (FAD) merupakan gugus prostetik dari enzim suksinat dehidrogenase (yaitu enzim yang mengkatalisis perubahan suksinat menjadi fumarat pada reaksi siklus Kreb's).

**Koenzim** adalah senyawa organik yang berasosiasi dengan apoenzim dan bersifat sesaat (tidak permanen), biasanya berlangsung pada saat katalisis. Secara katalitik koenzim bersifat tidak aktif, sehingga dapat disebut kosubstrat. Koenzim mudah dipisahkan secara dialisis. Selanjutnya, koenzim yang sama dapat menjadi kofaktor pada enzim yang berbeda. Pada umumnya, koenzim tidak hanya membantu enzim memecah substrat tetapi juga bertindak sebagai aseptor sementara untuk produk yang terjadi. Kebanyakan komponen kimia koenzim merupakan derivat dari vitamin B.

Bentuk koenzim aktif dari Vitamin B1 (tiamin) adalah Tiamin Pirofosfat (TPP). TPP memegang peranan penting dalam transformasi energi, konduksi membran dan saraf serta dalam sintesis pentosa. Riboflavin (Vitamin B2) terutama berfungsi sebagai komponen koenzim FAD dan Flavin Adenin Mononukleotida (FMN). FMN dan FAD bertindak sebagai gugus prostetik pada enzim *Oksidoreduktase*. Niasin (Vitamin B3) berfungsi sebagai komponen koenzim Nikotinamida Adenin Dinukleotida (NAD) dan Nikotinamida Adenin Dinukleotida Fosfat (NADP), yang berada di semua sel dan berperan sebagai kofaktor berbagai oksidoreduktase yang terlibat dalam glikolisis, metabolisme asam lemak dan respirasi sel. Asam pantotenat (Vitamin B5) merupakan prekursor dari koenzim dari Ko-A dan *acyl carrier protein* (ACP). Dalam keadaan difosforilasi, vitamin B6 (piridoksal) berperan sebagai koenzim berupa piridoksal fosfat (PLP) dan piridoksamin fosfat (PMP) dalam berbagai reaksi transaminasi. Koenzim derivat dari vitamin B12 (kobalamin) yang aktif adalah metilkobalamin dan deoksiadenosil-kobalamin.

Ditinjau dari fungsinya, dikenal adanya koenzim yang berperan pada reaksi oksidasi-reduksi dan sebagai pemindah gugus. Semua enzim oksidoreduktase memerlukan koenzim. Koenzim yang penting untuk reaksi redoks adalah NAD dan NADP, FMN dan FAD serta asam lipoat. NAD dan NADP merupakan koenzim dehidrogenase. Koenzim ini mentransport ion hidrida dan selalu bekerja dalam bentuk larut. Sebagian besar koenzim FMN dan FAD terikat erat pada enzim. Kedua koenzim ini serupa dan dapat dijumpai pada reaksi-reaksi dengan enzim dehidrogenase, oksidase dan monooksigenase. Asam lipoat terutama berperan pada dekarboksilasi oksidatif asam 2-keto.

Koenzim dapat diklasifikasikan menurut gugus yang pemindahannya dipermudah oleh koenzim tersebut, yaitu (1) koenzim pemindah gugus bukan hidrogen (Gula fosfat, KoA-SH, TPP, PLP, Koenzim folat, Biotin, Koenzim kobamida (B<sub>12</sub>), Asam lipoat), dan (2) koenzim pemindah gugus hidrogen (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD, Asam lipoat, Koenzim Q). Koenzim pemindah gugus dan gugus yang dipindahkan serta contoh enzimnya terdapat pada Tabel 5.

Tabel 5. Koenzim pemindah gugus dan gugus yang dipindahkan

No	Koenzim	Gugus Yang dipindahkan	Contoh enzim
1.	NAD	Hidrogen	Gliseraldehid fosfat dehidrogenase
2.	NADP	Hidrogen	Glukosa 6-P dehidrogenase
3.	FMN	Hidrogen	D dan L- asam amino oxidase
4.	FAD	Hidrogen	Suksinat dehidrogenase, gliserol 3P dehidrogenase
5.	Ko-Q (Koenzim Q atau Quinon)	Hidrogen	Suksinat dehidrogenase
6.	Asam lipoat	Hidrogen	Piruvat dehidrogenase

			$\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenase
7.	Nukleosida fosfat (ATP, ADP, GTP, GDP)	Gugus fosfat	Fosfoglukomutase, heksokinase
8.	Piridoksal fosfat (PLP)	Gugua amino, residu asam amino	Transaminase, rasemasinase, dekarboksilasi asam amino
9.	Tetrahidrofolat (THF)	Gugus C1: folmil-, metilen-, metil-	C1 transferase
10.	Biotin	Karboksil (CO <sub>2</sub> )	Karboksilase
11.	Ko-A (Koenzim A)	Residu asil	Asil transferase, Ko-A transferase
12.	TPP (Tiamin pirofosfat)	Residu hidroksi-alkil	Dekarboksilase, Asam okso dehidrogenase, transketolase

Koenzim dapat dianggap sebagai substrat sekunder, berdasarkan dua alasan penting. Alasan pertama, perubahan kimia di dalam koenzim terjadi dengan mengimbangi perubahan kimia yang berlangsung di dalam substrat. Sebagai contoh, dalam reaksi oksidoreduksi, jika satu molekul substrat dioksidasi, satu molekul koenzim akan direduksi. Alasan kedua, aspek reaksi katalisis dengan koenzim mempunyai makna fisiologik mendasar yang lebih besar. Sebagai contoh, peran penting kemampuan otot yang bekerja secara anaerob untuk mengubah piruvat menjadi laktat tidak terletak pada piruvat ataupun laktat. Reaksi tersebut semata-mata bertujuan mengoksidasi koenzim NADH yang tereduksi menjadi NAD<sup>+</sup>. Proses tersebut merupakan proses regenerasi NAD<sup>+</sup>. Tanpa NAD<sup>+</sup>, glikolisis tidak dapat berlanjut dan sintesis ATP anaerob (dan dengan demikian, aktivitas kerjanya) akan terhenti. Pada keadaan anaerob, reduksi piruvat

menjadi laktat menghasilkan oksidasi ulang NADH dan memungkinkan sintesis ATP.

Ion metal merupakan salah satu bentuk kofaktor yang diperlukan untuk aktivitas enzim tertentu. Ion metal tersebut membentuk ikatan koordinasi (*coordination bond*) dengan rantai spesifik pada tempat aktif dan pada saat yang sama membentuk satu atau lebih ikatan koordinasi pula dengan substrat. Ikatan koordinasi adalah suatu ikatan kovalen khusus antara oksigen dan nitrogen dengan ion metal tertentu. Adanya ikatan tersebut akan membantu polarisasi di dalam substrat, sehingga dapat dipecah oleh enzim. Sebagai contoh disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Contoh ion logam pada aktivitas enzim

No	Ion logam	Contoh enzim
1	Zn <sup>2+</sup>	Karbonat anhidrase, Karboksipeptidase, Alkohol dehidrogenase
2	Mg <sup>2+</sup>	Heksokinase, Fosfohidrolasa, Fosfotransferasa
3	Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup>	Sitokrom, Peroksida, Katalase, Feredoksin
4	Cu <sup>2+</sup> / Cu <sup>+</sup>	Askorbat oksidase, Asam urat oksidase, Sitokrom oksidase
5	K <sup>+</sup>	Piruvat kinase (juga memerlukan Mg <sup>2+</sup> )
6	Na <sup>+</sup>	ATPase membrane sel (juga memerlukan K <sup>+</sup> dan Mg <sup>2+</sup> )

Berdasarkan uraian di atas, secara umum kofaktor mempunyai peran sebagai berikut:

1. Kofaktor berperan melengkapi struktur tempat aktif atau memodifikasi tempat aktif sedemikian rupa sehingga substrat dapat melekat
2. Kofaktor bereaksi sebagai donor elektron atau donor atom bagi substrat
3. Kofaktor dapat bertindak sebagai resipien sementara dari produk suatu reaksi, atau elektron maupun proton yang selanjutnya dapat kembali ke bentuk semula setelah reaksi selesai
4. Kofaktor bersama dengan residu tertentu pada tempat aktif dapat mempolarisasi molekul substrat sehingga mudah mengalami perubahan pada proses katalitik.

## **BAB IV**

### **Sintesis Protein**

#### **DNA berisi materi genetik pada makhluk hidup**

*Deoxyribonucleic acid* (DNA) berfungsi sebagai molekul hereditas atau pewarisan sifat. Sebagai molekul pembawa informasi genetik, molekul DNA menyandi urutan asam amino dari protein fungsional. Fragmen-fragmen DNA yang informasinya diubah menjadi molekul protein fungsional, disebut dengan gen. Pada sel eukariot, DNA terdapat di dalam nukleus dan mitokondria (sel hewan) atau kloroplas (sel tumbuhan), sedangkan pada sel prokariot, terdapat dalam sitoplasma dan plasmid. Informasi keturunan diletakkan dalam urutan basa dari molekul-molekul DNA. Urutan dari salah satu rantai DNA akan diterjemahkan melalui suatu proses transkripsi menjadi suatu urutan *ribonucleic acid* (RNA) yang komplementer. Molekul RNA yang terbentuk, berfungsi sebagai matrik untuk sintesa protein (mRNA) atau menerima fungsi tersendiri (rRNA, tRNA atau snRNA). Pada eukariot, hanya fragmen-fragmen gen tertentu yang mengandung sandi genetik, fragmen tersebut disebut ekson. Sementara fragmen yang tidak menyandi disebut intron, yang terletak diantara ekson. Setelah transkripsi, intron akan dipisahkan dari hnRNA yang pertama-tama terbentuk. Hal ini terjadi selama proses pematangan RNA yang memodifikasi kedua ujung RNA. RNA yang matang akan meninggalkan inti sel, dan di sitoplasma akan berikatan dengan ribosom, sehingga RNA akan diterjemahkan menjadi bahasa asam amino. Penerjemahan tersebut dikenal dengan istilah translasi. Pada proses ini berperan tRNA yang mengenali urutan RNA tertentu yang disebut kodon. tRNA sebelumnya akan diaktivasi sehingga membawa asam amino tertentu.

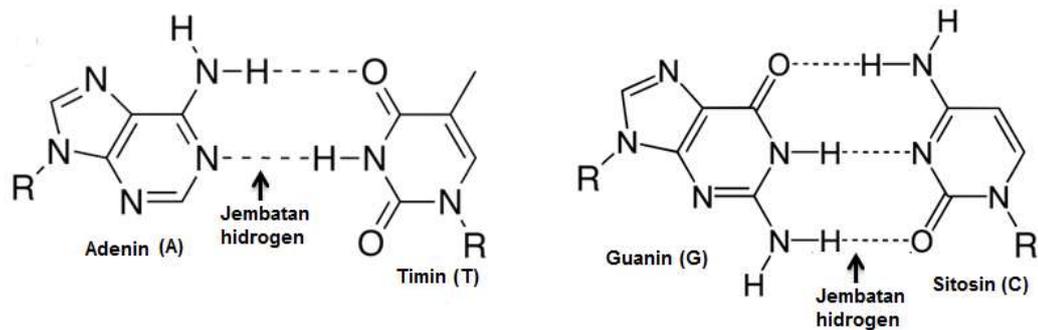
Pada pembelahan sel, informasi genetik akan diteruskan ke sel-sel anak dengan cara membuat salinan dari keseluruhan DNA melalui proses replikasi. Jadi sel-sel anak mengandung molekul DNA yang identik dengan sel induk.

## **Molekul DNA dan RNA**

DNA dan RNA merupakan dua bentuk utama asam nukleat yang fungsi utamanya menyimpan dan mengekspresi informasi genetik. DNA berfungsi sebagai pembawa informasi, sedangkan RNA berperan pada sebagian besar langkah ekspresi gen atau biosintesis protein. Keduanya merupakan polimer linier, tidak bercabang dan tersusun dari subunit-subunit nukleotida. Satu nukleotida terdiri dari tiga bagian yaitu (1) gula berkarbon lima (pentosa), (2) basa organik heterosiklik (mengandung karbon, nitrogen dan berbentuk datar) dan (3) gugus fosfat bermuatan negatif, yang membuat polimer asam nukleat bersifat asam. DNA dan RNA dapat dibedakan dari jenis gulanya. Pada RNA, gula pentosanya adalah ribosa, sedangkan pada DNA gula pentosanya mengalami kehilangan satu atom oksigen (O) pada posisi karbon (C) nomor 2' sehingga dinamakan gula 2'-deoksiribosa.

DNA yang utuh terdiri dari dua molekul polideoksinukleotida (untai). Setiap basa dalam satu untai DNA berhubungan dengan satu basa sejdodoh (**komplementer**) pada rantai lainnya melalui **jembatan hidrogen** (H). Dalam hal ini adenin (A) sejdodoh dengan timin (T), dan guanin (G) sejdodoh dengan sitosin (C). Jadi pada setiap pasangan basa berperan satu basa purin dan satu basa pirimidin.

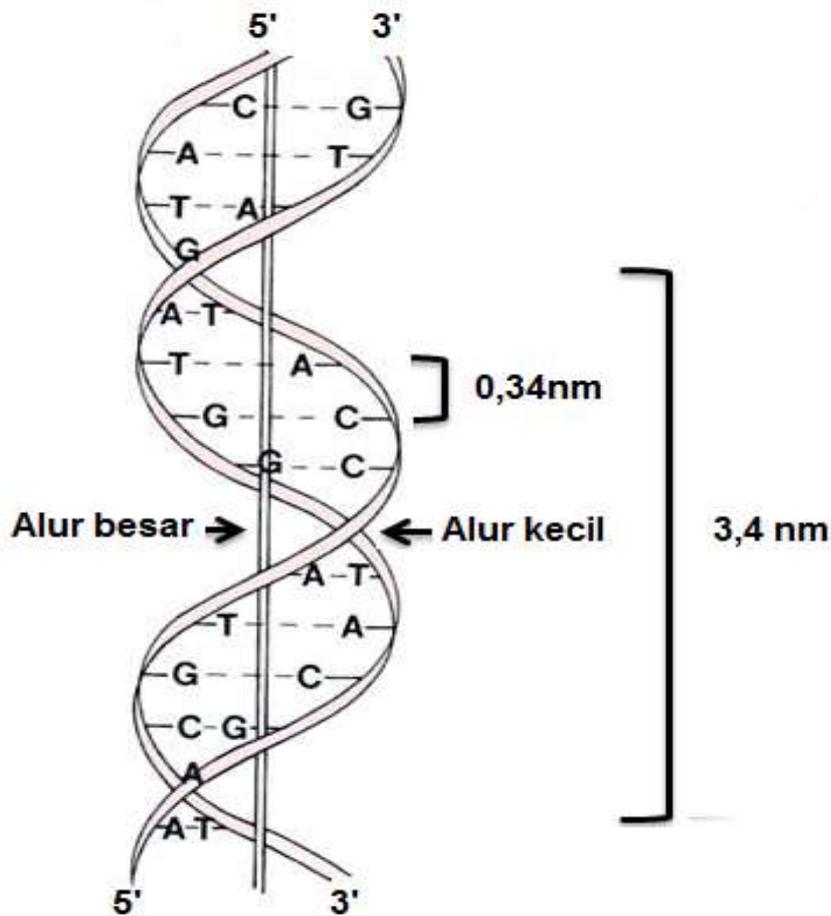
Terjadinya pasangan sejdodoh antara A dan T atau C dan G adalah masuk akal, bila diamati jembatan hidrogen yang mungkin terbentuk antara basa-basa tersebut. Bertindak sebagai donor adalah gugus-gugus amino (adenin, guanin, sitosin), dan gugus cincin NH (guanin, timin). Akseptornya adalah atom karbonil oksigen (timin, sitosin, guanin) dan atom nitrogen di dalam cincin. Karena itu, pada pasangan A-T dapat terbentuk dua jembatan hidrogen, dan pada pasangan G-C terbentuk tiga jembatan hidrogen yang linier dan sangat stabil (Gambar 10). Urasil yang terdapat pada RNA (sebagai pengganti timin), bila berpasangan dengan basa akan bertindak seperti timin. Model yang diformulasikan J. Watson dan F. Crick pada tahun 1953 menerangkan perbandingan yang konstan antara jumlah A dan T terhadap jumlah G dan C.



Gambar 10. Jembatan hidrogen pada pasangan basa komplementer (A-T dan G-C)

DNA terdiri atas dua rantai polinukleotida yang saling berpilin membentuk **helix**. Struktur DNA yang seperti ini merupakan struktur sekunder DNA. Bentuk helik ini dikemukakan pertama kali oleh Watson dan Crick. Masing-masing polinukleotida merupakan **polimer linier** dari **monomer deoksinukleotida** yang dihubungkan melalui ikatan **fosfodiester**. Ikatan ini menghubungkan atom C3' dari satu deoksinukleotida dengan atom C5' dari deoksiribosa nukleotida berikutnya, sehingga pada **ujung-5'** DNA selalu terdapat gugus fosfat bebas; sedangkan pada **ujung-3'** terdapat gugus hidroksil bebas.

Atom karbon pada posisi 3' (C3') pada deoksiribosa berikatan dengan fosfat pada posisi C5' deoksinukleotida berikutnya membentuk 'tulang belakang' DNA. Bagian ini dapat dianggap sebagai **batang tangga**. Di bagian dalam, basa nukleotida saling komplementer A–T serta G–C membentuk ikatan hidrogen, ibarat **anak tangga**. Cincin-cincin aromatik tersusun kurang lebih membentuk sudut siku-siku terhadap sumbu heliks dan berjarak 0,34 nm. Setiap basa berputar dengan sudut 35° terhadap basa yang berada di belakangnya. Satu putaran penuh dari heliks ganda (360°) mengandung sekitar 10 pasangan basa (disingkap bp) dan mempunyai panjang sebesar 3,4 nm. Bagian dalam dari heliks ganda DNA bersifat nonpolar. Sebaliknya permukaan molekul bersifat polar dan bermuatan negatif, disebabkan oleh residu gula dan residu fosfat dari tulang punggung DNA. Antara kedua untai pada keseluruhan panjang DNA terdapat dua jenis alur yaitu **alur kecil** dan **alur besar** (Gambar 11).



Gambar 11. Alur besar dan kecil pada struktur DNA doble heliks

Karena kedua untai DNA hanya dipertahankan melalui interaksi non kovalen, maka heliks ganda DNA dapat dipisahkan menjadi dua untai tunggal dengan cara pemanasan (**denaturasi**). Bila kemudian dilakukan pendinginan secara perlahan-lahan, maka basa-basa dari kedua untai tunggal tersebut dapat kembali berpasangan dan membentuk heliks ganda seperti sebelumnya (**renaturasi**). Denaturasi dan renaturasi DNA memainkan peranan penting pada teknologi gen.

#### **Bentuk dan struktur fisik DNA**

Struktur DNA yang paling umum terdapat di alam adalah struktur yang dikemukakan Watson dan Crick, yaitu heliks ganda putar kanan (*right-handed helix*), atau searah jarum jam. Setiap putarannya 10 basa DNA, namun demikian

jumlah putaran ini ternyata juga bervariasi. Struktur DNA kemungkinan juga bervariasi, tidak hanya helix putar kanan. Variasi struktur DNA terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Beberapa variasi struktur DNA

Tipe untaian	Pasangan basa/putaran	Rotasi/pasangan basa	Diameter untaian (Å, Angstrom)
A	11	+32,7°	23
B	10	+36,0°	19
C	9,33	+38,6°	19
Z	12	-30,0°	18

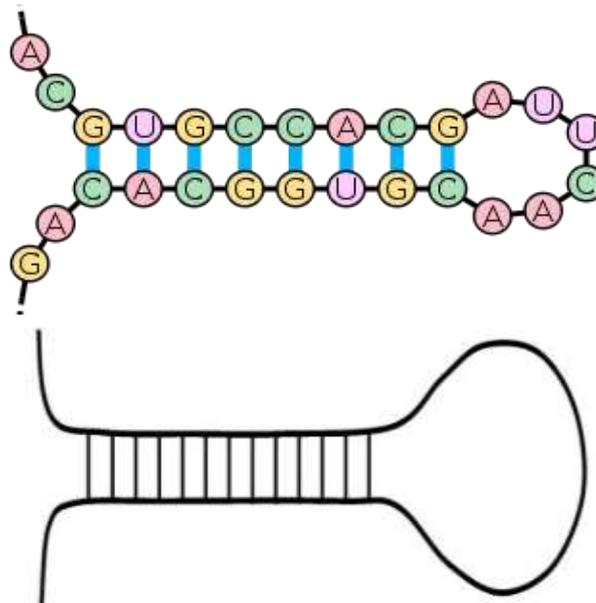
Sumber: Lewin 1987. Rotasi nilai positif (+) berarti memutar ke kanan, dan nilai negatif (-) berarti memutar ke kiri.

Struktur DNA yang telah dibahas tersebut di atas (menurut Watson dan Crick) merupakan tipe B. Lekukan besar pada tipe B lebih mudah mengikat protein tertentu dibandingkan tipe A, karena lekukan besar tipe A lebih dalam. Bentuk A lebih menyerupai konformasi bagian untai ganda molekul RNA (seperti tRNA) dan hidrid DNA-RNA. Bentuk C, kemungkinan tidak ada pada kondisi *in vivo*. Bentuk lain seperti D dan E juga hanya terjadi secara *in vitro*, terutama pada molekul DNA yang tidak memiliki basa guanin. Bentuk D dan E memiliki pasangan basa masing-masing 8 dan 7,5 per putaran.

Satu-satunya bentuk DNA yang memutar ke kiri adalah bentuk Z, yang memiliki kerangka gula-fosfat zigzag (sehingga disebut Z). Bentuk ini pertama kali dikemukakan Alexander Rich. Struktur ini hanya terjadi pada molekul DNA yang memiliki poli (CG) serta polinukleotida dengan pola purin-pirimidin bergantian seperti GCGCGCGCGC atau ATATATATAT. DNA Z hanya memiliki satu kelukan dengan kepekatan muatan negatif lebih besar dibandingkan tipe B. Bentuk Z secara *in vitro* terjadi pada kondisi kadar garam yang tinggi. Secara *in vivo*, bentuk Z dapat terjadi pada kondisi sitosin termetilasi membentuk 5-metilsitosin.

## Struktur RNA

Struktur RNA tidak memiliki kemampuan membentuk heliks ganda, sehingga molekul RNA kurang teratur dibandingkan DNA. Molekul RNA biasanya berantai tunggal, tetapi dapat melingkar membentuk bentukan “jepit rambut” (hair pin) (Gambar 12). Pada struktur jepit rambut, struktur melingkar difasilitasi oleh ikatan hidrogen diantara basa-basa komplementer pada rantai yang sama. Sel memiliki 3 bentuk RNA, yaitu RNA-ribosom (rRNA), RNA-*messenger* (mRNA/RNA utusan) dan RNA-transfer (tRNA). rRNA merupakan 65% dari struktur ribosom. mRNA ditranskripsi dari molekul DNA, membawa informasi untuk sintesis protein dalam sel. Berbeda dengan DNA yang bersifat utuh dan tidak berubah selama hidup sel, molekul mRNA berumur pendek (sekitar 1 jam), dengan cepat akan dirombak menjadi molekul nukleotida penyusunnya.

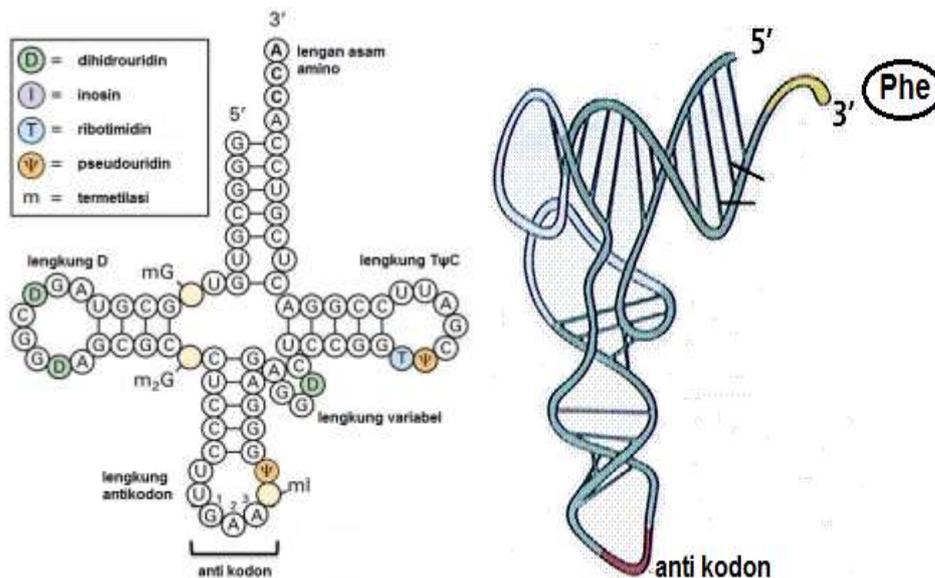


Gambar 12. Struktur jepit rambut molekul RNA

Molekul tRNA berperan sebagai penghubung antara tingkat asam nukleat dengan tingkat protein. Strukturnya kecil, terdiri 70-90 basa dan mampu mengenali kodon pada mRNA tertentu melalui pemasangan basa. Setiap sel minimal memiliki 1 jenis tRNA untuk setiap jenis asam amino. Semua tRNA memiliki kemiripan struktur. tRNA pada ujung 3' (urutan ...CCA) membawa asam amino

tertentu yang berhubungan dengan kodon mRNA yang bersangkutan. Kodon pada mRNA merupakan hasil transkripsi dari DNA sebagai pembawa sandi genetik.

Struktur tRNA fenilalanin pada khamir berbentuk seperti daun semanggi (Gambar 13). Seperti DNA, sebagian besar basa tRNA terdapat di bagian dalam molekul, dan tulang punggungnya yang bersifat polar terletak di permukaan. Kecuali pada tiga basa antikodon yang harus berinteraksi dengan mRNA, terletak di permukaan. Seperti disebutkan sebelumnya, bahwa pada tRNA memiliki basa yang tidak lazim dan mengalami modifikasi. Sejumlah besar pemasangan basa yang menyimpang, justru berperan menstabilkan konformasi molekul tRNA ini.



www.studyblue.com

Gambar 13. Struktur tRNA

### Replikasi DNA

Untuk meneruskan informasi genetik, sebelum pembelahan sel, harus dibuat satu salinan dari genom. Replikasi DNA terutama dikatalisis oleh enzim polimerase DNA yang bergantung pada DNA. Enzim ini memerlukan satu DNA untai tunggal yang disebut sebagai untai cetakan dan mensintesis untai kedua yang komplementer, sehingga dihasilkan suatu DNA heliks ganda lengkap.

Saat ini telah diketahui gambaran yang tepat tentang replikasi pada prokariot, sementara pada eukariot relatif lebih rumit dibanding prokariot. Namun,

sebagian besar proses replikasi pada prinsipnya sama. Pada buku ini akan dibahas replikasi pada bakteri *Eschericia coli*. Replikasi akan dimulai pada tempat tertentu DNA yang disebut *origin of replication* (ORI; awal mula replikasi). Selanjutnya akan terbentuk garpu replikasi yang berjalan ke dua arah yang berlawanan. Pada garpu replikasi, kedua untai direplikasi bersamaan. Setiap garpu mengandung sedikitnya 2 molekul DNA polimerase III dan serangkaian enzim lainnya (topoisomerase DNA dan helikase). Topoisomerase aktivitasnya mengendurkan jalinan untai ganda DNA. Helikase memisahkan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal dan protein-protein yang terikat pada untai tunggal. Untai cetakan selalu dibaca dengan arah 3'→5', sehingga hanya satu dari kedua untai tunggal yang direplikasi secara tidak terputus. Untuk untai yang kedua, arah pembacaan berlawanan dengan arah pergerakan garpu. Pada untai cetakan tersebut, pertama-tama dibentuk untai yang baru dalam bentuk potongan DNA yang terpisah, yang kemudian disebut fragmen Okazaki (nama penemunya). Setiap fragmen dimulai dengan suatu urutan awal yang pendek (disebut primer) dari RNA. Primer ini diperlukan agar polimerase DNA dapat berfungsi. Primer RNA disintesis oleh suatu polimerase RNA yang khusus (disebut primase). Primer tersebut akan diperpanjang sekitar 1000-2000 komponen deoksinukleotida oleh enzim polimerase DNA III. Selanjutnya, sintesis fragmen Okazaki berhenti dan akan dimulai sintesis okazaki baru pada suatu primer RNA lainnya lagi. Pada mulanya, masing-masing fragmen okazaki yang terbentuk tidak saling berhubungan satu dengan lainnya, dan masih mengandung RNA pada ujung 5'. Setelah garpu replikasi berjalan dengan jarak tertentu, baru dimulai kerja enzim polimerase DNA I (yaitu menggantikan primer RNA dengan DNA). Akhirnya, celah yang tertinggal diantara dua fragmen Okazaki ditutup oleh enzim ligase DNA. Pada suatu heliks ganda DNA yang terbentuk dengan cara tersebut, hanya satu untai DNA yang disintesis baru, artinya replikasi bersifat semikonservatif.

### **Transkripsi**

Agar informasi genetik yang disimpan di dalam DNA dapat digunakan, maka harus disalin ulang dalam bentuk RNA (ditranskripsi). DNA hanya berfungsi sebagai pola. Selama proses transkripsi, DNA tidak akan mengalami

perubahan. Fragmen DNA yang dapat ditranskripsi adalah yang mengandung sandi genetik.

Transkripsi dikatalisis oleh enzim polimerase RNA yang tergantung pada DNA (yang bekerja seperti polimerase DNA, namun yang ditambahkan ribonukleotida dan bukan deoksiribonukleotida). Sel eukariot setidaknya memiliki 3 polimerase RNA. Polimerase RNA I mensintesis suatu RNA yang berfungsi sebagai prekursor untuk 3 RNA ribosom. Produk polimerase RNA II adalah hnRNA yang kemudian akan menjadi mRNA, dan juga prekursor snRNA. Polimerase RNA III mentranskripsi gen yang mengandung sandi genetik untuk tRNA, 5S-rRNA dan snRNA tertentu. Dari prekursor-prekursor ini akan mengalami pematangan RNA, dan membentuk molekul RNA fungsional.

Polimerase RNA II terikat pada ujung 3' daerah promotor yang memiliki *TATA box* (kotak TATA). Daerah tersebut merupakan potongan rangkaian basa pendek yang kaya nukleotida A dan T. Kotak TATA bervariasi dari satu gen ke gen lainnya. Suatu urutan basa yang khas untuk kotak TATA (urutan konsensus) ialah ...TATAAA. Untuk interaksi polimerase dengan daerah promotor tersebut mutlak diperlukan lebih dari satu protein, dikenal sebagai faktor transkripsi basal. Faktor tambahan lainnya dapat menstimulasi atau menghambat proses (kontrol transkripsi). Setelah inisiasi, polimerase RNA bergerak dengan arah 5'→3'. Enzim polimerase RNA memisahkan satu bagian pendek heliks ganda DNA menjadi untai tunggal. Nukleosida trifosfat yang komplementer akan berpasangan dengan basa pada untai DNA yang kodogenik dan tahap demi tahap diikatkan pada RNA yang sedang terbentuk. Setelah perpanjangan dimulai, ujung 5' dari transkrip dilindungi dengan suatu topi penutup. Setelah mencapai urutan poliadenilat (urutan basa khas: ..AATAAAA..) transkrip akan dilepaskan. Selanjutnya, polimerase mengakhiri proses transkripsi dan berdisosiasi dari DNA.

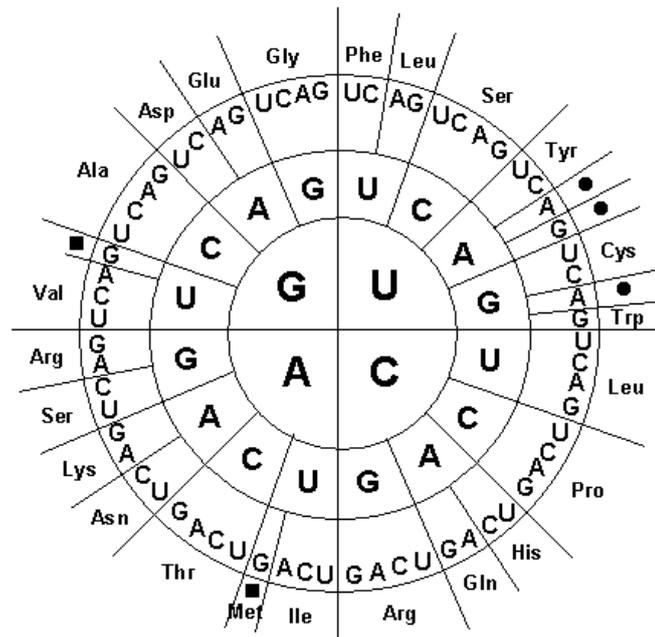
Setelah transkripsi, urutan-urutan hnRNA yang tidak mengandung sandi genetik (intron) dilepaskan melalui proses *splicing* (putus-sambung) oleh kompleks RNA-protein yang disebut *small nuclear ribonucleoprotein particles* (snRNP). Gugus OH residu adenosin ekson, dengan bantuan snRNP, menyebarkan ikatan diester asam fosfat pada ujung 5' daerah intron dan memutus ikatan

tersebut. Dalam waktu bersamaan terbentuk ikatan baru dalam intron, sehingga intron menyerupai bentuk *lasso*. Gugus OH terminal ekson yang berada pada posisi 5' menyerbu ikatan pada ujung 3' intron. Proses tersebut mengakibatkan kedua ekson diikatkan, dan intron dilepaskan.

Tidak lama setelah transkripsi eukariot dimulai, ujung 5' RNA yang sedang terbentuk ditutup oleh struktur topi penutup (*cap*). Pada mRNA, *cap* tersebut terdiri dari residu 7-metil-GTP. *Cap* ini melindungi RNA dari pemecahan oleh enzim 5'eksonuklease. Setelah transkripsi selesai, pada ujung 3'-hnRNA ditambahkan suatu ekor poliadenilat yang tersusun dari 200an residu AMP. Setelah proses pematangan tersebut, mRNA meninggalkan inti sel.

### **Translasi**

Urutan rantai DNA diterjemahkan melalui proses **transkripsi** menjadi suatu urutan mRNA yang komplementer. Selanjutnya, pada ekspresi genetik, bahasa asam nukleat harus diterjemahkan ke dalam bahasa protein. Konsep ini dikenal istilah **translasi** pada biosintesa protein. Aturan yang berlaku untuk penerjemahan itu dinamai sandi genetik. Karena terdapat 20 asam amino proteinogen, maka bahasa asam nukleat sekurangnya mengandung kata-kata (yang selanjutnya disebut kodon) yang sama banyaknya. Asam nukleat hanya memiliki 4 huruf/basa yang berbeda (yaitu A, T, G dan C atau U). Untuk dapat membentuk 20 kata-kata yang berlainan (dari keempat jenis huruf tersebut), maka sedikitnya mengandung 3 huruf untuk 1 kata. Konsep kodon yang tersusun dari 3 basa berurutan inilah yang disebut dengan triplet. Karena sandi untuk 20 asam amino tersedia dalam  $4^3=64$  kodon, maka untuk kebanyakan asam amino terdapat lebih dari satu kodon sinonim. Tiga triplet tidak mengandung sandi untuk asam amino melainkan memberi sinyal untuk berakhirnya translasi (kodon berhenti/*stop*). Pada kodon berhenti tersebut (UAA, UAG atau UGA), pemanjangan akan terhenti karena tidak ada tRNA yang komplementer dengan kodon tersebut. Kodon khusus lainnya (AUG) adalah kodon mulai (*start*) yang menandai dimulainya penerjemahan. Sandi genetik berlaku universal (Gambar 14), kecuali pada mitokondria dan beberapa mikroorganisme terdapat beberapa penyimpangan dari sandi genetik standar.



Gambar 14. Diagram sandi genetik ([www.operon.com](http://www.operon.com)). Dibaca dari dalam keluar. Penamaan asam amino mengikuti cara penulisan 3 huruf secara internasional.

Kurang lebih 20 ligase asam amino-tRNA yang berbeda di dalam sitoplasma menghubungkan masing-masing satu jenis asam amino dengan tRNA yang dimilikinya. Ketepatan translasi terutama tergantung dari spesifitas ligase asam amino-tRNA. Residu asam amino yang salah dimasukkan, tidak dapat dikenali oleh ribosom. Karena itu, suatu mekanisme koreksi pembacaan di pusat aktif ligase mengatur agar residu amino asil yang salah dimasukkan segera dilepaskan kembali.

Pada prinsipnya, biosintesis protein pada prokariot serupa dengan eukariot. Translasi pada prokariot berlangsung lebih sederhana dan telah luas diteliti, pada buku ini dijelaskan pada *E.coli*. Fase pertama translasi adalah inisiasi, yaitu pembentukan kompleks inisiasi 70S mengandung fMet-tRNA<sup>fMet</sup> dikenal sebagai tempat peptidil (P). Tempat ikatan yang kedua ialah tempat akseptor (A), yang pada fase ini belum terisi.

Setelah inisiasi translasi, rantai peptida yang sedang terbentuk diperpanjang lebih lanjut dengan residu-residu asam amino

(perpanjangan/*elongation*). Tempat peptidil (P) ribosom diisi oleh suatu tRNA yang pada ujung 3' membawa keseluruhan rantai peptida yang telah terbentuk. Suatu tRNA kedua, bermuatan asam amino yang sesuai dengan antikodonya dan bersifat komplementer, berikatan pada kodon mRNA pada tempat akseptor (A). Langkah selanjutnya berlangsung sintesis yang sesungguhnya dari ikatan peptida. Peptidiltransferase ribosom mengkatalisis pemindahan rantai peptida dari tRNA pada posisi P ke gugus amino residu pada tempat A. tRNA bebas pada tempat P berdisosiasi dan suatu faktor elongation yang mengandung GTP berikatan pada ribosom. Hidrolisis GTP pada faktor ini menghasilkan energi untuk translokasi ribosom. Akibatnya, ribosom bergerak pada mRNA sejauh 3 basa dengan arah menuju ujung 3'. tRNA yang membawa rantai peptida berhasil mencapai tempat P ribosom, sementara pada tempat A muncul kodon mRNA berikutnya. Dengan demikian, ribosom siap untuk pemanjangan berikutnya, begitu seterusnya. Jika tempat A muncul suatu kodon berhenti (UAA, UAG atau UGA), pemanjangan akan terhenti. Tidak ada tRNA yang komplementer dengan kodon berhenti (*stop codon*).

## **BAB V**

### **Pengaturan Sintesis Enzim**

Gen-gen yang menyandi protein sebagai komponen esensial bagi semua sel, perlu diekspresikan terus-menerus sepanjang umur individu di hampir semua jenis sel tanpa bergantung kepada kondisi lingkungan di sekitarnya. Gen-gen yang dimaksud di atas, misalnya adalah protein ribosomal, rRNA, tRNA, RNA polimerase, dan enzim-enzim yang mengatalisis berbagai reaksi metabolisme dan berkaitan dengan fungsi pemeliharaan sel. Namun, banyak pula gen lain yang ekspresinya sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan sehingga gen tersebut hanya akan diekspresikan pada waktu dan di dalam jenis sel tertentu. Untuk gen-gen semacam ini harus ada mekanisme pengaturan ekspresinya.

Pengaturan ekspresi gen dapat terjadi pada berbagai tahap, misalnya transkripsi, prosesing mRNA, atau translasi. Namun, hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaturan ekspresi gen, khususnya pada prokariot, paling banyak terjadi pada tahap transkripsi.

Mekanisme pengaturan transkripsi, baik pada prokariot maupun eukariot, secara garis besar dapat dibedakan menjadi dua kategori utama, yaitu (1) mekanisme yang melibatkan *turn on* dan *turn off* ekspresi gen sebagai respon terhadap perubahan kondisi lingkungan dan (2) **sirkuit** ekspresi gen yang telah terprogram (*pre-programmed circuits*). Mekanisme **on-off** sangat penting bagi mikroorganisme untuk menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan. Sebaliknya, mekanisme **on-off** nampaknya tidak terlalu penting bagi eukariot. Pada eukariot, justru sel cenderung merespon sinyal-sinyal yang datang dari dalam tubuh.

Pada mekanisme sirkuit, produk suatu gen akan menekan transkripsi gen itu sendiri dan sekaligus memacu transkripsi gen kedua. Produk gen kedua akan menekan transkripsi gen kedua dan memacu transkripsi gen ketiga, demikian seterusnya. Ekspresi gen yang berurutan ini telah terprogram secara genetik sehingga gen-gen tersebut tidak akan dapat diekspresikan di luar urutan. Oleh

karena urutan ekspresinya berupa sirkuit, maka mekanisme tersebut dinamakan sirkuit ekspresi gen.

### **Induksi dan Represi pada Prokariot**

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang sering dijadikan model untuk mempelajari berbagai mekanisme genetika molekuler. Bakteri ini secara alami hidup di dalam usus besar manusia dengan memanfaatkan sumber karbon yang umumnya berupa glukosa. Apabila *E. coli* ditumbuhkan pada medium laktosa, maka enzim pemecah laktosa akan disintesis, sehingga gen-gen penyandi berbagai enzim yang terlibat dalam pemanfaatan laktosa akan diekspresikan (*turned on*). Sebaliknya, dalam kondisi tersedia glukosa, maka gen-gen penyandi enzim pemecah laktosa tersebut tidak diekspresikan (*turned off*). Proses yang terjadi ketika ekspresi gen merupakan respon terhadap keberadaan suatu zat di lingkungannya dikenal sebagai **induksi**, sedangkan zat atau molekul yang menyebabkan terjadinya induksi disebut sebagai **induser**. Jadi, dalam contoh ini laktosa merupakan induser.

Selain mempunyai kemampuan untuk memecah suatu molekul (katabolisme), bakteri juga dapat mensintesis (anabolisme) berbagai molekul organik yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Sebagai contoh, *Salmonella typhimurium* mempunyai sejumlah gen yang menyandi enzim-enzim untuk biosintesis triptofan. Dalam medium pertumbuhan yang tidak mengandung triptofan, *S. Typhimurium* akan mengekspresikan (*turned on*) gen-gen tersebut. Akan tetapi, jika ditumbuhkan dalam medium dengan penambahan triptofan, maka gen-gen tersebut tidak perlu diekspresikan (*turned off*). Proses pemadaman (*turn off*) ekspresi gen sebagai respon terhadap keberadaan suatu zat di lingkungannya dinamakan **represi**, sedangkan zat yang menyebabkan terjadinya represi disebut sebagai **korepresor**. Jadi, dalam contoh ini triptofan merupakan korepresor.

Induksi secara molekuler terjadi pada tingkat transkripsi. Peristiwa ini berkenaan dengan laju sintesis enzim, dan bukan dengan aktivitas enzim. Pada pengaktifan enzim, suatu molekul kecil akan terikat pada enzim sehingga terjadi peningkatan aktivitas enzim tersebut, bukan peningkatan laju sintesisnya. Seperti

halnya induksi, represi juga terjadi pada tahap transkripsi. Represi sering dikacaukan dengan inhibisi umpan balik (*feedback inhibition*), yaitu penghambatan aktivitas enzim akibat pengikatan produk akhir reaksi yang dikatalisis oleh enzim itu sendiri. Represi tidak menghambat aktivitas enzim, tetapi menekan laju sintesisnya.

### **Model operon**

Mekanisme molekuler induksi dan represi telah dapat dijelaskan menurut model yang diajukan oleh F. Jacob dan J. Monod pada tahun 1961. Menurut model yang dikenal sebagai **operon** ini ada dua unsur yang mengatur transkripsi gen struktural penyandi enzim, yaitu **gen regulator (gen represor)** dan **operator** yang letaknya berdekatan dengan gen-gen struktural yang diaturinya. Gen regulator menyandi pembentukan suatu protein yang dinamakan **represor**. Pada kondisi tertentu represor akan berikatan dengan operator, menyebabkan terhalangnya transkripsi gen-gen struktural. Hal ini terjadi karena enzim RNA polimerase tidak dapat memasuki promoter yang letaknya berdekatan, atau bahkan tumpang tindih dengan operator.

Secara keseluruhan, setiap operon terdiri atas promoter operon (PO) atau promoter bagi gen-gen struktural, operator (O), dan gen-gen struktural (GS). Di luar operon terdapat gen regulator (R) beserta promoternya (PR), molekul protein represor yang dihasilkan oleh gen regulator, dan molekul efektor. Molekul efektor pada induksi adalah induser, sedangkan pada represi adalah korepresor.

Terikatnya represor pada operator terjadi dalam keadaan yang berkebalikan antara induksi dan represi. Pada induksi, represor secara normal akan berikatan dengan operator sehingga RNA polimerase tidak dapat memasuki promoter operon. Akibatnya, transkripsi gen-gen struktural tidak dapat berlangsung. Namun, dengan terikatnya represor oleh induser, promoter operon menjadi terbuka bagi RNA polimerase sehingga gen-gen struktural dapat ditranskripsi dan selanjutnya ditranslasi. Dengan demikian, gen-gen struktural akan diekspresikan apabila terdapat molekul induser yang mengikat represor.

Operon yang terdiri atas gen-gen yang ekspresinya terinduksi dinamakan **operon induksi**. Salah satu contohnya adalah operon *lac*, yang terdiri atas gen-

gen penyandi enzim pemecah laktosa seperti telah disebutkan di atas. Secara normal, represor tidak berikatan dengan operator sehingga RNA polimerase dapat memasuki promoter operon dan transkripsi gen-gen struktural dapat terjadi. Tetapi, dengan adanya korepresor, akan terbentuk kompleks represor-korepresor yang kemudian berikatan dengan operator. Dengan pengikatan ini, RNA polimerase tidak dapat memasuki promoter operon sehingga transkripsi gen-gen struktural menjadi terhalang. Jadi, ekspresi gen-gen struktural akan terepresi apabila terdapat molekul korepresor yang berikatan dengan represor.

Gen-gen yang ekspresinya dapat terepresi merupakan komponen operon yang dinamakan **operon represi**. Operon *trp*, yang terdiri atas gen-gen penyandi enzim untuk biosintesis triptofan merupakan contoh operon represi.

### **Pengaturan Ekspresi Gen pada Eukariot**

Pada eukariot tingkat tinggi, gen-gen yang berbeda akan ditranskripsi pada jenis sel yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme pengaturan pada tahap transkripsi, dan juga prosesing mRNA, memegang peran penting dalam proses diferensiasi sel. Operon, kalau pun ada, nampaknya tidak begitu penting pada eukariot. Hanya pada eukariot tingkat rendah seperti jamur dapat ditemukan satuan-satuan operon atau mirip operon. Semua mRNA pada eukariot tingkat tinggi adalah monosistronik, yaitu hanya membawa urutan sebuah gen struktural.

Selain itu, terindikasi juga bahwa diferensiasi sel sedikit banyak melibatkan ekspresi seperangkat gen yang telah terprogram (*pre-programmed*). Berbagai macam sinyal seperti molekul-molekul sitoplasmik, hormon, dan rangsangan dari lingkungan memicu dimulainya pembacaan program-program dengan urutan tertentu pada waktu dan tempat yang tepat selama perkembangan individu. Bukti paling nyata tentang keharusan urutan pembacaan program pada waktu dan tempat tertentu dapat dilihat pada kasus mutasi yang terjadi pada lalat *Drosophila*, misalnya munculnya sayap di tempat yang seharusnya untuk mata. Dengan mempelajari mutasi semacam ini, akan diperoleh pengetahuan tentang mekanisme pengaturan ekspresi gen selama perkembangan normal individu.

Pada eukariot tingkat tinggi, <10% gen dari seluruh genomnya akan diekspresikan. Sebagai contoh, hanya 2-5% urutan DNA mencit yang akan diekspresikan di dalam sel-sel hatinya. Demikian pula, mRNA di dalam sel-sel otak katak *Xenopus* hanya mengekspresikan 8% urutan DNANYA. Dengan perkataan lain, molekul mRNA yang dihasilkan dari perangkat gen yang berbeda akan dijumpai di dalam sel atau jaringan yang berbeda pula.

### **Dosis gen dan amplifikasi gen**

Kebutuhan akan produk-produk gen pada eukariot dapat sangat bervariasi. Beberapa produk gen dibutuhkan dalam jumlah lebih besar daripada produk gen lainnya sehingga terdapat nisbah kebutuhan di antara produk-produk gen yang berbeda. Misalnya, ada gen A dan gen B yang ditranskripsi dan ditranslasi dengan efisiensi yang sama namun produk gen A dapat 20 kali lebih banyak daripada produk gen B apabila jumlah gen A 20 kali lebih banyak dibanding gen B. Contoh yang nyata dapat dilihat pada gen-gen penyandi histon. Histon diperlukan dalam jumlah besar ketika pembentukan kromatin. Untuk memenuhi kebutuhan histon, kebanyakan sel mempunyai beratus-ratus kali salinan gen histon daripada jumlah salinan gen yang diperlukan untuk replikasi DNA.

Salah satu pengaruh dosis gen adalah **amplifikasi gen**, yaitu peningkatan jumlah gen sebagai respon terhadap sinyal tertentu. Sebagai contoh, amplifikasi gen terjadi selama perkembangan oosit katak *Xenopus laevis*. Pembentukan oosit dari prekursor (oogonium) merupakan proses kompleks yang membutuhkan sejumlah besar sintesis protein. Untuk itu dibutuhkan sejumlah besar ribosom, dan ribosom antara lain terdiri dari molekul-molekul rRNA. Padahal, sel-sel prekursor tidak mempunyai gen penyandi rRNA dalam jumlah cukup untuk sintesis molekul tersebut dalam waktu relatif singkat. Namun, sejalan dengan perkembangan oosit, terjadi peningkatan jumlah gen rRNA hingga 4000 kali, sehingga dari 600 gen yang ada pada prekursor akan diperoleh sekitar dua juta gen setelah amplifikasi. Jika sebelum amplifikasi ke-600 gen rRNA berada di dalam satu segmen DNA linier, maka selama dan setelah amplifikasi gen tersebut akan berada di dalam gulungan-gulungan kecil yang mengalami replikasi. Molekul rRNA tidak

diperlukan lagi ketika oosit telah matang. Oleh karena itu, gen rRNA yang telah begitu banyak disalin akan didegradasi oleh berbagai enzim intrasel.

Jika waktu yang tersedia untuk melakukan sintesis sejumlah besar protein cukup banyak, amplifikasi gen sebenarnya tidak perlu dilakukan. Cara lain untuk mengatasi kebutuhan protein tersebut adalah dengan meningkatkan masa hidup mRNA (lihat bagian pengaturan translasi).

### **Pengaturan transkripsi**

Berdasarkan banyaknya salinan di setiap sel, molekul mRNA dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu (1) mRNA salinan tunggal (*single copy*), (2) mRNA semiprevalen dengan jumlah salinan lebih dari satu hingga beberapa ratus per sel, dan (3) mRNA superprevalen dengan jumlah salinan beberapa ratus hingga beberapa ribu per sel. Molekul mRNA salinan tunggal dan semiprevalen masing-masing menyandi enzim dan protein struktural. Sementara, mRNA superprevalen biasanya dihasilkan sejalan dengan terjadinya perubahan di dalam suatu tahap perkembangan organisme eukariot. Sebagai contoh, sel-sel eritroblas di sumsum tulang belakang mempunyai sejumlah besar mRNA yang dapat ditranslasi menjadi globin matang. Di sisi lain, hanya sedikit sekali atau bahkan tidak ada globin yang dihasilkan oleh sel-sel prekursor yang belum berkembang menjadi eritroblas. Dapat dipastikan, ada suatu mekanisme pengaturan ekspresi gen penyandi mRNA superprevalen pada tahap transkripsi eukariot. Meskipun demikian, hingga kini belum banyak rincian proses yang dapat diungkapkan.

Salah satu regulator yang diketahui berperan dalam transkripsi eukariot adalah hormon. Mekanisme kerja hormon dalam mengatur transkripsi eukariot dapat disetarakan dengan induksi pada prokariot. Namun, penetrasi hormon ke dalam sel target dan pengangkutannya ke dalam nukleus merupakan proses yang jauh lebih rumit bila dibandingkan dengan induksi laktosa pada *E. coli*.

Secara garis besar, pengaturan transkripsi oleh hormon dilakukan oleh kelompok hormon lipofilik. Aktivitas dimulai dengan masuknya hormon ke dalam sel target melewati membran sel, kemudian ditangkap oleh reseptor khusus yang terdapat di dalam sitoplasma sehingga terbentuk kompleks hormon-reseptor. Setelah kompleks ini terbentuk biasanya reseptor akan mengalami modifikasi struktur kimia. Kompleks hormon-reseptor yang termodifikasi kemudian menembus dinding nukleus. Kompleks ini berikatan pada urutan nukleotida pendek, dan disebut sebagai *elemen respons hormone* (ERH). Elemen ini adalah segmen DNA yang mengontrol transkripsi sebagai elemen penguat (*enhancer element*). Misalnya ERH untuk hormon glukokortikoid adalah AGAACACANNNTGTTCT. ERH untuk hormon yang lain mempunyai urutan basa nukleotida yang berbeda pula, namun mempunyai spesifisitas kerja hormon. Setiap reseptor hormon hanya mengenal satu ERH. Karena satu ERH dapat mengontrol bermacam-macam gen, tergantung dari tipe selnya, maka sangat logis mengapa satu hormon yang sama menghasilkan respon yang berbeda pada berbagai jaringan. Ikatan dimer hormon-reseptor pada elemen penguat menyebabkan penguatan transkripsi gen-gen yang berdekatan. Aktivasi transkripsi berlangsung melalui suatu perubahan struktur nukleosom atau melalui interaksi langsung dengan kompleks transkripsi. Akhirnya, kerja hormon menghasilkan suatu perubahan kadar mRNA untuk protein kunci pada sel.

Contoh induksi transkripsi oleh hormon antara lain dapat dilihat pada stimulasi sintesis ovalbumin pada saluran telur (oviduk) ayam oleh hormon kelamin estrogen. Jika ayam disuntik dengan estrogen, jaringan-jaringan oviduk akan memberikan respon berupa sintesis mRNA untuk ovalbumin. Sintesis ini akan terus berlanjut selama estrogen diberikan, dan hanya sel-sel oviduk yang akan melakukan sintesis mRNA tersebut. Hal ini karena sel-sel atau jaringan lainnya tidak mempunyai reseptor hormon estrogen di dalam sitoplasmanya.

### **Pengaturan pada tahap prosesing mRNA**

Dua jenis sel yang berbeda, dapat membuat protein yang sama tetapi dalam jumlah yang berbeda, meskipun transkripsi di dalam kedua sel tersebut terjadi pada gen yang sama. Fenomena ini seringkali berkaitan dengan molekul-

molekul mRNA yang berbeda, yang akan ditranslasi dengan efisiensi berbeda pula.

Pada tikus, misalnya, ditemukan bahwa perbedaan sintesis enzim  $\alpha$ -amilase oleh berbagai mRNA yang berasal dari gen yang sama. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan pola pembuangan intron. Kelenjar ludah menghasilkan  $\alpha$ -amilase lebih banyak daripada jaringan hati meskipun gen yang ditranskripsi sama. Jadi, dalam hal ini transkrip primernya sebenarnya sama, tetapi ada perbedaan mekanisme prosesing, khususnya pada penyatuan (*splicing*) mRNA.

### **Pengaturan translasi**

Berbeda dengan translasi mRNA pada prokariot yang terjadi dalam jumlah yang relative sama, pada eukariot ada mekanisme pengaturan translasi. Macam-macam pengaturan tersebut adalah (1) mRNA tidak akan ditranslasi sama sekali sebelum datangnya suatu sinyal, (2) pengaturan umur (*lifetime*) molekul mRNA, dan (3) pengaturan laju seluruh sintesis protein.

Telur yang tidak dibuahi secara biologi bersifat statis. Akan tetapi, begitu fertilisasi terjadi, sejumlah protein akan disintesis. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam sel telur yang belum dibuahi akan dijumpai sejumlah mRNA yang menantikan datangnya sinyal untuk translasi. Sinyal tersebut tidak lain adalah fertilisasi oleh spermatozoon, sedangkan molekul mRNA yang belum ditranslasi itu dinamakan **mRNA tersembunyi** (*masked mRNA*).

Pengaturan umur mRNA juga dijumpai pada telur yang belum dibuahi. Sel telur ini akan mempertahankan diri untuk tidak mengalami pertumbuhan atau perkembangan. Dengan demikian, laju sintesis protein menjadi sangat rendah. Namun, hal ini bukan akibat kurangnya pasokan mRNA, melainkan karena terbatasnya ketersediaan suatu unsur yang dinamakan **faktor rekrutmen**. Meskipun hingga saat ini belum diketahui hakekat unsur tersebut, tetapi faktor tersebut nampaknya berperan pada pembentukan kompleks ribosom-mRNA.

Sintesis beberapa protein tertentu diatur oleh aktivitas protein itu sendiri terhadap mRNA. Sebagai contoh, konsentrasi suatu jenis molekul antibodi dipertahankan konstan oleh mekanisme inhibisi atau penghambatan diri dalam

proses translasi. Jadi, molekul antibodi tersebut berikatan secara khusus dengan molekul mRNA yang menyandinya sehingga inisiasi translasi akan terhambat.

### **Sintesis beberapa protein dari satu segmen DNA**

Pada prokariot terdapat mRNA polisistronik yang menyandi semua produk gen. Sebaliknya, pada eukariot tidak pernah dijumpai mRNA polisistronik, tetapi ada kondisi yang dapat disetarakan dengannya, yakni sintesis **poliprotein**. Poliprotein adalah polipeptida berukuran besar yang setelah berakhirnya translasi akan terpotong-potong untuk menghasilkan sejumlah molekul protein yang utuh. Setiap protein ini dapat dilihat sebagai produk satu gen tunggal. Dalam sistem semacam itu urutan penyandi pada masing-masing gen tidak saling dipisahkan oleh kodon stop dan kodon awal, tetapi dipisahkan oleh urutan asam amino tertentu yang dikenal sebagai tempat pemotongan (*cleavage sites*) oleh enzim protease tertentu. Tempat-tempat pemotongan ini tidak akan berfungsi serempak, tetapi bergantian mengikuti suatu urutan.

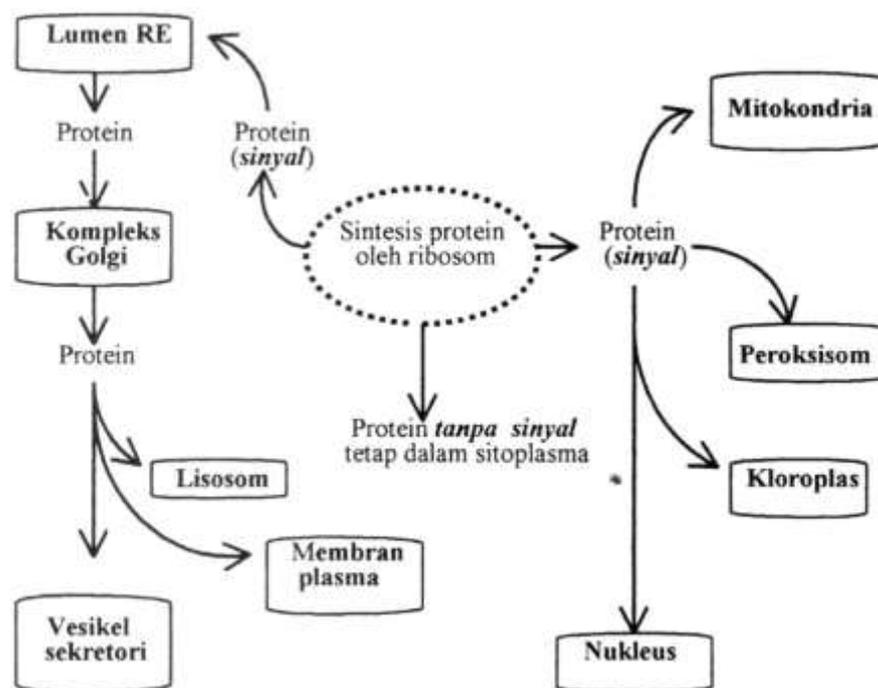
### **Transport protein dari sel**

Protein hasil sintesis, dipilah dan dikirim ke berbagai lokasi di dalam dan di luar sel secara tepat sesuai target. Pada sel eukariotik, protein yang disintesis di sitoplasma akan mengalami beberapa kemungkinan, yaitu (1) merupakan bagian dari substansi terlarut dalam sitoplasma (2) menuju ke inti atau organel sel atau membran organel, (3) merupakan bagian dari membran plasma, atau (4) merupakan protein ekstrasel atau protein sekretori. Ketepatan pemilahan dan distribusi protein ditentukan oleh rangkaian sinyal asam amino, sebagai bagian dari struktur protein tersebut.

Molekul protein dengan target sitoplasma, akan dilepas segera setelah proses sintesis oleh ribosom berakhir. Protein tersebut tidak mempunyai gugus khusus atau tidak mempunyai *signal* (sinyal) pada ujung molekulnya. Sementara protein hasil sintesis dan bersinyal khusus akan dikirim ke organel, membran plasma atau ekstrasel berlangsung secara spesifik (Gambar 15).

Translasi protein dilakukan di sitoplasma dengan bantuan ribosom. Protein dengan target mitokondria, nukleus, peroksisom, kloroplas dan sitoplasma ditranslasi oleh ribosom bebas di sitoplasma, setelah selesai baru

dipilah ke target-target tersebut sesuai sinyal yang dimiliki protein. Sementara protein dengan target retikulum endoplasma (RE), ditranslasi oleh ribosom dan karena sinyal pengarah RE pada ujung N (ditranslasi paling dulu) akan segera dipandu masuk RE. Sinyal pengarah RE akan ditangkap oleh SRP (*signal recognition particle*) dan mengarahkan ribosom yang masih melangsungkan translasi menuju membran RE, dan translasi dilanjutkan sampai translasi selesai. Selanjutnya protein dalam RE akan tetap dalam lumen RE, menjadi bagian membran RE atau melanjutkan perjalanan ke kompleks golgi dan seterusnya ke lisosom, membran plasma atau vesikel sekretori sangat bergantung pada sinyal-sinyal yang dibawa protein tersebut. Mekanisme pemilahan dan distribusi protein dapat dipelajari pada buku-buku metabolisme sel atau biologi sel.



Gambar 15. Sintesis protein dan transport hasil sintesis protein di dalam sel

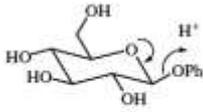
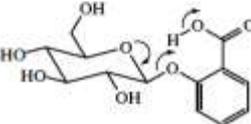
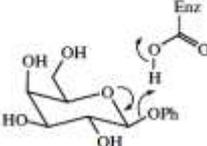
## BAB VI

### Katalisis Enzim

#### Spesifikasi enzim

Enzim merupakan katalis khusus dan efisien. Kekhususan katalis enzim adalah, hanya mengkatalisis satu reaksi kimia dengan hanya satu jenis substrat. Enzim hanya mengkatalisis reaksi kimia tertentu atau substrat tertentu. Kesanggupan enzim mengatalisis satu reaksi spesifik, dan tidak mengatalisis reaksi yang lain, merupakan sifat enzim yang paling signifikan. Kespesifikan enzim dapat ditunjukkan terhadap reaksi yang dikatalis maupun terhadap substrat yang terlibat dalam reaksi. Bentuk, muatan dan katakteristik hidrofilik/ hidrofobik enzim dan substrat bertanggung jawab terhadap kespesifikan ini.

Efisiensi katalisis oleh enzim ditunjukkan dengan dapat bekerja suatu enzim secara berulang kali (*reusable*) dalam satuan waktu tertentu. Sifat ini didasari bahwa suatu enzim akan kembali ke bentuk semula setelah mengkatalisis reaksi, dan akan mengkatalisis reaksi yang sama untuk substrat yang sama. Contohnya adalah enzim karbonat anhidrase mampu mengkatalisis pemecahan sekitar 36 juta molekul subtrat (asam karbonat) dalam satu menit.

	Kecepatan hidrolisis
	Hidrolisis menggunakan katalis asam $k_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ dalam 0.1 M HCl
	Katalisis intramolekuler $k_{\text{uni}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
	$\beta$ -galaktosidase $k_{\text{cat}} = 40 \text{ s}^{-1}$

Gambar 16. Laju kecepatan reaksi hidrolisis glikosida menggunakan katalis intramolekuler dan enzim  $\beta$ -galaktosidase

Selain spesifisitas dan efisiensi, keunggulan katalisis oleh enzim adalah kecepatan dan selektivitas. Enzim dapat menunjukkan tingkat stereospesifisitas, regioselektivitas dan kemoselektivitas yang sangat tinggi. Enzim dapat mengkatalisis suatu reaksi biokimia jutaan kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (rasio  $k_{cat} / k_{uncat}$  adalah  $10^6$ - $10^{14}$ ). Gambar 16 mengilustrasikan perbandingan kecepatan proses hidrolisis senyawa glikosida oleh berbagai macam katalis. Laju hidrolisis menggunakan katalis asam intramolekuler mengakselerasi proses katalisis sebesar  $10^3$  kali, sedangkan katalisis oleh enzim  $\beta$ -galaktosidase mempercepat proses reaksi sebesar  $10^4$  kali.

Meskipun enzim bersifat spesifik, kespesifikan aktivitas enzim bervariasi menurut tingkatannya yaitu kespesifikan absolut dan kespesifikan luas.

1. Kespesifikan absolut hanya berlaku untuk substrat tertentu dan tidak terhadap molekul lain ataupun mirip sekalipun. Contohnya :
  - a. Aspartase hanya bekerja pada perubahan fumarat menjadi aspartat
  - b. Maltase mengkatalisis glikosida  $\alpha$  dan bukan pada glikosida  $\beta$
  - c. Urease mengkatalisis urea menjadi  $\text{CO}_2$  dan amonia
  - d. Enzim glikolitik hanya mengkatalisis perubahan gula fosfat D dan bukan pada gula fosfat L
  - e. Laktat dehidrogenase spesifik untuk isomer laktat L
  - f. Akonitase (akonitat hidratase) mengkatalisis reaksi bolak balik sitrat menjadi isositrat
  - g. Glutamat dehidrogenase mengkatalisis L glutamat

2. Kespesifikan luas berarti spesifik untuk grup, stereo atau ikatan tertentu. Contohnya adalah:

Spesifisitas grup (*group specificity*) sebagai contoh: enzim heksokinase yang bereaksi dengan glukosa dengan enam spesies karbon.

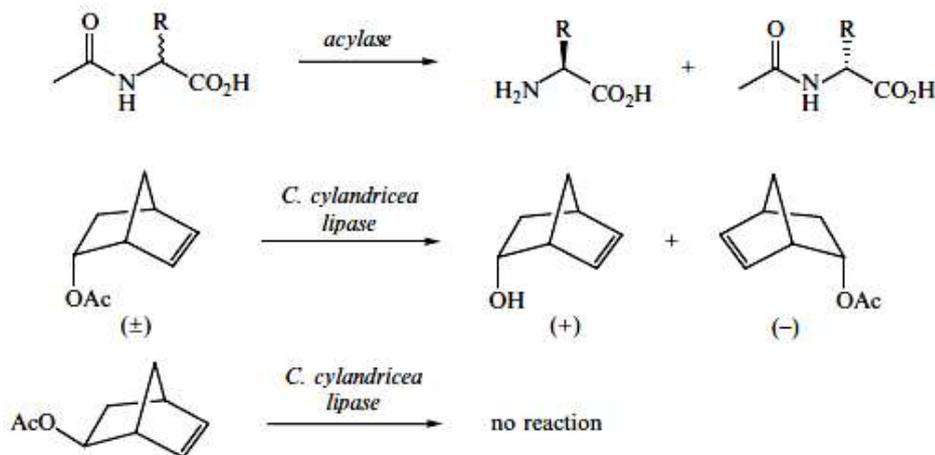
Spesifisitas stereo (*stereospecificity*), sebagai contoh: enzim asam amino oksidase (*D-amino acid oxidase*, EC 1.4.3.3) akan bekerja dengan asam amino tertentu.

Spesifisitas ikatan (*bond specificity*) sebagai contoh: enzim yang terlibat dalam pencernaan (amilase, lipase, dan protease).

Pada struktur globular enzim terdapat celah/tempat spesifik dimana substrat yang dikatalisa bisa masuk dan bersifat komplementer, tempat ini disebut **tempat/tapak aktif**. Oleh karena itu substrat harus benar-benar cocok dengan tapak aktifnya. Tapak aktif suatu enzim dibentuk oleh residu asam amino yang mempunyai 2 fungsi, yaitu untuk:

1. Menarik dan mengorientasikan substrat kepada gugus spesifik pada molekul enzim yang disebut gugus/residu kontak dengan cara spesifik pula
2. Membentuk ikatan sementara dengan molekul substrat, yang selanjutnya terjadi polarisasi dan regangan pada ikatan di dalam molekul substrat, sehingga mudah dipecah. Asam amino yang bertindak demikian terletak pada tempat aktif dan disebut residu katalitik. Letak residu kontak dan residu katalitik pada tapak aktif terletak cukup jauh jika diletakkan pada struktur primer enzim. Namun pada struktur tersier, letak keduanya sangat berdekatan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas suatu enzim diperankan oleh struktur tiga dimensinya (struktur tersier).

Enzim berikatan dengan substrat melalui interaksi ikatan enzim-substrat pada sisi/tempat/tapak aktif. Ikatan enzim-substrat ini bersifat selektif, karena enzim dapat memilih substrat yang sesuai, dapat membedakan perubahan struktur pada substrat, dan dapat membedakan antara regioisomer dan enantiomer (Gambar 17).



Gambar 17. Stereoselektivitas dalam reaksi hidrolisis enzimatik

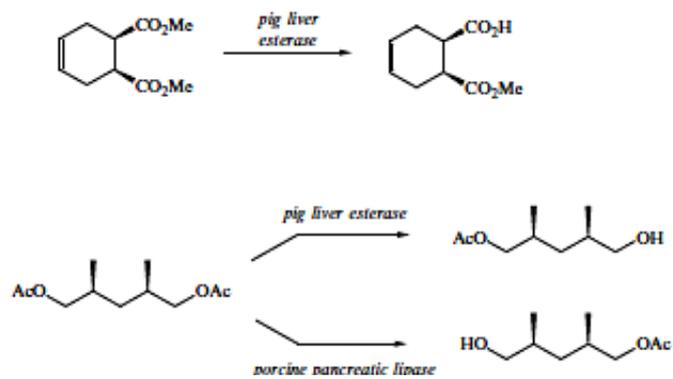
Enzim tertentu memperlihatkan spesifisitas optis. Kecuali enzim epimerase (rasemase) yang mengatalisis interkonversi isomer optis, hampir semua enzim memperlihatkan spesifisitas optis absolut untuk suatu molekul substrat. Enzim dari lintasan glikolisis dan oksidasi langsung akan mengatalisis interkonversi gulafosfat-D tetapi tidak gulafosfat-L. Dengan beberapa pengecualian (misal, enzim D-asam amino oksidase pada ginjal), kebanyakan enzim mamalia bekerja pada isomer-L asam amino.

### **Enzim Bersifat Spesifik bagi Tipe Reaksi yang Dikatalisisnya**

Enzim untuk proses lisis (enzim lisis) bekerja pada kelompok kimia khusus, misalnya enzim glikosidase pada glikosida, pepsin serta tripsin pada ikatan peptida, dan esterase pada senyawa-senyawa ester. Berbagai substrat peptida yang berbeda dapat diserang oleh hanya satu enzim sehingga mengurangi jumlah enzim pencernaan yang seharusnya diperlukan. Enzim protease dapat pula mengatalisis proses hidrolisis senyawa ester. Enzim-enzim lisis tertentu memperlihatkan spesifisitas yang lebih tinggi. Enzim kimotripsin menghidrolisis ikatan peptida. Pada reaksi ini, gugus karboksil berasal dari asam amino aromatik fenilalanin, tirosin, atau triptofan. Enzim karboksipeptidase dan aminopeptidase melepas asam-asam amino satu persatu, masing-masing secara berturutan, dari ujung terminal karboksil atau terminal amino rantai polipeptida.

Meskipun beberapa enzim oksidoreduktase memanfaatkan  $\text{NAD}^+$  dan  $\text{NADP}^+$  sebagai akseptor elektronnya, kebanyakan hanya menggunakan salah satu diantaranya. Secara umum, enzim oksidoreduktase yang berfungsi dalam proses biosintesis pada mamalia (misal, sintesis asam lemak atau sterol) menggunakan  $\text{NADPH}$  sebagai reduktan sementara enzim yang berfungsi dalam proses penguraian (misal, glikolisis, oksidasi asam lemak) menggunakan  $\text{NAD}^+$  sebagai oksidan.

Enzim bekerja secara presisi, yaitu hanya memilih satu gugus fungsional dari substrat dan menjalankan reaksi enzimatik secara stereospesifik, seperti ditunjukkan pada Gambar 18. Spesifisitas adalah properti dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim guna menciptakan produk yang memiliki regio- dan stereo-isomer tunggal.



Gambar 18. Stereospesifisitas dalam reaksi hidrolisis enzimatik

### Mekanisme katalitik enzim untuk mengkonversi substrat menjadi produk

Kinetika reaksi yang dikatalisis oleh enzim (artinya ketergantungan kecepatan reaksi dari kondisi reaksi) ditentukan terutama oleh *sifat-sifat dari katalisator*, sehingga reaksi enzimatik lebih kompleks daripada kinetika reaksi yang tidak terkatalisis. Kinetika enzim terutama berguna dalam mempelajari segi keilmuan dari enzim itu sendiri, akan tetapi cakupan terapannya tidaklah sedikit. Apalagi mengingat saat ini dunia tengah memasuki era bioteknologi, pengetahuan tentang peranan enzim pada benda-benda hidup serta reaksinya merupakan suatu hal yang tidak dapat dipisahkan dari aktivitas bioteknologi.

Penyatuan atau asosiasi enzim dengan substrat membentuk suatu kompleks enzim- substrat (ES) telah lama diketahui akan tetapi sukar dideteksi. Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten ternyata diperoleh bukti bahwa pada reaksi enzimatik terdapat kompleks tersebut enzim-substrat. Michaelis dan Menten berpendapat bahwa reaksi terdiri dari beberapa fase, yaitu:

1. Pembentukan kompleks Enzim-susbstrat (ES)
2. Modifikasi dari substrat membentuk Produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP)
3. Pelepasan produk dari molekul enzim

Pembentukan kompleks ES merupakan limit kecepatan reaksi enzimatik. Artinya, kecepatan maksimum reaksi enzim dicapai pada tingkat konsentrasi substrat yang mampu mengubah seluruh enzim menjadi kompleks ES pada kondisi lingkungan yang memungkinkan. Pada konsentrasi substrat di bawah

konsentrasi ini, reaksi enzim tergantung kepada konsentrasi substrat yang ditambahkan, sedangkan pada konsentrasi substrat di atas konsentrasi tersebut, kecepatan reaksi menjadi tidak tergantung pada konsentrasi substrat, dengan kata lain reaksinya menjadi ke orde nol.

Pada persamaan reaksi di atas, kombinasi dari enzim dengan substrat adalah reversibel.  $k_{+1}$  adalah konstanta laju reaksi pembentukan kompleks enzim substrat (ES).  $k_{-1}$  adalah konstanta laju reaksi untuk disosiasi dari ES. Sesudah kompleks ES terbentuk, selanjutnya S dikonversi menjadi P dengan konstanta laju reaksi  $k_{+2}$ . Selama konsentrasi P tetap rendah atau P dengan cara tertentu segera diambil dari sistem tersebut, maka tidak perlu memikirkan akan terjadi reaksi balik  $E + P$  menjadi EP kemudian menjadi ES. Pada konsentrasi substrat rendah, laju reaksi ( $V_0$ ) terlihat berbanding langsung dengan kadar substrat. Selanjutnya semakin tinggi kadar substrat, laju reaksi semakin berkurang dan mendekati harga maksimum ( $V_{maks}$ ).

Akhirnya pada konsentrasi yang tinggi laju reaksi dibatasi oleh waktu yang diperlukan untuk mengubah kompleks ES menjadi produk (P) dan jumlah enzim bebas (E) Dalam keadaan demikian, tingkat reaksi menyerupai reaksi tingkat 0 (zero order), di mana reaksi sudah tidak bergantung lagi pada kadar substrat dan pada saat ini enzim dalam keadaan jenuh dengan substrat. Sifat kejenuhan ini merupakan sifat umum enzim yang sangat penting, merupakan dasar uraian kinetika enzim.

Michaelis-Menten merupakan dua orang ahli yang pertama kali memperkenalkan reaksi enzim secara matematik dan mengekspresikan reaksi enzimatik dalam bentuk konstanta Michaelis-Menten dan persamaannya.

Persamaan Michaelis-Menten adalah :

$$V_0 = \frac{V_{maks}(S)}{K_m + (S)}$$

$V_0$  adalah kecepatan awal,  $V_{maks}$  adalah kecepatan maksimal, S adalah substrat dan  $K_m$  adalah ketetapan Michaelis-Menten. Dari persamaan Michaelis-Menten dapat diperoleh persamaan Lineweaver-Burk, dengan membalikkan persamaan di atas agar menjadi garis lurus, sehingga didapatkan persamaan sebagai berikut :

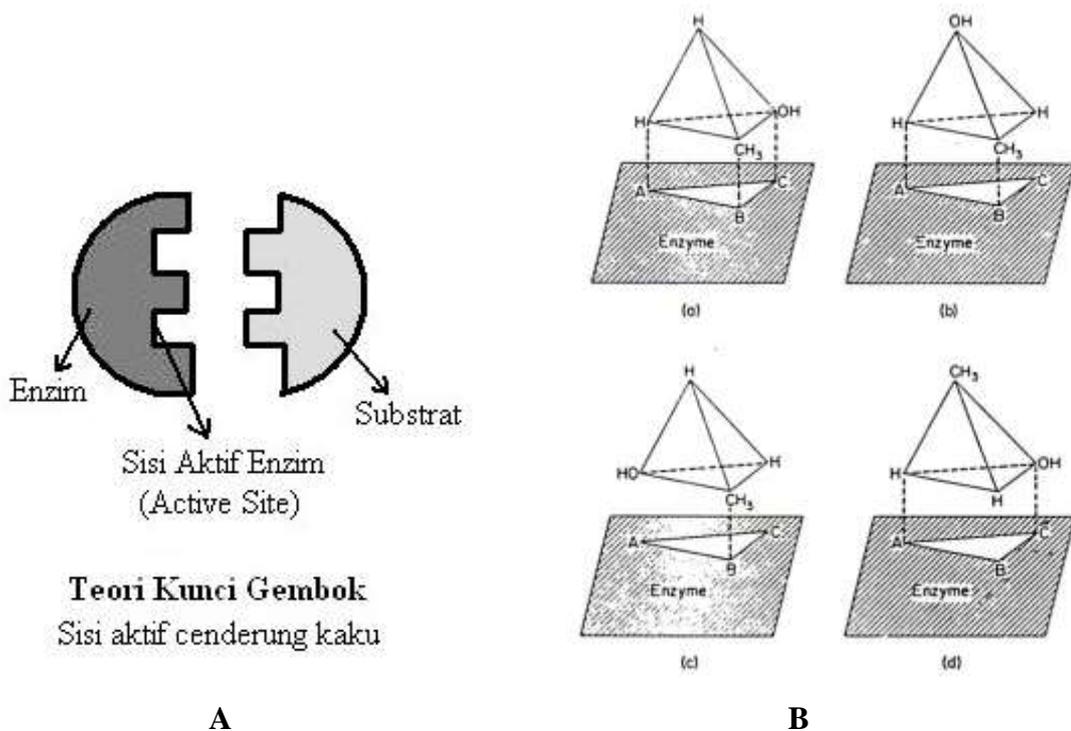
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{maks}} + \frac{1}{V_{maks} \cdot (s)}$$

Persamaan Lineweaver-Burk ini dapat digunakan pula untuk memperlihatkan berbagai reaksi hambatan enzim. Reaksi enzimatik dapat dihambat oleh berbagai inhibitor. Hambatan ini dapat berupa hambatan bersaing (*competitive inhibition*), dan hambatan tidak bersaing (*non-competitive inhibition*), sedangkan hambatan uncompetitive jarang dijumpai. Reaksi hambatan bersaing adalah jenis hambatan yang sering dijumpai dalam proses biokimia, baik pada percobaan *in vitro* maupun *in vivo*. Oleh karena itu yang sering dibahas adalah reaksi hambatan bersaing. Pada hambatan bersaing, inhibitor (I) akan berebut dengan substrat untuk memperoleh tempat pada pusat aktif enzim. Kompleks EI tidak menghasilkan produk (P) seperti halnya dengan ES.

#### **Model Gembok dan Kunci (*Lock and key model*)**

Pada tahun 1894, Emil Fischer mengajukan model yang menjelaskan spesifisitas enzim terhadap substrat seperti gembok dan kunci (*lock and key*). Fischer mengajukan bahwa baik enzim dan substrat memiliki bentuk geometri yang saling memenuhi. Hal ini sering dirujuk sebagai model "Gembok dan Kunci". Model kunci dan anak kunci menerangkan adanya kespesifikan suatu enzim. Senyawa yang tidak cocok bentuk maupun muatannya dengan tapak aktif, tidak dapat terikat pada tapak aktif. Interaksi enzim dengan substrat melibatkan akselerasi sisi aktif pada enzim dan lokus ikatan pada substrat untuk menghasilkan produk. Terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim disebabkan karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif dari enzim. Substrat yang mempunyai daerah polar (-) atau (+) dan nonpolar (H, hidrofobik) dilekatkan pada tapak aktif yang komplementer (baik bentuk maupun muatannya) dengan substrat tersebut. Daerah yang bermuatan positif dan negatif serta hidrofobik pada tapak aktif tercipta oleh rantai peptida. Rantai ini mengandung residu kontak yang menuntun substrat untuk bereaksi dengan residu katalitik. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam sisi aktif, yang berperan sebagai gembok sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat

ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Proses ini juga melibatkan energi aktivasi. Perubahan sedikit saja pada struktur atau bentuk dari substrat akan menyebabkan enzim tidak dapat bekerja mengubah substrat menjadi produk. Spesifisitas ukuran, bentuk, dan struktur molekuler substrat sangat mempengaruhi proses ikatan enzim-substrat. Meskipun model kunci dan anak kunci dapat menerangkan berbagai kespesifikan substrat, namun pada keadaan tertentu sulit dijelaskan dengan model ini.



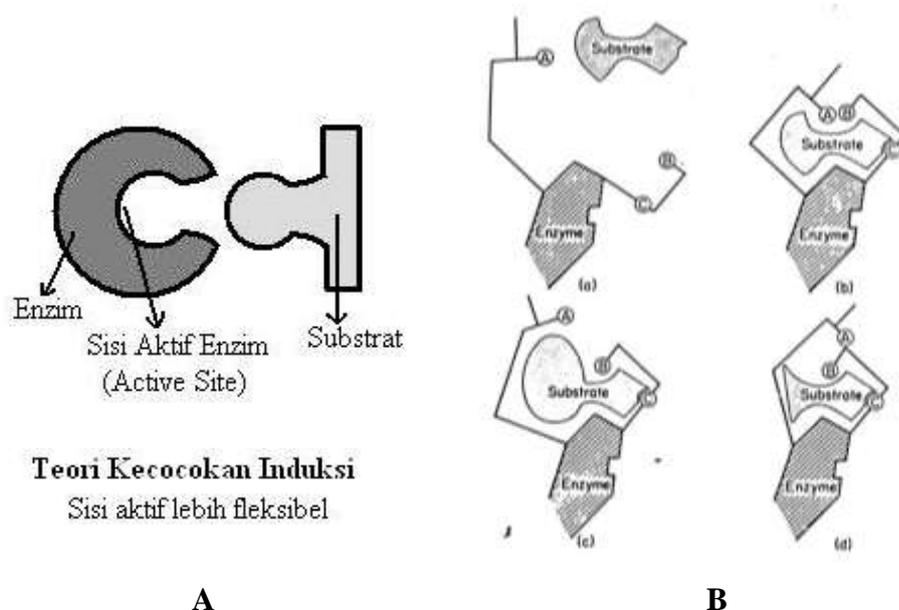
Gambar 19. A. Gambaran teori *lock and key*, B. Model *lock and key* pada proses ikatan enzim alkohol dehidrogenase dengan substrat etanol.

Model ini menjelaskan kespesifikan enzim, namun gagal menjelaskan stabilisasi keadaan transisi yang dicapai oleh enzim. Misalnya ada senyawa yang berbeda dengan substrat namun dapat berikatan dengan enzim walaupun gagal menghasilkan produk. Model ini telah dibuktikan tidak akurat, dan model ketepatan induksilah yang sekarang paling banyak diterima. Gambar 19

menunjukkan kemungkinan ikatan etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) dengan enzim alkohol dehidrogenase ADH, EC 1.1.1.1 dalam menghasilkan asetaldehida ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ).

### Model kesesuaian terinduksi (*Induced fit model*)

Model ini diusulkan oleh Daniel Koshland pada tahun 1959, merupakan model ikatan enzim-substrat yang lebih diterima dibandingkan dengan model *lock and key*. Kecocokan induksi reaksi antara enzim dengan substrat berlangsung karena adanya induksi substrat terhadap sisi aktif enzim sedemikian rupa sehingga keduanya merupakan struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Teori ini menjelaskan bahwa tapak aktif pada mulanya belum sesuai dengan substrat, namun setelah substrat menempel pada bagian tertentu dari tapak aktif akan menginduksi tapak aktif untuk menyesuaikan bentuknya dengan substrat. Hal ini dapat digambarkan seperti jari tangan menyesuaikan bentuk dengan sarung tangan. Sesuai teori Koshland, enzim atau tapak aktif bersifat fleksibel. Menurut teori ini, sisi aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel. Sisi aktif enzim terus berubah konformasinya sampai substrat berikatan sempurna dengan enzim (Gambar 20).



Gambar 20. A. Teori *induced fit*, B. Perubahan konformasi sisi aktif enzim supaya substrat dapat berikatan sempurna dengan enzim.

Teori *induced-fit* dapat menjelaskan pengaruh suatu inhibitor bersifat kompetitif atau non kompetitif. Perubahan bentuk tapak aktif suatu enzim, dapat juga diinduksi oleh pengikatan pada tempat permukaan enzim jauh dari tapak aktif. Perubahan tersebut ditransmisi melalui molekul enzim dari tempat pengikatan ke tapak aktif. Perubahan ini dapat meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim.

### **Reduksi energi aktivasi (*Reduction of activation energy*)**

Energi aktivasi adalah energi minimum yang harus dimiliki partikel untuk dapat bertumbukan dalam menjalani reaksi. Energi aktivasi diperlukan untuk mengaktifkan atom atau molekul, sehingga dapat mengalami transformasi kimia atau transportasi fisik. Beberapa reaksi dapat terjadi pada suhu kamar dengan mudah karena partikel yang bereaksi sudah memiliki energi aktivasi yang cukup untuk melakukan reaksi. Sementara, reaksi lainnya hanya terjadi jika dipanaskan, karena partikel tidak memiliki energi yang cukup sehingga harus ditambahkan sumber panas eksternal.

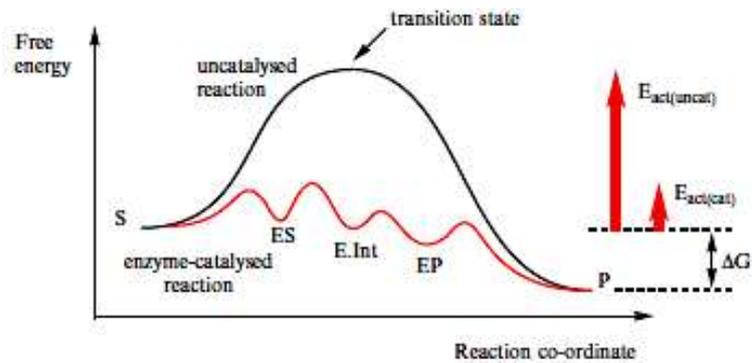
Sejumlah besar energi sering diperlukan untuk memecah kekuatan ikatan, sehingga reaksi kimia dapat berlangsung. Jumlah energi aktivasi yang diperlukan untuk memulai reaksi sering disebut hambatan energi (*energi barrier*). Energi ini jarang disediakan oleh molekul yang sedang bertabrakan, sehingga diperlukan suatu faktor untuk menghilangkan penghalang energi dan memfasilitasi reaksi kimia. Beberapa faktor tersebut adalah panas (merupakan faktor fisik) dan atau enzim (merupakan faktor kimia).

Untuk sebagian besar reaksi enzimatik secara biologis, pemanasan tidak praktis digunakan karena suhu tubuh terbatas pada rentang yang sangat kecil. Panas hanya dapat digunakan untuk mengatasi hambatan energi, namun hanya terbatas sebelum sel-sel rusak. Untuk reaksi dalam tubuh, sel-sel harus menggunakan enzim yang secara selektif dapat menurunkan energi aktivasi reaksi. Enzim merupakan katalis yang mempercepat reaksi kimia, tetapi tetap tidak berubah pada akhir reaksi. Hampir setiap reaksi metabolisme yang terjadi di dalam organisme hidup dikatalisis oleh enzim. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim

akan berlangsung cepat pada temperatur yang lebih rendah dibandingkan tanpa enzim.

Pada reaksi respirasi sel, molekul glukosa bereaksi dengan molekul oksigen membentuk karbon dioksida dan air dan melepaskan energi. Secara alami, glukosa dan oksigen bersifat tidak reaktif, sehingga sejumlah kecil energi aktivasi harus ditambahkan untuk memulai proses respirasi. Ketika salah satu molekul substrat berikatan dengan enzim, bentuk molekul akan sedikit berubah. Hal ini akan mempermudah molekul mengikat molekul lain atau berubah menjadi produk reaksi. Dengan demikian, enzim telah mengurangi energi aktivasi reaksi, atau membuat lebih mudah berlangsungnya reaksi. Hambatan energi aktivasi mencegah sebagian besar reaksi dapat terjadi dengan mudah. Hal ini memastikan lingkungan yang stabil bagi semua makhluk hidup.

Dalam proses biokimia, molekul harus memiliki energi kinetik (*velocity*) untuk bergabung dengan molekul yang lain guna menginisiasi suatu reaksi. Seperti diungkap sebelumnya, energi yang diperlukan untuk memulai suatu reaksi disebut energi aktivasi (*activation energy*). Semakin rendah energi aktivasi, maka semakin cepat sebuah reaksi terjadi. Reaktan dan produk memiliki energi spesifik. Untuk mengubah suatu substrat menjadi produk, substrat harus melalui *transition state* yang memiliki energi yang besar. Pada akhirnya, produk menurunkan energi untuk menjadi sebuah bentuk produk akhir. Enzim adalah protein yang mereduksi energi untuk mencapai *transition state*. Enzim mereduksi energi aktivasi melalui proses yang dinamakan katalisis. Pada Gambar 21, kompleks enzim substrat intermediet ( $E_{inter}$ , ES) dibentuk pada saat ikatan dengan substrat yang dikonversi menjadi kompleks enzim produk (E-P).



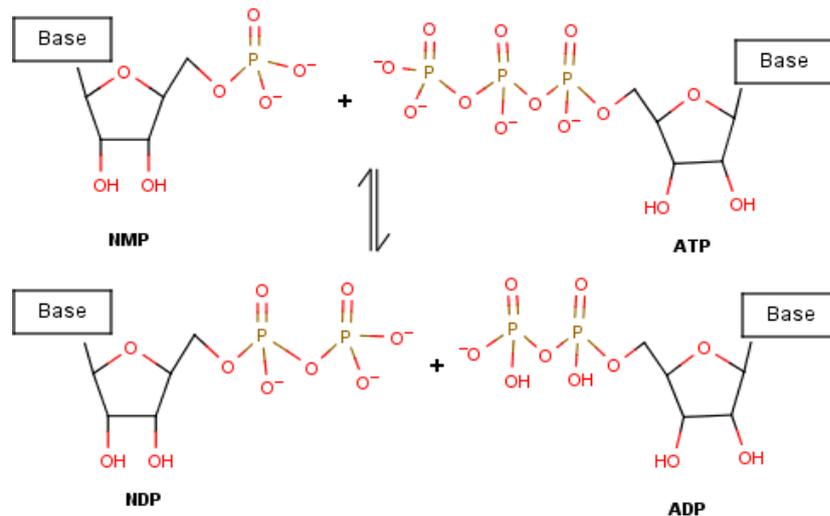
Gambar 21. Profil energi bebas dalam reaksi konversi substrat (S) menjadi produk (P) yang dikatalisis oleh enzim

### Aproksimasi (*Approximation*)

Substrat bersamaan bertemu dengan katalis enzim secara acak, sehingga memiliki kemungkinan kecil untuk kontak dengan sisi aktif enzim. Oleh karena itu, enzim menggunakan strategi yang dikenal sebagai katalisis dengan pendekatan/aproksimasi, yaitu enzim menyatukan dua substrat untuk meningkatkan laju reaksi. Strategi ini mengambil keuntungan dari energi ikatan dan orientasi posisi substrat yang benar untuk kelanjutan reaksi. Dalam reaksi, biasanya akan ada kerugian entropi translasi dan rotasi entropi. Dalam reaksi, keadaan *transitional state* lebih menguntungkan dari pada *ground state* dalam membuat  $\Delta S$  menjadi negatif. Reaksi ini berlangsung di sisi aktif enzim dengan melibatkan substrat dan kelompok katalitik sehingga mencegah hilangnya energi translasi dan energi rotasi. Agar dapat bereaksi, molekul-molekul harus berada dalam jarak yang cukup dekat untuk membentuk ikatan satu sama lain. Semakin tinggi konsentrasinya, akan semakin sering molekul-molekul itu bertemu satu sama lain dan semakin besar laju reaksinya. Ketika mengikat molekul substrat di bagian aktifnya, enzim menciptakan suatu regio dengan konsentrasi substrat lokal yang tinggi. Lingkungan ini juga secara spasial mengatur arah molekul-molekul substrat sehingga diperoleh posisi ideal untuk berinteraksi. Hal tersebut menyebabkan laju reaksi meningkat sedikitnya seribu kali lipat.

Sebagai contoh, ketika NMP kinase (enzim yang membantu transfer grup fosforil pada ujung nukleotida trifosfat ke grup fosforil pada nukleosida

monofosfat) membawa dua nukleotida untuk memfasilitasi transfer grup fosforil dari satu nukleotida ke nukleotida yang lain. Dengan adanya tambahan dari ATP, grup fosfat ditempatkan pada grup fosfat pada NMP kinase. Aproksimasi ini memfasilitasi transfer fosfat di antara dua molekul (Gambar 22).



Gambar 22. Mekanisme transfer grup fosforil yang dibantu enzim nukleosida monofosfat (NMP) kinase

### **Katalisis kovalen (*Covalent catalysis*)**

Katalisis kovalen oleh enzim membantu katalisis sebuah reaksi spesifik. Proses katalisis kovalen melibatkan pembentukan suatu ikatan kovalen antara enzim dengan satu atau lebih substrat. Dalam reaksi ini, enzim memiliki gugus reaktif yang biasanya berupa residu nukleofilik yang bereaksi dengan substrat. Rantai samping asam amino mempunyai sejumlah gugus nukleofilik ( $\text{RCOO}^-$ ;  $\text{R-NH}_2$ ; aromatik-OH; histidil;  $\text{R-OH}$ ; dan  $\text{RS}^-$ ). Gugus-gugus ini menyerang bagian elektrofilik (kekurangan elektron) pada substrat untuk membentuk ikatan kovalen antara substrat dan enzim, menghasilkan suatu zat intermediet. Dalam pembentukan zat intermediet yang terikat secara kovalen, penyerangan oleh enzim nukleofil terhadap substrat dapat mengakibatkan asilasi, fosforilasi, atau glikosilasi pada nukleofil. Hilangnya muatan dalam reaksi selama *transitional state* menyebabkan akselerasi proses hidrolisis. Residu berikatan secara kovalen

pada substrat di sepanjang reaksi katalitik. Tambahan intermediet membantu menstabilkan *transitional state* dengan menurunkan energi aktivasi. Ikatan kovalen selanjutnya putus untuk meregenerasi enzim. Setelah reaksi selesai, enzim kembali ke keadaan sebelum termodifikasi.

Katalisis kovalen sering terjadi pada enzim-enzim yang mengatalisis reaksi pemindahan gugus. Residu di enzim yang ikut serta dalam katalisis kovalen umumnya adalah suatu sistein atau serin dan kadang-kadang lisin, asparagin atau histidin. Katalisis kovalen sering mengikuti suatu mekanisme dengan substrat pertama yang terikat dan produknya dibebaskan sebelum substrat keduanya terikat.

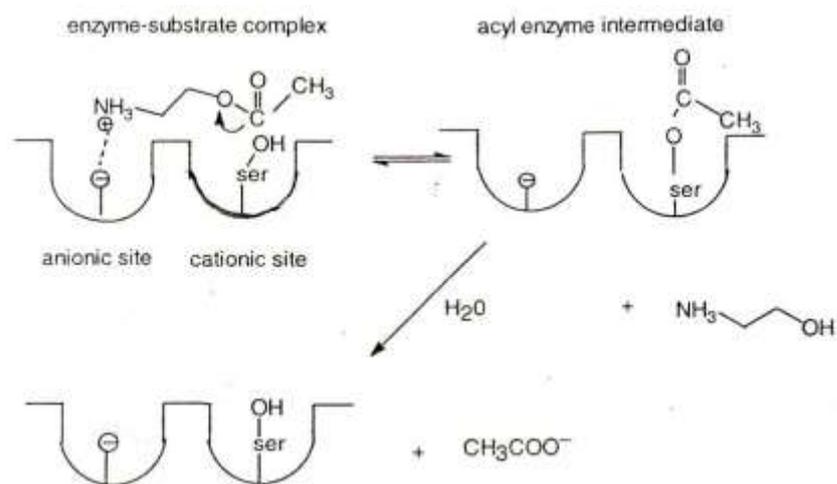
Katalisis kovalen terdiri dari dua jenis, yaitu:

1. Nukleofilik: sumber elektron berasal dari enzim

Contohnya Serin protease, lipase, esterase, fosfatase, tiol protease, aldolase, transaldolase, DNA ligase, topoisomerase.

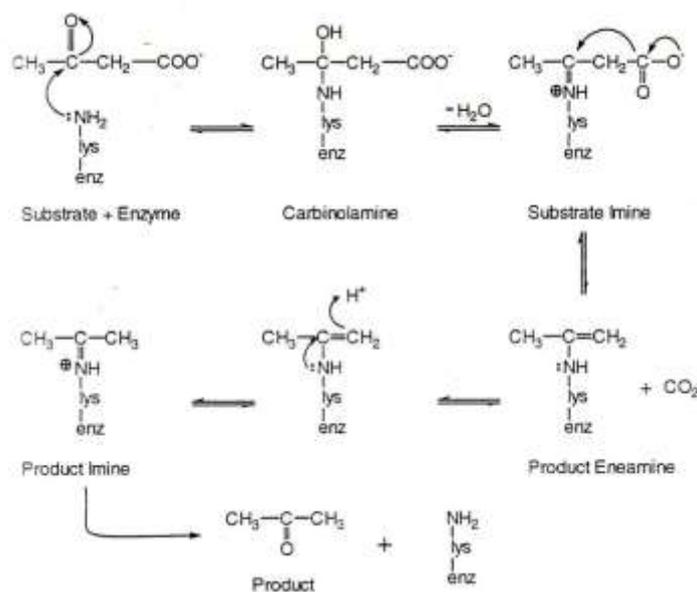
Gambar 23. menunjukkan mekanisme aksi asetilkolin esterase (ACE) yang memiliki nukleofil serin berupa intermediet asetil pada situs esteratik, serta jembatan garam yang meningkatkan pengenalan dan ikatan region trimetil amonium dari asetilkolin. Nukleofilik serin menyerang ikatan ester sehingga kolin terlepas dan intermediet asil enzim terbentuk. Air melepas asetat dari intermediet asil.

**Acetylcholine -----> choline + acetic acid**



Gambar 23. Mekanisme aksi enzim asetilkolin esterase

2. Elektrofilik: elektron ditarik dari pusat reaksi yang berasal dari intermediet Dalam reaksi, melibatkan koenzim tiamin pirofosfat (TPP) dan piridoksal fosfat (PLP). Dalam beberapa kasus, melibatkan pembentukan *shift base* seperti asetoasetat dekarboksilase, dekarboksilase, residu asil enzim, dan aldolase dalam glikolisis. Gambar 24 menunjukkan mekanisme kerja enzim asetoasetat dekarboksilase, menggambarkan adanya intermediet Schiff base.



Gambar 24. Mekanisme kerja enzim asetoasetat dekarboksilase, menggambarkan adanya intermediet Schiff base.

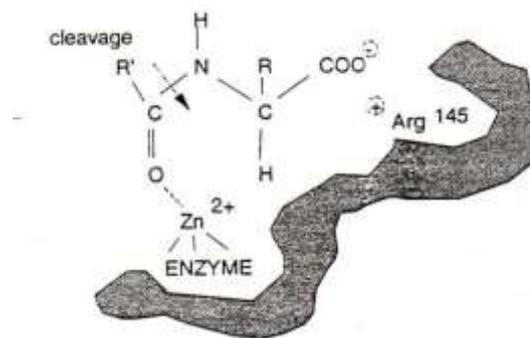
### Katalisis Asam-Basa Umum (*General acid/base catalysis*)

Katalisis asam dan basa dalam proses enzimatik melibatkan transfer proton dari suatu gugus asam yang menyebabkan penurunan energi aktivasi dari keadaan reaksi transisi (*transition state*). Proses ini tidak melibatkan pembentukan ikatan kovalen untuk setiap tahapan, tetapi untuk reaksi enzimatik secara keseluruhan. Dengan kata lain, hanya sedikit enzim yang tidak memiliki gugus katalitik asam atau basa pada sisi aktifnya. Meskipun demikian, enzim memiliki keterbatasan, tidak seperti reaksi organik yang dapat berlangsung pada rentang pH yang luas. Enzim hanya dapat bekerja pada pH fisiologis yaitu pada rentang 5,0-9,0. Asam

amino dalam enzim berfungsi sebagai pengkatalis asam atau basa dalam reaksi. Reaksi dikatalisis dengan cara mendonorkan atau menerima proton yang ditransfer pada saat *transition state*. Keberadaan gugus asam atau basa pada sisi aktif berperan untuk menstabilkan proses *transition state*.

### Katalisis dengan Melibatkan Ion Logam

Enzim yang berperan dalam proses katalisis yang melibatkan ion-ion logam disebut dengan metaloenzim. Ion logam yang terlibat antara lain Fe, Cu, Mn, Co yang bersifat katalitik. Ion Na, K atau Ca bersifat struktural, sedangkan Mg dan Zn dapat bersifat katalitik maupun struktural. Keterlibatan ion logam dalam proses katalitik adalah mengikat substrat sehingga orientasinya sesuai untuk bereaksi, membantu reaksi redoks melalui perubahan biloks ion L dan menstabilkan elektrostatik. Tabel 8. menunjukkan enzim-enzim yang merupakan metaloenzim, sedangkan Gambar 25 menunjukkan aktivitas katalitik suatu metaloenzim.



Gambar 25. Aktivitas katalitik sebuah metaloenzim yang memiliki ion  $Zn^{2+}$  pada sisi aktifnya

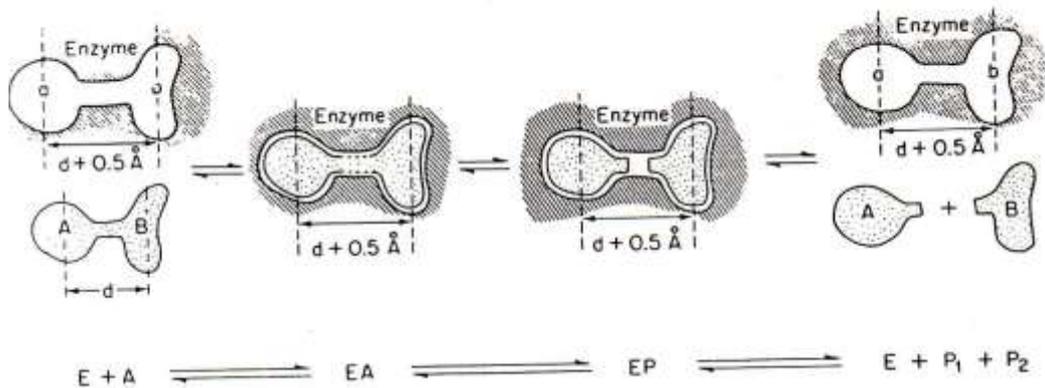
Tabel 8. Enzim yang melibatkan peran ion logam dalam proses katalisisnya.

Logam	Tipe enzim	Fungsi dari logam	Redoks
Mg	Kinase, fosfatase, fosfodiesterase	Ikatan fosfat polifosfat	✗
Zn	Metalloprotease, dehidrogenase	Aktivasi asam karbonil Lewis	✗
Fe	Oksigenase (P450,	Ikatan dan aktivasi	✓

	non-heme) kluster [FeS]	oksigen, transport electron, hidratase	
Cu	Oksigenase	Aktivasi oksigen	✓
Mn	Hidratase	Asam Lewis	✓
Co	Koenzim vitamin B12	Homolisis ikatan Co-karbon	✓
Mo	Nitrogenase	Komponen dari kluster Mo/Fe	✓

### **Katalisis Regangan Ikatan atau Distorsi Molekul**

Reaksi antara enzim dengan substrat dengan cara distorsi lazim disebut dengan rack mechanism. Pada mekanisme ini terjadi regangan dan pelepasan regangan dalam ikatan reaktan. Pada keadaan transisi, substrat berubah menjadi produk dan menghasilkan peningkatan laju reaksi kimia. Pada kasus enzim, tidak hanya substrat yang terdistorsi (mempunyai regangan) tetapi derajat kebebasan pun bertambah, yaitu enzim dengan semua rantai samping asam aminonya. Untuk meningkatkan laju katalitik, diperlukan destabilisasi kompleks enzim-substrat secara keseluruhan dan peningkatan kestabilan keadaan transisi. Destabilisasi kompleks enzim-substrat terjadi karena distorsi sudut dan panjang ikatan dari konfigurasi sebelumnya yang lebih stabil. Destabilisasi ini dapat diperoleh karena adanya gaya tarik atau gaya tolak elektrostatik oleh gugus-gugus yang terdapat pada substrat dan enzim. Atau, bisa juga melibatkan pelepasan air dari gugus bermuatan dalam tapak aktif hidrofobik. Gambar 26 menunjukkan mekanisme distorsi molekul atau regangan ikatan enzim-substrat



Gambar 26. Mekanisme distorsi molekul/ regangan ikatan enzim-substrat

### Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Aktivitas enzim tergantung pada macam dan konsentrasi substrat, temperatur, pH, serta susunan dan jumlah bahan/cairan lain yang ditambahkan.

#### 1. Macam substrat dan kadar (konsentrasi) substrat

Jika konsentrasi substrat kecil, maka reaksinya ditentukan oleh substratnya, sehingga tercapai keseimbangan antara kecepatan reaksi dan konsentrasi substrat. Jika konsentrasi substrat kecil, terdapat aktivitas enzim yang kecil pula. Jika substrat dalam keadaan berlebih, maka reaksinya tergantung pada jumlah/konsentrasi enzim yang ada. Kecepatan reaksi enzim tidak tergantung pada konsentrasi substrat yang ada. Hubungan antara enzim dan substrat dapat diperumpamakan sebagai berlangsungnya hubungan penawaran dan permintaan.

Pada kondisi substrat terbatas, akan terbentuk kurva pS (parameter-substrat) yaitu suatu kurva kejenuhan dan setelah dihitung secara semi logaritme merupakan kurva disosiasi yang kita kenal sebagai kurva jenuh yang berbentuk S adalah kecepatan reaksi. Pada kondisi substrat yang konsentrasinya berlebih dibandingkan dengan enzim, terdapat kejenuhan substrat, maka pengaruh ini disebut konstanta Michaelis ( $K_m$ ) atau konstanta substrat ( $K_s$ ). Kurva yang terbentuk ditentukan menurut anjuran Lineweaver dan Burk. Berdasarkan hal tersebut di atas, penentuan aktivitas enzim secara *in vitro* hendaknya dalam keadaan substrat yang berlebih (substrat optimum), sehingga menunjukkan kurva linier.

## 2. Temperatur

Seperti pada reaksi kimia lainnya, reaksi-reaksi enzim sangat tergantung pada temperatur. Temperatur dapat menentukan aktivitas maksimum enzim. Tercapainya temperatur optimum tergantung pula pada macam enzim, susunan cairan (*milieu*) dan lamanya percobaan. Aktivitas enzim tergantung pada temperatur percobaan. Jalannya reaksi enzimatik pada bermacam-macam temperatur menunjukkan bahwa lebih tinggi temperatur, lebih kuat lekukan kurva waktu penguraian. Pada percobaan *in vitro*, enzim masih dapat beraktivitas pada temperatur 30°C, dan enzim menjadi inaktif pada temperatur 40°C. Masa inkubasi enzim pada 37°C dapat dilakukan, namun lebih aman jika diinkubasi pada suhu kamar (25°C).

## 3. Konsentrasi ion hidrogen H<sup>+</sup>

Kondisi pH dimana aktivitas tertinggi enzim tercapai disebut pH optimum. Nilai pH optimum pada masing-masing enzim berbeda karena setiap enzim mempunyai karakteristik tertentu, juga tergantung pada macam dan konsentrasi substrat yang digunakan serta syarat-syarat percobaan lainnya. Pada umumnya pH optimum untuk beberapa enzim terdapat antara netral atau asam lemah. Nilai ekstrim pH optimum terdapat pada enzim pencernaan, misalnya pepsin (pH 1,2-2,5) dan tripsin (pH8-11).

## 4. Banyak dan susunan cairan yang ditambahkan

Substansi-substansi yang mempertinggi aktivitas suatu enzim disebut *aktivator* dan yang menghambat disebut *inhibitor*. Tiap percobaan dengan enzim mempunyai aktivator dan inhibitor dalam jumlah dan macam yang berbeda. Aktivitas enzim merupakan resultanta pengaruh aktivator dan inhibitor.

### **Aktivator enzim**

Beberapa enzim tidak memerlukan komponen tambahan untuk mencapai aktivitas penuhnya. Namun beberapa memerlukan pula molekul non-protein yang disebut kofaktor untuk berikatan dengan substrat sehingga enzim menjadi aktif. Kofaktor dapat berupa aktivator zat anorganik (contohnya ion logam Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> dan kluster besi sulfur) ataupun zat organik (contohnya flavin dan heme).

Kofaktor zat organik dapat berupa *gugus prostetik* yang mengikat dengan kuat, ataupun *koenzim*, yang akan melepaskan diri dari tapak aktif enzim ketika reaksi.

Enzim yang memerlukan kofaktor namun tidak terdapat kofaktor yang terikat dengannya disebut sebagai *apoenzim* ataupun *apoprotein*. Apoenzim beserta dengan kofaktornya disebut *holoenzim* (bentuk aktif). Kebanyakan kofaktor tidak terikat secara kovalen dengan enzim, tetapi terikat dengan kuat. Namun, gugus prostetik organik dapat pula terikat secara kovalen (contohnya tiamin pirofosfat (TPP) pada enzim piruvat dehidrogenase). Istilah *holoenzim* juga dapat digunakan untuk merujuk pada enzim yang mengandung subunit protein berganda, seperti DNA polimerase. Pada kasus ini, holoenzim adalah kompleks lengkap yang mengandung seluruh subunit yang diperlukan agar menjadi aktif. Contoh enzim yang mengandung kofaktor adalah karbonat anhidrase, dengan kofaktor seng terikat sebagai bagian dari tapak aktifnya.

Koenzim adalah kofaktor berupa molekul organik kecil yang mentranspor gugus kimia atau elektron dari satu enzim ke enzim lainnya. Contoh koenzim mencakup NADH, NADPH dan adenosin trifosfat. Gugus kimiawi yang dibawa mencakup ion hidrida ( $H^-$ ) yang dibawa oleh NAD atau  $NADP^+$ , gugus asetil yang dibawa oleh koenzim A, formil, metenil, ataupun gugus metil yang dibawa oleh asam folat, dan gugus metil yang dibawa oleh S-adenosilmetionin. Beberapa koenzim seperti riboflavin, tiamin, dan asam folat adalah vitamin. Karena koenzim secara kimiawi berubah oleh aksi enzim, sehingga dapat dikatakan koenzim merupakan substrat yang khusus, ataupun substrat sekunder. Sebagai contoh, sekitar 700 enzim diketahui menggunakan koenzim NADH. Regenerasi serta pemeliharaan konsentrasi koenzim terjadi dalam sel. Contohnya NADPH diregenerasi melalui lintasan pentosa fosfat, dan S-adenosilmetionin melalui metionin adenosiltransferase.

### **Molekul inhibitor enzim**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa jenis molekul, seperti molekul inhibitor. Berdasarkan reaksi kimianya, ada dua macam inhibitor, yaitu inhibitor *irreversible* dan *reversible*. Setelah berikatan dengan enzim, inhibitor *irreversible* tidak dapat dipisahkan lagi dari enzim. Inhibitor *irreversible* menyebabkan enzim

tidak dapat bekerja lagi. Sementara inhibitor *reversible* dapat dipisahkan dari molekul enzim, setelah berikatan dengan enzim. Ada 3 macam jenis inhibitor *reversible*, yaitu inhibitor yang bekerja secara kompetitif, non kompetitif, dan unkompetitif.

Inhibitor kompetitif memiliki struktur yang mirip dengan substrat asli enzim, dan berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan tapak/sisi aktif enzim. Penambahan substrat dapat mengurangi daya hambat dari inhibitor kompetitif, karena inhibitor bersaing dengan substrat untuk mengikat sisi aktif enzim. Contohnya adalah malonat merupakan inhibitor kompetitif enzim suksinat dehidrogenase yang mengkatalisis oksidasi asam suksinat menjadi fumarat. Penambahan asam suksinat sebagai substrat reaksi, akan menormalkan kembali kecepatan aktivitas enzim. Aktivitas inhibitor kompetitif sangat bergantung pada konsentrasi inhibitor, konsentrasi substrat, dan afinitas relatif inhibitor dan substrat.

Inhibitor non-kompetitif dapat mengikat pada bagian enzim tetapi bukan pada sisi aktif (tempat terikatnya substrat), sehingga molekul inhibitor tidak bersaing dengan substrat. Inhibitor ini dapat mengikat enzim bebas atau substrat dan inhibitor mengikat enzim secara bersamaan membentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor. Substrat dan molekul inhibitor non-kompetitif masing-masing berikatan pada bagian yang berbeda dari molekul enzim. Namun, dengan terikatnya molekul inhibitor pada enzim, akan mengubah konformasi bagian tapak/sisi aktif enzim sehingga substrat tidak dapat terikat secara fit pada enzim. Dengan demikian, penambahan substrat tidak akan dapat menghambat aktivitas inhibitor jenis ini. Daya kerja inhibitor sangat tergantung pada konsentrasi inhibitor dan afinitas inhibitor terhadap enzim. Secara kinetika, karena inhibitor tidak dapat diatasi dengan peningkatan konsentrasi substrat, maka  $V_{max}$  reaksi berubah. Namun, karena substrat masih dapat mengikat enzim, maka  $K_m$  tetap sama. Pada inhibitor non-kompetitif, inhibitor tidak dapat berikatan dengan enzim bebas, namun hanya dapat dengan kompleks ES. Kompleks EIS yang terbentuk kemudian menjadi tidak aktif. Jenis inhibitor ini sangat jarang, namun dapat terjadi pada enzim-enzim multimerik.

## **BAB VII**

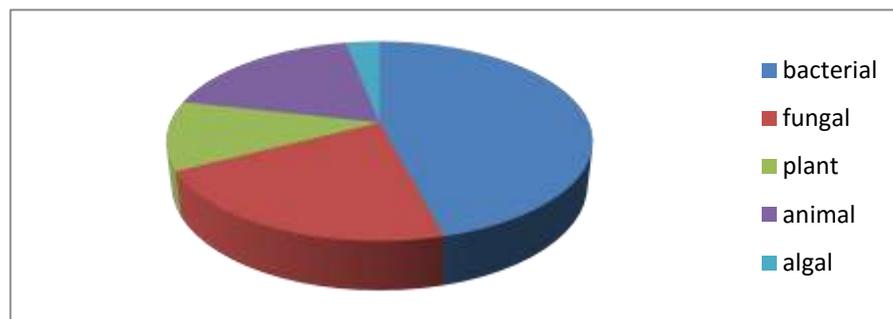
### **Produksi Enzim dan Peningkatan Kualitas Strain**

Pemanfaatan enzim oleh manusia sudah dilakukan sejak masa lampau. Aktivitas pemanfaatan enzim di waktu lampau misalnya pembuatan mentega dan keju yang memanfaatkan ekstrak dari rumen sapi, preparasi kecap kedelai koji yang memanfaatkan protease dan amilase dari tepung dan kedelai, pemanfaatan kotoran burung merpati untuk proses *tanning* dalam penyamakan kulit, proses fermentasi *wine* beras yang memanfaatkan amilase dan protease dari pepaya dan nanas, dan lain sebagainya. Ada dua cara penggunaan enzim dalam industri, yaitu (1) memanfaatkan enzim yang secara alami ada dalam sel dari mikroorganisme, jaringan tanaman dan jaringan hewan (enzim endogen), dan (2) menambahkan enzim dari luar ke dalam proses produksi suatu industri (enzim eksogen). Berbagai enzim yang digunakan secara komersial berasal dari jaringan tumbuhan, hewan, dan dari mikroorganisme yang terseleksi. Proses fermentasi yang memanfaatkan enzim dilakukan dengan dua cara yaitu fermentasi dalam media cair (*submerged fermentation*) dan media padat (*solid-state fermentation*).

#### **Keuntungan Enzim yang Dihasilkan oleh Mikroba**

Enzim berperan penting dalam keberlangsungan semua makhluk hidup (tumbuhan, hewan, manusia, dan mikroorganisme). Enzim yang memiliki peran utama dalam keberlangsungan makhluk hidup yaitu enzim yang bekerja dalam proses metabolisme. Enzim-enzim dalam makhluk hidup dapat diekstrak dan diproduksi. Akan tetapi, enzim yang diperoleh dari tumbuhan dan hewan memiliki keterbatasan yaitu dalam lambatnya dan rendahnya kapasitas produksi, pengendalian produksi yang sulit, proses ekstraksi yang memakan banyak biaya dan waktu, dan ketergantungan terhadap musim. Biasanya, enzim yang diperoleh dari tumbuhan dan hewan seringkali berupa produk samping bukan produk utama. Jika permintaan jumlah enzim meningkat, seperti contoh yaitu enzim rennet yang berasal dari rumen sapi yang dimanfaatkan dalam pembuatan keju, maka yang terjadi adalah pembunuhan besar-besaran ternak sapi. Alternatif yang sudah dilakukan adalah mengganti enzim rennet dengan enzim papain yang berasal dari

lateks papaya. Akan tetapi, jumlahnya masih belum dapat memenuhi kebutuhan dengan maksimal. Lebih jauh lagi, preparasinya cukup rumit dan memakan waktu. Hal inilah yang mendorong para ilmuwan untuk mencari alternatif yang efektif dan efisien dalam hal produksi enzim. Untuk itulah dilakukan eksplorasi produksi enzim yang berasal dari mikroorganisme baik yang berasal dari kapang, bakteri, maupun alga (Gambar 27).



Gambar 27. Perbandingan produksi enzim yang berasal dari berbagai sumber

Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan tanaman dan hewan. Produk enzim dari mikroorganisme memiliki beberapa keunggulan, yaitu ketersediaan berbagai jenis mikroorganisme di alam, sehingga produsen enzim dapat memilih strain yang tepat untuk produksi enzim yang diinginkan. Selain itu, kultur mikroorganisme relatif mudah dilakukan, memerlukan waktu yang singkat dan dapat dilakukan kontrol produksi. Semakin banyak jumlah sel mikroorganisme, maka semakin banyak pula enzim yang diinginkan dapat diproduksi. Enzim yang diproduksi mikroba dilepas ke medium, sehingga proses pemanenan dapat dilakukan dengan mudah. Enzim mikroba bersifat lebih stabil dibandingkan dengan enzim yang berasal dari tumbuhan dan hewan. Lebih jauh lagi, mikroorganisme dapat direkayasa untuk perbaikan sifat sehingga produksi enzim yang diinginkan meningkat. Seperti contoh, sebagai pengganti enzim rennet, telah ditemukan kapang yang memproduksi enzim protease yang sifatnya hampir sama dengan rennin yaitu *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* dan *Mucor miehei*. Saat ini, telah dilakukan rekayasa genetika dimana gen produsen protease pada *Mucor miehei* disisipkan ke dalam *Escherichia coli* untuk produksi besar-besaran enzim rennin dari bakteri.

Pertimbangan penggunaan mikroorganisme sebagai sumber produksi enzim adalah:

1. Secara normal mempunyai aktivitas spesifik yang tinggi per unit berat kering produk
2. Tidak ada fluktuasi musiman, dan tidak ada kemungkinan kekurangan makanan akibat perubahan iklim
3. Karakteristik cakupan mikroorganisme yang lebih luas, seperti cakupan pH, dan resistensi temperatur
4. Industri genetika sangat meningkat pesat, sehingga memungkinkan optimalisasi hasil dan tipe enzim melalui seleksi strain, mutasi, induksi dan seleksi kondisi pertumbuhan

Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim sangat rumit. Galur tertentu hanya akan menghasilkan konsentrasi enzim yang tinggi pada media padat, sedangkan galur yang lain pada media cair. Produk enzim yang aman sebaiknya mempunyai potensi alergi yang rendah, dan dalam partikelnya terbebas dari kontaminan. Produk enzim dari mikroba harus memenuhi spesifikasi yang ketat berkenaan dengan sifat racun dan aspek keamanan yang lain.

#### **Enzim intra sel dan ekstra sel**

Enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme dapat berada di dalam sel (intraseluler) maupun di luar sel (ekstraseluler). Enzim tersebut dapat berupa molekul kecil yang bekerja di dalam sel namun dapat disekresikan keluar sel ketika medium substrat yang berada di luar sel perlu didigesti. Enzim tersebut merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang secara normal dihasilkan oleh mikroorganisme dalam lingkungan eksternal sel. Meskipun demikian, beberapa enzim intraseluler, sekarang juga banyak diproduksi secara industri seperti glukosa oksidase untuk pengawetan makanan, asparaginase untuk terapi kanker, dan penicilin asilase untuk antibiotika. Keberadaan enzim di dalam sel maupun di luar sel mempengaruhi proses pemanenan enzim tersebut. Jika enzim berada di dalam sel, maka disrupsi atau penghancuran sel perlu dilakukan untuk memperoleh enzim, sedangkan jika enzim berada di luar sel, maka dapat dilakukan ekstraksi dan purifikasi enzim dari medium secara langsung.

## Produksi Enzim

Sampai saat ini lebih dari 200 enzim telah diisolasi dari mikroorganisme, tumbuhan dan hewan, tetapi kurang dari 20 macam enzim yang digunakan pada skala komersial atau industri. Kini, produsen enzim komersial memasarkan enzim dalam bentuk kasar karena proses isolasinya lebih sederhana, terutama digunakan dalam industri detergen (menggunakan enzim amilase), industri roti (menggunakan enzim proteinase), industri bir (menggunakan enzim beta-glukanase, amiloglukosidase), industri tekstil (menggunakan enzim amilase), industri kulit (menggunakan enzim tripsin), industri farmasi dan obat-obatan (menggunakan enzim tripsin).

Enzim yang secara tradisional diperoleh dari tumbuhan termasuk protease (papain, fisin, dan bromelain), amilase, lipoksigenase, dan enzim khusus tertentu. Enzim utama dari jaringan hewan adalah tripsin pankreas, lipase dan enzim untuk pembuatan mentega. Enzim dari tumbuhan dan hewan tersebut memungkinkan timbul banyak persoalan. Enzim dari tumbuhan, persoalan yang timbul antara lain variasi musim, konsentrasi rendah dan biaya proses yang tinggi. Sementara enzim dari hewan, selain jumlahnya terbatas juga dimanfaatkan untuk kepentingan lain. Dengan demikian, sumber enzim tradisional ini (dari tumbuhan dan hewan) tidak memenuhi syarat untuk mencukupi kebutuhan enzim masa kini. Oleh karena itu, peningkatan sumber enzim banyak dilakukan dari mikroba penghasil enzim. Beberapa sumber enzim disajikan dalam Tabel 9.

Tabel 9. Enzim dan sumbernya

Enzim	Sumber
$\alpha$ -amilase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
$\beta$ -glukonase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Glucoamilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus sp</i>
Glukosa isomerase	<i>Arthobacter sp</i> , <i>Bacillus sp</i>
Lactase	<i>Kluyveromyces sp</i>

Lipase	<i>Candida lipolytica</i>
Pectinase	<i>Aspergillus sp</i>
Penicilin acylase	<i>Eschericia coli</i>
Protease, asam	<i>Aspergillus sp</i>
Protease, alkali	<i>Aspergillus oryzae, Bacillus sp</i>
Protease, netral	<i>Bacillus amyloliquefacien, Bacillus thermoproteolyticus</i>
Pullulanase	<i>Klebsiela aerogenes</i>

Produksi enzim diawali dengan proses pemilihan mikroorganisme penghasil enzim yang diinginkan. Proses seleksi dapat pula ditambah dengan memilih enzim intraseluler atau ekstraseluler. Jika enzim yang diproduksi akan dimanfaatkan dalam industri pangan, maka mikroorganisme harus memenuhi kriteria *generally recognized as safe* (GRAS), yaitu mikroorganisme yang tidak menghasilkan toksikan dan bukan merupakan mikroorganisme patogen. Beberapa mikroorganisme yang masuk dalam kategori GRAS yaitu *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* dan *A. oryzae*. Mikroorganisme yang dipilih harus stabil material genetiknya dan tidak mudah mengalami mutasi. Konsiderasi yang lain yaitu mikroorganisme harus dapat hidup dalam medium yang murah dan stabil terhadap perubahan suhu lingkungan.

Mikroorganisme dapat ditumbuhkan sebagai starter dalam proses *enrichment culture* serta melalui proses purifikasi. Medium khusus dan zat anti dapat digunakan supaya mikroorganisme lain yang tidak diinginkan tidak dapat tumbuh dalam medium *starter*. Uji aktivitas enzim perlu dilakukan guna mengetahui seberapa tinggi aktivitas enzim yang diinginkan. Karakterisasi sifat enzim berupa pH optimum, suhu optimum, dan stabilitas. Kultur murni bakteri dapat disimpan dalam agen kriogenik seperti 20% gliserol pada suhu 4°C atau -20°C dan -196°C dalam nitrogen cair. Proses *freeze drying* juga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif penyimpanan kultur mikroorganisme.

Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam produksi enzim oleh mikroorganisme adalah tipe dari mikroorganisme, komposisi medium yang tepat

(sumber C, N, P, mineral dan vitamin), suhu dan pH lingkungan, transfer oksigen, dan level karbondioksida, stimulator dan inhibitor.

### **Desain kultur**

Dalam mendesain medium untuk kultur mikroorganisme guna memproduksi enzim, sebaiknya digunakan adalah sumber yang biayanya murah dan mudah diperoleh. Sumber karbon dapat berupa karbohidrat seperti glukosa, laktosa, sirup sukrosa, molase, pati jagung, pati kentang, pati ketela, dan hidrolisat pati. Sumber nitrogen dapat berupa amonia dan garam amonium, tepung kedelai, ekstrak khamir, ekstrak daging, dan limbah cair industri tahu tempe. Kontrol pH juga perlu dilakukan dengan cara penambahan asam maupun basa. Mineral yang dibutuhkan dapat berupa kalsium, magnesium, fosfor, potasium, tembaga, klorida, seng, dan besi. Penggunaan surfaktan (Tween 80, Triton X100, SDS) terkadang diperlukan untuk meningkatkan produksi enzim. Tambahan induktor dan represor dalam produksi enzim terkadang diperlukan untuk menginduksi produksi katabolit enzim maupun untuk merepresi katabolit.

### **Pentingnya Aerasi dalam Produksi Enzim**

Mikroorganisme memerlukan udara untuk tumbuh. Oleh karena itu, agitasi sangat diperlukan untuk meningkatkan solubilitas oksigen dalam medium tumbuh selama proses kultur mikroorganisme. Viskositas medium juga mempengaruhi kadar oksigen terlarut, sehingga diperlukan agitasi yang lebih kuat. Penambahan agen *anti-foaming* kemungkinan diperlukan dalam proses agitasi, karena proses agitasi dapat memunculkan gelembung busa sangat tinggi. Munculnya gelembung busa ini dapat menurunkan kadar oksigen terlarut sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas enzim.

### **Produksi Enzim Mikroba menggunakan Media Padat (*solid-state*)**

Salah satu media yang digunakan dalam produksi enzim oleh mikroorganisme adalah media padat. Media padat seringkali digunakan untuk produksi enzim oleh kapang atau khamir. Media padat bersifat solid dengan kelembaban sekitar 60%. Dalam praktek pembuatan tempe, koji, dan miso, media padat sangat cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme. Enzim dan protein yang terkandung dalam tepung kedelai, beras, gandum dapat digunakan untuk

memproduksi berbagai macam enzim. Teknik sterilisasi yang tepat untuk media padat adalah dengan cara menyesuaikan pH menjadi asam dan pengukusan media. Setelah didinginkan, media ditabur dengan spora dari mikroorganisme secara merata. Teknik produksi enzim menggunakan media padat memiliki kelemahan karena memerlukan ruang yang besar, pengendalian selama fermentasi yang sulit, *yield* yang tidak seragam, dan mudah terkontaminasi. Namun, penggunaan media padat memiliki keunggulan yaitu konsentrasi enzim yang diperoleh pada saat panen sangat tinggi.

#### **Produksi Enzim Mikroba menggunakan media cair (*submerged*)**

Selain penggunaan media padat, penggunaan media cair sangat populer dalam produksi enzim. Penggunaan media cair memiliki beberapa keunggulan, yaitu proses sterilisasi mudah, kontrol proses fermentasi yang sederhana dan tidak memakan banyak tenaga, pertumbuhan mikroorganisme lebih cepat jika dengan agitasi dan aerasi yang cukup. Disamping itu, penggunaan media cair dalam proses fermentasi memudahkan proses pemanenan produk enzim.

#### **Pengaruh Kondisi Lingkungan pada Produksi Enzim**

Faktor lingkungan utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan produksi enzim adalah suhu, pH dan oksigen terlarut. Temperatur dan pH optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme berbeda-beda (Tabel 10) Beberapa mikroorganisme menyukai suhu dingin, dan beberapa menyukai suhu tinggi. Jika suhu tidak sesuai, maka pertumbuhan mikroorganisme tidak optimal. Sebagai contoh *Trichoderma reesei* memproduksi selulase selama dua hari pada suhu 31 °C dan pada pH 3.0. *Aspergillus niger* memiliki pH optimum untuk produksi lipase pada 7,0. Kadar oksigen terlarut untuk 7-10 ppm, merupakan kadar oksigen yang tepat untuk tumbuh mikroorganisme, guna meningkatkan kadar oksigen terlarut dapat dilakukan dengan aerasi dan agitasi dalam fermentor.

#### **Optimasi Produktivitas dan Produksi Enzim**

Secara umum, hasil isolasi mikroorganisme dari alam untuk produksi enzim hanya menghasilkan sedikit jumlah enzim. Oleh karena itu, diperlukan teknik optimasi sehingga diperoleh jumlah dan aktivitas enzim yang tinggi dan

mencukupi. Langkah yang perlu ditempuh adalah menemukan bagaimana cara meningkatkan produktivitas dan *yield* enzim, bagaimana cara menurunkan resiko kontaminasi dan ongkos produksi, serta bagaimana cara mengubah jalur metabolisme mikroorganismenya supaya produksi enzim dapat dilakukan terus-menerus. Cara-cara tersebut dapat dilakukan dengan optimasi konsentrasi dan komposisi medium, mutasi, rekayasa genetika dan rekayasa protein, evolusi langsung, hibridisasi, *cloning*, dan *DNA shuffling*.

Tabel 10. Kondisi lingkungan yang berbeda-beda antar mikroorganismenya

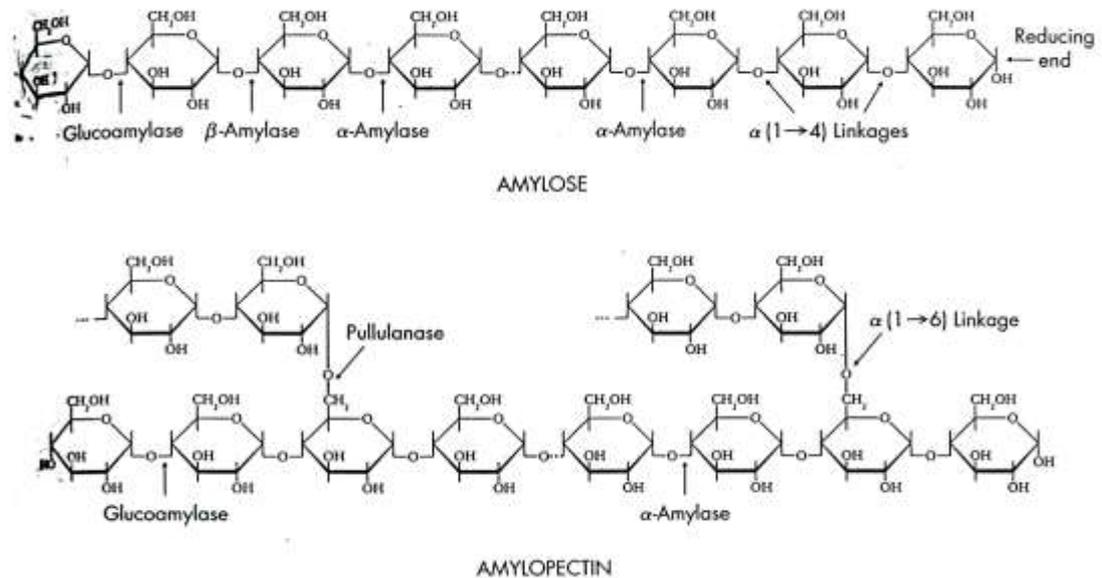
Organisme	Suhu Pertumbuhan (°C)	Suhu optimum (°C)	pH optimum
<b>Bakteri</b>			
<i>Acinetobacter sp</i>	30	50-55	7.0
<i>Bacillus acidocaldarius A-2</i>	50	70	3.5
<i>B. alcalophilus subsp. halodurans</i>	37	-	10.5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	37	50-70	5.5
<i>B. cereus</i>	30	55	6.0
<i>B. coagulans B 49</i>	30	60	7.0
<i>B. coagulans</i>	35	45-55	6.5-8.0
<i>B. licheniformis</i>	30	90	7.0-9.0
<i>B. macerans</i>	40	-	6.0
<i>B. subtilis</i>	37	55	6.5
<i>Halobacterium halobium</i>	37	55	6.5
<i>Bacteroides amylophilus</i>	37	43	6.3
<i>Micrococcus halobius</i>	30	50-55	6.0-7.0

<i>Streptococcus sp.</i>	40	48	5.5-6.5
<b>Cendawan</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	30	50	5.0
<i>A. oryzae</i>	30	50-55	4.5-5.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	27	25	4.0
<i>Humicola insolens</i>	45	50	6.0
<i>H. lanuginose</i>	45	50	6.0-7.0
<i>Mucor pusillus</i>	45	50	6.0
<i>Trichoderma viride</i>	29	-	5.0-5.5
<b>Yeast</b>			
<i>Candida japonica</i>	30	55	5.0-6.0
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	21	30-40	5.0-6.0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	28	50	3.0-4.0
<i>S. castellii</i>	28	60	6.0
<i>Pichia polymorpha</i>	28	40	4.0
<i>Sachwanniomyces alluvius</i>	30	40	6.5

## **BAB VIII**

### **Enzim Karbohidrase**

Karbohidrase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan karbohidrat (polisakarida) menjadi gula tunggal (monosakarida). Karbohidrat memiliki komponen berupa rantai karbon, hidrogen, dan oksigen. Contoh polisakarida yang penting adalah amilosa dan amilopektin (Gambar 28). Amilosa merupakan polisakarida, polimer tidak bercabang yang tersusun dari glukosa sebagai monomernya. Setiap monomer terhubung dengan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik. Amilosa bersama-sama dengan amilopektin menjadi komponen penyusun pati. Dalam masakan, amilosa memberi efek "keras" atau "pera" bagi pati atau tepung. Amilopektin merupakan polimer bercabang yang tersusun dari monomer  $\alpha$ -glukosa. Walaupun tersusun dari monomer yang sama, karakteristik fisik amilopektin berbeda dengan amilosa. Secara struktural, amilopektin terbentuk dari rantai glukosa yang terikat dengan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik, sama dengan amilosa. Namun, pada amilopektin terbentuk cabang-cabang (sekitar tiap 20 mata rantai glukosa) dengan ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik. Selain itu, amilopektin tidak larut dalam air. Glikogen (disebut juga 'pati otot') merupakan karbohidrat penyimpan energi pada hewan, memiliki struktur mirip dengan amilopektin. Perbedaannya, percabangan pada glikogen lebih rapat/sering.



Gambar 28. Struktur amilosa dan amilopektin beserta enzim yang berperan memotong ikatan dalam struktur polisakarida tersebut.

### Enzim Amilase Pencernaan

Enzim karbohidrase dalam pencernaan disekresi oleh mulut, pankreas dan usus kecil. Enzim amilase dihasilkan oleh mulut dan ditemukan dalam air liur. Amilase di mulut mulai bekerja saat makanan dikunyah. Amilase mendigesti molekul pati kompleks (polisakarida) menjadi maltosa (disakarida). Maltosa masih perlu didigesti lebih lanjut supaya dapat diserap oleh tubuh. Maltase adalah enzim yang memecah maltosa menjadi glukosa. (Gambar 29).

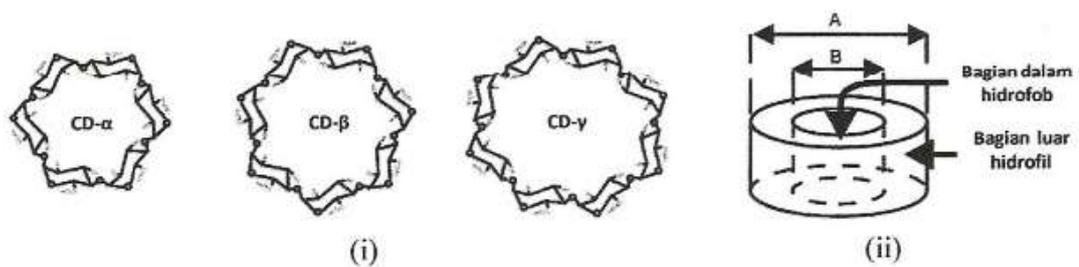


Gambar 29. Perubahan pati menjadi glukosa dengan bantuan enzim amylase dan maltase

### Siklodekstrin Glikosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19)

Siklodekstrin glikosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) merupakan suatu enzim industrial penting yang mengkonversi pati menjadi siklodekstrin (CD). Enzim ini diproduksi secara ekstraseluler oleh mikroba yang umumnya berasal

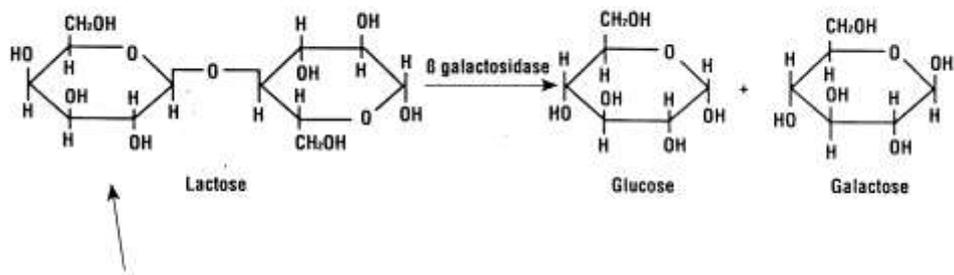
dari genus *Bacillus*, *Archaea*, serta *Actinomycetes*. Berdasarkan jenis CD dominan yang dihasilkannya, CGTase dibedakan menjadi CGTase- $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$  yang masing-masing menghasilkan CD-  $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$  sebagai produk utamanya (Gambar 30). CD memiliki struktur khas dengan bentuk tiga dimensi menyerupai donat yang bagian tengahnya bersifat relatif hidrofob dan bagian luarnya hidrophil. Struktur demikian menjadikan CD mampu menangkap senyawa asing hidrofob dan mengubah sifat fisikokimianya. Oleh karena itu, CD banyak digunakan dalam industri farmasi, kosmetik, kimia, makanan dan proteksi lingkungan karena dapat meningkatkan kelarutan, meningkatkan ketersediaan hayati, stabilitas, mengurangi volatilitas, serta menutupi rasa dan bau yang kurang baik dengan cara membentuk kompleks dengan senyawa-senyawa hidrofob dan mengubah fisikokimianya.



Gambar 30. Struktur kimia CD-  $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$  (i) serta ilustrasi molekul CD (ii) A: diameter eksternal, B: diameter internal.

### Laktase ( $\beta$ -galaktosidase; EC 3.2.1.108)

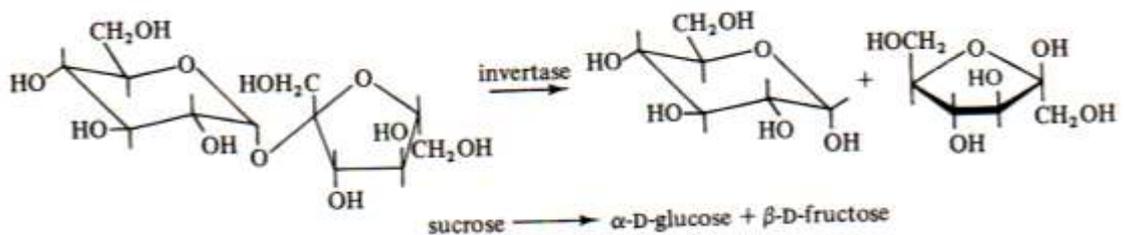
Laktase adalah enzim yang diproduksi oleh banyak organisme. Organ penghasil enzim laktase terletak di perbatasan usus kecil manusia dan mamalia lainnya. Laktase sangat penting untuk pencernaan susu. Individu yang kekurangan laktase, jika mengkonsumsi produk susu kemungkinan mengalami gejala intoleransi laktosa. Laktase dapat dibeli sebagai suplemen makanan, dapat ditambahkan ke susu untuk menghasilkan produk susu "bebas laktosa". Laktase (juga dikenal *lactase-phlorizin hydrolase*; LPH), bagian dari keluarga enzim  $\beta$ -galaktosidase. Laktase adalah hidrolase glikosida yang terlibat dalam hidrolisis laktosa menjadi konstituen monomer galaktosa dan glukosa (Gambar 31). Pada manusia, laktase dikodekan oleh gen LCT.



Gambar 31. Mekanisme kerja enzim lactase dalam memecah lactose menjadi glukosa dan galaktosa

### Invertase (Beta Fruktofuranosidase; EC 3.2.1.26)

Invertase adalah enzim yang menghidrolisis (memecah) sukrosa (gula meja). Nama alternatif untuk invertase adalah sakarase, glukosukrase, beta-fruktosidase, beta-fruktosidase, invertin, sukrase, maxinvert L 1000, *fructosylinvertase*, invertase basa, invertase asam, dan nama sistematis: beta-fruktofuranosidase. Campuran yang dihasilkan dari fruktosa dan glukosa disebut sirup gula terbalik. Invertase dan sukrase menghidrolisis sukrosa untuk memberikan campuran yang sama dari glukosa dan fruktosa (Gambar 32). Invertase membelah ikatan O-C (fruktosa), sedangkan sukrase membelah ikatan O-C (glukosa). Untuk keperluan industri, invertase biasanya diperoleh dari ragi. Invertase juga disintesis oleh lebah, yang digunakan untuk membuat madu dari nektar. Suhu optimum invertase di mana laju reaksi paling besar adalah 60°C dan pH optimum 4,5. Akan tetapi, harga invertase relatif mahal, alternatif yang lebih baik untuk membuat fruktosa adalah dari glukosa menggunakan glukosa isomerase.

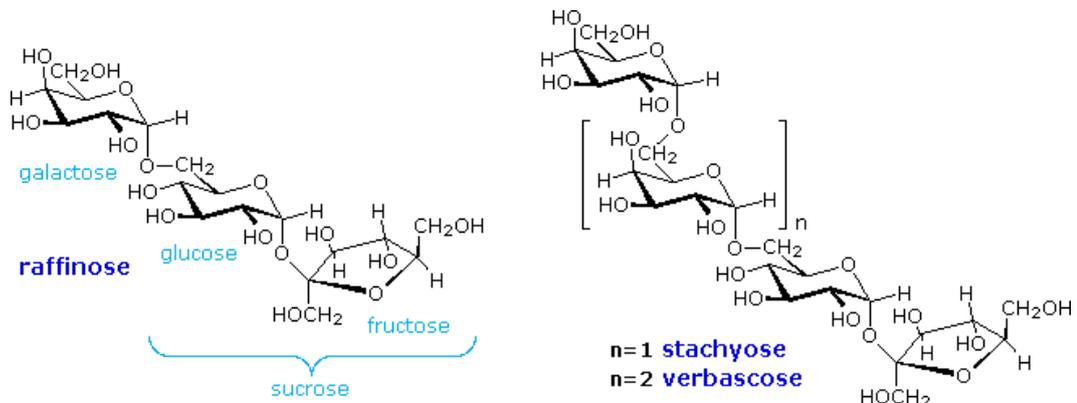


Gambar 32. Mekanisme aksi enzim invertase dalam memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa

### **$\alpha$ -galaktosidase, EC 3.2.1.22**

Enzim  $\alpha$ -galaktosidase menghidrolisis residu 1,6-galaktosa dari rantai oligosakarida seperti melobiosa, rafinosa, stakiosa, galaktomanan, dan galaktolipid. Saat ini, galaktosidase memiliki potensi yang baik dalam bidang bioteknologi. Enzim ini dapat diaplikasikan untuk meningkatkan nilai gizi makanan olahan dari kacang-kacangan. Enzim ini bekerja mengeliminasi galakto oligosakarida (gula rafinosa), suatu zat antigizi yang menyebabkan flatulensi. Dalam industri gula tebu, enzim ini dimanfaatkan untuk menghilangkan rafinosa dari molase guna mendukung proses kristalisasi dan meningkatkan kadar sukrosa. Selain itu, enzim ini digunakan dalam industri kertas, kesehatan dan analisis biokimia.

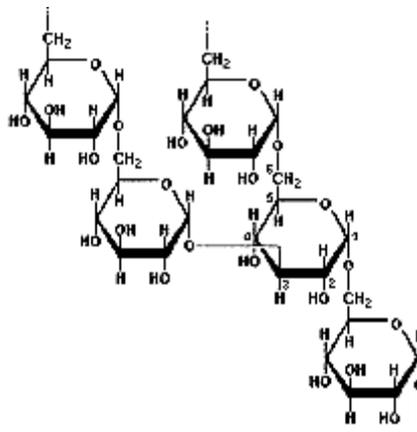
Manusia tidak memiliki sumber alpha-galaktosidase dalam sistem pencernaan sehingga oligosakarida tidak berubah hingga ke dalam usus besar. Mikroorganisme anaerob dalam usus besar memfermentasi gula ini, menghasilkan karbon dioksida dan metana, gas yang menyebabkan perut kembung. Ada dua terapi penggantian enzim yang tersedia untuk mengkompensasi kekurangan alpha-galaktosidase. Agalsidase alpha dan beta merupakan bentuk rekombinan dari enzim A  $\alpha$ -galaktosidase manusia. Keduanya memiliki urutan asam amino yang sama seperti enzim alami. Agalsidase alpha dan beta berbeda dalam struktur rantai samping oligosakaridanya. Perusahaan farmasi Shire memproduksi agalsidase alfa (INN) dengan nama dagang Replagal untuk pengobatan penyakit Fabry. Perusahaan farmasi Genzyme menghasilkan agalsidase beta sintetis (INN) dengan nama dagang Fabrazyme untuk pengobatan penyakit Fabry. Alpha-galaktosidase merupakan bahan aktif dalam Beano, Suntaqzyme, Bean-zyme, dan Gas-zyme 3x. Bloateez (India) dipasarkan sebagai produk untuk mengurangi produksi gas perut setelah makan makanan yang diketahui menyebabkan gas.



Gambar 33. Struktur molekul rafinosa, stakhiosa dan verbaskosa

### Dekstranase (EC 3.2.1.11)

Dekstranase adalah enzim ekstraselular yang dihasilkan oleh beberapa jamur, yeast dan bakteri. Enzim ini menghidrolisis dekstran (Gambar 34) dengan cara memutus ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosida menjadi oligosakarida atau isomaltooligosakarida (IMO). Dalam industri gula, pemakaian dekstranase dapat meningkatkan kualitas dan produksi kristal gula sampai 10%.



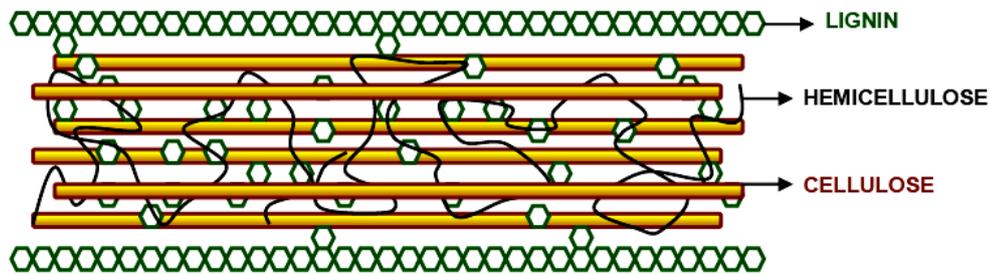
Gambar 34. Struktur molekul dekstran

## BAB IX

### Selulase dan Xilanase

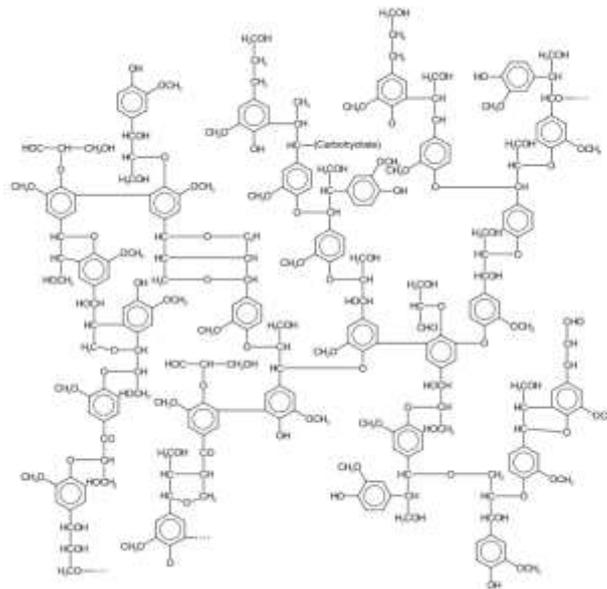
#### Struktur Lignin, Selulosa, Hemiselulosa dan Xilan

Senyawa lignoselulosa (Gambar 35) adalah senyawa yang ditemukan di dalam sel tanaman. Komponen utama lignoselulosa adalah selulosa, hemiselulosa dan lignin. Dalam sel tanaman, ada sekitar 40-50% selulosa, 20-30% hemiselulosa dan 20-30% lignin.



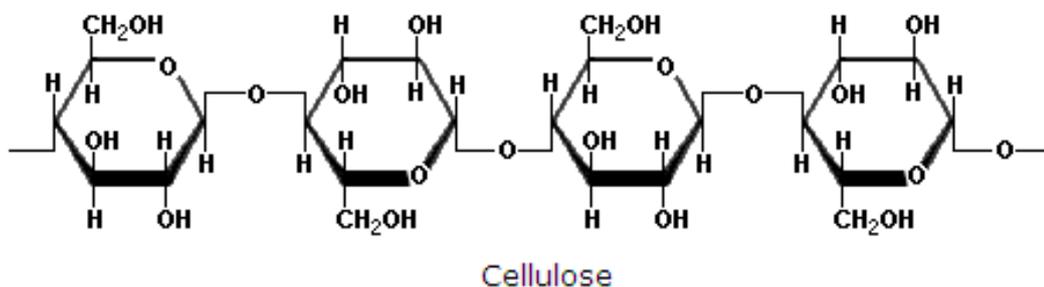
Gambar 35. Struktur komponen penyusun lignoselulosa

Lignin adalah kelas polimer organik kompleks. Lignin merupakan salah satu kelas utama bahan struktural dalam jaringan pendukung dari tumbuhan vaskular dan beberapa ganggang. Lignin mengisi ruang-ruang di dinding sel antara selulosa, hemiselulosa, dan komponen pektin, terutama pada trakeid xylem dan sel sklereid. Lignin berikatan secara kovalen dengan hemiselulosa. Lignin sangat penting dalam pembentukan dinding sel, terutama di kayu dan kulit kayu, karena menyumbang sifat kaku dan tidak mudah membusuk. Struktur kimia lignin (Gambar 36) adalah polimer fenol yang saling silang.



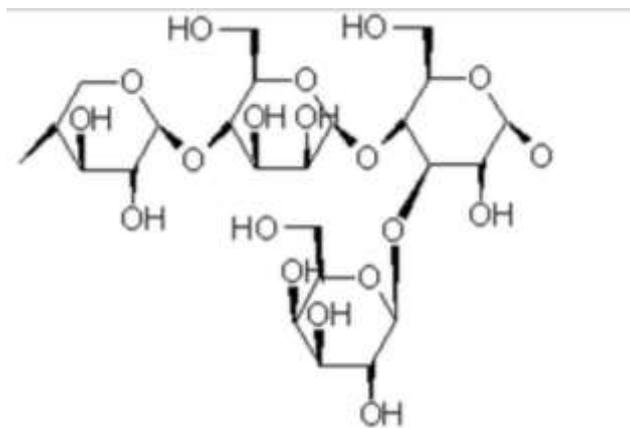
Gambar 36. Struktur molekul lignin

Selulosa (Gambar 37) adalah komponen glukosa yang saling berikatan melalui  $\beta$ -1,4 glikosida, pada struktur ikatan hidrogen yang tertata rapi membentuk misel. Struktur yang linier membuat selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut dalam air. Selulosa biasanya berasosiasi dengan hemiselulosa, pektin, xilan, dan lignin. Molekul selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang membuat struktur bahan bersifat kuat dan keras serta tahan terhadap penguraian secara enzimatik. Secara alami, penguraian selulosa berlangsung sangat lambat. Selulosa dapat dikonversi menjadi produk glukosa dan etanol dengan bantuan enzim selulase.



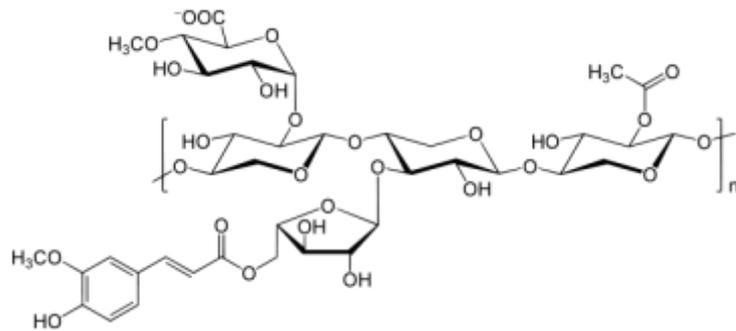
Gambar 37. Struktur selulosa

Hemiselulosa (juga dikenal sebagai poliosa) adalah matriks polimer bercabang yang tersusun dari polisakarida xilan, glukuronoxilan, glukomanan, arabinoxilan, dan xiloglukan bersama dengan selulosa yang ada di seluruh dinding sel tumbuhan. Jika selulosa berupa kristalin, kuat dan resisten terhadap hidrolisis, maka hemiselulosa memiliki struktur acak amorfik yang lemah. Hemiselulosa (Gambar 38) sangat mudah terhidrolisis oleh asam atau basa, maupun enzim hemiselulase.



Gambar 38. Struktur molekul hemiselulosa

Xilan (Gambar 39) merupakan salah satu komponen penyusun sel pada tanaman berkayu. Degradasi senyawa ini dilakukan oleh berbagai jenis mikroorganisme. Enzim-enzim penghidrolisis yang dihasilkan oleh mikroorganisme inilah yang memegang peranan kunci dalam degradasi biomasa tanaman dan siklus karbon di alam. Di dalam dinding sel tanaman, xilan akan berinteraksi dengan lignin dan selulosa melalui ikatan nonkovalen membentuk struktur sel yang kuat. Xilan termasuk golongan kompleks polisakarida dengan ikatan beta-1,4 xilopiranosil sebagai tulang punggungnya. Pada beberapa tanaman lain, seperti rumput laut, xilan dapat terbentuk dengan ikatan beta-1,3. Di samping itu, residu ramnosa dan galaktosa kadang dijumpai terikat pada molekul xilan. Diperlukan beberapa jenis enzim hidrolisis untuk memecah struktur xilan. Terdapat dua mekanisme pendegradasian xilan, yaitu dengan memutus ikatan pada rantai utamanya dan dengan memotong rantai sampingnya. Pemutusan rantai utama dapat dilakukan dengan enzim xilanase.



Gambar 39. Struktur molekul xilan

### Enzim Selulase dan Hemiselulase

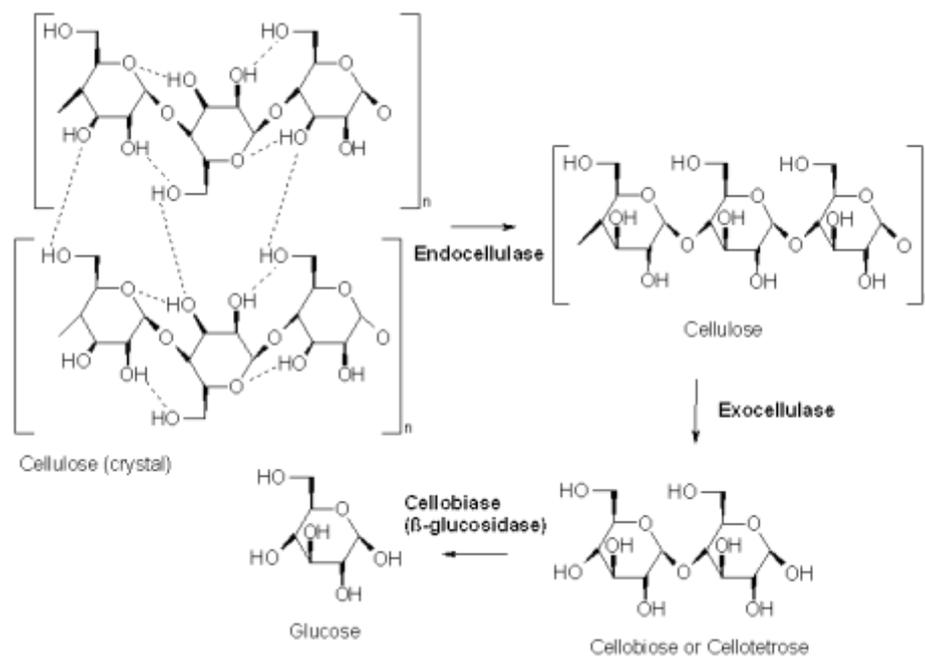
Salah satu jenis enzim yang dapat menghidrolisis ikatan  $\beta(1-4)$  pada selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya adalah enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, protein sel tunggal, makanan ternak, etanol dan lain-lain. Selulase diproduksi oleh bakteri simbiotik dalam perut herbivora dan beberapa serangga rayap.

Beberapa jenis selulase diketahui berbeda secara struktural dan mekanis. Enzim selulase memiliki sinonim, derivatif, dan enzim spesifik, yaitu endo-1,4-beta-D-glukanase (beta-1,4-glukanase, beta-1,4-endoglukan hidrolase, endoglukanase D, 1,4 - (1,3,1,4) -beta-D glukon 4-glucanohidrolase), karboksimetil selulase (CMCase), aviselase, celludextrinase, selulase A, cellulysin AP, selulase alkali, selulase A 3, 9,5 selulase, dan pancellase SS . Enzim yang membelah lignin kadang-kadang disebut selulase, tetapi hal ini biasanya dianggap keliru. Tipe selulase yang dikenal adalah sebagai berikut:

- Endoselulase (EC 3.2.1.4) secara acak membelah ikatan internal pada situs amorf yang membuat ujung rantai baru.
- Eksoselulase atau selobiohidrolase (EC 3.2.1.91) membelah dua sampai empat unit dari ujung rantai yang diproduksi oleh endoselulase menjadi tetrasakarida atau disakarida, seperti selobiosa.

Eksoselulase diklasifikasikan lebih lanjut ke tipe I, yang bekerja urut dari ujung reduksi rantai selulosa, dan tipe II, yang bekerja urut dari ujung non-reduksi.

- Selobiosa (EC 3.2.1.21) atau beta-glukosidase menghidrolisis produk eksoselulase menjadi monosakarida tunggal.
- Selulase oksidatif mendepolimerisasi selulosa melalui reaksi radikal, sebagai contoh selobiosa dehidrogenase (aseptor).
- Selulosa fosforilase mendepolimerisasi selulosa melalui fosfat bukan air.



Gambar 40. Ketiga jenis reaksi dikatalisis oleh selulase: 1. Kerusakan interaksi nonkovalen hadir dalam struktur amorf selulosa (endoselulase), 2. Hidrolisis rantai berakhir untuk memecah polimer menjadi gula yang lebih kecil (exocellulase), 3. Hidrolisis disakarida dan tetrasakarida menjadi glukosa (beta-glucosidase).

Xilanase (endo-beta-1,4-xilanase, E.C 3.2.1.8) adalah enzim yang mampu memutuskan ikatan pada rantai utama xilan, membentuk oligosakarida pendek. Enzim ini memegang peranan kunci dalam mendegradasi polimer xilan yang banyak ditemukan pada dinding sel tanaman berkayu. Aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan cara memutus ikatan antar gugus pada bagian tengah secara

acak menghasilkan xilooligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase.  $\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo oligosakarida. Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim  $\beta$ -xilosidase. Sebagian besar enzim  $\beta$ -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase sehingga enzim ini kurang dapat digunakan industri penghasil xilosa. Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut.

## **BAB X**

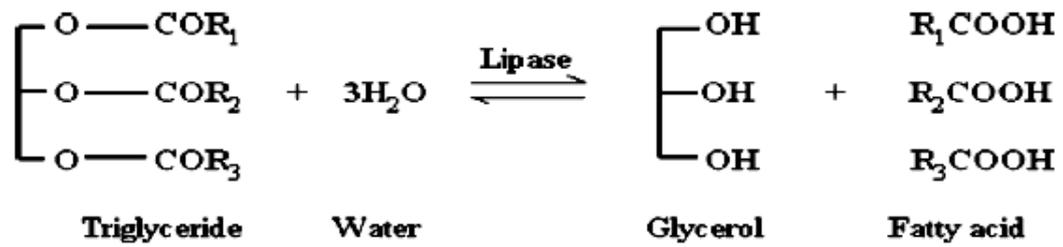
### **Lipase**

#### **Lipid**

Lipid dapat ditemukan di semua makhluk hidup. Lipid terlibat dalam pembentukan membran biologis, penyimpanan energi, panas, air, produksi panas, dan berperan dalam penghantaran sinyal interseluler. Selain itu, lipid juga berperan dalam bentuk hormon, pigmen, vitamin, kofaktor enzim, transporter elektron, dan deterjen (Boyer, 2000; Gurr et al, 2002). Lipid didefinisikan sebagai zat asal biologis dalam bentuk minyak, lemak dan lilin yang larut dalam pelarut organik. Pelarut organik tersebut meliputi seperti hidrokarbon, kloroform, benzena, eter dan alkohol. Lipid sangat rendah kelarutannya dalam air. Selain itu, kebanyakan dari lipid adalah dalam bentuk molekul seperti lilin, trigliserida, dan fosfolipid. Lipid dalam bentuk yang lain seperti vitamin larut lemak (A, D, E dan K), koenzim (ubiquinones), pigmen (karotenoid), terpene, sterol dan fenolat dapat diekstraksi dengan pelarut lemak (Boyer 2000). Unsur-unsur non-polar yaitu karbon dan hidrogen adalah komponen utama dari lipid, sedangkan kelompok oksigen, nitrogen, dan fosfor merupakan komponen tambahan penyusun lipid. Lipid memiliki ikatan sederhana atau ganda meliputi karbon-karbon, ester karboksilat, ester fosfat, dan amida sebagai kelompok kimia fungsional yang paling umum (Boyer, 2000). Lipid yang bersifat hidrofobik memiliki kepala kutub yang terhubung ke struktur non-polar melalui ikatan non-kovalen melalui interaksi hidrofobik. Interaksi Van der Waals antara daerah hidrokarbon dari molekul lipid menjaga kestabilan struktur lipid. Lipid cenderung membentuk *monolayers* permukaan, lapisan ganda, atau misel ketika melakukan kontak dengan molekul air (Gurr et al, 2002; Mathews et al, 2000).

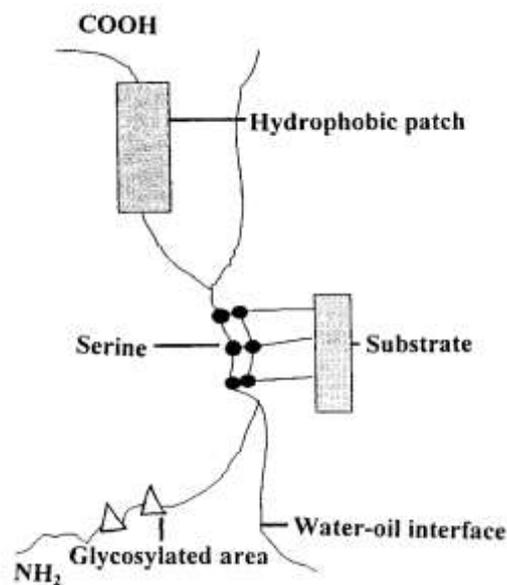
#### **Lipase, Gliserol ester hidrolase, EC. 3.1.1.3**

Lipase (triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3) adalah kelas enzim hidrolase yang mengkatalisis hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas dan sintesis ester dalam pelarut organik. Dalam kondisi percobaan tertentu, seperti dengan adanya jejak air, lipase mampu membalikkan reaksi mengarah ke esterifikasi dan pembentukan gliserida dari asam lemak dan gliserol (Gambar 41).



Gambar 41. Hidrolisis trigliserida oleh enzim lipase

Substrat alami lipase berupa triasilgliserol memiliki kelarutan sangat rendah dalam air. Dalam kondisi alami, lipase mengkatalisis hidrolisis ikatan ester pada antarmuka antara fase substrat dengan fase air di mana enzim terlarut (Gambar 42).



Gambar 42. Representasi diagramatik yang menunjukkan komponen utama dari molekul lipase. Substrat dapat berupa trigliserida dalam bentuk apapun.

Sementara itu, reaksi dari lipase dengan substrat terjadi pada antarmuka antara substrat dan fase air. Enzim ini juga mengkatalisis pertukaran ikatan ester (transesterifikasi) saat hadir dalam media yang bukan air. Lipase memiliki spesifisitas dan enantioselektifitas tinggi untuk reaksi esterifikasi dan transesterifikasi (Gambar 43).

## **Sumber Lipase**

Lipase ditemukan pada semua makhluk hidup di alam. Beberapa penelitian telah dilakukan pada tanaman, hewan dan mikroorganisme (bakteri dan jamur benang) (Ghosh et al., 1996).

### *a. Lipase Tanaman*

Enzim lipase dari tanaman telah banyak diisolasi, namun, hanya ada beberapa lipase tanaman yang menunjukkan aktivitas lipase yang baik, yaitu dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis rantai panjang trigliserida dengan tingkat aktivitas spesifik yang tinggi (Mukherjee, 1994). Enzim lipase telah banyak diidentifikasi berada di dalam jaringan tanaman. Misalnya, konsentrasi tertinggi enzim lipase ditemukan dalam biji, terutama pada biji tanaman gandum dan beras. Selain itu, aktivitas lipase juga ditemukan pada getah pepaya, biji jarak, biji bunga matahari, biji kacang tanah, biji melon, kelapa sawit dan getah Euphorbia.

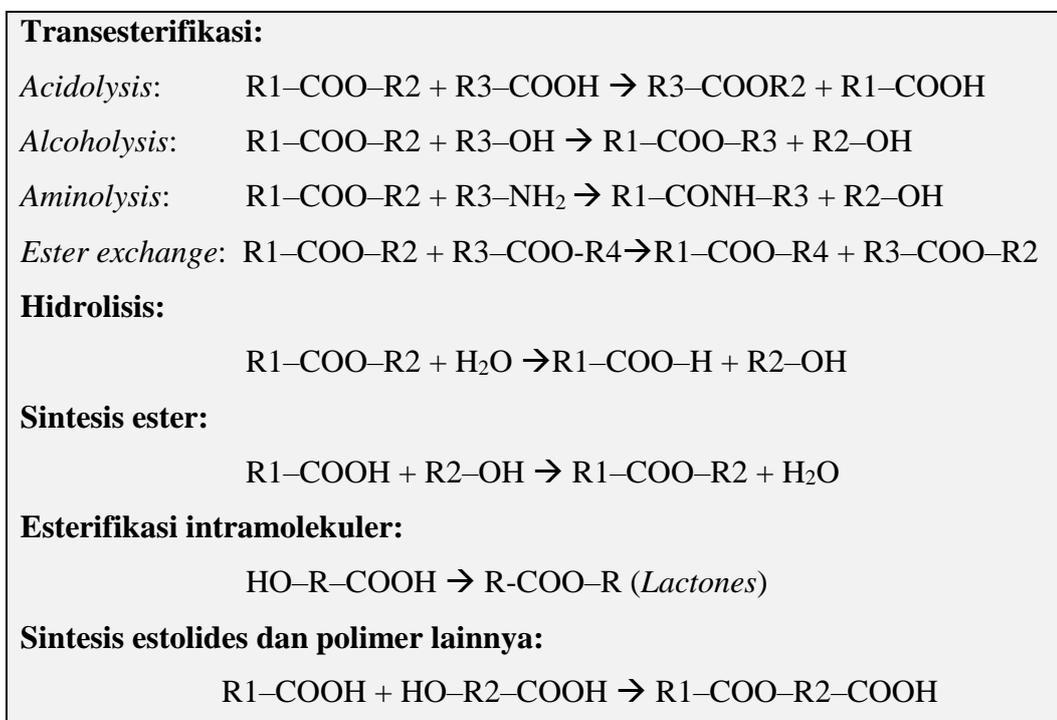
### *b. Lipase Hewan*

Enzim lipase lebih banyak diproduksi oleh hewan dibandingkan dengan tanaman. Sebagai contoh, lipase banyak diisolasi dari serangga, ikan, dan mamalia. Pada hewan, lipase memainkan peran penting dalam pencernaan lipid dalam sistem biologi yang ditemukan di pankreas dan pada permukaan sel-sel lendir dari mukosa lambung. Pada serangga, enzim ini kebanyakan ditemukan dalam plasma, kelenjar ludah, otot dan abdomen. Lipase pankreas dari kambing, babi, dan kalajengking telah digunakan secara tradisional untuk berbagai keperluan.

### *c. Lipase Mikroorganisme*

Enzim mikroorganisme memiliki keunggulan yang lebih daripada enzim yang berasal dari tanaman atau hewan. Mikroorganisme memiliki pola pertumbuhan yang cepat, mudah dimanipulasi secara genetik, dan pasokan rutin karena tidak adanya fluktuasi musiman. Enzim mikroba yang dihasilkan dari proses fermentasi dapat dilepaskan secara langsung ke dalam medium kultur. Enzim mikroba juga lebih stabil dibandingkan dengan enzim dari tanaman dan enzim hewan. Selain itu, proses produksi enzim mikroba dikenal lebih aman (Wiseman, 1995). Lipase mikroba memiliki spesifisitas substrat yang luas, menunjukkan stabilitas yang

tinggi dalam pelarut organik, tidak memerlukan kofaktor, dan menunjukkan enantioselektifitas tinggi (Jaeger dan Reetz, 1998).



Gambar 43. Reaksi-reaksi yang dimediasi oleh lipase

Faktanya, lipase dapat dihasilkan dari mikroba dalam skala besar, dan beberapa lipase penting diproduksi oleh genera bakteri termasuk *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* dan *Pseudomonas*. Beberapa produk berdasarkan lipase bakteri telah diluncurkan dan berhasil dipasarkan dalam beberapa tahun terakhir. Jumlah produk tersebut berasal dari *Pseudomonas* sp. seperti Lumafast dan Lipomax dengan aplikasi utama mereka sebagai enzim untuk formulasi deterjen. Sementara Chiro CLEC-PC, Chirazyme L-1 dan Amano P, P-30 dan PS memiliki potensi yang luar biasa dalam sintesis organik (Gupta et al., 2004).

Lipase fungi telah diteliti sejak tahun 1950-an. Fungi mampu menghasilkan lipase yang ditemukan di beberapa habitat, termasuk tanah yang terkontaminasi dengan minyak, limbah minyak nabati, industri produk susu, biji-bijian, dan makanan busuk (Sharma et al, 2001; Ko et al, 2005.). Beberapa lipase penghasil

utama jamur termasuk genera *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium*, *Ophiostoma* dan *Penicillium*. Juga, genus *Pichia*, *Hansenula*, dan *Saccharomyces* dilaporkan sebagai produsen lipase.

Penggunaan komersial lipase fungi terdiri dari aplikasi yang berbeda termasuk produksi biopolimer, biodiesel, obat-obatan, bahan kimia pertanian, kosmetik, penyedap rasa, dll (Haki dan Rakhsit, 2006). Saat ini, lipase dalam industri enzim diproduksi melalui teknologi DNA rekombinan (Hasan et al., 2006). Organisme laut seperti ikan, ganggang, dan rumput laut yang ditemukan merupakan sumber yang kaya lipase. Ada beberapa laporan tentang produksi lipase oleh mikroorganisme laut. Ganggang yang ditemukan merupakan sumber utama dari lipid dan lemak. Kelompok alga relatif belum dieksplorasi secara lanjut dalam hal produksi lipase, mengingat data yang cukup banyak mengenai lipase yang bersumber dari bakteri, tanaman dan hewan.

#### **Aplikasi Penggunaan Lipase dalam Industri**

Lipase memiliki peranan penting dalam pembuatan yoghurt dan fermentasi keju. Namun, lipase juga dieksploitasi sebagai katalis yang harganya relative murah dan diaplikasikan dalam industri yang lebih modern, seperti kue, deterjen dan bahkan sebagai biokatalis dalam proses pembuatan energi alternatif untuk mengubah minyak nabati menjadi bahan bakar. Penggunaan enzim lipase dalam pengolahan biodiesel menggantikan katalis kimia memiliki keunggulan yaitu lebih ramah lingkungan dan aman. Aplikasi industri lipase membutuhkan proses intensifikasi untuk pengolahan terus menerus menggunakan alat-alat seperti microreactors aliran kontinu pada skala kecil. Aplikasi lipase dalam dunia industri dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Aplikasi enzim lipase dalam dunia industri

Industri	Aksi enzim lipase	Produk/ Aplikasi
Deterjen	Hidrolisis lemak	Penghapusan noda minyak dari kain
Produk susu	Hidrolisis lemak susu, pematangan keju	Pengembangan agen penyedap dalam susu, keju, dan mentega
Makanan Bakery	Modifikasi lemak mentega	Rak-hidup perpanjangan
Minuman	Peningkatan rasa	Minuman beralkohol
Dressing makanan	Peningkatan aroma	Mayones dan saus
Daging dan ikan	Transesterifikasi	Produk daging dan ikan; penghilangan lemak
Lemak dan minyak	Pengembangan rasa	<i>Cocoa butter</i> , margarin, asam lemak
Bahan kimia farmasi	Transesterifikasi; hidrolisis	Gliserol, mono dan digliserida Blok bangunan kiral, Lipid khusus, obat untuk membantu pencernaan
Kosmetik	Enantioselectivity, sintesis	Pengemulsi, pelembab kulit dan krim matahari, cokelat, minyak mandi, dll
Kulit	Transesterifikasi, hidrolisis	Produk kerajinan kulit
Kertas	Perpaduan	Kertas dengan peningkatan kualitas
Pembersihan dan pengendalian polusi	Hidrolisis	Penghapusan lemak, untuk menghapus noda dan menghidrolisis minyak dan lemak
Agro-kimia	Hidrolisis	Herbisida seperti phenoxypropionate
Surfaktan	Hidrolisis dan transesterifikasi minyak dan lemak	Poligliserol dan asam lemak karbohidrat ester digunakan sebagai deterjen industri dan emulsifier dalam formulasi makanan seperti saus dan es krim
Industri bahan bakar	Esterifikasi	Produksi biodiesel

## **BAB XI**

### **Protease**

#### **Protein**

Protein adalah makromolekul biologi, senyawa biokimia yang terdiri dari satu atau lebih polipeptida. Polipeptida merupakan polimer dari asam amino, dan masing-masing asam amino dihubungkan dengan ikatan kovalen yang disebut ikatan peptida. Protein adalah bagian penting dari organisme dan berpartisipasi dalam hampir setiap proses di dalam sel. Banyak protein adalah enzim-enzim yang mengkatalisis reaksi biokimia dan sangat penting untuk metabolisme (Devaraj, 2009). Enzim memiliki karakteristik spesifik dan berbeda dari katalis sintetik atau anorganik. Enzim memiliki tingkat tinggi dan lebih besar dari spesifisitas substrat dan daya katalitik. Beberapa enzim bertindak atas protein lain untuk menambah atau menghapus kelompok kimia dalam proses yang dikenal sebagai modifikasi pasca-translasi. Sekitar 4.000 reaksi yang diketahui dikatalisis oleh enzim. Meskipun enzim dapat terdiri dari ratusan asam amino, biasanya hanya sebagian kecil dari residu yang datang dalam kontak dengan substrat, yang secara langsung terlibat dalam katalisis (Bairoch, 2000).

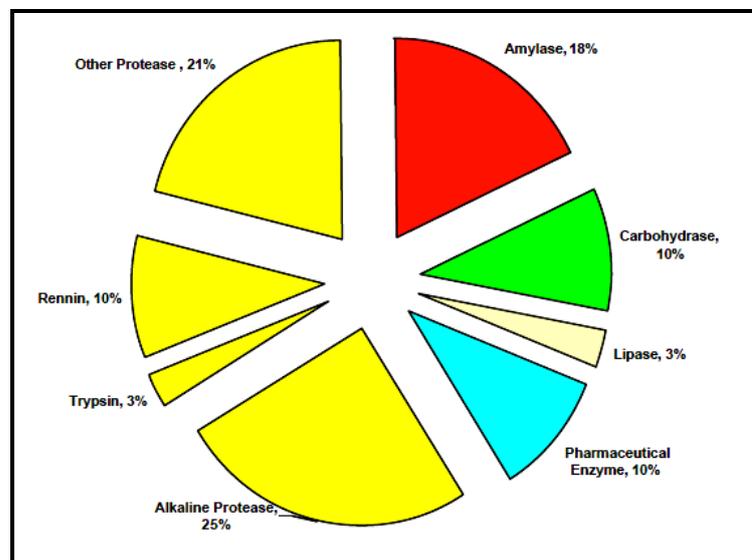
#### **Protease, proteinase, peptidase, EC 3.4.X.X**

Protease adalah kelompok besar enzim, dan mereka menghidrolisis ikatan peptida protein (Gambar 44). Protease juga disebut enzim proteolitik atau proteinase (Mahajan dan Badgular, 2010). Enzim ini umumnya ditemukan pada tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Mereka sangat penting untuk banyak proses fisiologis, misalnya konversi protein makanan dalam proses pencernaan makanan, daur ulang protein intraseluler, jalur pembekuan darah, antigen dan aktivasi berbagai protein (Rao et al., 1998). Enzim proteolitik tidak hanya penting untuk proses fisiologis tetapi juga dapat berbahaya ketika aktivitas mereka tidak terkontrol (Devaraj, 2009).



Gambar 44. Aktivitas protease memecah protein/ polipeptida

Enzim proteolitik juga digunakan dalam proses seperti pembuatan bir, pengempukan daging dan pengolahan susu. Karena peran penting dari protease dalam bioteknologi, mereka memiliki tempat pertama di pasar dunia enzim (Leary et al., 2009). Nilai ini diperkirakan dari penjualan di seluruh dunia dari enzim industri adalah \$ 1 milyar (Godfrey dan West, 1996). Protease merupakan salah satu dari tiga kelompok terbesar dari enzim industri dan mencapai sekitar 59% (Gambar 45) dari total penjualan di seluruh dunia dari enzim (Gaur dan Wadhwa, 2008).



Gambar 45. Distribusi penjualan enzim, penjualan enzim protease ditunjukkan pada porsi yang berwarna kuning (Gaur and Wadhwa, 2008)

### Klasifikasi Enzim Protease

Protease sangat selektif untuk posisi hidrolisis ikatan peptida dalam substrat. Berdasarkan jenis reaksi, ada dua kelas protease yaitu endopeptidase dan eksopeptidase (Devaraj, 2009). Eksopeptidase membelah proksimal ikatan peptida pada bagian ujung/ terminal substrat, sedangkan endopeptidase memutus ikatan peptida membelah pada bagian tengah/dalam substrat (Mahajan dan Badgujar, 2010). Protease dapat diklasifikasikan dalam beberapa cara, misalnya, berdasarkan kisaran pH di mana mereka aktif (asam, netral, atau basa), atau kemampuan mereka untuk menghidrolisis protein spesifik (keratinase, elastase,

kolagenase, dan lain-lain), atau kesamaan mereka untuk proteinase juga ditandai seperti pepsin, tripsin, chymotrypsin, atau cathepsins mamalia. Ada lima kelas protease dikategorikan oleh database Merops, yaitu Serine, Sistein, Aspartat, Metallo dan Threonine. Tabel 12 menunjukkan situs pemotongan enzim protease pada ikatan peptide protein.

Tabel 12. Letak situs pemotongan enzim protease pada ikatan peptida

Enzim	Situs pemutusan ikatan peptida*
Tripsin	_Lys (atau Arg) ↓_____
Kimotripsin, subtilisin	_Trp (atau Tyr, Phe, Leu) ↓_____
<i>Staphylococcus</i> V8 protease	_Asp (atau Glu) ↓_____
Papain	_Phe (atau Val, Leu)_Xaa↓_____
Termolisin	_____↓Leu (atau Phe) _____
Pepsin	_Phe (atau Tyr, Leu) ↓Trp (atau Phe, Tyr)

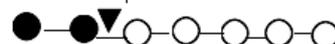
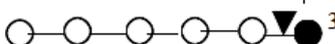
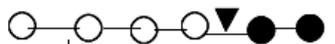
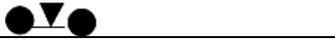
\*Panah menunjukkan situs aksi enzim protease. Xaa merupakan residu asam amino

Secara umum, berdasarkan aktivitas protease pada pH optimum, protease dibagi menjadi: (i) protease Asam, aktif dalam kisaran 2 pH - 3,5; (ii) Protease Netral, aktif dalam pH antara 6,5 dan 7,5 dan (iii) protease Alkali, aktif dalam pH antara 7,5 dan 10,5. Berdasarkan urutan asam amino dan kelompok katalitik enzim yang terlibat dalam aktivitas nukleofilik pada ikatan peptida, protease diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok yaitu untuk protease serin (EC 3.4.21), protease sistein (EC 3.4.22), protease aspartat (EC 3.4.23), metalloproteases (EC 3.4.24), atau jenis yang tidak diketahui masing-masing.

#### a. Eksopeptidase

Eksopeptidase bertindak hanya pada posisi dekat ujung rantai polipeptida. Berdasarkan situs mereka dari aksi di N atau C terminus [Tabel 13], Eksopeptidase diklasifikasikan menjadi aminopeptidase dan karboksipeptidase.

Tabel 13. Kelas dan situs aktif Eksopeptidases (Mahajan dan Badgular, 2010)

Protease	Mode aksi dan Nomor EC
Aminopeptidase	 3.4.11
- Dipeptidil peptidase	 3.4.14
- Tripeptidil peptidase	 3.4.14
Karboksipeptidase	 3.4.16-3.4.18
- Peptidil dipeptidase	 3.4.15
- Dipeptidase	 3.4.13

### 1. Aminopeptidases

Aminopeptidase bertindak pada posisi N ujung bebas dari rantai polipeptida dan membebaskan residu tunggal asam amino dipeptida, atau tripeptide. Aminopeptidase banyak ditemukan di berbagai spesies mikroba termasuk bakteri dan jamur. Kekhususan substrat dari enzim dari bakteri dan jamur yang jelas berbeda dalam bahwa organisme dapat dibedakan atas dasar profil produk hidrolisis (Mahajan dan Badgular, 2010).

### 2. Karboksipeptidase

Karboksipeptidase melakukan tindakan di C terminal dari rantai polipeptida dan membebaskan asam amino tunggal atau dipeptida. Karboksipeptidase dibagi menjadi tiga kelompok besar, Karboksipeptidase serin, metallokarboksipeptidase, dan karboksipeptidase sistein, berdasarkan sifat dari residu asam amino di situs aktif enzim. Karboksipeptidase serin diisolasi dari *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp* dalam kekhususan substrat mereka tetapi sedikit berbeda dalam sifat-sifat lain seperti optimal pH, stabilitas, berat molekul, dan efek inhibitor. Metallokarboksipeptidase dari *Saccharomyces sp.* (Egito et al., 2007) dan *Pseudomonas sp.* (Asano et al., 1999) membutuhkan  $Zn^{2+}$  atau  $Co^{2+}$  untuk kegiatan mereka. Enzim juga menghidrolisis peptida di mana kelompok peptidil digantikan oleh bagian pteroyl atau dengan kelompok asil (Mahajan dan Badgular, 2010).

#### b. Endopeptidase

Aktivitas endopeptidase ditandai dengan adanya tindakan preferensial pada daerah ikatan peptida di bagian dari rantai polipeptida jauh dari N dan C termini.

Kehadiran amino atau karboksil kelompok bebas memiliki pengaruh negatif pada aktivitas enzim. Endopeptidase dibagi menjadi empat sub kelompok berdasarkan mekanisme katalitik mereka, (i) protease serin, (ii) protease aspartat, (iii) protease sistein, dan (iv) metaloprotease. Untuk memfasilitasi penamaan grup tertentu peptidase, telah ditetapkan kode huruf yang menunjukkan jenis katalitik peptidase, yaitu, C, A, M, atau U diikuti oleh nomor yang telah ditetapkan.

#### 1. Protease Serine

EC 3.4.21-*Serine protease* adalah kelompok enzim yang memiliki kelompok serin (residu Ser) di situs aktif mereka. Mereka memiliki mekanisme katalitik umum ditandai dengan kepemilikan residu serin reaktif tertentu yang penting untuk aktivitas mereka. Berdasarkan kesamaan struktural, protease serin telah dikelompokkan ke dalam 20 grup (Mahajan dan Badgular, 2010). Protease serin biasanya aktif pada pH netral dan basa, dengan optimal antara 7,0 dan 11,0. Titik isoelektrik protease serin adalah antara pH 4,0-6,0. Massa molekul protease jenis ini berkisar antara 18 dan 35 kDa. Protease serin banyak diproduksi oleh kapang, khamir dan jamur, dan juga beberapa virus, bakteri dan eukariota (Devaraj, 2009; Mahajan dan Badgular, 2010). Ikatan peptida yang memiliki tirosin, fenilalanin, leusin atau di sisi karboksilnya dapat dihidrolisis oleh enzim ini. pH optimal protease alkali adalah sekitar pH 10, dan memiliki titik isoelektrik pada pH 9. Protease jenis ini memiliki massa molekul dari 15 sampai 30 kDa. Protease serin yang bersifat alkali diproduksi oleh beberapa bakteri seperti *Arthrobacter*, *Streptomyces*, dan *Flavobacterium sp.* (Boguslawski et al., 1983). Subtilisin merupakan protease alkali yang diproduksi oleh *Bacillus sp.*, selain itu, protease alkali juga diproduksi oleh *S. cerevisiae* (Mizuno dan Matsuo, 1984) dan jamur berfilamen seperti *Conidiobolus sp.* (Phadare et al., 1993), *Aspergillus sp.* dan *Neurospora sp.* (Lindberg et al., 1981). Studi sebelumnya mengidentifikasi dua jenis protease alkali, yaitu Subtilisin Carlsberg diproduksi oleh *Bacillus licheniformis* ditemukan pada tahun 1947 oleh Linderstrom, Lang, dan Ottesen di laboratorium Carlsberg (Jacobs et al., 1985), dan Subtilisin Novo atau protease bakteri Nagase (BPN9), yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens*. Subtilisin Carlsberg umumnya digunakan dalam deterjen. Kedua subtilisin

memiliki massa molekul 27,5 kDa dengan 58 asam amino dan memiliki sifat yang mirip, seperti suhu optimal pada 60 °C dan pH optimal 10.0. Situs aktif subtilisin memiliki kemiripan dengan tripsin dan kimotripsin terlepas dari perbedaan dalam pengaturan molekul mereka secara keseluruhan. *Conidiobolus coronatus* kapang penghasil protease memiliki struktur yang berbeda dari Subtilisin Carlsberg meskipun memiliki kesamaan fungsional (Padhatare et al., 1997). Aktivitas protease jenis ini tidak bergantung pada keberadaan kofaktor, sehingga aktivitasnya tidak terpengaruh oleh oksidasi dan atau logam ion, serta agen pengkhelat (Ullah et al., 2006).

## 2. Protease sistein

EC 3.4.22-*Cystein protease* terdapat pada semua organisme hidup, baik prokariot maupun eukariot. Beberapa hasil studi menjelaskan bahwa lebih dari 20 kelompok dari protease sistein, misalnya: papain, bromelain, ficin, dan cathepsins diperlukan untuk proses industri dan biologi. Residu sistein dan residu histidin memainkan peran penting dalam aktivitas protease sistein (Barett, 1995). Secara umum, protease sistein hanya bekerja di hadapan reduktor yaitu HCN atau sistein. Mekanisme katalitik dari protease sistein telah dieksplorasi pada enzim papain. Pada awal proses katalitik, protease berikatan secara non-kovalen dengan substrat. Selanjutnya, diikuti dengan proses asilasi, kemudian diikuti dengan konfigurasi dan pelepasan produk pertama. Pada langkah *deacylation* berikutnya, asil-enzim bereaksi dengan molekul air untuk melepaskan produk kedua bersamaan dengan molekul enzim bebas (Storer dan Menard, 1994). Protease sistein bekerja optimal dalam kondisi pH netral, meskipun misalnya, protease lisosom, aktif pada pH asam. Clostripain, diproduksi oleh bakteri *Clostridium histolyticum*, menunjukkan spesifisitas ketat untuk residu arginyl di sisi karboksil dari ikatan peptida. Streptopain, protease sistein yang dihasilkan oleh *Streptococcus sp.*, Menunjukkan spesifisitas yang luas, termasuk dapat memutus rantai insulin B dan substrat sintesis lainnya (Mahajan dan Badgular, 2010).

## 3. Protease aspartat

EC 3.4.23-*Aspartat protease* (AP), juga dikenal sebagai protease asam, aktivitas katalitik protease jenis ini sangat bergantung pada residu asam aspartat

(Asp). Situs residu asam aspartat terletak dalam urutan Asp-XAA-Gly, di mana XAA dapat Ser atau THR. Protease aspartat umumnya terhambat oleh pepstatin. Ada tiga kelompok protease aspartat, yaitu pepsin (AP1), retropepsin (AP2), dan enzim dari retrovirus Para (AP3) (Barret 1994). Umumnya, enzim jenis ini terlibat dalam proses fisiologis dan patologis seperti proses pencernaan (pepsin), homeostasis dan tekanan darah (rennin), infeksi retroviral (protease HIV), degradasi hemoglobin dalam malaria (plasmepsin) dan proteolisis intraseluler (cathepsin A) (Dunn, 1992). Aktivitas optimum protease aspartat terjadi pada pH rendah (pH 3 sampai 4) dan titik isoelektrik antara pH 3 sampai 4,5. Kelompok enzim memiliki massa molekul sebesar 30 sampai 45 kDa. Studi kristalografi menunjukkan bahwa anggota keluarga AP1 memiliki molekul bilobal dengan situs aktif yang terletak di antara lobus, dan setiap lobus berkontribusi ke dalam residu asam aspartat (Sielecki et al., 1991). Protease aspartate sangat sensitif terhadap senyawa diazoketone: diazoacetyl-DL-norleucine metil ester (DAN) dan 1, 2-epoxy-3- (p-nitrophenoxy) propana (EPNP) serta terhadap ion tembaga. Protease aspartat yang diproduksi oleh mikroorganisme memiliki karakteristik tertentu yang mirip dengan pepsin, meski aktivitasnya tidak sebaik pepsin. Protease aspartat jenis ini memiliki residu asam amino aromatik di kedua sisi ikatan peptida. Protease aspartat mikroba dapat dibagi menjadi dua kelompok, (i) enzim pepsin seperti yang dihasilkan oleh *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, dan *Neurospora* dan (ii) enzim seperti rennin yang dihasilkan oleh *Endothia* dan *Mucor sp.*

#### 4. Metalloprotease

EC 3.4.24-*Metalloprotease* memerlukan ion logam (umumnya  $Zn^{2+}$ ) sebagai kofaktor dalam mekanisme katalitik mereka. Kelompok enzim ini memiliki jenis yang paling beragam dari semua protease (Barett, 1995). Mekanisme enzim ini memerlukan kehadiran terikat kation divalen. Sebagian besar enzim memiliki His-Glu-XAA-XAA-His untuk membentuk bagian dari situs untuk mengikat ion logam. Beberapa metalloprotease berasal dari beberapa organisme, seperti kolagenase dari organisme tingkat tinggi, racun hemoragik ular, dan thermolysin dari bakteri (Okada et al, 1986; Shannon et al, 1986; Weaver et al, 1977). Sekitar

30 keluarga metaloprotease telah diidentifikasi, yaitu 17 (M1) endopeptidase, 12 (M2) eksopeptidase, dan 1 (M3) endo dan eksopeptidase. Berdasarkan spesifisitas aksi mereka, metaloprotease dibagi menjadi empat kelompok, yaitu (i) netral, (ii) alkali, (iii) Myxobacter I, dan (iv) Myxobacter II. Protease netral menunjukkan spesifisitas untuk asam amino hidrofobik, sedangkan protease alkali memiliki spesifisitas yang sangat luas. Myxobacter I adalah spesifik untuk residu asam amino kecil di kedua sisi ikatan peptida, sedangkan Myxobacter II spesifik untuk residu lisin di sisi amino dari ikatan peptida. Agen pengkelat seperti EDTA dapat menghambat aktivitas enzim metaloprotease. Beberapa metaloprotease telah diidentifikasi dalam kapang, sebagai contoh, Gripon et al., (1977) menyatakan bahwa enzim dari *Penicillium caseicolum* dan *Penicillium roqueforti*, serta *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae* memiliki metaloprotease asam.

### **Protease dalam Industri**

Protease memiliki tempat pertama di pasar dunia enzim dan memainkan peran utama dalam bidang bioteknologi. Sebagian besar enzim komersial telah diproduksi terutama dari sumber mikroorganisme. Namun, beberapa enzim protease dari tanaman juga menjadi semakin penting, dengan aplikasi dalam proses industri, bioteknologi dan farmakologi. Karena tingkatan reaksi yang cepat, rentang pH optimal dan suhu yang luas membuat enzim protease sangat aplikatif dalam berbagai industri (Poliana dan MacCabe, 2007). Beberapa aplikasi enzim protease dalam bidang industri yaitu dalam proses pembuatan keju, pelunak daging (*tenderizing agent*), bir, penguat rasa, dan lain sebagainya. Enzim protease juga digunakan dalam industri kulit untuk membuat kulit lebih kenyal, sebagai bahan pembersih seperti deterjen dan cairan pembersih lensa kontak (Rao et al., 1998). Uhlig (1998) menjelaskan bahwa protease tanaman telah diterima di industri farmasi dan bioteknologi karena aktivitas mereka dalam berbagai suhu dan pH. Protease sistein seperti papain dan bromelain sangat berguna dalam industri makanan dan industri obat.

#### *Industri pangan*

Papain kasar atau bromelain dan ficin digunakan dalam industri pembuatan bir untuk mendapatkan sifat koloid baik pada suhu rendah, sehingga

menghilangkan kekeruhan (Siota dan Villa, 2011). Protease diaplikasikan pada industri kue untuk menghidrolisis gluten, sehingga massa kue lebih mudah disiapkan. Bromelain juga telah digunakan untuk mendapatkan tepung terigu yang bersifat *hypoallergenic* karena kemampuannya untuk memecah glutenin gandum (Tanabe et al., 1996). Dalam industri pelunakan daging, hanya lima enzim yang dianggap sebagai memiliki status *generally recognized as safe* (GRAS) yaitu papain, ficin, bromelain, protease dari *Aspergillus oryzae* dan protease dari *Bacillus subtilis*. Actinidin (EC 3.4.22.14) dan zingibain (EC 3.4.22.67) merupakan sumber baru sebagai agen pelunak daging (Naveena et al, 2004; Sullivan dan Calkins 2010). Cucumisin menunjukkan aktivitas yang sama seperti papain, akan tetapi pada prosesnya menghasilkan residu peptide pahit (*bitter peptide*).

Pembuatan keju digambarkan sebagai proses menghilangkan air, laktosa dan beberapa mineral dari susu untuk menghasilkan konsentrat lemak susu dan protein. Bahan-bahan penting keju adalah susu, enzim koagulasi (rennet), kultur bakteri dan garam. Rennet menyebabkan protein susu menjadi agregat dan akhirnya mengubah cairan susu menjadi semi-gel. Ketika gel ini dipotong kecil-kecil (dadih), whey (sebagian besar air dan laktosa) mulai terpisah dari dadih. Produksi asam oleh kultur bakteri sangat penting untuk membantu pemisahan whey dari dadih dan sangat menentukan kelembaban, rasa, dan tekstur akhir keju (Hill, 2012). Koagulasi enzimatik sangat penting dalam pembuatan keju. Rennet yang diisolasi dari anak sapi adalah yang pertama dan masih adalah yang paling banyak digunakan dalam industry keju di seluruh dunia (Guiama et al., 2009). Rennet memiliki kelebihan yaitu kestabilannya dalam pH dan suhu pada pembuatan keju, stabil dalam proses pematangan keju, spesifisitas yang tinggi dan dapat mencegah proses proteolysis yang berlebihan (Silva dan Malcata, 2005). Namun, seiring dengan permintaan enzim rennet di seluruh dunia, penyembelihan anak sapi demi memenuhi kebutuhan rennet juga meningkat. Hal ini membuat para ilmuwan tergerak untuk menemukan alternatif pengganti rennet (Cavalcanti et al., 2004). Rennet mikroba yang dihasilkan oleh bakteri rekayasa genetika telah terbukti menjadi pengganti yang cocok untuk rennin. Selain itu, kendala

konsumen pada penggunaan rennets telah menyebabkan minat yang tumbuh untuk menggunakan koagulan dari tanaman. Beberapa tanaman telah terbukti mampu menggumpalkan susu. Fibriana dan Upaichit (2015) membuktikan bahwa protease yang diisolasi dari tanaman *Euphorbia* mampu menggumpalkan susu. Sayangnya, sebagian besar dari tanaman tersebut terbukti tidak cocok untuk pembuatan keju karena karakter aktivitas proteolitik yang berlebihan sehingga dapat menurunkan kualitas keju dan menimbulkan rasa pahit pada produk keju (Sousa dan Malcata, 2002; Roseiro et al., 2003).

#### *Industri farmasi*

Dalam industri farmasi dan obat-obatan, enzim papain, bromelain, ficin, chimopapain dapat membunuh nematoda gastrointestinal dengan menghancurkan kutikulanya. Selain itu, enzim ini sedang diteliti sebagai alternative yang baik untuk pengobatan kanker payudara, kolorektal, dan plasmositoma (Ulasan di Siota dan Villa, 2011). Lateks dari *Euphorbia milii* telah dilaporkan sebagai agen molluscicidal. Milin bertanggung jawab untuk mematikan siput untuk mengendalikan schistosomiasis (Yadav dan Jagannadham, 2008).

#### *Industri deterjen*

Papain adalah protease yang sangat potensial untuk digunakan dalam industri deterjen karena enzim ini aktif pada berbagai suhu dan stabil pada pH basa. Papain merupakan salah satunya, namun, penggunaan papain dalam deterjen tidak dipublikasikan. Papain kehilangan sebagian besar aktivitasnya pada pH yang ekstrim. Untuk mengatasi ini, papain telah dimodifikasi dengan anhidrida dikarboksilat yang berbeda sehingga pH optimum berubah ke nilai yang lebih mendasar (pH 9) dan suhu optimal mencapai 80 °C. Stabilitas meningkat ketika papain diimobilisasi pada pati gel (Ulasan di Siota dan Villa, 2011). Yadav et al. (2011) mempelajari nerifoliin, protease dari lateks *Euphorbia neriifolia* sebagai tambahan deterjen. Enzim deterjen yang ideal harus stabil dan aktif dalam larutan deterjen untuk jangka waktu yang panjang dan harus memiliki stabilitas suhu yang cukup efektif pada berbagai suhu cuci. Neriifolin cukup menjanjikan untuk formulasi deterjen dengan stabilitas pada berbagai pH dan suhu, serta tingkat kompatibilitas yang tinggi dengan deterjen. Miliin, protease dari *Euphorbia milii*,

cukup stabil dalam larutan deterjen ionik (SDS dan CTAB) dan deterjen non-ionik (Triton X-100), pelarut organik, dan urea (Moro et al. 2008). Interaksi surfaktan-enzim menunjukkan bahwa enzim ini dapat mempertahankan aktivitasnya sampai dengan 85% dalam deterjen non-ionik dan 35% dalam deterjen ionik. Urea pada konsentrasi tinggi menyebabkan penghambatan hanya sebesar 10%. Pelarut organik (aseton dan etanol), menyebabkan penurunan aktivitas menjadi 27,5% dan 47,5%. Oleh karena itu, miliin dapat digunakan untuk formulasi deterjen.

#### *Industri biologi molekuler*

Protease dari lateks dari *Carica candamarcensis* digunakan sebagai agen pelindung selama ekstraksi DNA (Genelhu et al., 1998). Sebuah protease tanaman bernama brofasin baru berhasil diekstrak dari *Bromelia fastuosa*, enzim ini memainkan peran protektif dalam protokol ekstraksi DNA dan sebagai alternatif pengganti proteinase K untuk ekstraksi DNA (Cabral et al., 2000). Baru-baru ini protease dari *Cucumis melo* telah digunakan untuk ekstraksi DNA dari kuku. Penelitian ini memeriksa aktivitas keratinolytic dari protease kasar yang diekstrak dari tanaman yang berbeda (*Cucumis melo*, *Ficus carica*, *Actinidia chinensis*, *Pyrus communis*), serta papain murni atau bromelain, dan membandingkan hasilnya dengan proteinase K. Mereka menemukan cucumisin memiliki aktivitas DNase dan harus menambahkan EDTA dalam konsentrasi tinggi (Yoshida-Yamamoto et al., 2010). Beberapa produsen protease komersial dan aplikasi protease ditunjukkan pada Tabel 14.

Tabel 14. Produsen protease komersial dan aplikasi protease

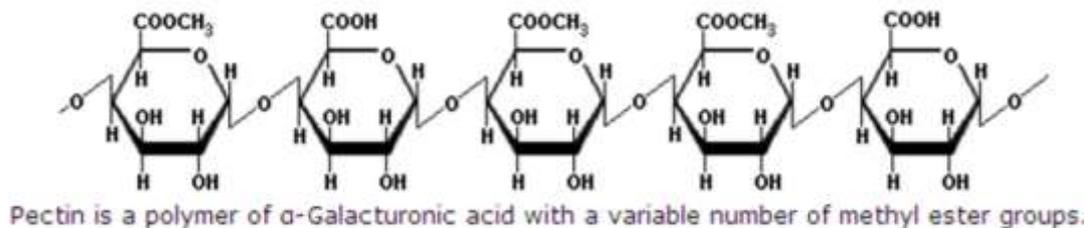
Suplaier	Nama dagang produk	Sumber mikroba	Aplikasi
Novo Nordisk, Denmark	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Deterjen, kain sutera
	Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen, tekstil
	Esperase	<i>B. lentus</i>	Deterjen, makanan, kain sutera
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Pakan
	Durazym	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen
	Novozyme 471MP	<i>n.s.</i>	Hidrolisis gelatin fotografik
	Novozyme 243 Nue	<i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus sp.</i>	Pembersih Industri kulit
Genencor International, USA	Purafact Primatan	<i>B. lentus</i> Bacterial source	Deterjen Industri kulit
Gist-Brocades, The Netherlands	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjen
	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen
	Maxatase	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen
Solvay Enzymes,	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjen

Germany	Optimase Maxapem  HT-Proteolytic Protease	<i>B. licheniformis</i> Protein engineered variant of <i>Bacillus sp.</i> <i>B. subtilis</i>  <i>B. licheniformis</i>	Deterjen Deterjen  Alkohol, baking, brewing, pakan, makanan, kulit, limbah fotografi Makanan, limbah
Amano Pharmaceuticals, Japan	Proleather Collagenase Amano protease S	<i>Bacillus sp.</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>	Makanan Teknik Makanan
Enzyme Development, USA	Enzeco alkaline protease Enzeco alkaline protease-L FG Enzeco high alkaline protease	<i>B. licheniformis</i>  <i>B. licheniformis</i>  <i>Bacillus sp.</i>	Industri  Makanan  Industri
Nagase Biochemicals, Japan	Biopraxe concentrate Ps. Protease Ps. Elastase Cryst. Protease Cryst. Protease Biopraxe Biopraxe SP-10	<i>B. subtilis</i>  <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i> (K2) <i>B. subtilis</i> (bioteus) <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>	Kosmetik, obat-obatan  Studi Studi Studi Studi Deterjen, pembersih Makanan
Godo Shusei, Japan	Godo-Bap	<i>B. licheniformis</i>	Deterjen, makanan
Rohm, Germany	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Makanan
Wuxi Synder Bioproducts, China	Wuxi	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen
Advance Biochemicals, India	Protosol	<i>Bacillus sp.</i>	Deterjen

## BAB XII

### Pektinase

Pektinase merupakan enzim yang berperan dalam proses degradasi molekul pektin (polisakarida) yang umumnya berada pada sel tumbuhan. Pada umumnya, pektin berperan dalam membentuk struktur tubuh tumbuhan sehingga menjadikan tumbuhan tersebut kuat dan kaku. Pektin adalah matriks seperti jelly yang menyusun komponen dinding bersama dengan fibril selulosa (Gambar 46). Pektinase adalah enzim yang memecah pektin, polisakarida yang ditemukan di dinding sel tanaman. Biasanya disebut enzim pectolyase, pectozyme dan poligalakturonase. Pektinase mampu mendegradasi beberapa jenis molekul pektin, yaitu protopektin, pektin, asam pektinat, asam pektik, dan rhamnogalakturonan (Tabel 15).



Gambar 46. Struktur pektin

Kemampuan pektinase mendegradasi molekul keras pektin membuat pektinase terlibat langsung dalam siklus karbon di alam. Pektin dipecah sehingga menghasilkan molekul galakturonan jenuh dan tak jenuh, kemudian dikatabolis menjadi 5-keto-4-deoksi-uronat. Pada reaksi selanjutnya, molekul ini akan diubah menjadi piruvat dan 3-fosfogliseraldehida (Poliana dan MacCabe, 2007; Vincent-Sealy et al., 1999). Beberapa mikroorganisme mampu menghasilkan enzim pektinase seperti *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, dan *Botrytis cinerea*.

Poligalakturonase, salah satu jenis enzim yang memecah golongan pektin, berperan dalam proses pematangan buah secara alami (Lang dan Dörenberg, 2000; DiPietro dan Roncero, 1996; Chin et al., 1999). Poligalakturonase juga

merupakan salah satu pektinase komersial yang paling banyak dipelajari dan banyak digunakan.

Tabel 15. Struktur berbagai jenis molekul pektin

Substansi pektik	Deskripsi struktur
Protopektin	Unit galakturonat dihubungkan melalui ikatan $\alpha$ -1,4-glikosida. Gugus karboksil diesterifikasi menggunakan methanol. Polimer disilanghubungkan dengan $Ca^{2+}$ atau dengan polisakarida yang lain
Pektin	Unit galakturonat dihubungkan dengan ikatan $\alpha$ -1,4-glikosida. Gugus karboksil diesterifikasi dengan methanol
Asam pektinat	Unit galakturonat dihubungkan dengan $\alpha$ -1,4-glikosida. Gugus karboksil sedikit diesterifikasi dengan methanol
Asam pektat	Unit galakturonat dihubungkan dengan $\alpha$ -1,4-glikosida.
Ramnogalakturonan	Unit galakturonat dihubungkan dengan * $\alpha$ -1,4-glikosida dengan unit ramnosa diurutkan dengan ikatan $\beta$ -1,2 dan $\beta$ -1,4. Rantai samping adalah polimer asam galakturonat dan arabinosa yang homogen

\*oligomers dari galakturonat

Sumber: Pandey et al. (2006)

Pektinase dapat diekstraksi dari jamur benang seperti *Aspergillus niger*. Jamur ini menghasilkan enzim untuk memecah lamella tengah pada tanaman sehingga dapat memasukkan hifa jamur dan mengekstrak nutrisi dari jaringan tanaman. Pektinase memiliki suhu optimum dan pH sehingga menghasilkan aktivitas yang paling tinggi. Pektinase komersial dapat aktif pada suhu 45 sampai 55 °C dan bekerja dengan baik pada pH 3,0-6,5. Selain pada pembuatan anggur, pektinase umumnya digunakan dalam industri buah untuk mempercepat ekstraksi jus buah dari puree. Enzim pektinase digunakan untuk mengekstraksi jus dari puree. Hal ini dilakukan ketika enzim memecah substrat pektin substrat sehingga

jus dapat diekstrak. Enzim pektinase menurunkan energi aktivasi yang diperlukan untuk jus yang akan diproduksi dan mengkatalisis reaksi. Enzim pektinase dibagi menjadi dua kelompok utama:

1. Pektin esterase, PE – Pektin metilsterase, PME, EC.31.1.11

Enzim ini ditemukan dalam buah-buahan, jamur, dan bakteri seperti *Rhodotorula sp.*, serta kapang *Aspergillus niger* dan *Erwinia chrysanthemi*. Enzim tidak memutus ikatan antara molekul asam galakturonat dan tidak mengurangi panjang dari polimer (derajat polimerisasi). Enzim ini digunakan dalam proses purifikasi jus sehingga dapat meningkatkan viskositas dari karakter jus tersebut. Beberapa jus yang diproses menggunakan enzim ini, di dalamnya ditemukan ion kalsium yang terikat pada asam galakturonat yang dideesterifikasi.

2. Pektin depolimerase

a. Pektin liase atau pektin metilgalakturonat liase, EC. 4.2.2.10, PL atau PMGL

Enzim ini bekerja di antara ikatan antar molekul asam galakturonat dan mampu menurunkan viskositas jus sampai dengan 50%.

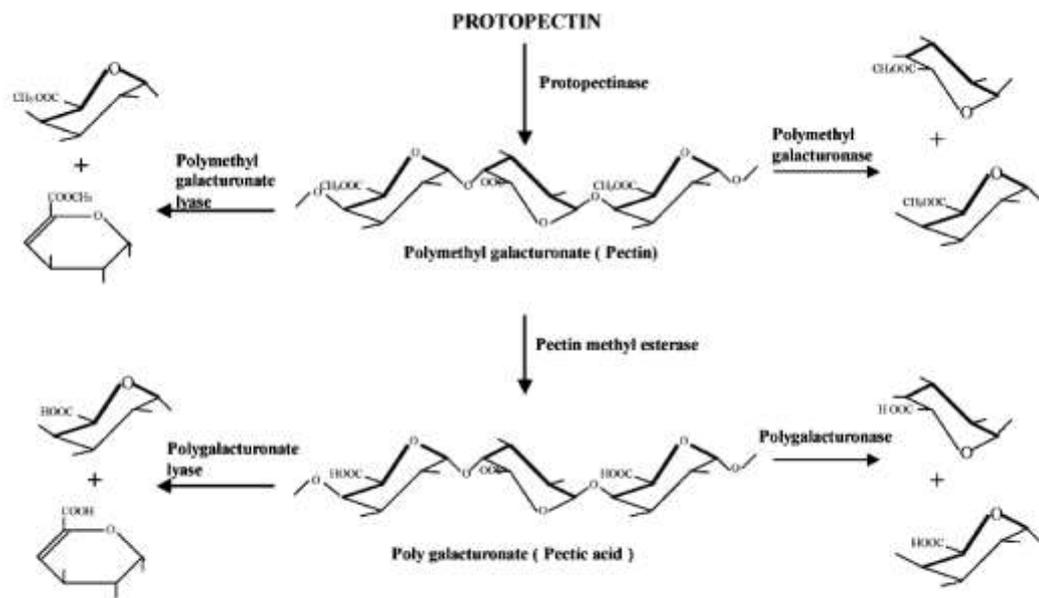
b. Poligalakturonase, PG

Terdapat enzim Poligalakturonase exo-PG (EC.3.2.1.67) yang memotong sub pektin pada ujung non pereduksi sehingga membuat polimer pektin menjadi lebih pendek dan mengurangi berat molekul. Enzim bekerja dengan baik dalam memecah pektin dengan adanya penambahan air dalam reaksi. Sering ditemukan pada bakteri *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, dan *Bacillus sp*, serta jamur kapang *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum* dan *Ralstonia solanacearum*. Poligalakturonase endo-PG (EC.3.2.1.15) memotong secara acak polimer pektin sehingga dapat mengurangi viskositas jus dengan cepat. Biasanya ditemukan pada jamur seperti *Aureobasidium pullulans*, *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus stolonifer* dan *Aspergillus spp*. Polimetilgalakturonase (EC 4.2.2.2, PMG) mencerna pektin dengan penambahan air dalam reaksi pada rantai metil pektin yang banyak. Pektinase yang dapat memecah pektin ditunjukkan pada Gambar 47 dan Gambar 48. Enzim pektinase berikut juga dapat mencerna pektin, seperti pektin asetilsterase (E.C.3.1.1.6, PA) yang memotong pektin di antara sub-

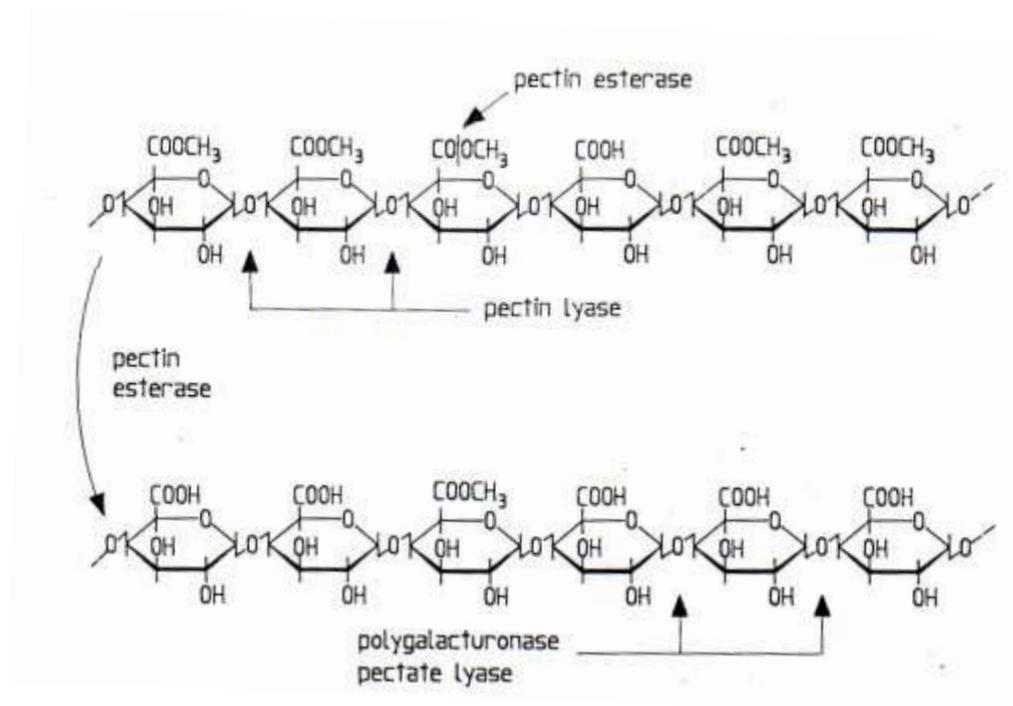
asetil pektin; Rhamnogalakturonase (EC 3.2.1.-, RG) adalah enzim yang mencerna pektin dan pada gula rhamnosa dan asam galakturonat.

### Aplikasi enzim pektinase

Pektinase umum digunakan dalam proses yang melibatkan degradasi bahan tanaman, seperti mempercepat ekstraksi jus buah dari buah, termasuk apel dan sawo. Pektinase juga telah digunakan dalam produksi anggur sejak 1960-an. Fungsi pektinase dalam pembuatan minuman anggur ada dua, yang pertama membantu memecah dinding sel buah dan membantu ekstraksi rasa dari hancuran buah. Kedua, adanya pektin dalam proses pembuatan anggur menyebabkan produk anggur menjadi sedikit keruh, dan pektinase berperan dalam menghilangkan kekeruhan sehingga dihasilkan anggur yang jernih (Tabel 16).



Gambar 47. Jenis enzim untuk mencerna pektin



Gambar 48. Mekanisme aksi enzim pektin esterase, poligalakturonase, dan pektin liase Sumber: Nagodawithana and Reed (1993).

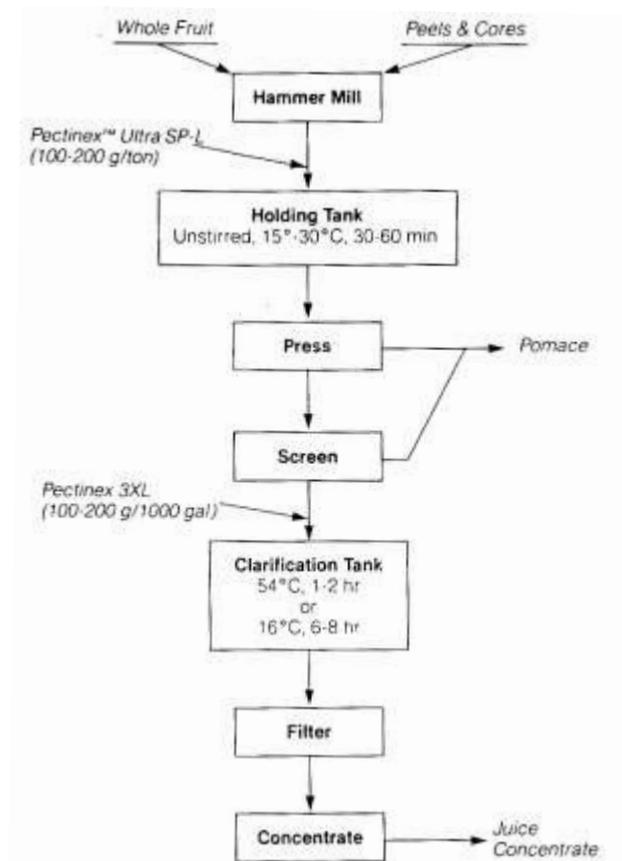
### Aplikasi enzim pektinase dalam ekstraksi jus

Pektinase digunakan dalam proses ekstraksi jus dan mampu membantu menjaga keutuhan warna, rasa, dan kandungan vitamin. Proses ekstraksi jus tidak memerlukan suhu tinggi. Pektinase digunakan dalam proses maserasi dan depektinisasi. Proses maserasi merupakan langkah awal untuk memecah komponen hemiselulosa pada buah, kerja enzim pektinase dibantu oleh enzim selulase. Proses depektinisasi merupakan langkah lanjutan untuk memisahkan jus dengan residu pemecahan pektin dan hemiselulosa (Gambar 49).

Tabel 16. Aplikasi enzim pektinase

Aplikasi	Tujuan aplikasi
Stabilisasi kekeruhan	Presipitasi material hidrokoloid yang ada pada jus buah
Klarifikasi jus buah	Degradasi pembentukan substansi pectin yang keruh, sehingga jus dapat dengan mudah disaring dan diproses
Ekstraksi jus dan minyak	Membantu pemerasan buah untuk memperoleh jus dan minyak
Maserasi	Untuk memecah jaringan sayur dan buah untuk menghasilkan produk makanan bayi, pudding dan yoghurt
Liquifaksi	Untuk memecah karbohidrat tumbuhan menjadi gula sederhana
Gelasi	Untuk mengubah gula menjadi gel pada produk buah
Pengawetan kayu	Untuk mencegah invasi serangga pada kayu dengan cara meningkatkan permeabilitas kayu
Tali rami	Menghilangkan lapisan karet pada serat rami
Pengolahan limbah	Mendegradasi substansi pektik pada limbah industry jeruk
Fermentasi kopi dan teh	Untuk menghilangkan lapisan lendir pada biji kopi dan meningkatkan pembentukan property busa pada fermentasi teh

Sumber: Pandey et al (2006)



Gambar 49. Pektinase dalam proses ekstraksi dan klarifikasi jus buah  
 Sumber: Nagodawithana dan Reed (1993)

### **Aplikasi enzim pektinase dalam ekstraksi minyak zaitun**

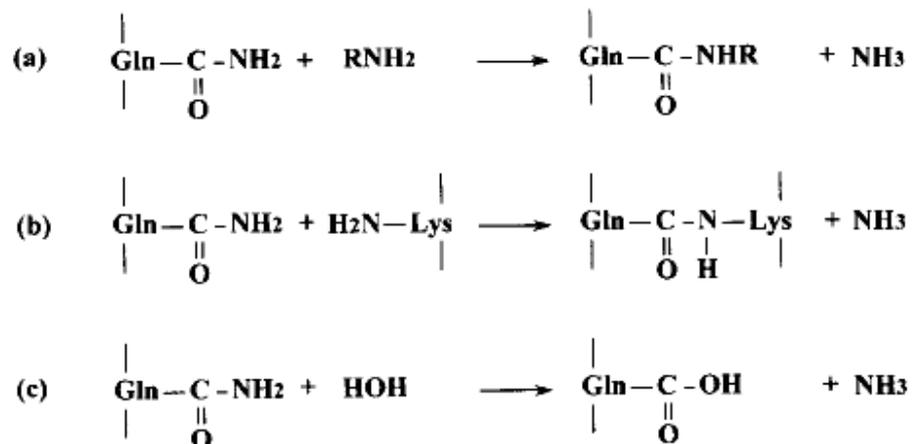
Minyak zaitun merupakan minyak yang berkualitas tinggi yang dihasilkan banyak negara sekitar Laut Mediterania (Italia, Spanyol, Yunani, dan Tunisia). Ekstraksi minyak zaitun cukup sulit dilakukan apabila hanya menggunakan teknik ekstraksi biasa. Enzim pektinase dan selulase berperan dalam proses ekstraksi minyak zaitun dan meningkatkan produktivitas biji zaitun dalam menghasilkan minyak. Penambahan enzim dilakukan selama penggilingan biji zaitun kemudian dibantu proses sentrifugasi.

## BAB XIII

### Transglutaminase

#### Transglutaminase, TGase, EC 2.3.2.13

Transglutaminase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan isopeptida antara gugus amina bebas (misalnya, proteinuria atau peptida-terikat lisin) dan gugus asil pada akhir rantai sisi proteinuria atau peptida-terikat glutamin (Gambar 50). Reaksi ini juga menghasilkan molekul amonia. Struktur yang dibentuk oleh transglutaminase menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap degradasi proteolitik (proteolisis). Transglutaminase pertama kali ditemukan pada tahun 1959 (Clarke et al. 1959). Aktivitas biokimia dari transglutaminase ditemukan pada pembekuan darah protein faktor XIII pada tahun 1968 (Pisano et al., 1968). Transglutaminases membentuk ekstensif *cross-linked*, umumnya tidak larut pada polimer protein. Polimer biologis sangat diperlukan untuk organisme untuk menciptakan suatu sistem hambatan dan struktur yang stabil. Contohnya adalah pada proses pembekuan darah (koagulasi faktor XIII), serta pembentukan kulit dan rambut. Reaksi katalitik transglutaminase umumnya bersifat ireversibel. Enzim transglutaminase dihasilkan oleh mikroorganisme seperti *Streptovercillium mobaraense* dan dapat diekstrak dari darah hewan.



Gambar 50. Reaksi yang dikatalisis enzim transglutaminase, asam glutamate dan proses deamidasi yang dibantu oleh TGase (Motoki dan Kamazawa (2000))

### **Peran enzim transglutaminase dalam mekanisme penyakit**

Pada kondisi seseorang yang mengalami defisiensi faktor XIII (kondisi genetik langka) yaitu predisposisi perdarahan; enzim transglutaminase terkonsentrasi dapat digunakan untuk memperbaiki kelainan dan mengurangi resiko pendarahan (Griffin et al, 2002). Selain itu, antibodi anti-transglutaminase ditemukan pada penyakit celiac. Antibodi ini memainkan peran dalam kerusakan usus kecil ketika terpapar gandum yang mengandung protein gliadin. Dalam kaitannya dengan kondisi herpetiformis dermatitis di mana perubahan usus kecil yang sering ditemukan dan yang merespon produk makanan gandum yang mengandung gliadin, epidermal transglutaminase adalah autoantigen dominan (Sardy et al, 2002). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa penderita penyakit neurologis seperti Huntington dan Parkinson mungkin memiliki satu jenis transglutaminase jaringan dengan tingkat yang sangat tinggi. Ini adalah hipotesis bahwa transglutaminase jaringan mungkin terlibat dalam pembentukan agregat protein yang menyebabkan penyakit Huntington (Lesort et al, 2002).

### **Aplikasi transglutaminase dalam industri dan bidang kuliner**

Industri kuliner mengenal enzim transglutaminase sebagai “lem daging”. Daging yang dicincang atau remahan daging dapat disatukan kembali menggunakan enzim ini. Dalam pengolahan makanan secara komersial, transglutaminase digunakan untuk menyatukan protein makanan. Sebagai contoh, produk makanan yang dibuat dengan memanfaatkan transglutaminase adalah daging kepiting sintesis, bakso ikan, galantin, sosis, dan produk dadih darah hewan. Selain itu, transglutaminase juga digunakan dalam berbagai proses pengolahan daging dan ikan. Transglutaminase dapat digunakan sebagai iagen yang dapat mengikat dan memperbaiki tekstur makanan kaya akan protein seperti surimi dan ham (Vermes et al, 2008; Yokoyama et al, 2004). Beberapa produsen pasta dari 95% udang juga menggunakan transglutaminase untuk menciptakan produk yang bertekstur (Jon, 2005). Beberapa aplikasi enzim transglutaminase ditunjukkan pada Tabel 17.

Tabel 17. Aplikasi enzim transglutaminase yang diperoleh dari berbagai sumber

Enzim	Sumber	Substrat daging	Efek
TG	Plasma sapi	Miosin sapi yang dimurnikan	Polimerisasi myosin
	Hati marmot	Aktomiosin dari daging ayam kalkun dan sapi	Polimerisasi aktomiosin
	Plasma babi	Protein myofibril ayam	Polimerisasi myosin dan aktin
	Plasma babi	Bakso ayam	Meningkatkan kekuatan dan yield masakan
	<i>S. mobaraense</i>	Aktin dari kelinci	Ikatan intramolekular pada aktin
	<i>S. ladakanum</i>	Surimi ikan makarel	Meningkatkan kekuatan gel dan menurunkan elastisitas
	Ajinomoto	Homogenate babi	Pembentukan gel pada saat peingkatan pemanasan.
	Activa TG-TI Ajinomoto	Protein myofibril jantung sapi	Pembentukan gel meningkat pada suhu 70 °C
	TG dipurifikasi dari produk Activa WM	Protein miofibrilar ayam	Pembentukan gel meningkat sebagai fungsi dari dosis TG dan konsentrasi NaCl

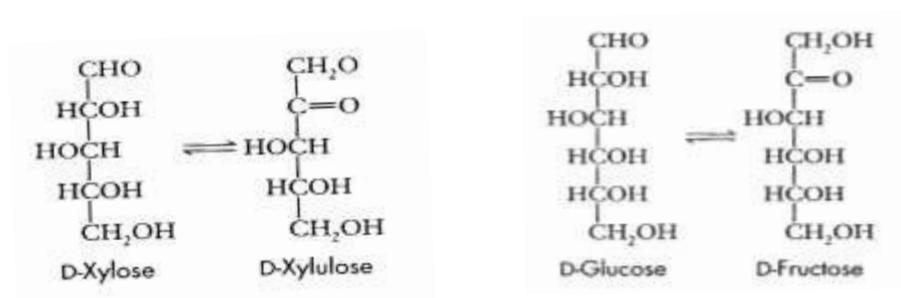
Sumber: Buchert et al. (2007)

## BAB XIV

### Glukosa Isomerase

#### Glukosa Isomerase, EC 5.3.1.5

Xilosa isomerase (EC 5.3.1.5) adalah enzim yang mengkatalisis interkonversi D-xilosa dan D-xilulose. Enzim ini tergolong dalam keluarga enzim isomerase, khususnya yang berperan dalam interkonversi oksidoreduktase pada intramolekul aldosa dan ketosa. Aktivitas xilosa isomerase pertama kali diamati oleh Mitsuhashi dan Lampen pada tahun 1953 pada bakteri *Lactobacillus* (Mitsuhashi dan Lampen, 1953). Isomerase diproduksi oleh banyak spesies bakteri khususnya pada genus *Actinoplanes*, *Streptomyces* dan *Bacillus*. Aktivitas xilosa isomerase dalam mengkonversi D-glukosa menjadi D-fruktosa diinvestigasi oleh Marshall dan Kooi (1957). Xilosa isomerase sering disebut sebagai glukosa-isomerase telah diaplikasikan dalam industri sirup jagung tinggi fruktosa dan glukosa. karena penggunaannya dalam industri untuk memproduksi sirup jagung fruktosa tinggi dari glukosa (Beerens, 2012). Enzim ini mampu mengubah glukosa menjadi isomernya yaitu fruktosa. Nama sistematis kelas enzim ini adalah D-xilosa aldosa-ketosa-isomerase. Nama lain yang umum digunakan termasuk D-xilosa ketoisomerase. Selain mengubah gula pentose seperti glukosa menjadi fruktosa, enzim ini juga bekerja pada berbagai macam substrat gula heksosa seperti D-ribosa, L-arabinosa, L-rhamnosa, dan D-allosa (Jokela and Pastinen, 2002).



Gambar 51. Reaksi polimerisasi isomer xilosa dan glukosa yang dikatalisis oleh enzim xilosa isomerase (Glazer dan Nikaido, 1995).

Konversi glukosa menjadi fruktosa dengan xilosa isomerase pertama kali dipatenkan pada 1960-an. Akan tetapi, proses katalisis yang dipatenkan pada saat itu belum layak untuk digunakan dalam industri. Proses *recovery* enzim belum dapat dilakukan sehingga membutuhkan banyak biaya untuk pembelian enzim. Takanashi mengembangkan xilosa isomerasi imobil pada permukaan padat sehingga dapat digunakan berkali-kali dalam memproduksi sirup fruktosa jagung (Jokela dan Pastinen, 2002).

### **Produksi gula fruktosa dari glukosa**

Setelah pati diubah menjadi glukosa, dengan menggunakan enzim glukosa isomerase glukosa diubah menjadi fruktosa. Fruktosa merupakan gula yang memiliki tingkatan rasa manis diatas glukosa dan sukrosa. Tingkatan rasa manis berbagai jenis gula disajikan pada Tabel 18.

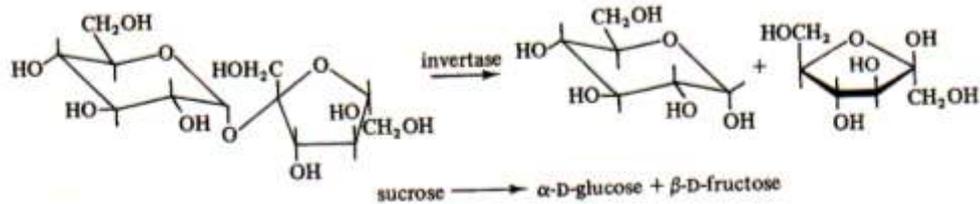
Tabel 18. Tingkatan rasa manis pada beberapa jenis gula

Pemanis	Tingkat kemanisan relatif
Laktosa	0,27
Galaktosa	0,35
D-glukosa	0,5-0,6
Maltosa	0,6
Gula invert	0,8-0,9
Sukrosa	1,0
D-fruktosa	1,2-1,8
Sodium siklamat	30
Sakarin	200-700
Aspartam	200
Urea Aryl dan guanidine trisubstitusi	Sampai dengan 200.000

Sumber: Nagodawithana dan Reed (1993)

Sirup fruktosa dapat dibuat dari sukrosa dengan cara hidrolisis asam atau dengan menggunakan enzim invertase alami dari *Saccharomyces cerevisiae*. Akan tetapi, jika jumlahnya lebih dari 20% maka akan menghambat aktivitas enzim

invertase. Reaksi katalisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa ditunjukkan pada Gambar 52.



Gambar 52. Konversi sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase (Chaplin and Bucke (1990))

Saat ini, produksi sirup fruktosa menggunakan isomerisasi lebih menjanjikan dan menguntungkan karena rasa sirup fruktosa yang lebih manis. Terdapat tiga jenis sirup fruktosa yang saat ini dikomersialisasikan, yaitu sirup fruktosa 42%, 55%, dan 90%. Enzim glukosa isomerase juga telah banyak diproduksi secara komersial seperti yang ditunjukkan pada Tabel 19. Enzim yang dikomersialkan dikemas dalam bentuk enzim imobil sehingga dapat digunakan untuk reaksi yang berkelanjutan (*continuous*) di dalam tangki reaktor (*packed bed reactor*) dengan pengaturan suhu, pH, waktu dan substrat secara berkesinambungan.

Tabel 19. Glukosa isomerase yang telah diproduksi dan dikomersialkan

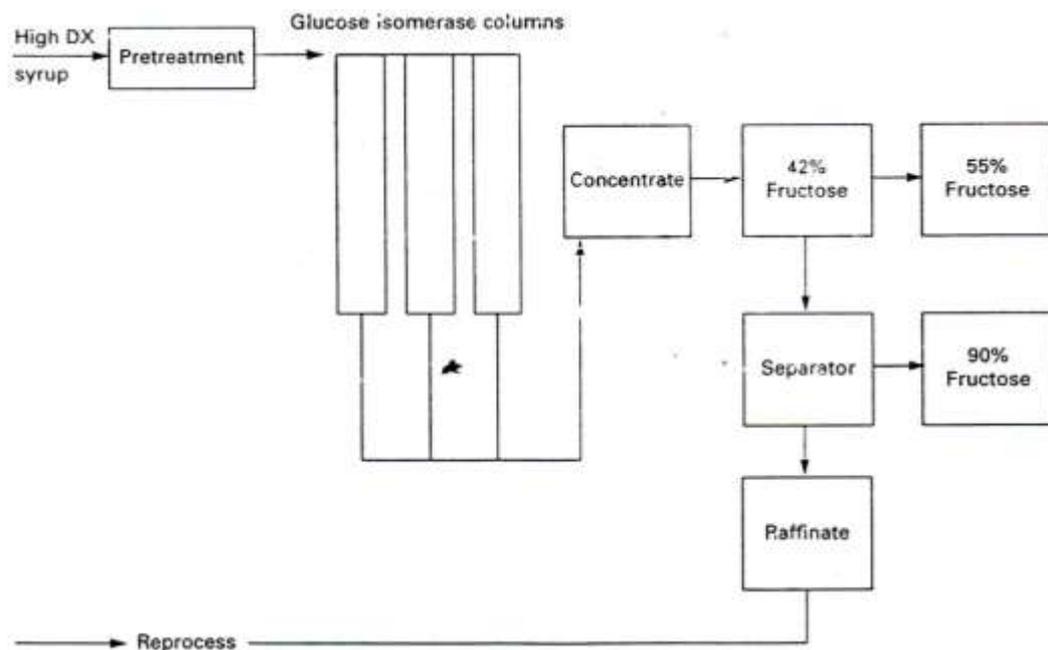
Organisme sumber enzim	Nama dagang	Pembuat	Metode imobilisasi
Enzim murni			
<i>S. olivochromogenes</i>	G-zyme G-994	CPC (Enzyme Biosystems)	Adsorpsi pada resin penukar anion
<i>S. rubiginosus</i>	Spezyme	Genencor International	DEA-selulosa diaglomerasi dengan polistiren dan TiO <sub>2</sub>
<i>S. rubiginosus</i>	Optisweet II	Solvay	Adsorpsi partikel SiO <sub>2</sub> diikuti berikatan silang dengan glutaraldehid

<i>S. olivochromogenes</i>	Ketomax 100	UOP	Polietilenemin-dengan perlakuan alumina dengan ikatan silang dengan sel yang diekstrusi dan digranulasi
Sel utuh			
<i>Actinoplanes missourinensis</i>	Maxazyme	IBIS	Sel diokulasi dalam gelatin dan glutaraldehid
<i>Flavobacterium arborescens</i>	Takasweet	Solvay	Poliamin glutaraldehid yang dikat silang dengan sel yang diekstrusi dan digranulasi
<i>S. griseofuseus</i>	AGIS-600	Godo-Shusei	Kitosan dengan perlakuan sel dengan ikatan silang glutaraldehid
<i>S. phaeochromogenes</i>	Sweetase	Nagase	Sel dengan perlakuan pemanasan yang terikat pada resin penukar anion
<i>S. murinus</i> dan <i>Bacillus coagulans</i>	Sweetzyme T	Novo-Nordisk	Sel dengan ikatan silang glutaraldehid yang diekstrusi

Sumber: Bhosale et al. (1996)

Glukosa murni yang diperoleh dari proses pemecahan pati disaring melalui filter resin penukar ion dan karbon aktif dengan kandungan DE (dextrose equivalent) sebesar 93-97% kemudian dievaporasi menjadi bentuk solid terkonsentrasi 40%-50%. Dalam produksi fruktosa, ke dalam substrat ditambahkan magnesium sebagai kofaktor enzim dan mencegah kalsium untuk menghambat enzim. Selain itu, ditambahkan komponen sulfur dan grafit untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme serta mengontrol kadar oksigen. Reaksi dilakukan selama satu hingga empat jam hingga menghasilkan 41%-43% sirup

fruktosa. Guna memperoleh konsentrasi fruktosa yang lebih tinggi, maka dilakukan penyaringan menggunakan resin penukar ion guna menghilangkan kandungan glukosa yang tersisa. Glukosa yang tertinggal dalam kolom resin akan meningkatkan konsentrasi fruktosa hingga 90%. Produksi fruktosa dari glukosa dalam kondisi yang berkelanjutan (*continuous production*) ditunjukkan pada Gambar 52.



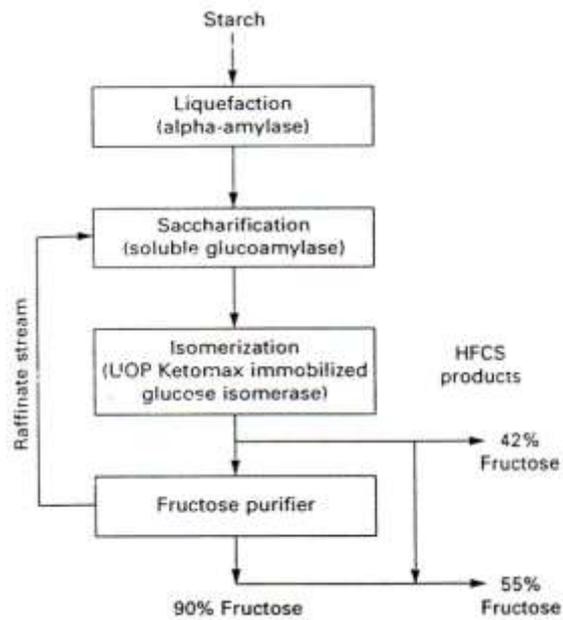
Gambar 52. Proses produksi sirup fruktosa dalam reaktor dengan memanfaatkan enzim glukosa isomerase (Chaplin and Bucke, 1990).

Terdapat tiga jenis sirup fruktosa hasil konversi dari glukosa oleh enzim glukosa isomerase, yaitu:

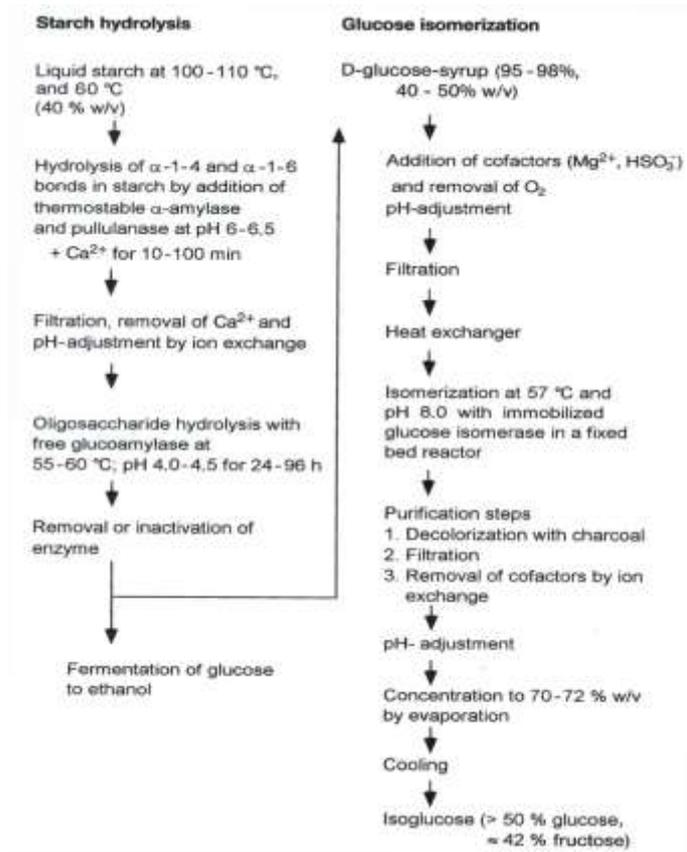
1. Sirup fruktosa 42% yang lebih manis dibandingkan sukrosa,
2. Sirup fruktosa 55% yang lebih manis dibandingkan sukrosa 8%,
3. Sirup fruktosa 90% yang lebih manis dibandingkan sukrosa 20-30%

Dalam proses produksi sirup fruktosa dari pati secara langsung, pati akan diubah menjadi glukosa terlebih dahulu. Enzim alpha amylase dan glukosidase amylase mengubah pati menjadi glukosa. Selanjutnya, glukosa diubah menjadi fruktosa dengan bantuan enzim glukosa isomerase. Langkah produksi sirup

fruktosa dari pati ditunjukkan pada Gambar 53. Detail dari proses produksi ditunjukkan pada Gambar 54.



Gambar 53. Langkah krusial dalam proses konversi pati menjadi fruktosa dengan bantuan enzim (Godfrey and West, 1996).



Gambar 54. Detail proses produksi fruktosa dari pati (Buchholz et al. 2005).

## **BAB XV**

### **Prinsip Imobilisasi Enzim**

Enzim adalah katalis biologis yang terdiri dari protein atau glikoprotein. Enzim telah dimanfaatkan dalam proses industri makanan, minuman, farmasi, tekstil dan deterjen. Meskipun demikian, dalam penggunaannya, enzim memiliki keterbatasan, seperti harganya yang mahal, terutama enzim yang tingkat kemurniannya tinggi, serta tingkat stabilitas enzim yang rendah. Pada umumnya, reaksi katalisis memerlukan enzim larut sehingga enzim tidak dapat digunakan kembali. Dengan demikian, dalam produksi berbagai senyawa dengan menggunakan katalis enzim, biaya yang diperlukan menjadi lebih tinggi. Untuk mengatasi masalah ini, kemampuan enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi dapat dipertahankan dengan cara melakukan imobilisasi dalam matriks pendukung yang tidak larut dalam reaksi. Enzim amobil atau imobil adalah enzim yang melekat pada inert, bahan yang tidak larut seperti kalsium alginate (diproduksi dengan mereaksikan campuran larutan natrium alginat dan larutan enzim dengan kalsium klorida). Imobilisasi enzim dapat meningkatkan ketahanan enzim terhadap perubahan pH dan suhu. Imobilisasi juga bertujuan untuk mendapatkan enzim yang dapat dipisahkan dari produk dan dapat digunakan kembali setelah melalui proses reaksi katalisis. Keuntungan dan kerugian penggunaan enzim imobil ditunjukkan pada Tabel 20. Penggunaan enzim imobil memiliki keunggulan dibandingkan penggunaan enzim larut, yaitu:

1. Enzim dapat digunakan kembali
2. Mampu menghasilkan produksi yang berkelanjutan dan terkontrol dengan baik
3. Hasil dari enzim dapat dipisahkan dengan mudah
4. Dalam beberapa kasus, stabilitas enzim imobil dapat ditingkatkan, enzim imobil biasanya memiliki stabilitas termal dan operasional yang lebih jika dibandingkan enzim larut
5. Dapat digunakan bersama-sama dengan enzim lain dalam suatu proses manufaktur yang kompleks

Sedangkan kelemahan imobilisasi enzim adalah:

1. Biaya carrier/penyangga dan proses imobilisasi cukup besar
2. Terjadi perubahan karakteristik enzim
3. Pembatasan transfer massa (problem dengan kofaktor dan regenerasi, serta problem dengan sistem multienzim)
4. Aktivitas enzim hilang selama imobilisasi

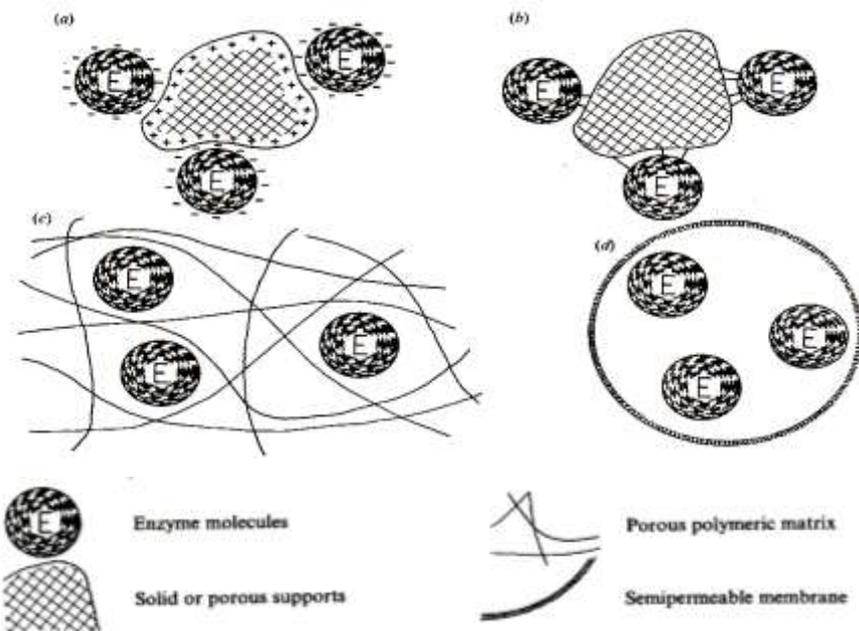
Tabel 20. Keuntungan dan kerugian dari menggunakan enzim amobil untuk mengkatalisis reaksi.

Aspek umum	Aspek khusus
<b>Keuntungan</b>	
Retensi biokatalis dalam bioreaktor	Memungkinkan penggunaan ulang biokatalis
	Kontaminasi produk dapat dihindari
	Metode laju pengenceran yang tinggi tidak memungkinkan adanya pemusnahan biokatalis
Konsentrasi biokatalis yang tinggi	Meningkatkan volume produktivitas
	Konversi substrat yang tidak stabil secara cepat
	Meminimalisir reaksi sampingan
Kontrol lingkungan mikro dari biokatalis	Manipulasi aktivitas dan spesifisitas biokatalis
	Stabilisasi aktivitas biokatalis
	Proteksi terhadap biokatalis yang sensitive terhadap pengadukan
Fasilitasi pemisahan biokatalis dengan produk	Kontrol yang presisi terhadap waktu bioreaksi
	Meminimalisasi transformasi produk berlebih
<b>Kerugian</b>	
Biaya produksi yang tinggi	Peningkatan kebutuhan material dan peralatan untuk merancang sebuah bioreaktor
Hilangnya aktivitas biokatalis selama imobilisasi	Terkait dengan biokatalis: pengaruh pH, suhu, reaktan yang toksik, gerakan mekanis di dalam reactor Terkait dengan lingkungan mikro: hambatan pada reaksi enzimatik di situs aktif, pH hanya local, adanya transfer masa yang terbatas
Hilangnya aktivitas biokatalis selama operasi bioreaktor	Perubahan struktur kompleks biokatalis: matriks yang mengalami erosi dan larut dalam campuran, partikel matriks yang tidak dapat menahan biokatalis karena adanya aliran fluida dalam bioreaktor, serta

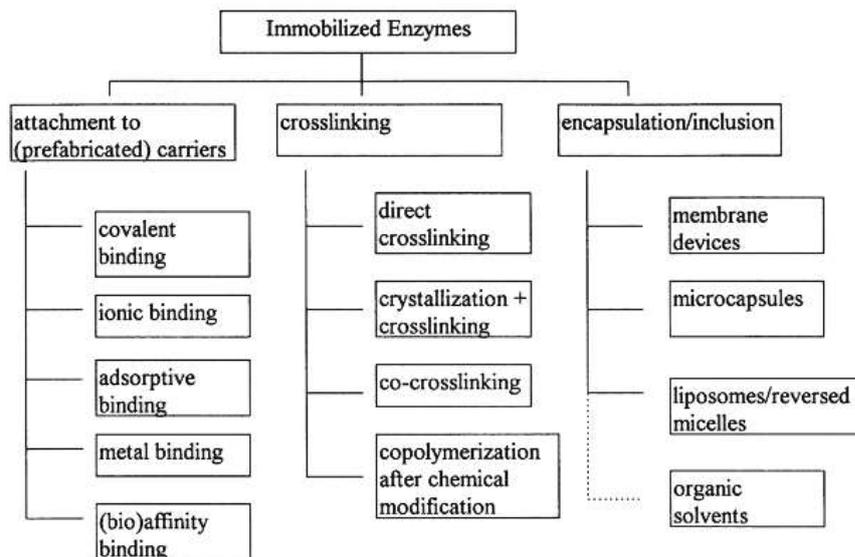
	adanya ukuran pori yang beragam dalam matriks. Terkait dengan matriks yang menjadi inhibitor pada lingkungan mikro dan adanya pembentukan biofilm yang mengganggu
Keadaan di lapangan	Memerlukan analisis yang spesifik, optimasi multi-parameter, dan proses kontrol serta modeling yang sulit.

Sumber: Ratledge dan Kristiansen (2001)

Terdapat berbagai cara untuk membuat enzim imobil, seperti membuat enzim dalam bentuk larut seperti adsorpsi pada manik-manik alginate, kaca berpori dengan daya apung, menggabungkan dengan ikatan kovalen pada gel matriks penahan, atau dalam membran dengan ukuran pori yang lebih kecil dari ukuran enzim, atau menjebak enzim dengan menggunakan matriks. Berbagai metode untuk membuat enzim imobil ditunjukkan pada Gambar 55 dan Gambar 56.

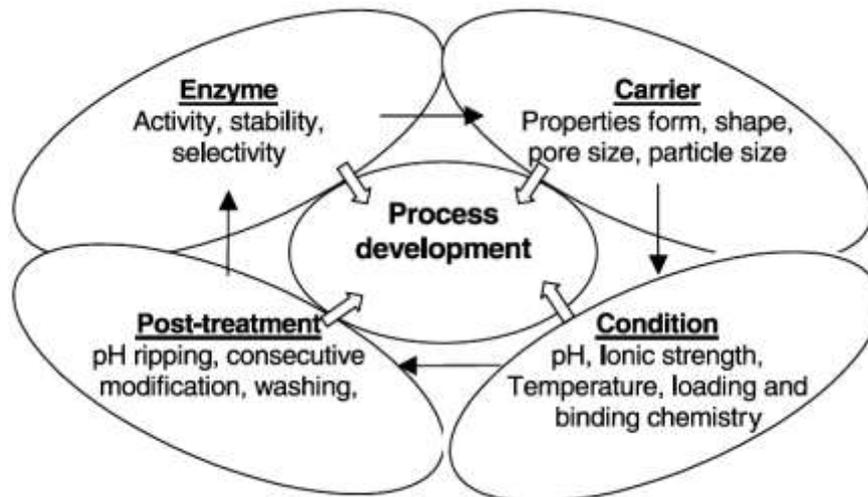


Gambar 55. Metode immobilisasi enzim. a) memperbaiki daya apung, b) immobilisasi dengan ikatan kovalen, c) menjerab enzim dalam matrik pendukung, d) *cross-linked*, penahanan enzim dalam membran (Chaplin dan Bucke, 1990).



Gambar 56. Klasifikasi teknik immobilisasi enzim (Tischer and Wedekind, 1999)

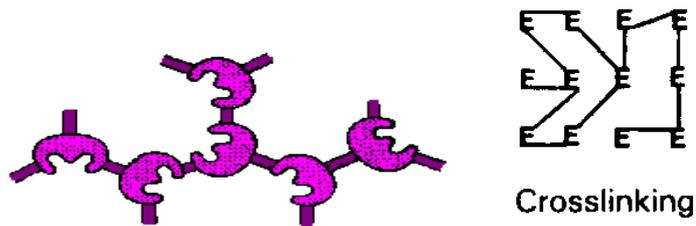
Faktor yang perlu dipertimbangkan dalam teknik imobilisasi enzim adalah bagaimana cara supaya enzim tersebut tetap stabil. Faktor-faktor yang perlu dipertimbangkan dan dimanipulasi dalam imobilisasi enzim adalah saling terkait seperti yang ditunjukkan pada Gambar 57.



Gambar 57. Faktor-faktor yang perlu dicermati dalam proses imobilisasi enzim (Cao, 2005)

### Metode *cross-linking*

Metode ini berdasarkan pembentukan ikatan kimia seperti dalam metode ikat kovalen, namun pembawa yang tidak larut dalam air tidak digunakan dalam metode ini. Imobilisasi enzim dilakukan dengan pembentukan ikat silang intermolekuler diantara molekul enzim dengan penambahan reagent bi- atau multifungsional. Preparasi enzim imobil dengan menggunakan metode ini yaitu dengan menciptakan ikatan kovalen tanpa bantuan penyangga padat. Enzim diimobilisasi dengan cara ikatan silang antara molekul enzim dengan agen pengikat (matriks alifatik diamin, dimetilsuberimidat, formaldehid, dan glutaraldehid) sehingga molekul enzim menjadi tidak larut (*insoluble*) (Gambar 58).



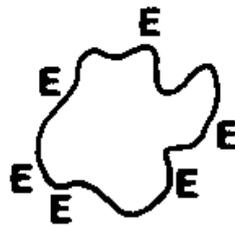
Gambar 58. Teknik immobilisasi enzim secara *cross-linking*

Keuntungan dari metode ini adalah dapat digunakan hanya dalam enzim immobilisasi tunggal dan reaksi silang terjadi dengan mudah. Kelemahannya adalah bahwa dalam keadaan seperti gel, kemampuan enzim untuk beraktivitas pada kondisi yang sesuai pada agen *cross-linking* berkurang, perlu diperhatikan adanya kondisi yang sesuai yaitu pH, konsentrasi ion, suhu dan waktu. Enzim yang menggunakan teknik ini adalah golongan glukosa isomerase. Dalam industri, penisilin asilase, EC 3.5.1.11 sudah digunakan dengan baik.

#### **Metode *support-binding/ carrier-binding***

Metode adsorpsi fisik

Dengan metode ini, enzim diimmobilisasi dengan berikatan hydrogen, Van der Waals dan sifat hidrofobik penyangga solid. Metode ini berdasarkan pada adsorpsi fisika dari protein enzim pada permukaan pembawa yang tidak larut dalam air. Kelemahan dari metode ini dimana enzim yang diserap dapat bocor selama pemakaian karena gaya ikat antara protein enzim dan pembawa lemah, serta enzim mudah dirusak oleh enzim protease dan mikroorganisme. Contoh *carrier* untuk adsorpsi fisik adalah: Karbon aktif, hidroksil apatit, gelas porous, gel Ca-fosfat, tanah liat, pati, kaolin, gluten, alumina, butil sefarosa, silika gel, concana valin A, bentonit (Gambar 59).

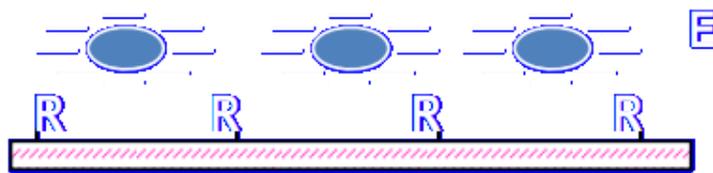


## Adsorption

Gambar 59. Metode adsorpsi fisik

### Metode pengikatan ionik

Metode pengikatan ionik pada teknik imobilisasi enzim adalah berdasarkan pengikatan ionik dari protein enzim pada pembawa yang tidak larut dalam air yang mengandung residu penukar ion. Terjadi ikatan ionik antara enzim dengan “carrier” yang tidak larut air dan mengandung residu penukar ion (Gambar x). Matriks penukar ion yang digunakan antara lain selulosa, DEAE-sefadex, “glass-fibre paper”, dan polistiren sulfonat. Kelemahan metode ini dimana kebocoran dapat terjadi dimana dalam larutan substrat dengan kekuatan ionik yang tinggi atau pada variasi pH (Gambar 59)

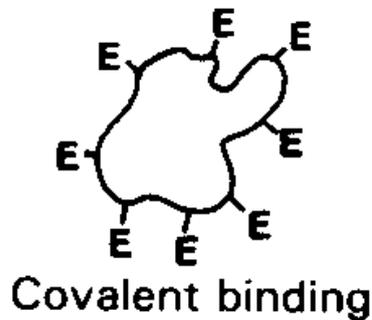


Gambar 60. Ionik antara enzim dengan matriks penukar ion

### Metode pengikatan kovalen

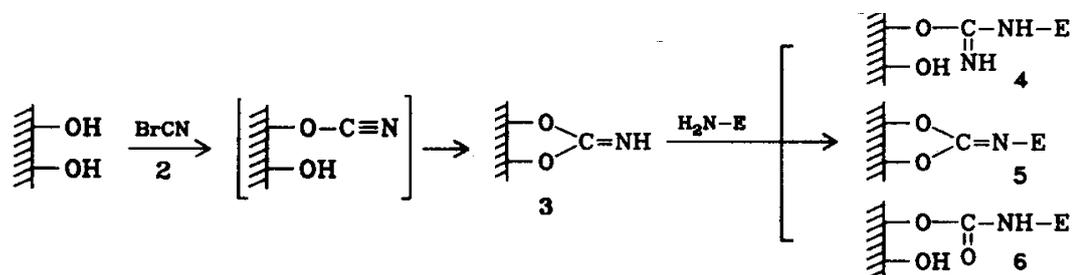
Pada metode ini diperlukan kondisi reaksi yang sulit dan biasanya dilakukan dalam keadaan yang khusus bukan pada suhu ruangan. Gugus fungsional enzim yang berperan dalam metode imobilisasi ini adalah  $\alpha$  atau  $\beta$ -amino,  $\alpha$ ,  $\beta$ , atau  $\gamma$ -karboksil, sulfhidril, hidroksil, imidazole, dan fenolik. Sedangkan dalam matriks carrier mengandung gugus reaktif diazonium, asam azida, isosianat, cyanogen bromide, dan lain sebagainya. Dalam beberapa kasus, ditemukan bahwa ikatan kovalen mengubah bentuk konformasi dan pusat aktif

enzim yang mengakibatkan kehilangan aktivitas atau perubahan spesifitas aktivitas (Gambar 61).



Gambar 61. Ikatan kovalen antara enzim dengan matriks *binding*

*Carrier* yg memiliki gugus hidroksil (polisakarida, manik gelas) dapat diaktivasi dengan menggunakan cyanogen bromide untuk menghasilkan turunan imidokarbonat yang reaktif lalu berikatan dengan gugus amino enzim (Gambar 62).



Gambar 62. Interaksi antara gugus hidroksil karier dengan gugus amin enzim

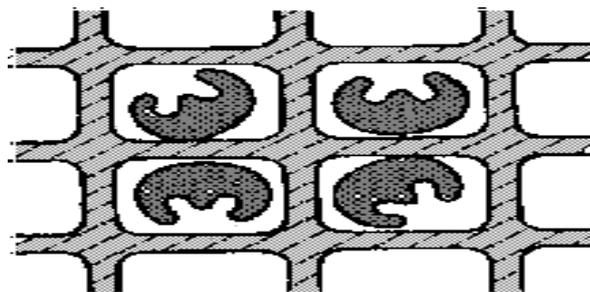
### Metode penjeraban (*Entrapment method*)

Metode penjeraban berdasarkan pengikatan enzim dalam kisi matriks polimer atau melingkupi enzim dalam membrane semipermeabel dan dibagi menjadi tipe kisi dan mikrokapsul. Teknik penjeraban yang umum untuk mikroorganisme dalam butiran adalah *ionotropic gelation* dari makromolekul dengan kation multivalensi. Penjebakan dapat terjadi dengan mencampurkan mikroorganisme dengan polimer anionik dan kemudian diikat – silang larutan tersebut dengan kation multivalensi sehingga membentuk struktur yang menjerab mikroorganisme tersebut (Liouni, 2007). Stabilitas dari enzim ditentukan dengan

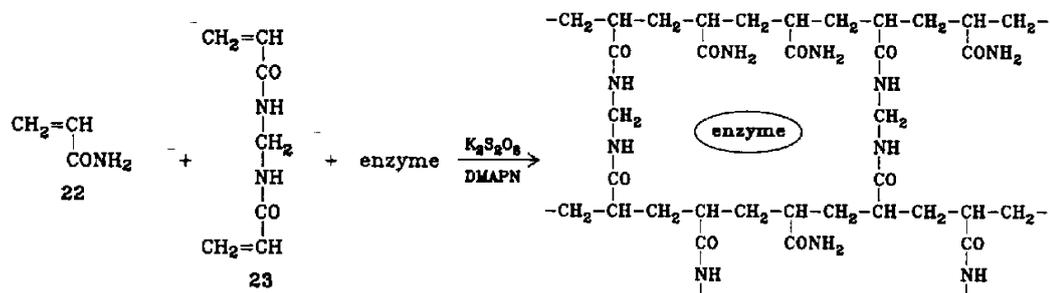
lamanya pemakaian dimana enzim tersebut masih aktif dan dapat mengkatalisis serta berdasarkan teknik imobilisasi yang digunakan (Jhonson, 1978).

Tipe kisi (*lattice type*)

Metode penjebakan tipe kisi meliputi penjeraban enzim dalam bidang batas (*interstitial space*) dari suatu ikat – silang polimer yang tidak larut dalam air misalnya gel matriks (Gambar 63 dan Gambar 64).



Gambar 63. Metode imobilisasi tipe kisi, enzim tidak terikat pada matriks



Gambar 64. Penjeraban enzim dalam matriks gel poliakrilamid

### Mikrokapsul

Penjebakan dengan cara mikrokapsul melibatkan pelingkupan enzim dengan membran polimer semipermeable (Gambar 65). Prosedur untuk mikroenkapsulasi enzim dapat dibagi ke dalam tiga kategori, yaitu polimerisasi interfasial, pengeringan cair (*liquid drying*), dan pemisahan fase (*phase separation*).



Gambar 65. Mikrokapulasi enzim dalam matriks/ membran

### Perubahan sifat enzim terimobilisasi

Enzim yang diimobilisasi dapat mengalami perubahan aktivitas, pH optimum, dan stabilitas. Perubahan aktivitas enzim terimobilisasi ada dua yaitu aktivitas relatif dan aktivitas spesifik absolut. Penurunan aktivitas enzim dapat disebabkan oleh adanya matriks yang menghalangi interaksi antara enzim dengan substrat, serta kemungkinan adanya gugus reaktif pada sisi aktif enzim ikut terikat pada matriks, serta adanya kemungkinan denaturasi enzim. pH optimum enzim yang terimobilisasi dapat berubah karena adanya distribusi ion  $H^+$ , ion  $OH^-$ , dan muatan substrat yang tidak merata. Stabilitas enzim (stabilitas operasi/  $t_{1/2}$  (*half-life*)) merupakan waktu dimana enzim kehilangan 50% dari aktivitas enzim semula. Stabilitas operasi enzim ditentukan oleh jenis enzim, cara imobilisasi, dan jenis bioreaktor (*batch reactor* atau *continuous reactor*).

**$V_1$ (aktivitas relatif) =**

Perbandingan aktivitas enzim imobil vs enzim larut dalam jumlah sama

**$V_2$  (aktivitas spesifik absolut) =**

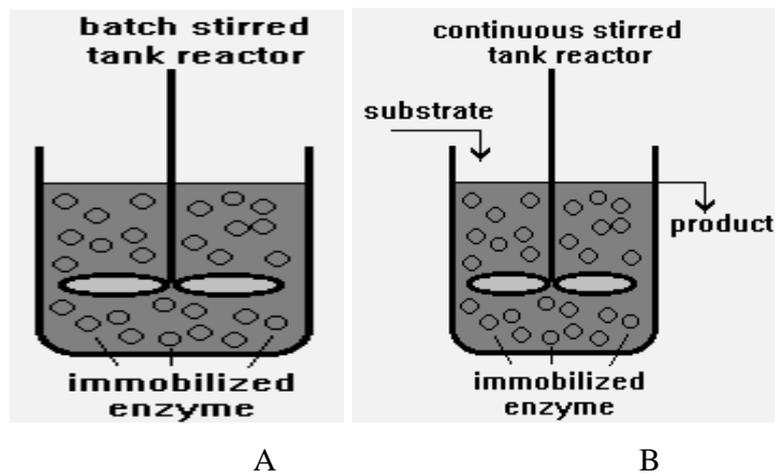
Kecepatan reaksi per unit berat atau unit volume seluruh katalis

### Reaktor untuk enzim imobil

Terdapat berbagai macam reaktor yang dapat digunakan untuk membuat suatu produk hasil reaksi enzim dengan substrat, khususnya dengan menggunakan enzim yang terimobilisasi. Penggunaan enzim terimobilisasi dan reaktor yang tepat dapat meningkatkan efisiensi dan efektivitas produksi. Enzim imobil dapat digunakan untuk beberapa siklus reaksi tergantung pada waktu paruhnya.

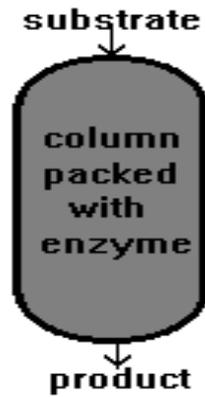
Reaktor curah (*batch*) merupakan reaktor yang sederhana dan mudah digunakan (Gambar 66), akan tetapi memiliki kelemahan ketika viskositas substrat dan enzim yang tinggi alat ini akan bekerja dengan sangat lambat karena

proses pengadukan (*stirring*) yang berat. Viskositas yang tinggi juga akan menurunkan aktivitas enzim imobil. Reaktor ini tidak memiliki mekanisme pengontrolan yang baik, sehingga enzim, substrat, dan produk menjadi satu di dalam tanki. Reaktor *continuous stirred tank reactor* (CSTR) merupakan reaktor yang mirip dengan reaktor curah akan tetapi memiliki keunggulan yaitu pengontrolan kondisi reaktor yang lebih mudah, cocok untuk kasus penghambatan substrat, dan dapat menghindari kontak enzim oleh substrat dan produk yang terlalu lama. Reaktor ini dapat diatur dengan baik karena memiliki sistem pengontrolan kapan saat memasukkan substrat dan kapan memanen produk.



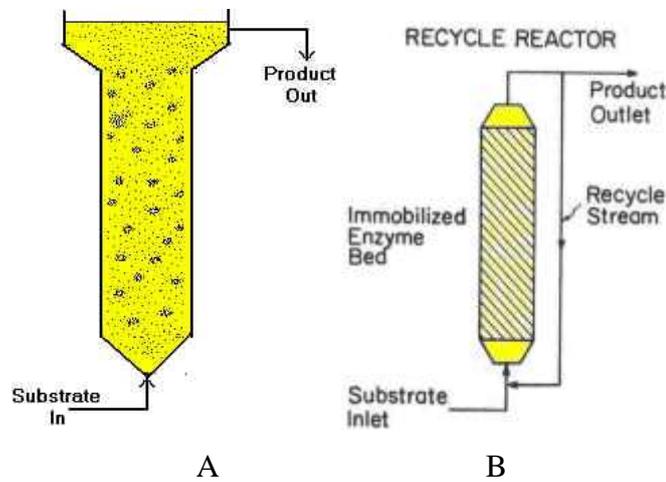
Gambar 66. A. Reaktor curah, B. Reaktor CSTR

*Fixed-bed-PFR* (Unggun Diam/Terkemas) merupakan reaktor yang paling sering digunakan. Reaktor ini memiliki keunggulan yaitu berkesinambungan, aliran substrat dapat berasal dari atas, bawah, atau daur-ulang (Gambar 67).



Gambar 67. *Packed-bed fixed reactor (PFR)*

*Fluidized-bed reactor* (Unggun Terfluidisasi) merupakan reaktor yang digunakan untuk substrat yang memiliki viskositas tinggi dan dalam reaksinya menghasilkan gas. Akan tetapi, laju fluidisasi perlu diatur supaya tidak merusak enzim imobil. *Recycle packed column reactor (RPCR)* merupakan bioreaktor yang dapat dioperasikan dengan laju alir tinggi. Reaktor ini dapat digunakan untuk substrat yang tidak dapat dilakukan hanya dengan sekali proses (Gambar 68).



Gambar 68. A. Reaktor PFR, B. Reaktor RPCR

## **BAB XVI**

### **Pemanfaatan Enzim untuk Diagnosa dan Analisis**

Enzim merupakan katalisator yang menjalankan reaksi tanpa langsung ikut serta dalam reaksi tersebut. Semua reaksi yang dikatalisis oleh enzim menjalankan fungsinya masing-masing. Setiap enzim bekerja dengan spesifik dan menghasilkan produk yang spesifik. Pada bidang kesehatan, diagnose dan analisis dapat dilakukan dengan dasar reaksi enzim dengan substrat. Enzim terdapat dalam sel, sehingga untuk mempelajari penyakit, beberapa enzim dapat digunakan sebagai dasarnya. Sebagai contoh, adanya penyimpangan dari kadar normalnya dalam tubuh. Jika enzim berada di dalam sel, maka keberadaan enzim dalam cairan tubuh menandakan bahwa telah terjadi sesuatu pada dinding sel, sehingga molekul enzim dapat menembusnya.

Di dalam darah, terdapat berbagai macam enzim dengan kadar yang rendah namun tidak diketahui fungsi fisiologisnya. Keberadaan enzim dalam darah menunjukkan adanya sintesis maupun destruksi sel secara terus menerus. Sehingga dapat diasumsikan jika kadar suatu enzim dalam darah meningkat, maka ada kerusakan sel yang mengandung enzim tersebut. Kadar enzim dalam serum yang menurun jarang memiliki makna diagnostik. Penurunan enzim dapat terjadi jika sel yang memproduksi enzim tersebut berkurang, ada hambatan dalam sintesis protein, maupun adanya eksresi dan degradasi enzim yang meningkat.

#### **Aminotransferase (Transaminase)**

Merupakan nama enzim yang mengkatalisis perpindahan reversible satu gugus amino dari asam amino ke asam alfa-keto. Kedua macam aminotransferase yang paling sering diukur adalah alanin aminotransferase (ALT) yang dulu disebut glutamate-piruvat transminase (GPT) dan aspartat aminotransferase (AST) yang dulu bernama glutamate-oxaloasetat transminase (GOT). Hati yang merupakan pusat sintesis protein dan penyaluran asam amino ke dalam jalur-jalur biokimia lain, adalah salah satu organ yang sangat banyak mengandung aminotransferase. Sel-sel hati memiliki konsentrasi ALT paling tinggi dibandingkan dengan sel-sel ginjal, jantung, dan otot lurik. Banyak AST di dalam

sel hati dan di dalam sel miokard. Hepatosit berisi 3-4 kali lebih banyak AST dari ALT, akan tetapi kadar ALT dalam serum menjadi petunjuk yang lebih sensitif kearah kerusakan hati.

### **Amilase**

Amilase adalah enzim cerna yang memecah pati (amilum) menjadi molekul-molekul karbohidrat yang lebih kecil. Enzim amylase dilepaskan keluar sel, disekresikan ke dalam air liur dan ke dalam saluran cerna bagian atas. Enzim ini mendepolimer zat-zat pati dalam makanan mejadi potongan-potongan sehingga dapat diserap. Banyak jenis sel mempunyai aktivitas amylase, tetapi yang bermakna dalam fisiologis dan diagnosis adalah kelenjar ludah dan pankreas. Amylase yang terdapat pada serum normal berasal dari kelenjar ludah dan dari pancreas. Jika terjadi peningkatan patologis karena enzim amylase, maka hamper selalu dating dari adanya kelainan pada pancreas.

Amylase dalam serum meningkat pada radang pancreas. Radang pancreas menyebabkan sel sekretori pecah dan enzim diserap dari usus dan dari cairan asites melalui saluran limfe dalam peritoneum yang melebar dan mudah ditembus. Pada pankreatitis akut, jumlah amylase dalam serum mulai meningkat dalam waktu 6-24 jam. Amylase mudah menembus filter glomerulus, sehingga beberapa jam setelah terjadi penigkatan dalam serum, urin juga menunjukkan kadar amylase yang tinggi. Jika tes diagnostik dilakukan setelah penyakit berlangsung beberapa hari, ada kemungkinan kadar amylase telah menyusut kepada kadar yang bersifat non-diagnostik. Namun, kadar amylase yang tinggi dalam urin dapat bertahan lebih lama, sehingga pemeriksaan urin lebih berguna dalam evaluasi klinis.

### **Kolinesterase**

Kolinesterase berbeda dengan enzim yang lain karena dasar untuk diagnosis adalah tidak berdasarkan meningkat atau menurunnya kadar enzim tersebut dalam serum. Dalam keadaan normal, serum berisi banyak enzim yang menghidrolisis asetilkolin dan memutus ester kolin. Enzim tersebut dinamakan pseudokolinesterase untuk membedakannya dengan asetilkolinesterase sejati. Asetilkolinesterase memiliki substrat asetilkolin yang spesifik dan bekerja dalam konsentrasi asetilkolin yang rendah. Asetilkolinesterase (AcCHS,

acetylcholinesterase) terutama ada pada ujung saraf dan di dalam eritrosit; dalam keadaan normal hanya ada sedikit sekali dalam serum. Pseudocholinesterase (CHS) dalam serum berasal dari hati. Kadar CHS dalam serum yang menurun terdapat pada banyak penderita penyakit hepatoseluler.

### **Kreatine Fosfokinase**

Kreatine fosfokinase (CPK, creatinephosphokinase) atau kreatinekinase mengkatalis reaksi pertukaran fosfat secara reversibel antara kreatine dan adenosinetrifosfat (ATP, adenosinetriphosphate). CPK memainkan peranan penting dalam menyimpan dan melepaskan energi dalam sel. Enzi ini ditemukan dalam otot lurik, otot jantung dan otak. Kadar CPK dalam serum meningkat seiring dengan adanya kerusakan otot. Kerusakan otak tidak terlalu berpengaruh pada kadar CPK serum karena enzim tersebut ditemukan dalam jumlah yang kecil pada barrier darah-otak. Kerusakan otot lurik dan otot jantung disebabkan karena olahraga yang berat, injeksi intramuscular, delirium tremens, maupun pada tindakan bedah sayat otot meningkatkan 2-5 kali kadar CPK dalam serum. Kadar CPK yang tinggi ditemukan pada tahap distrofi otot (*progressive muscular dystrophy*). Infark miokard akut melepaskan CPK ke dalam serum setelah 48 jam setelah kejadian. Nilai CPK yang meningkat dapat digunakan untuk membedakan infark miokard dari gagal jantung kongesti. Selain itu, hipotiroidisme menyebabkan kadar CPK dalam serum menjadi tinggi.

### **Gama Glutamil Transpeptidase**

Gama glutamil transpeptidase (GGT, *gamma glutamyl traspeptidase*) mengkatalisis pemindahan gugusan glutamil antara peptide atau asam amino. Sel epitel tubuli ginjal mengandung banyak GGT, sedangkan hati dan pancreas memiliki kadar GGT sedang. Enzi ini berasal dari hati bersama saluran empedu. Peningkatan kadar GGT berkaitan dengan penyakit hepatobilier. berisi agak banyak enzim itu. Enzim yang ada dalam terutama berasal dari hati bersama saluran empedu, jadi peningkatan kadar mengarah ke penyakit hepatobilier. GGT meningkat bersama dengan fosfatase alkalis yang bermakna adanya penyakit karsinoma hepatoseluler dan degenerasi hepatoseluler. sama maknanya dengan fosfatase alkalis yang meningkat, sedangkan polanya juga sama. Kadar GGT

dalam sel hati akan bertambah jika seseorang mengonsumsi alkohol enam kali sehari atau lebih. Kadar GGT ini dapat digunakan untuk mengukur apakah seseorang kecanduan alkohol ringan atau berat.

### **Laktat Dehidrogenase**

Banyak jaringan mengandung laktat dehidrogenase (LDH) yang mengkatalisis perubahan reversible laktat ke piruvat. Kadar LDH meningkat karena adanya anemia megaloblastik, hemolisis, distrofia otot atau mononukleus infeksius. Dalam keadaan normal LDH5 merupakan hanya bagian amat kecil dari LDH total dalam isoenzim itu mungkin meningkat tinggi tanpa ada peningkatan LDH total sampai melampaui batas normal. Infark paru khususnya meninggalkan LDH4 dan LDH5 (kadang-kadang LDH3), sedangkan infark miokard dengan LDH1 dan LDH2.

### **Lipase**

Lipase berperan dalam memecah trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Pankreas merupakan sumber utama lipase yang disekresikan ke dalam lumen saluran pencernaan. Kadar lipase dalam serum berkaitan lebih spesifik dengan pankreas dari kadar amylase. Tetapi tes untuk menetapkan kadar lipase bersifat dan lebih sulit dari pengukuran amylase. Kadar lipase dalam serum meningkat pada radang pankreas dan peningkatan itu tinggal lebih lama dibandingkan dengan kadar amylase. Selain itu, lipase tidak dikeluarkan ke dalam urin. Kadar lipase dalam serum yang tertinggi terjadi pada pankreatitis akut, tetapi karsinoma pankreas menyebabkan peningkatan lipase serum secara terus menerus.

### **Lipoprotein Lipase**

Lipase yang melepaskan asam lemak dari lipoprotein dan membersihkan darah dari kilomikron, jauh berbeda dari lipase yang ada dalam saluran cerna. Darah puasa berisi sedikit kilomikron dan mempunyai aktifitas lipoprotein lipase rendah. Setelah bersantap, darah orang normal dibersihkan dari kilomikron oleh lipase yang terikat pada membrane sel hati (lipoprotein lipase hepatik) dan oleh enzim-enzim yang diperkirakan terikat pada membran endotel kapiler (lipoprotein lipase ekstrahepatik). Pemberian heparin melepaskan lipase yang terikat pada membran dan kadarnya dalam plasma dapat diukur sebagai aktifitas

lipolitik pasca heparin (PHLA, *postheparin lipolytic activity*). Orang dengan hiperlipoproteinemia tipe 1 mempunyai kadar kilomikron puasa yang amat tinggi dan PHLA yang tegas lebih dari normal. Kilomikron juga meningkat pada hiperlipoproteinemia tipe 5, tetapi orang-orang itu mempunyai PHLA normal.

### **Fosfatase**

Dalam serum terdapat enzim yang melepaskan fosfat dari senyawa-senyawa yang berisi satu gugus fosfat; enzim-enzim itu secara kolektif diberi nama ortofosfat ester monohidrolase, tetapi masing-masing enzim mempunyai substrat dan pH optimal. Semua enzim fosfatase yang aktif secara optimal pada pH 5 dikenal sebagai fosfatase asam (ACP, *acid Phosphatase*) dan yang aktif pada pH 9 dikenal sebagai fosfatase alkali (ALP, *alkaline phosphatase*).

Banyak jaringan yang mengandung ACP, tetapi yang paling banyak mengandung ACP adalah kelenjar prostat, eritrosit, dan trombosit. ACP dalam serum diukur terutama untuk menemukan adanya atau luasan menyebarnya karsinoma prostat. ACP dari prostat meningkat pada 50-75% dari pasien karsinoma prostat yang telah menyebarkan metastasisnya ke tulang. Jika kanker tersebut masih berada dalam kelenjar, peningkatan ACP hanya ditemukan pada 10-25% dari pasien. ACP kembali menjadi normal 3-44 hari setelah berhasilnya terapi estrogen. ALP dihasilkan oleh berbagai macam organ. Hati, tulang, dan usus merupakan penghasil ALP. Kadar ALP bermanfaat pada diagnosis penyakit hati dan tulang. Kegiatan osteoblastik dan osteoklastik meningkatkan kadar ALP dalam serum, kadar itu bertambah pada waktu terjadi pertumbuhan tulang maupun perombakan tulang.

## **BAB XVII**

### **Biosensor**

Secara umum, sensor dibedakan menjadi dua jenis yaitu sensor fisika dan sensor kimia. Sensor fisika digunakan untuk mendeteksi kondisi besaran fisika seperti tekanan, gaya, tinggi permukaan air laut, kecepatan angin, dan sebagainya. Sedangkan sensor kimia merupakan alat yang mampu mendeteksi fenomena kimia seperti komposisi gas, kadar keasaman, susunan zat suatu bahan makanan, dan sebagainya. Dalam hal ini, biosensor termasuk ke dalam sensor kimia. Biosensor adalah sensor yang menggabungkan komponen hayati dengan komponen elektronik (transduser). Komponen elektronik ini mengubah sinyal dari komponen hayati menjadi luaran yang dapat diukur. Biosensor juga dapat diartikan sebagai sebuah alat analisis yang mengkombinasikan komponen biologis dengan detektor fisikokimia (Turner et al. 1987).

Biosensor diaplikasikan sebagai perangkat atau instrumen analitik yang menggunakan biomolekul seperti mikroba, jaringan, sel, protein, enzim, antibodi, dan DNA untuk melakukan pengenalan, deteksi, rekognisi pada suatu zat kimia tertentu yang menggabungkan komponen biologis dengan komponen detektor fisikokimia. Fungsi biosensor yaitu untuk mendeteksi atau memonitor kondisi berbagai hal, antara lain untuk mengukur tingkat keasaman (pH), kontrol polusi dan mendeteksi atau mengukur kadar mikroba atau zat kimia berbahaya tertentu, toksik di udara, air, dan tanah misalnya pestisida, untuk mendeteksi kebocoran, menentukan lokasi deposit minyak, mengontrol kualitas makanan (mendeteksi kontaminasi mikroba, menentukan kesegaran, analisis lemak, protein dan karbohidrat dalam makanan), mendeteksi dan mengukur kadar glukosa, kolesterol, tekanan darah, flu, infeksi, alergi dan lain-lain, sebagai perangkat diagnosis obat, metabolit, enzim, vitamin dan studi efisiensi obat (Tabel 21).

Komponen dasar biosensor adalah:

1. Bioreseptor, merupakan komponen biologis yang peka, yang dibuat dengan teknis biologis. Misalnya jaringan, mikroba, organel, sel, protein, enzim, antibodi, asam nukleat dan lain-lain.

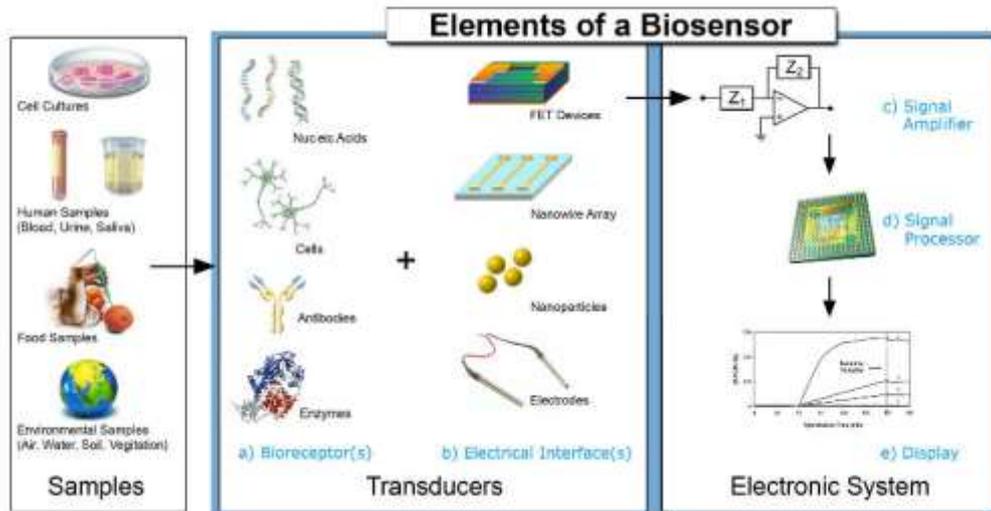
2. Transduser, merupakan komponen atau elemen pendeteksi atau detektor, yang bekerja secara fisikokimia, piezoelektronik, optik, elektrokimia, dan lain-lain yang mengubah sinyal yang dihasilkan dari interaksi antara analit dengan bioreseptor menjadi sinyal lain (yaitu, transduser) yang dapat lebih mudah diukur dan dihitung.
3. Elemen elektronik prosesor sinyal yang terutama bertanggung jawab untuk menampilkan hasil yg mudah dibaca dan dipahami. Elemen ini merupakan alat pembaca biosensor yang terkait dengan elektronika atau pemroses sinyal untuk ditampilkan (Cavalcanti et al. 2008).

Tabel 21. Aplikasi dan kegunaan biosensor

Bidang aplikasi	Kegunaan biosensor
Medis dan farmasi	Mengontrol penyakit: diabetes, kolesterol, jantung, dll
	Diagnosis obat, metabolit, enzim, dan vitamin
	Penyakit infeksi, alergi
	Studi efisiensi obat
Lingkungan hidup	Kontrol polusi dan monitoring senyawa toksik di udara, air, dan tanah
	Penentuan BOD
Kimia	Mengontrol kualitas makanan (mendeteksi kontaminasi mikroba, menentukan kesegaran, analisis lemak, protein, dan karbohidrat makanan)
	Mendeteksi kebocoran, menentukan lokasi deposit minyak
	Mengecek kualitas udara
	Parameter kualitas susu
Pertanian	Mengontrol kualitas tanah
	Menentukan degradasi seperti kayu dan makanan
	Mendeteksi keberadaan dan konsentrasi pestisida
Militer	Mendeteksi zat kimia dan biologi yang digunakan sebagai senjata perang (virus, bakteri pathogen dan gas pelemah syaraf)

Prinsip kerja biosensor adalah biokatalis (bioreseptor) yaitu senyawa aktif biologi akan berinteraksi dengan substansi atau zat kimia yang akan dideteksi (sampel analit atau molekul target). Hasil interaksi yang berupa besaran fisik seperti panas, arus listrik, potensial listrik atau lainnya akan dimonitor oleh transduser. Besaran tersebut kemudian diproses sebagai sinyal sehingga diperoleh

hasil yang dapat dipahami pada suatu layar monitor, *recorder*, atau komputer (Gambar 69).



Gambar 69. Elemen dari biosensor

Biosensor yang pertama kali dibuat adalah sensor yang menggunakan transduser elektrokimia yaitu elektroda enzim untuk menentukan kadar glukosa dengan metode amperometri. Sejauh ini, biosensor dalam perkembangannya mempunyai tiga generasi yaitu generasi pertama; dimana biosensor berbasis oksigen, generasi kedua; biosensor menjadi lebih spesifik yang melibatkan “mediator” diantara reaksi dan transduser, dan terakhir generasi ketiga; dimana biosensor berbasis *enzyme coupling*. Biosensor eksternal/internal dalam bentuk chip telah diproduksi oleh perusahaan Amerika i-Stat, MicroChips, Digital Angel, VeriChip yang dapat ditanam dalam tubuh manusia. Matsushita Electric Industrial Co. dengan teknologi biosensornya yang mampu menetapkan secara cepat dan mudah pengukuran kolesterol darah. Tokyo Medical and Dental University dengan biosensor nafasnya yang memanfaatkan enzim monoamine oksidase A (MAO A) dan lain sebagainya. Tetapi secara umum untuk pengguna biosensor, hampir 60% pengunanya berasal dari industri *health-care*.

Contoh yang paling umum dari biosensor adalah alat pengukur gula darah, yang menggunakan enzim glukosa oksidase untuk memecah gula darah. Biosensor ini bekerja dengan mengoksidasi glukosa terlebih dahulu dengan

menggunakan dua elektron untuk mereduksi FAD (komponen dari enzim) menjadi FADH<sub>2</sub>. Lalu FADH<sub>2</sub> dioksidasi oleh elektroda dan menerima dua elektron dari elektroda dalam beberapa tahap. Hasilnya adalah arus listrik yang mengukur konsentrasi glukosa. Dalam kasus ini, elektroda adalah transduser dan enzim adalah elemen biologis yang sensitif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. 2002. *Molecular Biology of The Cell*. 5<sup>th</sup> edition. Garland Science. New York.
- Akhdiya A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah* 9(2): 38-44
- Asano M, Suzuki S, Kawai M, Miwa T, & Shibai H. 1999. Characterization of novel cysteine protease from germinating cotyledons of soybean *Glycine max* L. *J Biochem*. 126: 296-301
- Bairoch A. 2000. The enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res*. 28 (1): 304-305
- Barett AJ. 1995. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol*. 248: 183-184.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:326-338.
- Beerens K. 2012. Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 39: 823-834.
- Biellmann JF, Lapinte C, Haid E, Weimann G. 1979. Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme. *Biochemistry* 18 (7): 1212-1217.
- Biely P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol* 3:286-290.
- Blanch WH & Clark DS. 1996. *Biochemica Engineering*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Boguslawski G, Shultz JL, Yehle CO. 1983. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Anal Biochem*. 132: 41-49
- Boyer R. 2000. Lipids, biological membranes and cellular transport. In *Concepts in Biochemistry*. 3rd ed. John Wiley and Sons. New York.

- Buchert J, Selinheimo E, Kruus K, Mattinen ML, Lantto R, & Autio K. 2007. *Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food in Novel Enzyme Technology for Food Applications* (edited by R. Rastall). Woodhead Publishing Ltd. Cambridge.
- Buchholz K, Kasche V & Bornscheuer UT. 2005. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bugg TDH. 2004. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* (2<sup>nd</sup> ed). Blackwell Science. Oxford.
- Brik A & Wong CH. 2003. HIV-I protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem* 1: 5-14
- Bruins ME, Janssen AE, Boom RM. 2001. Thermoenzymes and Their Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 90: 156-184.
- Cabral H, Ruiz MT, Carareto CMA & Bonilla R. 2000. A plant proteinase, extracted from *Bromelia fastuosa* as an alternative to proteinase K for DNA extraction. *Dros Inf Serv*. 83: 178-185
- Cao L. 2005. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*. Wiley-VCH GmbH&Co. Weiheim.
- Campbel NA, Reece JB & Mitchell LG. 2002. *Biologi*. Edisi Kelima. Erlangga. Jakarta.
- Cavalcanti MTH, Teixeira MFS, Lima Filho JL, Porto ALF. 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bior Tech*. 93: 29-35.
- Chaplin M & Bucke C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Chin L, Ali ZM, Lazan H. 1999. Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. *J Exp Botany* 50:767-775.
- Chirumamilla RR, Muralidhar R, Marchant R, Nigam P. 2001. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol Cell Biochem*. 244:159-168.
- Clarke DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H. 1959. The incorporation of amines into proteins. *Arch Biochem Biophys* 79: 338-354.

- Cohen R; Orlova Y, Kovalev M, Ungar Y, Shimoni E. 2008. Structural and Functional Properties of Amylose Complexes with Genistein. *J Agric Food Chem* 56 (11): 4212-4218.
- Conyers GB, Wu G, Bessman MJ, Mildvan AS. 2000. Metal requirement of a diadenosine pyrophosphatase from *Bartonella bacilliformis*. Magnetic resonance and kinetic studies of the role of Mn. *Biochemistry* 39: 2347-2354
- de Bolster MWG. 1997. *Glossary of terms used in bioinorganic chemistry: cofactor*. International Union of Pure and Applied Chemistry. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bioinorg/>. (Diakses 30 Oktober 2007)
- Dekker RFH. 1983. Bioconversion of hemicellulose: Aspect of hemicellulose production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25:1127-1146.
- Devaraj KB. 2009. Biochemical and Biophysical Properties of Ficin: Structure, Function and Stability. *Ph.D thesis*: Department of Protein Chemistry and Technology. Central Food Technological Research Institute.
- DiPietro A & Roncero MI. 1996. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett* 145:295-299.
- Dunn BM. 1992. *Structure and function of the aspartic proteinases*. Plenum Press: New York
- Egito AS, Girardet JM, Laguna LE, Poirson C, Molle D, Humbert G, Micol L, Gaillard JL. 2007. Milk clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine *k* – casein. *Int Dairy J.* 17 (7): 816- 825
- Endo T, Zheng M & Zimmermann W. 2002. Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins. *Aust J Chem.* 55: 39-48.
- Fibriana F & Upaichit A. 2015. Proteases from Latex of *Euphorbia spp.* and Its Application on Milk Clot Formation. *Biosaintifika* 7(2): 92-99

- Fischer E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Dt Chem Ges.* 27: 2985-2993.
- Fisher Z, Hernandez Prada JA, Tu C, Duda D, Yoshioka C, An H, Govindasamy L, Silverman DN, McKenna, R. 2005. Structural and kinetic characterization of active-site histidine as a proton shuttle in catalysis by human carbonic anhydrase II. *Biochemistry.* 44 (4): 1097-1115.
- Fitzpatrick PF. 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem.* 68: 355-81.
- Frost GM & Moss DA. 1987. Production of enzymes by fermentation in Biotechnology Volume 7a. Enzyme Technology (edited by J.F. Kennedy). VCH-Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Gaur S & Wadhwa N. 2008. Alkaline protease from senesced leaves of invasive weed *Lantana camara*. *Afr J Biotechnol.* 7(24): 4602-4608
- Genelhu MS, Zanini MS, Voloso IF, Carneiro AMD, Lopes MTP & Salas CE. 1998. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. *Brazil J Med Biol Res.* 31: 1129-1132
- Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP & Davidson S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci Progress.* 79: 119-157.
- Gibson LJ. 2013. [The hierarchical structure and mechanics of plant materials.](#) *J R Soc Interface* 9 (76): 2749-2766.
- Godfrey T & West S. *Industrial Enzymology.* 2<sup>nd</sup> ed. Macmillan Publisher, Inc. New York
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. 2002. [Transglutaminases: nature's biological glues.](#) *Biochem J* 368 (Pt 2): 377-396
- Gripon JC, Desnazeud MJ, Le Bars D, Bergere JL. 1977. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. *J Dairy Sci* 60: 1532-1538
- Guiama VD, Libouga DG, Ngah E, Beka RG, Ndi KC, Maloga B, Bindzi JM, Donn P, Mbofung CM. 2009. Milk-clotting potential of fruit extracts

- from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *Afr J Biotechnol.* 9: 1797-1802
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol.* 64: 763-781.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. 2002. Lipids: definition, isolation, separation and detection. In: *Lipid biochemistry*. 5<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing Company. Oxford.
- Haki GD & Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 89: 17-34.
- Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, Swallow DM. 1993. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. *Ann Hum Genet* 57 (Pt 3): 179-85.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 39: 235-251.
- Hill AR. 2012. Cheese making. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/cheese/welcom.htm>. (Diakses 10 Juni 2016)
- Hubert Schiweck H, Margaret Clarke M. 2007. Günter Pollach "Sugar" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. Weinheim.
- Jacobs M, Eliasson M, Uhlen M, Flock JI. 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucl Acids Res.* 13: 8913-8926
- Jaeger KE & Eggert T. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Op Biotechnol.* 15 (4): 305-13.
- Jaeger KE & Reetz MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech.* 16: 396-403.
- Järvelä I, Torniaainen S, Kolho KL. 2009. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Annals Med* 41 (8): 568-75.
- Johannes TW & Zhao H. 2006. Directed evolution of enzymes and biosynthesis pathways. *Curr Op Microbiol.* 9:261-267.

- Jokela J, Pastinen O, Leisola M. 2002. Isomerization of pentose and hexose sugars by an enzyme reactor packed with cross-linked xylose isomerase crystals. *Enzyme Microb Tech* 31: 67-76.
- Jon B. 2005. [Noodles, reinvented](http://www.msnbc.msn.com/). <http://www.msnbc.msn.com/> (Retrieved 2008-04-02)
- Ko WH, Wang IT, Ann PJ. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soil. *Soil Biol Biochem.* 37: 597-599.
- Koolman J & Rohn KH. 2001. *Color atlas of biochemistry*. Atlas berwarna dan teks biokimia. Terjemahan Septelia Inawati Wanandi. Editor Moh Sadikin. 1995. Penerbit Hipokrates. Jakarta.
- Koshland DE. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 44 (2): 98-104.
- Kurniawan, Lestari S, Hanggita SRJ. 2012. Hidrolisis protein tinta cumi-cumi (*Loligo sp*) dengan enzim papain. *Fishtech* 1(1): 41-54
- Lang C & Dörenberg H. 2000. Perspective in the biological function and the technological applications of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:366-375.
- Leary D, Marjo V, Gwenae H, Salvatore A, Catherine M. 2009. Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. *Mar Policy.* 33: 183-194
- Lebo SEJ, Gargulak JD, McNally TJ. 2001. *Lignin*. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Lehninger AI. 1994. Dasar-dasar biokimia. Jilid 2. Alih bahasa: Maggy Thenawidjaja. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Lesort M, Chun W, Tucholski J, Johnson GV. 2002. Does tissue transglutaminase play a role in Huntington's disease?. *Neurochem Int.* 40 (1): 37-52.
- Lestari RD & R. Susanti. 2015. Effectivity of Pedada fruit (*Sonneratia caseolaris*) extract to the level of SGOT and SGPT in rat treated by paracetamol induction. *Biosaintifika* 7(1): 29-36
- Lidya B & Djenar NS. 2000. *Dasar Bioproses*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. DEPDIKNAS. Jakarta.

- Lindberg RA, Eirich LD, Price JS, Wolfenbarger L.Jr, Drucker H. 1981. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. *J Biol Biochem*. 256: 811-814
- Mahajan RT & Badgular SB. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *J Pharm Res*. 3 (9): 2048-2068
- Martone Pt, Estevez Jm, Lu F, Ruel K, Denny Mw, Somerville C, Ralph J. 2009. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Curr Biol* 19 (2): 169-75.
- Marshall RO, Kooi ER.1957. Enzymic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science* 125: 648-649.
- Matthews CK, van Holde KE, Ahern KG. 2000. *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Benjamin Cummings Publishing Company. California.
- Mitsubishi S & Lampen J. 1953. Conversion of D-xylose to D-xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. *J Biol Chem* 204: 1011-1018.
- Mizuno K & Matsuo H. 1984. A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues. *Nature*. 309: 558-560
- Motoki M & Kumazawa Y. 2000. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Sci Tech Res*. 6:151-160.
- Mukherjee KD. 1994. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog Lipid Res*. 33: 165-174.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 1996. *Harpers biochemistry*. Biokimia Harper. Terjemahan Andry Hartono. Editor Alexander H Santoso. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Myrbäck K. 1960. Invertases. In Boyer PD, Lardy H & Myrbäck, K. *The Enzymes* 4 (2<sup>nd</sup> ed.). Academic Press. New York
- Moro LP, Murakami MT, Cabral H, Vidotto A, Tajara EH, Arni RK, Juliano L & Bonilla-Rodriguez GO. 2008. Purification, biochemical and functional characterization of new thiol-dependent serine protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. *Prot Pept Lett*. 15: 724-730.
- Nadeem MT, Butt MS, Anjum FM & Asgher M. 2009. Improving Bread Quality by Carboxymethyl Cellulase Application. *Int Journal Agric Biol*. 11: 727-730

- Nagodawithana T & Reed G. 1993. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. London.
- Naveena BM & Mendiratta SK. 2004. The tenderization of buffalo meat using ginger extract. *J Musc Foods* 15: 235-244
- Neumann NP & Lampen JO. 1967. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry* 6 (2): 468-475.
- [Nishiyama Y](#), [Langan P](#), [Chanzy H](#).2002. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I $\beta$  from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J Am Chem Soc* 124 (31): 9074-82.
- Okada Y, Nagase H, Harris ED. 1986. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 261: 14245-14255
- Okoko FJ & Ogbomo O. 2010. Amylolytic Properties of Fungi Associated with Spoilage in Bread. *Continental J Microbiol*.4: 1-7.
- Ompusunggu HES, Juwita, Silaban R. 2013. *Kajian Biomedik Enzim Amilase dan Pemanfaatannya Dalam Industri*. Unimed. Medan
- Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. 2006. *Enzyme Technology*. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi.
- Pangesti NWI, Pangastuti A, Retnaningtyas E. 2012. Pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh fungi *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi. *Bioteknologi* 9 (2):41-48
- Prodromidis MI & Karayannis MI. 2002. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis* 14:241-261.
- Phadatare SU, Srinivasan MC, Deshpande VV. 1993. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microbiol Technol*. 15: 72-76.
- Phadatare SU, Rao M, Deshpande VA. 1997. Serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg. *Arch Microbiol*.166: 414-417.

- Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. 1968. Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine. *Science* 160(3830): 892-893.
- Poliana J & MacCabe AP. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer. New York.
- Prayitno AD, Rachmawaty R, Handayani H, Selvy F, Sari RP. 2011. *Penggunaan Enzim Dalam Industri Pangan*. Makalah Teknologi Enzim. Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Primrose. 1987. *Modern Biotechnology*. Blackwell Scientific Publications. London.
- Purwadariat T, Marbun PA, Sinurat AP, Ketaren PP. 2003. Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi dari Rayap. *JITV* 8(4): 213-219
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (3): 597-635
- Ratlege C & Kristiansen B. 2001. *Basic Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company. New York.
- Reddy NS, Nimmagadda A, Rao KR. 2003. An overview of thermicrobial alpha amylase family. *Afr J Biotechnol.* 2:645-648
- Rickhal H. 2012. *Keterlibatan Enzim Dalam Bahan Pangan Skala Industri Makanan Dan Minuman*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Haluoleo Kendari.
- Roseiro LB, Barbosa M, Mames J, Wilbey A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of Cynara L. for the Production of Bovine milk cheese. *Int J Dairy Technol Rev.* 56: 76-8
- Sarah, Putra SR, Putro HS. 2009. Isolasi *a-amilase termostabil dari bakteri termofilik*. Prosiding Kimia FMIPA. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. 2002. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med.* 195 (6): 747-757.

- Sari MI. 2007. *Struktur protein*. FK USU
- Scheller HV & Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*. 61:263-829.
- Shallom D & Shoham Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr Op Microbiol* 6:219-228.
- Shannon JD, Baramova EN, Bjarnason JB, Fox JW. 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem*. 264: 11575-11583.
- Sharma R, Yusuf C & Banerjee UC. 2001. Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnol Adv*. 19: 627-662.
- Sielecki AR, Fujinaga M, Read RJ, James MNG. 1991. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. *J Mol Biol*. 219: 671-692.
- Silva SV & Malcata FX. 2005. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Le Lait*. 78: 513-519.
- Skovbjerg H, Sjöström H, Norén O. 1981. Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur J Biochem*. 114 (3): 653-61.
- Smith GM. 1995. *The Nature of Enzymes in Biotechnology* Vol. 9 (2<sup>nd</sup> ed.) (edited by H.J. Rehm and G. Reed). Verlag Chemie VCH. Weinheim.
- Smith JE. 1981. *Biotechnology*. Edward Arnold Publisher. London.
- Soedigdo. 1988. Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan momoasilgliserol. *Thesis*. Universitas Diponegoro.
- Sousa MJ & Malcata FX. 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*. 82: 151-170.
- Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*. 370: 389-391
- Storer AC & Menard R. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*. 244: 486-500

- Strayer L. 1995. *Biochemistry*. Fourth edition. WH Freeman & Company. New York
- Suhara. 2008. [\*Dasar-dasar Biokimia\*](#) . Prisma Press. Bandung
- Sullivan GA & Calkins CR. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Sci.* 85(4): 730-734
- Sulzenbacher G, Shareck F, Morosoli R, Dupont C, Davies GJ. 1997. The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic core, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution. *Biochemistry* 36 (51): 16032-16039
- Susanti R. 2004. Peranan air buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) menurunkan kadar enzim AST dan ALT serum mencit (*Mus musculus*) yang di-*treatment* CCl<sub>4</sub>. *Media Medika Indonesiana* 39 (1): 83-88
- Susanti R. 2014. Pengantar Kimia Organik. FMIPA Unnes. Semarang
- Szetzli J. 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* 76(10): 1825-1845.
- Tanabe S, Arai S, Watanabe M. 1996. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosci Biochem Biotechnol.* 60(8): 1269-1272.
- Tischer W & Wedekind F. 1999. Immobilized enzymes: method and applications. *Top Curr Chem.* 200:95-126.
- Turner NJ. 2003. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 11:474-478.
- Uhlig H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, Inc. New York,
- Ullah MA, Key-Sun K, Yeon GY. 2006. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochem.* 67: 870-875
- Van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. 2000. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta.* 1543: 336-360.

- Verma N, Thakur S, Bhatt AK. 2012. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int Res J Biol Sci.* 8: 88-92
- Wagner AL. 1975. *Vitamins and Coenzymes*. Krieger Pub Co. Florida.
- Vermes I, Steur EN, Jirikowski GF, Haanen C. 2004. Elevated concentration of cerebrospinal fluid tissue transglutaminase in Parkinson's disease indicating apoptosis. *Mov Disord.* 19(10): 1252-1254.
- Vincent-Sealy LV, Thomas JD, Commander P, Salmond GP. 1999. *Erwinia carotovora* DsbA mutants: evidence for a periplasmic-stress signal transduction system affecting transcription of genes encoding secreted proteins. *Microbiology* 145:1945–58.
- Wahyuni S, Susanti R, Iswari RS. 2015. Isolasi dan karakterisasi enzim fisin dari getah batang awar-awar (*Ficus septica* Burm F). *in press*.
- Wardrop. 1969. *Eryngium* sp. *Aust J Botany* 17: 229–240.
- Weaver LH, Kester WR, Matthews BW. 1977. A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of structures. *J Mol Biol.* 114: 119-132.
- Weaver RF. 2005. *Molecular Biology*. 3<sup>th</sup>. Ed. McGraw-Hill International Edition. Singapore
- Werner R. 1992. *Essential biochemistry and molecular Biology. A comprehensive review*. 2<sup>nd</sup>Ed. Prentice-Hall International Inc. London
- Wilbraham CA & Matta MS. 1992. *Introduction to organic and biological chemistry*. Pengantar Kimia Organik dan hayati. Terjemahan Suminar Achmadi. Penyunting Sofia Niksolihin. Penerbit ITB Bandung.
- Winarsi H, Wijayanti SPM, Purwanto A. 2012. Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Glutation Peroksidase Wanita Penderita Sindrom Metabolik. *MKB* 44(1) : 7-12
- Wirahadikusuma M. 1989. *Biokimia: protein, enzim dan asam nukleat*. Penerbit ITB. Bandung

- Wiseman A. 1995. *Introduction to Principles*. Editor: Wiseman, A. Handbook of enzyme biotechnology. Ellis Horwood, Ltd. T.J. Press, Padstow, Cornwall.
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. 1988. Multiplicity of 1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev* 52:305–317.
- Worthington Biochemical Corporation. 2014. [Cellulase](http://www.Worthington-biochemical.com/cel/default.html). <http://www.Worthington-biochemical.com/cel/default.html>. (Accessed on 2014-07-03)
- Yadav SC, Pande M, Jagannadham MV. 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochem.* 67 (14): 1414-1426
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(4): 447–54.
- Yoshida-Yamamoto S, Nishimura S, Okuno T, Rakuman M, Takii Y. 2010. Efficient DNA Extraction from Nail Clippings Using the Protease Solution from *Cucumis melo*. *Mol Biotechnol.* 20: 1073-6085.
- Yuniastuti A & Susanti R. 2013. Analisis sekuen gen glutation peroksidase (GPX1) sebagai deteksi stres oksidatif akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Saintekno* 11(2): 103-112
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/index.html>
- [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme\\_Catalytic\\_Mechanism/Nucleoside\\_Monophosphate\\_Kinase](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme_Catalytic_Mechanism/Nucleoside_Monophosphate_Kinase)
- [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme/Catalysis\\_By\\_Approximation](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Catalysis_By_Approximation)
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbohydrase>
- <http://www.gmo-compass.org/eng/glossary/>
- <http://www.passmyexams.co.uk/GCSE/biology/enzymes-and-digestion.html>
- Serum triglycerides determination kit, Technical bulletin, Sigma  
(<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/tr0100bul.Par.0001.File.tmp/tr0100bul.pdf>)
- Total serum cholesterol, Genzyme Duagnostics

(<http://www.sekisuidiagnostics.com/resources/PI/Total%20Serum%20Cholesterol.pdf>)

Serum triglycerides determination kit, Technical bulletin, Sigma

(<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/tr0100bul.Par.0001.File.tmp/tr0100bul.pdf>)

Glucose determination, Chronolab. ([http://www.chronolab.com/point-of-care/index.php?option=com\\_content&view=article&id=291&Itemid=45](http://www.chronolab.com/point-of-care/index.php?option=com_content&view=article&id=291&Itemid=45))

## GLOSARIUM

Anaerob	:	Suatu sifat yang dimiliki mikroorganisme tertentu, yaitu dapat hidup tanpa oksigen bebas
Antikodon	:	Urutan tiga basa yang berpasangan secara komplementer dengan kodon. Antikodon terdapat pada molekul tRNA, kodon terdapat pada mRNA
Antiparalel	:	Dua rantai heliks ganda pada molekul DNA yang arahnya berlawanan
Berat molekul	:	Berat suatu senyawa berdasarkan molekul-molekul penyusunnya
Bioteknologi	:	Cabang ilmu yang mempelajari pemanfaatan makhluk hidup (bakteri, fungi, virus, dan lain-lain) maupun produk dari makhluk hidup (enzim, alkohol) dalam proses produksi untuk menghasilkan barang dan jasa
Diagnosis	:	Penentuan jenis penyakit dengan cara meneliti (memeriksa) gejala-gejalanya, menggunakan cara dan alat seperti laboratorium, foto, dan klinik.
Ekspresi gen	:	Rangkaian proses penerjemahan informasi genetik (dalam bentuk urutan basa pada DNA) menjadi protein. Protein ini merupakan sifat fenotip. Informasi yang dibawa bahan genetik (DNA) tidak bermakna apa pun bagi suatu organisme apabila tidak diekspresikan menjadi fenotipe.
Fermentasi	:	Proses produksi energi dalam sel pada keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Lebih spesifik dikatakan, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, tanpa akseptor elektron eksternal
Fosfodiester	:	Ikatan diester pada polinukleotida

Gen regulator	:	Gen yang terlibat pada kontrol ekspresi satu atau lebih gen.
Gen struktural	:	Suatu gen yang mengkode RNA atau protein (protein structural, enzim, protein regulator)
Glikolisis	:	Berasal dari kata glukosa dan lisis (pemecahan). Glikolisis adalah serangkaian reaksi biokimia untuk oksidasi glukosa menjadi molekul asam piruvat
Gugus fungsi	:	Kelompok gugus khusus pada atom dalam molekul, yang berperan memberikan karakteristik reaksi kimia pada molekul tersebut. Senyawa yang bergugus fungsional sama, memiliki reaksi kimia yang sama atau mirip
Gugus hidroksil	:	Gugus fungsional-OH yang digunakan sebagai substituen di sebuah senyawa organik. Molekul yang mengandung gugus hidroksil dikenal dengan sebutan alkohol
Gugus karboksil	:	Gugus yang tersusun dari 2 gugus sekaligus yaitu gugus karbonil dan gugus hidroksil. Kata karboksil sendiri berasal dari karbonil dan hidroksil Gugus karboksil (-COOH), terdapat pada asam karboksilat
Gugus karbonil	:	Gugus fungsi dimana, atom karbon dihubungkan dengan ikatan ganda dua pada atom oksigen (--CO--). Gugus fungsi karbonil terdapat pada senyawa aldehida, keton, ester dan amida
Hidrofil	:	Suka air. Biasanya bersifat polar dan berion. Mudah berinteraksi dengan air
Hidrofob	:	Tidak suka air. Biasanya bersifat nonpolar.
Ikatan glikosida	:	Ikatan penghubung antar unit gula pada rantai disakarida atau polisakarida
Ikatan hidrogen	:	Ikatan yang terjadi karena adanya gaya tarik

		antarmolekul yang terjadi antara dua muatan listrik parsial dengan polaritas yang berlawanan. Ikatan hidrogen terjadi ketika sebuah molekul memiliki atom N, O, atau F yang mempunyai pasangan elektron bebas.
Ikatan ion	:	Ikatan yang terbentuk karena adanya gaya tarik-menarik elektrostatis antara ion positif dengan ion negatif. Ikatan biasanya terjadi antara atom yang cenderung melepas elektron dengan atom yang cenderung menerima elektron.
Ikatan kovalen	:	Ikatan yang terbentuk karena penggunaan pasangan elektron bersama.
Ikatan peptida	:	Ikatan yang menghubungkan antar unit asam amino pada suatu rantai peptida atau protein
Ikatan van der walls	:	Interaksi antar molekul senyawa nonpolar dan senyawa polar yang tidak memiliki ikatan hidrogen, interaksi tersebut menghasilkan suatu gaya antar molekul yang lemah.
Imunohistokimia	:	kombinasi metode dari anatomi, imunologi dan biokimia untuk mengidentifikasi komponen jaringan dengan ciri tertentu menggunakan interaksi antara antigen target dan antibodi spesifik yang diberi label
Jembatan disulfida	:	Ikatan sulfur ke sulfur yang menautkan atom sulfur dari dua rantai polipeptida
Kodon sinonim	:	Kodon yang mengode asam amino yang sama
Kodon stop	:	Suatu kodon (triplet nukleotida) pada mRNA sebagai signal terminasi translasi.
Mutasi	:	Perubahan permanen pada sekuen DNA dari suatu gen, sehingga berbeda dengan individu sejenis.
Oksidasi	:	Lepasnya elektron dari suatu zat secara sempurna atau

		sebagian
Pangan fungsional	:	Makanan dan bahan pangan yang dapat memberikan manfaat tambahan di samping fungsi gizi dasar pangan tersebut. Biasanya mengandung komponen bioaktif sehingga dapat memberikan dampak positif pada fungsi metabolisme manusia
Rekayasa genetika	:	Disebut juga modifikasi genetika, yaitu manipulasi genom organisme menggunakan bioteknologi, termasuk transfer gen antar spesies untuk menghasilkan organisme dengan sifat tertentu.
Rekayasa protein	:	Proses pengembangan useful or valuable proteins, termasuk folding (pelipatan protein).
Sitokimia	:	Biokimia dari sel, terutama makromolekul yang bertanggung jawab untuk struktur dan fungsi sel. Sitokimia bertujuan untuk identifikasi dan lokalisasi komponen kimiawi sel secara kualitatif maupun kuantitatif.
Tata nama trivial	:	Metode penamaan senyawa organik mengacu pada sumber senyawa tersebut berasal dan sifat-sifat spesifiknya atau nama orang yang pertama kali menemukannya.
Teknologi gen	:	Aktivitas yang berkaitan dengan konsep ekspresi gen, termasuk variasi genetik secara natural, modifikasi gen atau transfer gen

## INDEKS

ACE  
*Acid phosphatase*  
ACP  
Adenin  
Agitasi  
Akonitase  
Aktivator  
Alkalin fosfatase  
Alkohol dehidrogenase  
ALP  
ALT  
Alumina  
Amilase  
Amiloglukosidase  
Amilopektin  
Amilosa  
Aminopeptidase  
Aminotransferase  
Antibiotika  
*Anti-foaming*  
Apoenzim  
Apoprotein  
*Approximation*  
Arabinoxilan  
Asam amino  
Asam azida  
Asam nukleat  
Asam pektik  
Asam pektinat

Asetilkolin  
Asparginase  
Aspartase  
AST  
ATP  
*Batch reactor*  
Bentonit  
Beras  
Biji  
Biokatalis  
Bioreseptor  
Biosensor  
Bir  
Brofasin  
Bromelain  
Butil sefarosa  
*Carrier*  
*Cleavage sites*  
Cloning  
Concanavalin A  
*Continuous reactor*  
CPK  
*Cross-linking*  
CSTR  
*Cucumisin*  
*Cyanogen bromide*  
Dadih  
D-alosa  
De novo  
*DEAE-sephadex*  
Dehidrogenase

Dekstranase  
Dekstrin  
*Delirium tremens*  
Denaturasi  
Deoksiadenosil-kobalamin  
Depektinisasi  
Deterjen  
Diagnosis  
Diazonium  
Dipeptidase  
Distorsi molekul  
DNA  
DNA *shuffling*  
D-ribosa  
D-xilosa ketoisomerase  
Ekson  
Elektrofilik  
*Elongation*  
Emulsin  
Enantioselektifitas  
Endopeptidase  
*Enzyme code*  
*Enzyme coupling*  
ERH  
Ester  
Ester kolin  
Esterase  
Esterifikasi  
Eukariot  
Euphorbia  
Evolusi

FAD  
FADH<sub>2</sub>  
Fenilalanin  
Fenolat  
Fermentasi  
Fibrinogenolitik  
Fisin  
*Fixed-bed-PFR*  
*Fluidized-bed reactor*  
FMN  
Fosfat  
Fosfatase  
Fragmen Okazaki  
*Freeze drying*  
Gamma-GT  
Gen  
GGT  
Gliadin  
Glikogen  
Glikosida  
Glikosidase  
Glukomanan  
Glukoronoxilan  
Glukosa  
Glukosa oksidase  
Glutamate dehidrogenase  
Gluten  
GOT  
GPT  
GRAS  
*Ground state*

Guanin  
Haemoglobin  
*Half-life*  
Hemiselulosa  
Hepatoseluler  
Hibridisasi  
Hidrofil  
Hidrofob  
Hidroksil apatit  
Hidrolase  
Hiperlipoproteinemia  
Histon  
Holoenzim  
Hormon  
Imobilisasi  
*Induced-fit*  
Induksi  
Induser  
Industri  
Inert  
Inhibitor  
Interkonversi  
Intron  
Invertase  
Ion metal  
Isomerase  
Isomerisasi  
Isosianat  
IUPAC  
Kaolin  
Karbohidrase

Karboksipeptidase  
Karbon  
Karbondioksida  
Karotenoid  
Katalase  
Kecap  
Keju  
Khamir  
Kloroplas  
Klostripain  
Km  
Kodon  
Koenzim  
Kofaktor  
Koji  
Kolagenase  
Komplementer  
Korepresor  
Laktase  
Laktosa  
L-arabinosa  
LDH  
Liase  
Ligase  
Lignin  
Lipase  
Lipoksigenase  
Lipoprotein lipase  
Lisosom  
*Lock and key*  
L-ramnosa

Maltodekstrin  
Maltose  
Metaloenzim  
Metalokarboksipeptidase  
Metaloprotease  
Metilkobalamin  
Miliin  
Misel  
Miso  
Mitokondria  
Monosakarida  
Monosistronik  
mRNA  
Mutasi  
NAD  
NADP  
Trivial  
Nerifoliin  
Nitrogen  
Nukleofilik  
Nukleotida  
Nukleotidase  
Nukleus  
Oksidase  
Oksidoreduktase  
Oksigen  
Olistiren sulfonat  
Operator  
Operon  
ORI  
Osteoblastik

Osteoklastik  
*Packed bed reactor*  
Papain  
Pektin  
Pektinase  
Pektoliase  
Pektozime  
Pentosa  
Pepaya  
Peptidase  
Peroksisom  
Ph  
PHLA  
*Piezoelectronic*  
Pigmen  
Pirimidin  
PL  
Plasmid  
PLP  
PMP  
Poliadenilat  
Poliakrilamid  
Poligalakturonase  
Polimetilgalakturonase  
Poliprotein  
Polisakarida  
Prokariot  
Protease  
Protopektin  
Pseudokolinesterase  
Purin

Ragi  
Ramnagalakturonan  
Ramnosa  
*Random coil*  
*Recorder*  
Renaturasi  
Replikasi  
Represi  
*Reusable*  
Ribonuklease  
Ribosom  
Ribozim  
Roti  
RPCR  
rRNA  
Rubisco  
Sawit  
Selulosa  
Semikonservatif  
SGPT  
Siklodekstrin  
Sirkuit  
Sirup  
Sistein  
Sitoplasma  
Sitosin  
Sosis  
Spesifisitas  
*Splicing*  
Sterol  
Stimulator

*Stirring*  
Substrat  
Suhu  
*Support-binding*  
Surfaktan  
*Tanning*  
Tape  
TATA box  
Tempe  
Terpen  
Timin  
Topoisomerase  
TPP  
Transduser  
Transesterifikasi  
Transferase  
Transglutaminase  
Transkripsi  
Translasi  
Triplet  
Tripsin  
Tryptofan  
tRNA  
*Turn off*  
*Turn on*  
Ubiquinon  
Urease  
Viskositas  
*Whey*  
*Wine*  
Xilan

Xilanase

Xiloglukan

Yogurt

Zaitun

*$\beta$ -sheet*

## **PENJELASAN PERIHAL: PASAR SASARAN YANG DITUJU, PROSPEK PASAR, MANFAAT BUKU YBS.**

Pengetahuan dasar mengenai enzim sangat diperlukan oleh **mahasiswa dan peneliti dari berbagai jurusan dan bidang seperti Biologi, Pertanian, Peternakan, Kehutanan, Farmasi, Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, Kimia, dan Teknik Kimia serta program studi lain yang berkaitan dengan Ilmu Pengetahuan Alam.** Selain itu, buku ini juga dapat **digunakan para peneliti bidang enzim dan para pelaku industri khususnya yang memanfaatkan enzim** dalam proses industrinya. Kebutuhan pemanfaatan enzim dalam berbagai bidang seperti sandang, pangan, dan papan, farmasi dan kesehatan, serta energi alternatif memicu tumbuhnya minat mahasiswa, peneliti, dan pelaku industri untuk menggeluti bidang enzimologi. Saat ini, masih sangat minim buku referensi dalam Bahasa Indonesia yang membahas tentang teknologi enzim maupun enzimologi. Kebanyakan, sumber referensi yang digunakan mahasiswa, peneliti, maupun pelaku industri berasal dari artikel jurnal ilmiah yang tersedia baik dalam bentuk cetak, elektronik, maupun *online*. Selain itu, mereka memperoleh referensi dari buku berbahasa Inggris maupun terjemahan. Padahal, tidak semua kalangan dapat memahami sumber referensi berbahasa Inggris. Terkadang, buku terjemahan juga masih sulit diinterpretasi. Oleh karena itu, hadirnya buku ini sangat prospektif untuk memberikan kontribusi pengetahuan dasar tentang Teknologi Enzim di kalangan mahasiswa, peneliti, dan pelaku industri. Buku ini memberikan informasi dasar mengenai beberapa enzim yang umum digunakan dalam bidang industri dalam kehidupan sehari-hari meliputi struktur enzim, karakteristik enzim, serta aplikasi enzim. Penulis optimis bahwa buku ini akan laris di pasaran mengingat terbatasnya sumber referensi pengetahuan dasar tentang Teknologi Enzim di Indonesia.

## BIODATA PENULIS

### Biodata Penulis I

#### A. IdentitasDiri

1.	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Drh. R. Susanti, MP
2.	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
3.	Jabatan Struktural	-
4.	NIP/NIK/Identitas lainnya	196903231997032001
5.	NIDN	0023036907
6.	Tempat dan Tanggal Lahir	Sragen 23 Maret 1969
7.	Alamat Rumah	Jl. Sekar Gading Barat No.8 RT 03/RW 03 Kalisegoro, Semarang
8.	Nomor Telepon/Faks/ HP	08122893703
9.	Alamat Kantor	Gedung D6 Lt 1 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
10.	NomorTelepon/Faks	(024) 8508033
11.	Alamat e-mail	rsant_ti@yahoo.com
12.	Lulusan yang Telah Dihilangkan	S-1= 32 orang; S-2= 10 Orang; S-3= 0 Orang
13.	Mata Kuliah yg Diampu	1.Biokimia
		2.BiokimiaLanjut
		3.Enzimologi
		4.Imunologi
		5. Penulisan Karya Ilmiah
		6. Kapita Selektta Hewan
		7. Metabolisme Sel
		8. Biologi Molekuler

### A. Riwayat pendidikan

	S-1	S-2	S3
Nama Perguruan Tinggi	UGM	UGM	IPB
Bidang Ilmu	Kedokteran Hewan	Sain Veteriner	Sain Veteriner
Tahun Masuk-Lulus	1988-1992	1998-2000	2004-2009
Judul Skripsi/Thesis/Disertasi	Pengaruh Pemberian Karbohidrat Terhadap Pertumbuhan <i>Trypanosoma evansi</i> Secara <i>in vitro</i>	Efek 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Terhadap Gambaran hematologik, Respon Imun Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Analisis Molekuler Fragmen Gen Penyandi Hemaglutinin Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 dari Unggas Air
Nama Pembimbing/Promotor	Drh. Sumartono, SU. DEA	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. Dr. Drh. Siti Isrina Oktavia Salasia</li> <li>2. Prof. Dr. Drh. Soesanto Mangkoewidjojo, M.Sc</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. Dr. Drh. Retno D. Soejoedono, MS</li> <li>2. Dr. Drh. I Gusti Ngurah K Mahardika</li> <li>3. Dr. Drh. I Wayan T Wibawan, MS</li> <li>4. Prof. Dr. Maggy T Suhartono</li> </ol>

### C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1.	2012	Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Hiperglikemik Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Biji Mahoni	DIPA FMIPA Unnes	10
2.	2012	Karakterisasi Molekuler Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Manusia dan Hewan di Indonesia	DIPA PNBP Unnes	16
3.	2013	Analisis gen metalotionin (MT) Bakteri resistensi logam berat	Fundamental Dikti	40
4.	2012-2013	Studi Aktivitas Imunostimulan Ekstrak Tomat pada Infeksi Plasmodium berghei	Fundamental Dikti	80
5.	2014	Identifikasi gen resisten terhadap avian influenza (gen mx) pada unggas air domestic	Kompetensi dan publikasi	25

		dengan pcr-rflp	internasional	
6.	2014	Studi Aktivitas Antioksidan dan Dari Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Buah Rambutan	Penelitian KBK	8
7.	2015-2016	Dna barcode unggas air domestik di indonesia: gen coidan non-coi barcode region	Fundamental	55
8.	2015-2016	Studi antioksidan tomat dan potensinya pada tikus hiperkolesterolemi	Hibah Bersaing	52,5

#### D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber *	Jml (Juta Rp)
1.	2012	Pelatihan Pembuatan Perangkat Pembelajaran Bermuatan nilai-nilai Karakter Berbasis Konservasi pada Guru sekolah Dasar di Kecamatan Gunungpati Semarang	DIPA PNBP UNNES	4
2.	2012	Pelatihan pembuatan lembar kegiatan siswa bermuatan nilai-nilai karakter pada guru sekolah dasar di Kecamatan Gunungpati Semarang	DIPA FMIPA UNNES	5
3.	2013	Pembibitan dan Pemeliharaan Tanaman Aren Sebagai Penggerak Ekonomi Desa Jatirejo Kec. Gunungpati Semarang	DIPA FMIPA UNNES	11,06
4.	2014	Peningkatan kualitas hand made kertas daur ulang pada kelompok usaha "kupu-kupu kertas" kelurahan plalangan kecamatan gunung pati kota semarang	DIPA Unnes	6
5.	2014	Pengolahan pascapanen jamur tiram kulit aren sebagai peluang usaha masyarakat desa jatirejo kecamatan gunungpati kota semarang (anggota)	DIPA FMIPA Unnes	6
6.	2014	Peningkatan kesehatan keluarga melalui pemanfaatan kolang-kaling di Desa jatirejo Kec. Gunungpati Kota semarang (Anggota)	DIPA FMIPA Unnes	6
7	2014	Pengolahan sampah organik rumah tangga menjadi kompos di Desajatirejo kecamatan Gunungpati (Anggota)	DIPA FMIPA Unnes	6

8	2015	Peningkatan inovasi praktikum biologi pada guru SMP di Kabupaten Jepara	DIPA FMIPA Unnes	5
9	2015	Meningkatkan Ketrampilan Inokulasi dan Pengelolaan Laboratorium Bagi Laboran BPT-BUN Salatiga	DIPA FMIPA Unnes	5

#### E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Artikel Ilmiah	Volume/ Nomor/Tahun	Nama Jurnal
1.	Aktivitas <i>reactive oxygen species</i> makrofag akibat stimulasi gel lidah buaya pada infeksi <i>Salmonella typhimurium</i> (Ketua)	135 / 2 / 2012	Jurnal MIPA
2.	Isolasi dan identifikasi virus avian influenza subtipe H5N1 di peternakan tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang (Anggota)	24/2/2012	Biosaintifika
3.	Efektivitas pemberian minyak sawit dan minyak lemuru dalam mempercepat pubertas tikus betina (Anggota)	4/1/2012	Biosaintifika
4.	Pengaruh pemberian vitamin E terhadap kualitas sperma tikus putih yang dipapar timbal (Anggota)	4/1/2012	Biosaintifika
5.	Intensitas warna kuning dan kadar omega-3 telur burung puyuh akibat pemberian Undur-undur laut (Anggota)	2/2/2013	Unnes journal of life science
6.	Analisis sekuen gen glutathione peroksidase (GPX1) sebagai deteksi stres oksidatif akibat infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Anggota)	11/2/2014	Saintekmol
7.	Analisis Kadar logam berat Sungai di Jawa Tengah (Ketua)	12/1/2014	Saintekmol
8.	<a href="#">THE PREVALENCE OF H5N1 INFLUENZA VIRUS ON POULTRY AT TRADITIONAL MARKET IN SEMARANG, INDONESIA</a>	19 (2) 2015	Journal of Biological Researches

9.	<a href="#">Effectivity of Pedada Fruit (Sonneratia caseolaris) Extract to The Level of SgOT and SgPT in Rat Treated by Paracetamol Induction</a> <a href="#">Efektivitas Ekstrak Buah Pedada (Sonneratia caseolaris) terhadap Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih yang Diinduksi Parasetamol</a>	2015	Biosaintifika
10.	<a href="#">PROTEIN PROFILE AND MDA SPERMATOZOA LEVELS OF HYPERGLYCEMIC MICE FED BY BEAN SPROUTS EXTRACT</a>	26 (4) 2015	INDONESIAN JOURNAL OF PHARMACY
11.	<a href="#">Assessing pathogenicity potential of H5N1 avian influenza virus strains isolated from Indonesian waterfowl in chickens and Balb-c mice</a>	<a href="#">38 (2), 137-142, Mar- Apr. 2016</a>	<a href="#">Songklanakarin J. Sci. Technol</a>

**F. Pengalaman Penyampaian Makalah Secara Oral Pada Pertemuan / Seminar Ilmiah**

**Dalam 5 Tahun Terakhir**

No.	Nama Pertemuan Ilmiah / Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1.	Seminar Nasional MIPA Unnes "Peran MIPA dalam Peningkatan kualitas hidup dan pengembangan pendidikan karakter"	Karakter molekuler gen neuraminidase (NA) Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 di Indonesia	15 Desember 2012
2.	Seminar Nasional Biologi: Penelitian, pengembangan dan pembelajarannya	Deteksi Taura Syndrome Virus (TSV) pada udang vannamei ( <i>Penaeus vannamei</i> ) menggunakan teknik reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	Semarang, 29 November 2014
3	IconSSE	<a href="#">Vitamin A induction in reactive oxygen intermediate and nitric</a>	Hotel Laras Asri Salatiga 2015

		<a href="#">oxide intermediate production againts Plasmodium berghei</a>	
--	--	--	--

**G. Pengalaman Penulisan Buku dalam 5 Tahun Terakhir**

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1.	Monograf: Virus avian influenza dan dinamika molekulernya	2013	177	FMIPA Unnes
2.	Pengantar Kimia Organik	2014	232	FMIPA Unnes

**J. Penghargaan yang Pernah Diraih dalam 10 tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)**

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1.	Satyalencana 10 tahun	Pemerintah	2013

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidak-sesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima risikonya.

Semarang, 26 April 2016

Pengusul,



(Dr. Drh. R Susanti, M.P)

## **R. Susanti**

R. Susanti dilahirkan di Sragen, 23 Maret 1969 dari ayah Sukardi Indriatmoko, BA (Alm) dan ibu Sumi. Penulis merupakan putri kedua dari tiga bersaudara. Penulis menempuh pendidikan dasar sampai menengah atas di kota Sragen, berturut-turut di SDN Bener II (Desa Bener, Kecamatan Ngrampal, Kabupaten Sragen) lulus tahun 1982, SMPN 2 Sragen lulus tahun 1985, SMAN 1 Sragen lulus tahun 1988. Selepas SMA, tahun 1988 melanjutkan studi S1 (sarjana) di Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) UGM dan mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran Hewan (SKH) tahun 1992. Setelah mendapatkan gelar SKH langsung melanjutkan pendidikan profesi Dokter Hewan di FKH UGM juga, lulus tahun 1994 mendapatkan gelar Dokter Hewan (Drh). Pada tahun 1998 melanjutkan studi S2 di program studi Sains Veteriner Program Pasca Sarjana UGM, lulus tahun 2000 dan mendapatkan gelar Magister Pertanian (MP). Tahun 2004 melanjutkan studi S3 di program studi Sains Veteriner Sekolah Pasca Sarjana IPB, lulus tahun 2008 dan mendapatkan gelar Doktor (Dr). Selama pendidikan S1 sampai S3 bidang penelitian yang ditekuni adalah bidang biokimia dan biologi molekuler. Sejak tahun 1997 sampai sekarang, sebagai dosen di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang, mengampu mata kuliah Kimia Organik, Biokimia, Imunologi, Enzimologi, dan Parasitologi.

Sejak tahun 1997 sampai sekarang telah melakukan penelitian 37 judul, diantaranya adalah (1) Aspek intoksikasi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) terhadap aktivitas bakterisidal intrasel leukosit polimorfonuklear tikus putih (*Rattus norvegicus*)(2003), (2) (3) (4), (5) Stimuli pematangan dini ovarium burung puyuh dengan interaksi fotoperiode dan gonadotrophin releasing hormon (GnRH) (2007), (6), (7) Potensi unggas air sebagai reservoir virus highly pathogenic avian influenza (HPAI) subtipe H5N1 dan peluang penularannya pada manusia (2008-2009), (8) (9) Potensi Zat gizimikro seng terhadap respon imun seluler pada demam tifoid (2009), (10) Studi Aktivitas Imunostimulan Gel Lidah Buaya (*Aloe vera*) pada Infeksi *Salmonella typhimurium* (2010), (11) , (12) Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Hiperglikemik Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Biji Mahoni (2012),

Artikel yang telah dipublikasi dalam jurnal ada 33 judul, antara lain (1) Intoksikasi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): I. Efek terhadap gambaran darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) (2001), (6) Peranan air buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) menurunkan kadar enzim AST dan ALT serum mencit (*Mus musculus*) yang di-treatment CCL4 (2004), (7) Respon imun seluler terhadap intoksikasi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (2004), (8), (9) Potensi unggas air sebagai reservoir virus high pathogenic avian influenza subtype H5N1(2007), (12)), (13)) Hubungan Kekerbatan Burung Gelatik Jawa (*Padda oryzivora*) di Pulau Jawa Berdasarkan Karakter Morfologi (2008), (17) Aktivitas reactive oxygen species makrofag akibat stimulasi gel lidah buaya pada infeksi *Salmonella typhimurium* (2012).

## Biodata Penulis II

### A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap	Fidia Fibriana, S.Si., M.Sc.
2	Jenis Kelamin	Perempuan
3	Jabatan Fungsional	CPNS
4	NIP	198902242015042001
5	NIDN	0024028903
6	Tempat, tanggal lahir	Kabupaten Semarang, 24 Februari 1989
7	Alamat Rumah	Jl. Ampel Gading Timur III RT 02/ RW III Kalisegoro, Gunungpati, Semarang 50229
8	No Telepon/ Faks/ Hp	-/-/085727261089
9	Alamat kantor	Gedung D5 Lantai 1 Kompleks FMIPA UNNES, Kampus Sekaran-Gunungpati Semarang 50229
10	No telepon/ Faks/ HP	0248508112/ 0248508112/-
11	Alamat E-mail	<a href="mailto:fidiafibriana@gmail.com">fidiafibriana@gmail.com</a> <a href="mailto:fibriana.f@mail.unnes.ac.id">fibriana.f@mail.unnes.ac.id</a>
12	Lulusan yang telah dihasilkan	-
13	Mata Kuliah yang diampu	1. Genetika 2. Enzimologi 3. Praktikum Genetika 4. Bioteknologi 5. Biologi Molekuler 6. Praktikum Biologi Molekuler 7. Bahasa Inggris 8. Pengembangan media untuk pembelajaran 9. Mikrobiologi 10. Praktikum Mikrobiologi

### B. Riwayat Pendidikan

	S1	S2
Nama Perguruan	Universitas Negeri	Prince of Songkla

Tinggi	Semarang (Unnes)	University, Thailand
Bidang Ilmu	Biologi	Bioteknologi
Tahun masuk-lulus	2006-2010	2011-2014
Judul skripsi/thesis/disertasi	Deteksi daging babi pada bakso yang dijajakan di pusat kota Salatiga menggunakan teknik PCR	Selection, identification, optimization and characterization of lipase producing fungal strain isolated from palm oil contaminated wastes
Nama Pembimbing/promotor	Ir. Tuti Widianti, M.Biomed Dr. Ir. Amin Retnoningsih, M.Si	Asst. Prof. Dr. Apichat Upaichit  Asst. Prof. Dr. Tipparat Hongpattarakere

### C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jml (Juta Rp)
1	2011	Analisis keanekaragaman genom kultivar pisang berdasarkan marker ITS DNA menggunakan teknik PCR-RFLP	PKMP DIKTI	6
2	2011	Perbandingan metode ekstraksi DNA dan pemanfaatannya dalam deteksi daging babi pada produk olahan daging menggunakan teknik polymerase chain reaction (PCR)	PKMP DIKTI	10
3	2012	Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai fermented meat (Nhang and Nham)	PSU	
4	2012	Identification of lactic acid bacteria isolated from Thai traditional fermented meat (Nham) using molecular techniques	PSU	

5	2012	Purification of Lipase from <i>Geotrichum clavatum</i>	PSU	
6	2013	Selection, identification, optimization and characterization of lipase producing fungal strain isolated from palm oil contaminated wastes	PSU	15.000 THB
7	2014	PCR approach for rapid detection of <i>Escherichia coli</i> in tempe using a specific primer (Anggota)	DIPA FMIPA Unnes	7
8	2015	Penelitian dosen pemula: Karakterisasi dan identifikasi durian lokal ( <i>Durio spp.</i> ) Jawa Tengah berdasarkan analisis karakter morfologi dan sekuens dna ribosomal menggunakan teknik PCR-RFLP (Ketua)	DIPA PNBP Unnes	10
9	2015	Penelitian KBK: Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil pigmen dari limbah kulit kentang dan pemanfaatannya sebagai bio-colorant batik Semarangan (Anggota)	DIPA PNBP Unnes	7
10	2015	Research collaboration between Semarang State University, Indonesia and Prince of Songkla University, Thailand on river management based on local wisdom for climate change anticipation (Tenaga lapangan)	DIPA PNBP Unnes	90

#### D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta)
1	2015	Konsep <i>green economic</i>	DIPA PNBP	6

		melalui penyediaan pewarna alami batik dari tanaman mangrove (Anggota pelaksana)	Unnes	
2	2015	Peningkatan peran masyarakat dalam upaya pencegahan dan pengendalian demam berdarah dengue (DBD) di Kecamatan Gunungpati	DIPA FMIPA Unnes	5

#### E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah dalam Jurnal dalam 5 tahun terakhir

No	Judul Artikel Ilmiah	Volume/ Nomor/Tahun	Nama Jurnal
1	Deteksi kandungan daging babi pada produk bakso yang dijajakan di pusat kota Salatiga menggunakan teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	Vol 2/ No 2/ 2010	Biosaintifika
2	Optimization of bioprocess variables for fungal lipase production using statistical experimental design: a mini review	ISBN: 978-616-90749-3-9	Proceeding of the International Conference on Natural Science, Engineering, and Technology 2013
3	Improvement of extracellular lipase from selected fungal strain using Taguchi DOE methodology	1stICS/AE/BIOTECH002	Proceedings of the 1 <sup>st</sup> International Conference on Sustainable Agriculture and Environment 2013
4	PCR approach for rapid detection of <i>Escherichia coli</i> in Tempe using a specific primer	Vol 19/ No.2/ June 2014 p 54-58.	Journal of Biological Researches
5	Proteases from Latex of <i>Euphorbia spp.</i> and Its Application on Milk	Vol. 7/ No. 2/ September	Biosaintifika: Journal of

	Clot Formation	2015	Biology & Biology Education
6	Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Meat (Nham) by using Molecular Techniques	Proceeding PIT PERMI 2015 ISBN: 978-602-73556-0-6	Proceeding Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia 2015
7	Potensi Kitchen Microbiology Untuk Meningkatkan Keterampilan Teknik Hands-On Dalam Pembelajaran Mikrobiologi	Vol 5 No 2 2016	Unnes Science Education Journal
8	Phylogenetic Relationships of Local Durian Species based on Morphological Characteristics and PCR-RFLP Analysis of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA	Vol 8 No 2 2016	Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education

**F. Pengalaman Menyampaikan Makalah Secara Oral Pada Pertemuan / Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Nama Pertemuan/ Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	The 1 <sup>st</sup> International Conference on Sustainable Agriculture and Environment 2013	Improvement of extracellular lipase from selected fungal strain using Taguchi DOE methodology	Solo, Juni 2013
2	International Conference on Natural Science, Engineering, and Technology 2013	Optimization of bioprocess variables for fungal lipase production using statistical experimental design: a mini review	Bangkok, November 2013
3	Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia 2015	Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Meat (Nham) by using Molecular	Semarang, 8-9 Oktober 2015

		Techniques	
--	--	------------	--

**G. Pengalaman Menulis Buku Dalam Jurnal 5 Tahun Terakhir**

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah halaman	Penerbit

**H. Pengalaman Memperoleh HAKI Dalam Jurnal 5 Tahun Terakhir**

No	Judul/Tema HAKI	Tahun	Jenis	Nomor P /ID

**I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik Rekayasa Sosial Dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Judul/Tema Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang telah diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

**J. Penghargaan yang Pernah Diraih Dalam 10 Tahun Terakhir**

No	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1	Good Master Thesis Award 2014	Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Thailand	2014
2	2014 Prestige Outstanding Thesis Award Master Degree in Science and Technology	Prince of Songkla University, Thailand	2015

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila dikemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima resikonya.

Semarang, Oktober 2016

Pengusul

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fidia Fibriana', written over a faint rectangular stamp.

Fidia Fibriana, S.Si., M.Sc.

### **Fidia Fibriana**

Fidia Fibriana dilahirkan di Desa Suruh, Kabupaten Semarang, pada 24 Februari 1989 dari ayah Kurnaedi dan ibu Masruhah (Alm). Penulis merupakan putri pertama dari empat bersaudara. Penulis menempuh pendidikan dasar sampai menengah atas di kota Salatiga, yaitu di SDN Ledok 07, Kecamatan Argomulyo lulus tahun 2000, SMPN 01 Salatiga lulus tahun 2003, dan SMAN 1 Salatiga lulus tahun 2006. Setelah menyelesaikan pendidikan menengah, penulis melanjutkan studi jenjang sarjana (S1) di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES) dan mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada tahun 2010. Penulis mengabdikan diri di Jurusan Biologi sebagai asisten laboratorium hingga tahun 2011. Penulis mendapatkan kesempatan untuk melanjutkan studi ke jenjang Master di Department of Industrial Biotechnology, Prince of Songkla University, Thailand dengan meraih Beasiswa Unggulan Luar Negeri DIKTI (BULN DIKTI). Gelar Master of Science (M.Sc.) in Biotechnology diraih pada tahun 2014. Pulang dari studi di Thailand, penulis kembali mengabdikan diri di Jurusan Biologi FMIPA UNNES sebagai dosen kontrak mengampu mata kuliah Genetika, Biologi Molekuler, dan Enzimologi. Pada tahun 2015, penulis diangkat menjadi dosen tetap di Jurusan IPA Terpadu FMIPA UNNES mengampu mata kuliah Genetika dan Bioteknologi.

Sejak tahun 2012 sampai saat ini, penulis telah melakukan penelitian sebanyak 8 judul, diantaranya: **1)** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai fermented meat (Nhang and Nham), **2)** Identification of lactic acid bacteria isolated from Thai traditional fermented meat (Nham) using molecular techniques, **3)** Purification of Lipase from *Geotrichum clavatum*, **4)** Selection, identification, optimization and characterization of lipase producing fungal strain isolated from palm oil contaminated wastes, **5)** PCR approach for rapid detection of *Escherichia coli* in tempe using a specific primer, **6)** Karakterisasi dan identifikasi durian lokal (*Durio spp.*) Jawa Tengah berdasarkan analisis karakter morfologi dan sekuens dna ribosomal menggunakan teknik PCR-RFLP, **7)** Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil pigmen dari limbah kulit kentang dan pemanfaatannya sebagai bio-colorant batik Semarangan, **8)** Research

collaboration between Semarang State University, Indonesia and Prince of Songkla University, Thailand on river management based on local wisdom for climate change anticipation.

Artikel yang telah dipublikasi dalam jurnal ada 6 judul, antara lain **1)** Deteksi kandungan daging babi pada produk bakso yang dijajakan di pusat kota Salatiga menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), **2)** Optimization of bioprocess variables for fungal lipase production using statistical experimental design: a mini review, **3)** Improvement of extracellular lipase from selected fungal strain using Taguchi DOE methodology, **4)** PCR approach for rapid detection of *Escherichia coli* in Tempe using a specific primer, **5)** Proteases from Latex of *Euphorbia* spp. and Its Application on Milk Clot Formation, **6)** Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Meat (Nham) by using Molecular Techniques.