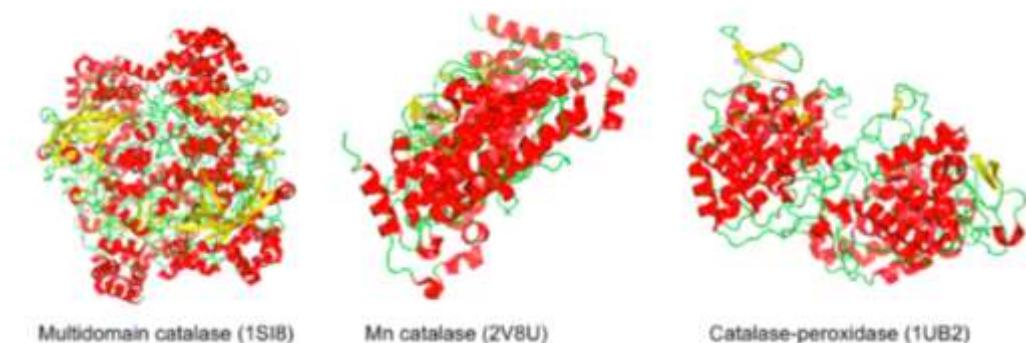


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Katalase

Katalase merupakan enzim antioksidan yang mengkatalisis hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen. Saat ini, setidaknya ada delapan *strain* yang dapat menghasilkan katalase yaitu, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus lysodeiktius*, *Thermoascus aurantiacus*, *Bacillus subtilis*, dan *Rhizobium radiobacte*.



Gambar 2.1. Struktur katalase (Brahmachari, Demain & Adrio, 2017)

Berdasarkan struktur dan urutannya, katalase terbagi menjadi tiga kelas (Gambar 2.1) yaitu, katalase monofungsional atau multidomain, pseudokatalase atau Mn katalase, dan katalase-peroksidase (Brahmachari, Demain & Adrio, 2017).

Menurut Nicholls, Fita & Loewen (2000), katalase terbagi menjadi empat jenis, yaitu:

1. Katalase Monofungsional (tipe A)

Katalase monofungsional merupakan kelompok katalase terbesar dan terbukti secara aktif sebagai tetramer. Kelompok katalase monofungsional dikategorikan berdasarkan ukuran subunit yang mengandung *heme* dan terbagi menjadi dua, yaitu katalase subunit kecil dengan bobot molekul 50-70 kDa yang mengandung *heme b* dan katalase subunit besar dengan bobot molekul 75-80 kDa yang mengandung *heme d*.

2. Katalase-Peroksidase (tipe B)

Katalase-peroksidase ini dapat menunjukkan aktivitas peroksidasi yang signifikan selain dengan aktivitas katalisnya. Katalase ini aktif baik sebagai dimer maupun tetramer. Kelompok katalase-peroksidase ini mengandung *heme b* dan memiliki subunit dengan bobot molekul > 80 kDa.

3. Katalase *Non-heme* (tipe C)

Kalase *non-heme* merupakan kelompok terkecil dan hanya ada tiga katalis *non-heme* yang dikarakterisasi dengan jumlah yang sama. Situs aktif dari ketiga enzim ini memiliki reaksi yang kaya mangan (Mn) dibandingkan dengan kelompok *heme*, sehingga kekurangan *heme* inilah yang menyebabkan kelompok ini disebut pseudokatalase. Enzim ini memiliki bobot molekul 170-210 kDa.

4. Protein Lain dengan Aktivitas Katalitik Minor (tipe D)

Beberapa protein yang mengandung *heme*, termasuk sebagian besar peroksidase telah diamati menunjukkan tingkat aktivitas katalitik yang rendah dengan kloroperoksidase. Enzim ini memiliki bobot molekul 42 kDa dan aktif sebagai monomer (Nicholls, Fita & Loewen, 2000).

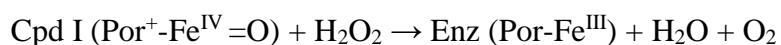
Reaksi katalase sangat sederhana dalam mendekomposisi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, dengan reaksi sebagai berikut:



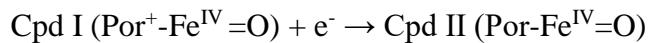
Jalur reaksi dibagi menjadi dua tahapan, yaitu tahap pertama melibatkan oksidasi *heme* besi dengan menggunakan substrat hidrogen peroksida untuk membentuk senyawa I. Spesies oksiferil dengan satu ekuivalen oksidasi yang terletak pada besi dan setara. Proses oksidasi kedua didelokalisasi dalam radikal kation *heme*, dengan reaksi sebagai berikut:



Tahap kedua, senyawa I direduksi menggunakan molekul kedua hidrogen peroksida sebagai donor elektron yang menyediakan dua ekuivalen oksidasi, dengan reaksi sebagai berikut:



Reduksi satu elektron dapat terjadi pada senyawa I dengan atau tanpa proton yang menghasilkan pembentukan senyawa II yang tidak aktif, dengan reaksi sebagai berikut:



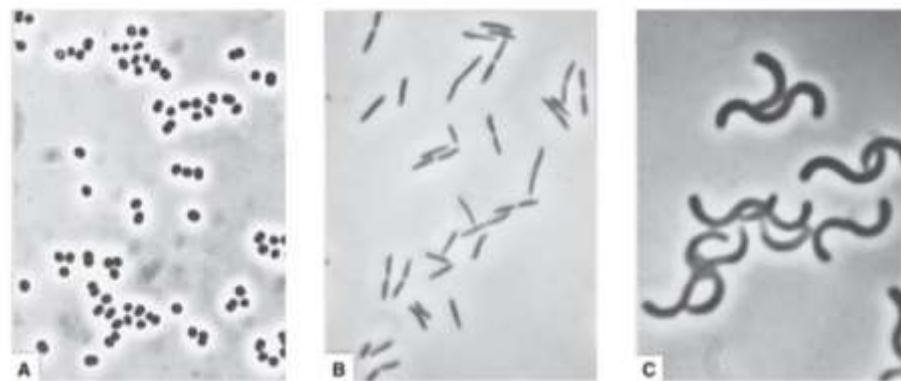
Heme dapat menimbulkan reaksi katalitik, yaitu reaksi yang dimediasi oleh katalase tetapi pada tingkat yang jauh lebih rendah. Apabila dibandingkan dengan protein katalitik yang mengandung *heme*, dan ini dapat menjelaskan aktivitas katalase dalam enzim yang biasanya tidak terkait dengan aktivitas katalis (Nicholls, Fita & Loewen, 2000).

Katalase dapat diproduksi dari berbagai sumber seperti mikroorganisme dan hewan seperti pada hati sapi. Enzim ini dapat diaplikasikan dalam industri makanan seperti

dalam produksi keju dan pada proses pengawetan susu. Katalase juga telah digunakan dalam industri tekstil, secara efektif dapat menghilangkan residu hidrogen peroksida sehingga kain akan terbebas dari peroksida (Kuddus, 2018). Dalam industri kosmetik enzim ini dapat digunakan pada pembersih lensa kontak, sisa hidrogen peroksida setelah desinfeksi dapat dihilangkan dengan enzim katalase yang mengandung *heme* sehingga dapat menurunkan hidrogen peroksida (Brahmachari, Demain & Adrio, 2017). Selain itu katalase juga dapat dibuat menjadi masker kecantikan dengan khasiat sebagai *anti-aging* (Indrayati *et al.*, 2016).

2.2. Bakteri

Bakteri merupakan kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk kedalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil. Hal ini menyebabkan organisme ini sangat sulit untuk dideteksi, terutama sebelum ditemukannya mikroskop. Dinding sel bakteri sangat tipis dan elastis, terbentuk dari peptidoglikan yang merupakan polimer unik yang hanya dimiliki oleh golongan bakteri. Fungsi dinding sel adalah untuk memberikan bentuk pada sel, memberikan perlindungan dari lingkungan luar dan mengatur pertukaran zat-zat dari dan ke dalam sel (Riedel *et al.*, 2019).



Gambar 2.2. Bentuk-bentuk bakteri: A) Coccus, B) Bacil, C) Spiral (Riedel *et al.*, 2019)

Berdasarkan bentuknya bakteri dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis yaitu berbentuk bulat (*coccus*) seperti *Staphylococcus*, dan *Streptococcus*, berbentuk batang (bacil) seperti *E. coli*, *Proteus*, dan *Pseudomonas*, berbentuk lengkung (spiral) seperti *Vibrio* sp. (Gambar 2.2.) (Riedel *et al.*, 2019).

Berdasarkan pewarnaan Gram bakteri dibagi menjadi dua yaitu, bakteri Gram-negatif dan bakteri Gram-positif. Teknik pewarnaan Gram ini merupakan teknik yang digunakan untuk menunjukkan perbedaan yang mendasar dalam organisasi struktur dinding sel bakteri. Bakteri Gram-positif memiliki dinding sel yang relatif tebal, terdiri dari berlapis-lapis polimer peptidoglikan. Tebalnya dinding sel ini yang menahan lolosnya kompleks kristal violet iodin ketika dicuci dengan alkohol atau aseton. Sedangkan, bakteri Gram-negatif memiliki dinding sel berupa lapisan tipis peptidoglikan, yang diselubungi oleh lapisan tipis *outer membrane* yang terdiri dari *lipopolysaccharide* (LPS). Daerah antara peptidoglikan dan lapisan LPS disebut *periplasmic space* (hanya ditemui pada Gram-negatif) adalah zona berisi cairan atau gel yang mengandung berbagai enzim dan *nutrient-carrier proteins*. Kompleks kristal violet iodin mudah lolos melalui LPS dan lapisan tipis peptidoglikan ketika sel diperlakukan dengan pelarut. Ketika sel diberi perlakuan pewarna tandingan Safranin O, pewarna tersebut dapat diserap oleh dinding sel bakteri Gram-negatif. Bakteri umumnya melakukan reproduksi atau berkembang biak secara aseksual dengan cara membelah diri (biner). Pembelahan sel pada bakteri adalah pembelahan biner yaitu setiap sel membelah menjadi dua. Selama proses pembelahan, material genetik juga menduplikasi diri dan membelah menjadi dua, dan mendistribusikan dirinya sendiri pada dua sel baru. Bakteri membelah diri dalam waktu yang sangat singkat. Pada kondisi yang menguntungkan berduplicasi setiap 20 menit (Riedel *et al.*, 2019).

2.3. Isolasi Enzim

Isolasi enzim dapat dilakukan menggunakan tiga metode non-mekanik untuk memisahkan suatu enzim yaitu secara kimiawi, fisika dan enzimatis. Metode secara kimiawi dilakukan dengan menambahkan bahan kimia yang dapat mengubah struktur dinding sel untuk memungkinkan terjadinya pemecahan sel, kelebihan dari penggunaan metode ini adalah bahan kimia yang mudah diperoleh, dan kelemahannya adalah menghasilkan limbah pada proses akhir sehingga membutuhkan proses penanganan yang tepat. Metode secara enzimatis dilakukan dengan penambahan suatu enzim yang dapat memecahkan dinding sel, kelebihan dari penggunaan metode ini adalah hasil yang diperoleh lebih banyak dibandingkan dengan metode yang lainnya, dan kelemahannya adalah harga enzim yang dibutuhkan relatif mahal. Metode secara fisika pada umumnya

dapat dilakukan dengan menggunakan *ultrasound* atau sonikator, dalam prosedur ini sel akan terganggu oleh gaya geser dan kavitas, kelebihan dari penggunaan metode ini adalah sederhana, efisien, dan menggunakan bahan kimia yang lebih sedikit. Adapun kelemahannya adalah diperlukannya suhu optimal untuk dipertahankan dengan mendinginkan suspensi sel karena dalam metode secara fisika ini dapat menghasilkan panas (Aehle, 2004). Pemecahan sel ini bertujuan agar protein dalam sel inang dapat dilepaskan dan berubah menjadi bentuk terlarut (Nasution *et al.*, 2018).

2.4. Purifikasi Enzim

Pemurnian merupakan proses menambahkan senyawa yang dapat memisah dan menggumpalkan protein dari bahan lainnya sehingga mendapatkan protein yang lebih murni (Aehle, 2004). Tujuan dilakukan purifikasi enzim adalah untuk mempertahankan dan memperkaya protein enzim yang digunakan dengan menghilangkan sebagian besar protein lain seperti DNA. Purifikasi enzim dapat dilakukan dengan mengkombinasikan beberapa teknik, seperti teknik pemisahan protein termasuk presipitasi, dialisis, dan kromatografi penukar ion (Punekar, 2018).

2.4.1. Presipitasi Fraksi

Enzim adalah molekul protein yang sangat kompleks yang memiliki kelompok yang terionisasi dan bersifat hidrofobik yang dapat berinteraksi dengan pelarut. Pengendapan merupakan prosedur yang sederhana dan paling banyak dilakukan untuk pengendapan protein. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan menambahkan garam, seperti natrium sulfat, natrium klorida, atau amonium sulfat (Aehle, 2004).

Amonium sulfat adalah garam yang sering digunakan untuk pemurnian enzim karena mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan garam lainnya, yaitu memiliki kelarutan yang tinggi, memiliki daya pengendapan yang efektif, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, dan memiliki stabilitas yang tinggi pada kebanyakan enzim. Kelarutan protein dapat dipengaruhi karena penambahan garam dengan konsentrasi tinggi. Hal ini terjadi karena adanya peningkatan muatan listrik pada protein yang dapat menarik protein dan molekul air. Prinsip kerja pada prosedur ini adalah proses pengendapan protein yang disebabkan karena adanya interaksi hidrofobik molekul protein pada suasana ionik yang tinggi (Scopes, 1994).

Purifikasi dengan penambahan amonium sulfat dapat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam yang tinggi, sehingga diperlukan proses dialisis dalam larutan dapar untuk menghilangkan amonium sulfat yang tersisa (Romualdo, Wuryanti & Suprihati, 2010).

2.4.2. Dialisis

Metode dialisis bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya yang memiliki berat molekul yang lebih rendah dibandingkan dengan protein enzim. Prinsip dialisis adalah dengan menggunakan membran semipermeabel untuk memisahkan molekul yang besar dari molekul yang kecil. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong dialisis (selofan) yang memiliki ukuran pori yang lebih kecil dibandingkan dengan protein sehingga protein dapat keluar dari kantong dialisis (selofan) (Dennison, 2002).

Dialisis terjadi karena adanya perpindahan garam amonium sulfat yang memiliki bobot molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan sampel dan digantikan dengan larutan dapar. Pada saat garam bergerak melalui pori-pori membran, maka garam akan teradsorpsi pada permukaan membran kemudian bergerak dari sisi membran yang lainnya. Proses ini dipengaruhi oleh adanya tekanan osmotik (Dennison, 2002; Arjita, 2009)

2.4.3. Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion adalah proses pemurnian senyawa dengan teknik pemisahan berdasarkan muatan molekul protein. Proses ini dilakukan dalam larutan campuran atau proses substitusi satu jenis senyawa ionik dengan yang lain terjadi pada permukaan fase stasioner. Fase stasioner tersebut merupakan suatu matriks yang kuat (rigid), yang permukaannya mempunyai muatan, dapat berupa muatan positif maupun negatif. Matriks yang digunakan untuk menghasilkan penukar ion harus bersifat hidrofilik untuk mencegah terjadinya denaturasi enzim dan memiliki kapasitas tinggi untuk molekul besar pada kesetimbangan yang cepat (Aehle, 2004).

Secara umum, terdapat dua jenis kromatografi penukar ion, yaitu:

1. Kromatografi penukar kation, yaitu apabila matriks yang digunakan bermuatan negatif sehingga dapat berfungsi sebagai penukar kation dengan molekul spesifik yang diinginkan bermuatan positif. Maka kolom kromatografi yang digunakan

- biasanya berupa matriks dekstran yang mengandung gugus karboksil dengan menggunakan larutan dapar seperti asam sitrat, asam laktat, asam asetat, dan fosfat.
2. Kromatografi penukar anion, yaitu apabila matriks yang digunakan bermuatan positif sehingga dapat berfungsi sebagai penukar anion, dengan molekul spesifik yang diinginkan bermuatan negatif. Maka kolom kromatografi yang digunakan biasanya berupa matriks dekstran dengan menggunakan larutan dapar seperti Tris, bis-Tris N-metil piperazin, dan etanolamin (Dennison, 2002).

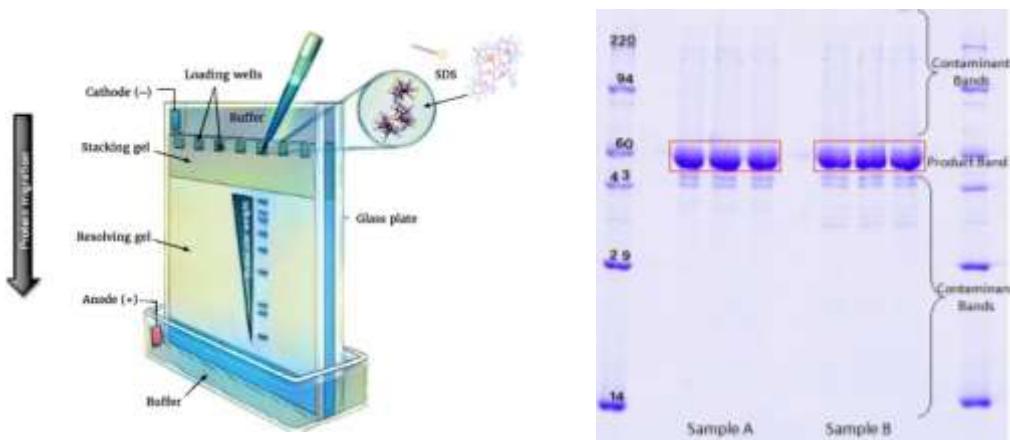
Metode ini didasarkan pada interaksi area hidrofobik molekul protein dengan kelompok hidrofobik pada matriks. Adsorpsi terjadi pada penggunaan konsentrasi garam yang tinggi, dan fraksinasi zat terikat yang dicapai dengan mengelusi dengan gradien negatif. Metode ini cocok untuk proses pemurnian enzim yang lebih lanjut setelah menggunakan pengendapan garam dengan konsentrasi yang tinggi seperti amonium sulfat (Aehle, 2004).

2.5. Karakterisasi Enzim

Penentuan karakterisasi enzim katalase meliputi penetapan bobot molekul, penetapan pH optimum dan penetapan suhu optimum dengan tahapan sebagai berikut:

2.5.1. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

SDS-PAGE adalah metode elektroforesis untuk memisahkan protein sesuai dengan berat molekulnya. Teknik ini dilakukan dengan menggunakan gel poliakrilamida yang mengandung *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). SDS adalah deterjen anionik yang dalam bentuk larutan terdiri dari 70-80 molekul dengan gugus hidrokarbon *dodecyl* dalam inti dan gugus sulfat dalam lapisan hidrofilik. SDS dan protein membentuk kompleks yang terdiri dari misel yang dihiasi protein yang dihubungkan oleh segmen polipeptida pendek yang fleksibel. SDS menutupi muatan protein dan kompleks anionik yang terbentuk dengan memiliki muatan negatif sekitar konstan per satuan massa. Selain SDS, zat pereduksi juga ditambahkan untuk memutus ikatan disulfida yang ada dalam protein. Ketika protein diperlakukan dengan SDS dan zat pereduksi, tingkat pemisahan elektroforesis dalam gel poliakrilamida sangat tergantung pada bobot molekul protein (Magdeldin, 2012).



Gambar 2.3. Alat SDS-PAGE dan hasil analisis menggunakan SDS-PAGE dengan terbentuknya pita protein (Kurien & Scofield, 2012)

Kunci untuk menentukan bobot molekul yang akurat adalah dalam memilih kondisi pemisahan yang menghasilkan hubungan linier antara logaritma dari bobot molekul dan migrasi protein. Migrasi protein di dalam gel poliakrilamida terutama ditentukan oleh muatan molekul dan juga dipengaruhi oleh ukuran molekul. Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan bobot molekulnya dengan satuan Kilo Dalton (kDa). Satu dalton sama dengan satu hidrogen molekul (Kurien & Scofield, 2012).

Analisis menggunakan SDS-PAGE ini terdiri dari dua jenis gel poliakrilamid, yaitu *stacking gel* dan *resolving gel* atau *separating gel*. *Stacking gel* berfungsi sebagai gel tempat meletakkan sampel dengan beberapa *well*, sedangkan *resolving gel* merupakan tempat dimana protein akan bergerak atau berpindah menuju anoda yang bermuatan positif (+). *Stacking gel* dan *resolving gel* memiliki komposisi yang sama, yang membedakannya hanya konsentrasi gel poliakrilamid pembentuknya, dengan konsentrasi *stacking gel* lebih rendah daripada *resolving gel* (Rachmania *et al.*, 2017).

2.5.2. pH Optimum

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, pH optimum diuji dengan menggunakan larutan dapar pada rentang pH pada suasa asam, normal, dan basa. Katalase yang diisolasi dari berbagai mikroorganisme memiliki pH optimum yang berbeda. Katalase memiliki pH optimum 7 yaitu yang diisolasi dari *Serratia marcescens* (Zeng, Cai & Liao, 2010), *Pigmentiphaga sp.* (Dong *et al.*, 2015), dan *Sternochetus mangiferae* (Damodaram *et al.*, 2016). Sedangkan katalase dengan pH optimum 10 yaitu

yang diisolasi dari *Acinetobacter sp.* (Fu *et al.*, 2014), *Acinetobacter gyllenbergii* (Muster *et al.*, 2015), dan *Escherichia coli* rekombinan (Ray *et al.*, 2012).

2.5.3. Suhu Optimum

Suhu optimum dapat menunjukkan kestabilan, aktivitas enzim dan tingkat inaktivasi yang mengarah pada kurva maksimum. Suhu optimum untuk enzim yang sama dapat bervariasi tergantung pada zat penstabil, pH, dan lain-lain (Punekar, 2018).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, katalase memiliki suhu optimum yang berbeda-beda karena penetapan hasil suhu optimum ini tergantung pada mikroorganisme yang memproduksi katalase dari hasil isolasi. Suhu optimum pada 60°C adalah hasil isolasi dari *Acinetobacter sp.* (Fu *et al.*, 2014), pada suhu 10-40°C adalah hasil isolasi dari *Escherichia coli* rekombinan (Ray *et al.*, 2012), pada suhu 56°C adalah hasil isolasi dari *Acinetobacter gyllenbergii* (Muster *et al.*, 2015), pada suhu 37°C adalah hasil isolasi dari *Pigmentiphaga sp.* (Dong *et al.*, 2015), pada suhu 20°C adalah hasil isolasi dari *Serratia marcescens* (Zeng, Cai & Liao, 2010), dan pada suhu 27°C dan 30°C adalah hasil isolasi dari *Sternochetus mangiferae* (Damodaram *et al.*, 2016).

2.6. Uji Aktivitas Enzim

Uji aktivitas enzim dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan metode Zimografi. Zimografi merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi enzim tertentu diantara pita-pita yang dipisahkan oleh elektroforesis. Metode ini biasanya bergantung pada reaksi spesifik enzim untuk menghasilkan warna dan menunjukkan posisi enzim. Sedangkan uji kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Metode ini merupakan metode yang paling umum digunakan untuk pengujian protein dengan cepat karena sederhana, memiliki sensitivitas dan tahan terhadap gangguan. Metode ini menggunakan pewarna seperti *Coomassie blue G-250*. Kelemahan dari uji Bradford ini adalah reagen yang digunakan biasanya menempel pada gelas dan peralatan plastik. Dengan demikian, penggunaan kuvet sekali pakai direkomendasikan tetapi pewarna juga dapat dihilangkan dengan menggunakan SDS (Dennison, 2002).

Uji aktivitas katalase secara umum dapat ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas O₂, dan menggunakan bakteri penghasil katalase sebagai kontrol positif. Larutan kontrol yang akan diuji diteteskan pada kaca preparat dan ditambah setetes H₂O₂, maka

gelembung gas O₂ pada sel tersebut akan timbul setelah 5 detik (Suhartanti, Sarjono & Aminin, 2010).