

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Amobilisasi Sel

Amobilisasi dalam bidang bioteknologi didefinisikan sebagai suatu cara yang digunakan untuk menempatkan secara fisika atau kimia suatu sel, organel, enzim atau protein lainnya ke dalam suatu penyangga berupa bahan padat, matrik, atau membran. Amobilisasi dilakukan dengan maksud untuk meningkatkan stabilitas dan membuat sel, organel atau enzim dapat digunakan secara terus menerus (Brodelius,1987).

2.2 Metoda Amobilisasi Sel

Amobilisasi sel dapat dilakukan dengan beberapa metoda yang dapat digunakan yaitu :

2.2.1 Metoda ikatan antar polimer (*cross-linking*).

Dinding sel mikroba yang mengandung gugus amin bebas dan gugus karboksil dapat berikatan silang dengan senyawa seperti glutaraldehid atau toluene diisosianat. Sel mikroba juga dapat diamobilisasi melalui ikatan ion dengan senyawa polielektrolit. Metoda amobilisasi dengan cara ini jarang dilakukan untuk sel. Dalam penggunaan untuk amobilisasi sel, metoda ini biasanya dikombinasikan dengan metoda penjerapan (*entrapment*) untuk stabilisasi proses amobilisasi.

2.2.2 Metoda kopolimerisasi (*copolymerization*).

Metoda ini merupakan metoda pengembangan dari metoda ikatan antar polimer (*cross-linking*). Pada saat proses amobilisasi biasanya ditambahkan senyawa yang berfungsi sebagai “*spacer*” seperti gelatin, albumin, polietilenimin ke dalam suspense sel yang akan diamobilisasi. Selanjutnya suspensi sel ini diamobilisasi dengan metoda ikatan antar polimer. Prosedur ini akan membuat sel terperangkap

pada suatu jaring kovalen. Metoda ini banyak menyebabkan kematian sel, akan tetapi pada beberapa aplikasi metoda ini dapat digunakan (Brodelius, 1987).

2.1.2 Metoda ikatan kovalen.

Metoda ini dilakukan dengan cara menggunakan sistem dimana sel dapat terikat secara kovalen dengan gugus reaktif dari suatu matrik, atau sel terikat pada suatu senyawa perantara yang menghubungkan sel dengan matriknya. Contohnya matrik selulosa dapat dikombinasi dengan glutaraldehid sebagai senyawa perantara. Senyawa perantara ini sebagian besar bersifat toksik sehingga dapat merusak sel (Brodelius, 1987).

2.2.3 Metoda adsorpsi,

Metoda ini didasarkan kepada afinitas mikroba terhadap suatu permukaan padat. Fenomena ini dapat terjadi secara alami. Misalnya, mikroba yang terikat pada butiran pasir, partikel tanah, permukaan gigi, permukaan logam dan permukaan senyawa polivinilklorida. Kekuatan afinitas mikroba terhadap suatu permukaan padat tergantung pada jenis mikroba. Reaksi yang terjadi antara permukaan padat dengan sel adalah interaksi elektrostatis. Beberapa jenis bahan yang telah digunakan untuk amobilisasi sel dengan cara ini adalah selulosa, lektin, polivinilklorida (Brodelius, 1987).

2.2.4 Metoda penjerapan (*entrapment*).

Metoda ini adalah metoda yang paling banyak dikembangkan untuk amobilisasi sel. Metoda ini dilakukan dengan membuat sel mikroba terperangkap di dalam matrik polimer. Metoda didasarkan pada terjadinya inklusi sel-sel di dalam suatu jaringan atau matrik yang kaku yang mencegah sel berdifusi ke lingkungan atau medium disekitarnya, akan tetapi masih dapat berinteraksi dengan substrat. Matrik yang umum digunakan adalah agar, alginat, karagen, selulosa dan turunannya, kolagen, gelatin, resin epoksi, poliakrilamid.

Metoda ini lebih banyak digunakan untuk amobilisasi sel karena tingkat keberhasilannya tinggi dan lebih kuat dalam menahan sel tetap berada di dalam

matrik apabila dibandingkan dengan metoda adsorpsi atau secara kimia (Brodelius, 1987).

2.3 Teknik Pembuatan Sel Amobil.

Ada beberapa teknik dalam pembuatan butiran sel amobil diantaranya dengan membuat desintegrasi sel ke dalam blok-blok polimer secara mekanik. Cara ini menghasilkan keseragaman partikel yang rendah. Cara lain adalah dengan membekukan sel bersama-sama dengan matriknya, setelah itu diperkecil ukurannya dengan pemotongan. Cara ini kurang efisien untuk pembuatan dalam jumlah besar. Cara ketiga dengan membuat sel menjadi manik-manik atau butiran (*beads*) bersama-sama dengan matriknya (Brodelius, 1987).

2.4 Matrik Amobilisasi

Matrik yang digunakan dalam proses amobilisasi ditentukan oleh metoda yang akan dipilih untuk amobilisasi. Diantara matrik yang umum digunakan untuk amobilisasi sel dapat adalah :

2.4.1 Polimer sintesis,

Polimer sintesis biasanya dipilih karena ingin mendapatkan sifat fisika kimia tertentu dari matrik tersebut. Porositas dan sifat hidrofob/hidrofil dari matrik jenis ini dapat diatur lebih mudah. Contoh polimer sintesis yang banyak digunakan untuk amobilisasi sel adalah, gel poliakrilamid, metakrilat, poliurethan, resin epoksi.

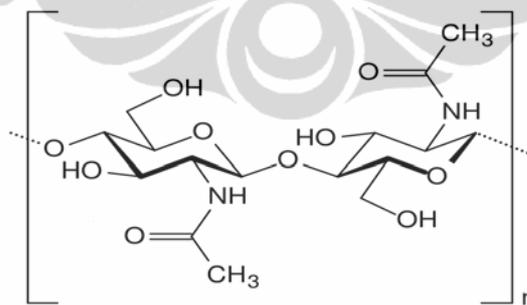
2.4.2 Polimer alam.

Polimer alam mempunyai keunggulan yang tidak dimiliki oleh polimer sintesis yaitu, polimer alam dapat diterima oleh hampir semua jenis sel. Sel umumnya dapat mempertahankan availabilitasnya yang tinggi apabila diamobilisasi dengan polimer alam. Polimer alam dapat dibedakan berdasarkan

perbedaan mekanisme pembentukan gelnya, yaitu polimer alam yang membentuk gel dengan perubahan temperatur (*thermal gel*) contohnya, kolagen, gelatin, agar, karagen. Polimer alam yang membentuk gel dengan reaksi pengionan, contohnya alginat, kitosan.

Alginat merupakan polimer alam atau polisakarida yang diekstraksi dari alga coklat (*Phaeophyta*). Monomer alginat terdiri dari asam β -D-manuronat dan asam α -L-guluronat. Alginat tidak memiliki unit berulang yang teratur. Alginat berada di dalam sel alga dalam bentuk gel mengandung ion natrium, kalsium, magnesium, stronsium dan barium. Alginat ini berfungsi memberikan kekuatan dan fleksibilitas pada jaringan. Alginat mempunyai kemampuan dalam mengikat air dan membentuk gel, viskositasnya tinggi serta memiliki stabilitas yang baik. Alginat adalah matrik amobilisasi sel yang paling banyak digunakan, karena ramah terhadap sel, mudah teknik pembuatannya terutama untuk pembuatan dalam jumlah besar, dan murah harga. Keuntungannya ini masih dapat mengimbangi kekurangannya yang juga dimiliki oleh senyawa polimer alam lain yaitu kemampuannya menahan sel di dalam matrik lebih rendah dari pada polimer sintetis (Brodellius, 1987).

2.5 Kitin



Gambar 1. Rumus struktur kitin (Kumar, 2000)

Kitin adalah senyawa polimer alam yang disusun oleh monomer N-asetil D-glukosamin, bersifat sukar larut seperti selulosa. Kitin merupakan polisakarida berwarna putih, bersifat kaku. Senyawa ini tinggi ketersediaannya di alam karena

secara aktif diproduksi oleh makhluk hidup dan merupakan senyawa penyusun cangkang udang dan kepiting. Kitosan adalah turunan kitin yang telah kehilangan gugus asetilnya. Kitin dan kitosan merupakan polimer poliamin yang berbentuk linier, mempunyai gugus amino aktif, dapat diproses menjadi berbagai macam bentuk mulai dari serpihan, serbuk halus, butiran, membran, spons, kapas, serat, dan gel. Keduanya bersifat biokompatibel, artinya dapat berikatan dengan sel mamalia dan sel mikroba secara agresif, hampir tidak mempunyai efek samping, tidak beracun, tidak dapat dicerna, mudah diuraikan oleh mikroba, mempunyai aktivitas biologi di dalam jaringan, organ, sel hewan dan tumbuhan (Kumar 2000).

Kitin secara komersial diperoleh dari limbah industri pengolahan hasil laut, diantaranya udang dan kepiting. Kitin juga dapat ditemukan pada anggota *Crustaceae* yang lain, pada beberapa jenis fungi, dan serangga tertentu. Ketersediaan yang tinggi dan untuk pemanfaatan limbah serta usaha untuk mengurangi pencemaran akibat limbah hasil laut merupakan pertimbangan utama dalam pemanfaatan limbah industri hasil laut sebagai sumber kitin (Kumar, 2000).

2.6 Proses Pengolahan Kitin

Proses pengolahan atau ekstraksi kitin dari kulit udang didasarkan pada dua tahapan utama yaitu penghilangan material anorganik, mineral (demineralisasi) dan hidrolisis protein (deproteinasi). Proses demineralisasi dan deproteinasi ini dapat dilakukan dengan cara kimia dan biologi (Healy, 2003).

Secara kimia, demineralisasi dilakukan menggunakan asam kuat seperti asam klorida sedangkan deproteinasi dilakukan dengan basa kuat seperti natrium hidroksida. Cara kimia ini diketahui menimbulkan beberapa kerugian, diantaranya, kitin yang dihasilkan bisa ikut terhidrolisis sehingga mempengaruhi sifat-sifatnya, proses ini membutuhkan air dan energi yang tinggi, serta menghasilkan limbah yang merusak lingkungan (Healy, 2003).

Sebagai pengganti cara kimia telah dikembangkan proses biologi secara fermentasi dengan memanfaatkan mikroba. Proses demineralisasi secara biologi, diantaranya dapat dilakukan dengan memanfaatkan asam organik atau asam laktat

yang dihasilkan oleh bakteri penghasil asam laktat, sedangkan proses deproteinasi dilakukan dengan memanfaatkan enzim pendegradasi protein atau protease yang dihasilkan oleh bakteri tertentu (Healy, 2003). Diantara bakteri penghasil asam laktat yang telah diteliti untuk proses demineralisasi ini adalah *Lactobacillus helveticus* (Adour, dkk 2008) *Lactobacillus salvarius* (Beaney, dkk 2005), *Lactobacillus plantarum* (Rao dan Stevens, 2006), Bakteri penghasil protease yang telah digunakan untuk deproteinasi kitin adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Yi-Su, dkk 2000), *Bacillus subtilis* (Sini dkk 2007), *Bacillus licheniformis* (Waldeck dkk, 2006), *Serratia marcescens* (Jung, dkk 2005)

2.7 *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* termasuk ke dalam golongan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat termasuk dalam kelompok bakteri gram positif. Genus *Lactobacillus* adalah bakteri asam laktat yang berbentuk batang. Karakterisasi penting yang digunakan dalam klasifikasi asam laktat adalah cara bakteri ini memfermentasi glukosa pada kondisi standar. Pada kondisi ini bakteri asam laktat dapat digolongkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok bakteri homofermentatif yang mengkonversi glukosa semuanya menjadi asam laktat dan kelompok yang kedua yaitu heterofermentatif yang mengkonversi glukosa menjadi asam laktat, etanol atau asam asetat dan CO₂. *Leuconostoc*, *Oenococci*, *Weissella* dan beberapa *Lactobacillus* termasuk ke dalam golongan heterofermentatif, sedangkan bakteri asam laktat lainnya termasuk golongan homofermentatif (Axelsson, 2004).

Lactobacillus acidophilus yang digunakan dalam penelitian ini tumbuh dengan baik pada pada temperatur 37°C. Media pertumbuhan yang paling baik digunakan adalah media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS).

Diantara faktor-faktor yang mempengaruhi produksi asam laktat pada fermentasi asam laktat adalah temperatur, pH dan komposisi substrat. Temperatur fermentasi yang terlalu rendah akan memperlambat metabolisme sel dan temperatur yang terlalu tinggi akan mengganggu pertumbuhan sel dan menyebabkan turunnya produksi medium fermentasi. Sebagian besar bakteri asam

laktat dapat berperan baik memproduksi asam laktat pada pH 3 – 4. Substrat karbon sangat penting dalam medium fermentasi asam laktat yang akan dirubah menjadi asam laktat. Jenis sumber karbon yang paling efektif untuk dirubah menjadi asam laktat ditentukan oleh jenis bakteri asam laktat. Sumber karbon yang umumnya digunakan adalah glukosa (Rao, Munoz, Stevens 2000).

2.8 *Bacillus licheniformis*

Bakteri *Bacillus licheniformis* termasuk dalam golongan jenis *Bacillus* yang dapat memproduksi enzim proteolitik dalam masa pertumbuhannya. *Bacillus licheniformis* pada penelitian ini dapat tumbuh pada temperatur antara 37°C – 55°C, Kondisi optimum pertumbuhannya adalah pada temperatur 55°C, pH, 7,3 dalam medium Luria Bertani (Waldeck dkk 2006).

Jenis protease yang dihasilkan oleh bakteri ini adalah enzim ekstra selular yang tergolong endoprotease netral dan alkali, mempunyai aktivitas cukup baik pada pH 8 – 11, enzim ini dapat bertahan sampai temperatur 50°C dan dinaktifkan dengan cepat pada pH dibawah 5 (Waldeck dkk 2006).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi untuk menghasilkan enzim protease diantaranya temperatur, pH dan medium. Temperatur pertumbuhan bakteri thermofil umumnya 50°C atau lebih. Temperatur tersebut mempengaruhi pertumbuhan atau peningkatan mass sel, reproduksi dan semua aktivitas yang dilakukan oleh mikroba. Enzim protease alkali dapat beraktivitas pada pH alkali mulai 8 – 11. Medium yang digunakan agar bakteri menghasilkan protease yang baik, harus mengandung sumber karbon, nitrogen, air dan garam organik yang optimal (Yi-Su, dkk 2000).

2.9 **Metoda Umum Pengujian Serin Protease**

Enzim serin protease ini terdiri dari grup enzim yang dibedakan dari reaktifitasnya terhadap residu serin pada sisi aktifnya. Substrat alami enzim golongan ini adalah protein atau fragmen protein. Enzim ini digolongkan pada endopeptidase karena umumnya pemutusan ikatan peptida terminal dihambat

oleh muatan amin atau gugus karboksil dari residu terminal. Protease banyak terdapat di alam, diantaranya pada pankreas mamalia, hewan invertebrata, produk dari bakteri terutama *Bacillus* sp. (Walsh and Wilcox, 1981).

Pengukuran aktivitas enzimatik secara umum berdasarkan pada tiga hal tergantung pada objek eksperimen, yaitu :

- a. Penentuan jumlah enzim dalam campuran misalnya ekstrak jaringan.
- b. Penentuan aktivitas sisa dari sampel murni setelah diberikan bahan kimia tertentu atau perlakuan fisika.
- c. Penentuan aktivitas spesifik relatif terhadap substrat untuk mendapatkan spesifikasi sediaan enzim.

Pada pengujian protease biasanya menggunakan substrat sintesis yang hanya mempunyai satu ikatan yang bereaksi pada proses hidrolisis oleh enzim (Walsh and Wilcox, 1981)

2.10 **Metoda Pengujian Protein**

Metoda pengujian kadar protein telah banyak dikembangkan sesuai dengan kebutuhan penelitian. Metoda gravimetri dipakai untuk pengujian protein dalam bentuk kering (*freeze dried*). Metoda ini dengan cepat digantikan oleh metoda kolorimetri dan spektroskopi karena lebih memuaskan dan akurat. Metoda yang umumnya dipakai untuk pengujian protein adalah metoda kolorimetri. Metoda ini digunakan berdasarkan pada kenyataan bahwa ion-ion logam dan senyawa berwarna tertentu terikat pada protein dalam perbandingan massa yang spesifik dan memiliki warna yang dapat diamati. Reagen pewarna ini akan bertambah intensitas serapannya dengan bertambahnya konsentrasi protein dalam larutan. Terdapat 3 metoda umum yang sering dipakai yaitu metoda Biuret, berdasarkan pada ikatan tembaga pada protein dalam kondisi basa. Komplek yang terbentuk antara tembaga dan protein berbanding lurus dengan konsentrasi protein dalam larutan. Metoda ini memiliki kemampuan deteksi protein pada konsentrasi 0,5 – 80 mg/ml (Copeland, 1994).

Metoda kedua adalah metoda Lowry. Metoda ini sama dengan metoda Biuret, tetapi menghasilkan intensitas warna yang lebih baik dan sensitivitasnya lebih baik dibandingkan metoda Biuret. Metoda ini dapat mendeteksi protein pada konsentrasi 1 – 300 µg/ml (Copeland, 1994).

Metoda ketiga adalah metoda Bradford, yang digunakan berdasarkan pada ikatan protein dengan zat warna Coomassie Brilliant Blue. Metoda ini memiliki kemampuan deteksi protein ≤ 25 µg/ml atau 200 – 400 µg/ml (Copeland, 1994).

2.11 Metoda Pengujian Asam Laktat.

Asam laktat tergolong asam organik yang dihasilkan dari proses fermentasi. Pada umumnya pada penelitian dalam fermentasi konsentrasinya dalam medium ditetapkan menggunakan KCKT karena lebih cepat dan akurat. Asam laktat juga dapat ditetapkan dengan metoda titrasi asam basa apabila dalam fermentasi diyakini bahwa asam yang dihasilkan hanya asam laktat (Narayan, 2004).

2.12 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metoda kimia dan fisikokimia, yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Diantara kelebihanannya jika dibandingkan metoda lain adalah : mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dengan kepekaan tinggi, dapat digunakan bermacam-macam detektor. Komponen KCKT terdiri dari pompa, injektor, kolom dan detektor (Gritter dkk, 1991).

Pada kromatografi cair komposisi fasa gerak adalah salah satu dari variable yang mempengaruhi pemisahan. Fasa gerak yang disukai dalam KCKT adalah murni atau tidak mengandung kontaminan, tidak bereaksi dengan wadah, sesuai dengan detektor dan melarutkan sampel (Putra, 2004).

Penentuan tipe KCKT yang akan digunakan, dilakukan dengan melihat informasi mengenai kelarutan, gugus fungsi yang ada, besarnya berat molekul. Berat molekul (BM) lebih besar dari 2000, maka kita dapat menggunakan kromatografi eksklusi. Fasa geraknya adalah air jika sampelnya larut air ; bila dapat larut dalam pelarut organik maka digunakan pelarut-pelarut organik. Fasa diamnya bisa Sephadex. Bila BM lebih rendah dari 2000, pertama yang harus ditentukan adalah apakah sampel larut dalam air. Bila sampel larut dalam air, maka kromatografi partisi fasa terbalik atau kromatografi penukar ion dapat digunakan. Bila kelarutan dipengaruhi oleh penambahan asam atau basa atau bila pH larutan bervariasi lebih dari 2 satuan pH dari pH 7, maka kromatografi penukar ion adalah pilihan utama. Bila kelarutan tidak dipengaruhi oleh asam dan basa dan larutan sampel adalah netral, maka kromatografi partisi fasa terbalik adalah pilihan terbaik (Putra, 2004).

2.13 Spektrofotometer

Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang di transmisikan atau yang di absorpsi. Penyerapan sinar uv dan sinar tampak oleh suatu molekul, melalui 3 proses yaitu penyerapan oleh transisi elektron ikatan dan elektron anti ikatan. Penyerapan oleh transisi elektron d dan f dari molekul kompleks. Penyerapan oleh perpindahan muatan. Interaksi antara energi cahaya dan molekul dapat digambarkan dalam persamaan $E = hv$, dimana E adalah energi (joule/second), h adalah tetapan plank dan v adalah frekuensi foton. Penyerapan sinar uv-vis dibatasi pada sejumlah gugus fungsional atau gugus kromofor (gugus dengan ikatan tidak jenuh) yang mengandung elektron valensi dengan tingkat eksitasi yang rendah. Dengan melibatkan 3 jenis elektron yaitu : sigma, phi dan non bonding elektron. Kromofor-kromofor organik seperti karbonil, alken, azo, nitrat dan karboksil mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak. Panjang gelombang maksimalnya dapat berubah sesuai dengan pelarut yang digunakan. Auksokrom adalah gugus fungsional yang mempunyai

elektron bebas, seperti hidroksil, metoksi dan amina. Terikatnya gugus auksokrom pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar (bathokromik) yang disertai dengan peningkatan intensitas (hyperkromik) (Underwood dan Day,1988).

Komponen dari suatu spektrofotometer berkas tunggal terdiri dari suatu sumber energi cahaya yang berkesinambungan yang meliputi daerah spectrum dimana instrument itu dirancang untuk beroperasi, monokromator yang merupakan suatu piranti untuk mengecilkan pita sempit panjang-panjang gelombang dari spectrum lebar yang dipancarkan oleh sumber cahaya, wadah sampel (kuvet), detektor, pengganda (amplifier), rangkaian yang membuat isyarat listrik memadai untuk di baca serta sistem baca (piranti pembaca) yang memperagakan besarnya isyarat listrik, menyatakan dalam bentuk % Transmitan (%T) maupun Adsorbansi (A) (Underwood,1988).

