

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rayap (*Reticulitermes flavipes*)

Rayap adalah serangga sosial pemakan selulosa, yang berukuran sedang dan merupakan ordo isoptera dengan 1900 spesies di dunia. Mereka hidup dalam koloni-koloni, yang secara morfologi rayap dibedakan dalam bentuk-bentuk berlainan yaitu kasta reproduktif, pekerja, dan serdadu. Dalam suatu koloni kasta pekerja adalah individu yang paling banyak. Mereka berwarna pucat dan bertubuh lunak, dengan bagian-bagian mulut yang digunakan untuk mengunyah. Karena fungsi kerjanya tersebut rayap kasta pekerja paling banyak menimbulkan kerusakan pada bahan-bahan yang mengandung selulosa. Selulosa dalam makanan rayap dicerna oleh mikroba yang terdapat dalam saluran pencernaan.⁽⁴⁾

Rayap-rayap menduduki dua posisi dalam sudut ekonomi. Dari satu sudut, mereka sangat merusak benda-benda yang mengandung selulosa. Sebaliknya dari sudut lain mereka bermanfaat karena membantu dalam perombakan pohon-pohon yang mati dan bahan-bahan dari tumbuhan lainnya, menjadi zat-zat yang dapat dipakai oleh tanaman.⁽⁴⁾

Enzim selulase yang dihasilkan mikroba dalam rayap secara ekonomi sangat berguna dalam berbagai industri, namun penggunaannya masih sangat terbatas.^(5,6)

Adapun klasifikasi rayap adalah sebagai berikut:

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Subkelas	: Pterygota
Ordo	: Isoptera
Famili	: Rhinotermitidae
Genus	: Reticulitermes
Species	: <i>Reticulitermes flavipes</i>

Dalam famili Rhinotermitidae terdapat kasta pekerja, famili ini banyak menimbulkan kerusakan dan penyebarannya sangat luas.^(4,7)

2.2 Enzim

Enzim adalah protein yang banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi sebagai katalisator dalam reaksi biokimia (biokatalisator).[®] Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang jauh lebih besar dari katalisator sintetik. Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Aktivitas enzim bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim seperti halnya protein lain mempunyai berat molekul antara 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran sangat besar dibandingkan dengan substratnya.[®]

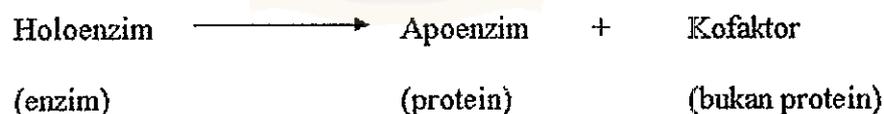
Oleh *Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry*, enzim dibagi dalam enam golongan besar. Penggolongan berdasarkan atas tipe reaksi

yang dikatalis oleh enzim, sehingga dikelompokkan menjadi 6 golongan yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase.⁹⁾

2.2.1 Komponen Enzim

Sejak tahun 1926 pengetahuan tentang enzim berkembang dengan cepat. Berdasarkan hasil penelitian para ahli biokimia ternyata bahwa banyak enzim yang mempunyai gugus bukan protein sehingga dapat dikatakan enzim merupakan protein majemuk. Enzim seperti ini terdiri atas protein (apoenzim) dan suatu gugus bukan protein (kofaktor). Kofaktor ada yang terikat kuat pada protein, ada pula yang tidak begitu kuat ikatannya. Gugus yang terikat kuat pada bagian protein, artinya yang sukar terurai dalam larutan disebut gugus prostetik, sedangkan yang tidak begitu kuat ikatannya, atau yang mudah dipisahkan secara dialisis disebut koenzim. Baik gugus prostetik maupun koenzim merupakan bagian enzim yang memungkinkan enzim bekerja terhadap substrat, yaitu zat-zat yang diubah atau direaksikan oleh enzim.⁹⁾

Keterkaitan antara apoenzim, kofaktor dan holoenzim dapat digambarkan sebagai berikut:



Kofaktor bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein yang disebut apoenzim akan terdenaturasi oleh pemanasan.⁹⁾ Kofaktor dapat juga berupa ion-ion seperti Fe^{2+} , Mn^{2+} atau Zn^{2+} .⁹⁾

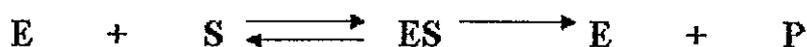
2.2.2 Fungsi dan Mekanisme Kerja Enzim

Fungsi suatu enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Seperti juga katalis lainnya, maka enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Reaksi kimia ada yang membutuhkan energi (reaksi endergonik) dan ada pula yang menghasilkan energi (reaksi eksergonik).⁹⁾

Suatu enzim mempunyai kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Untuk dapat bekerja terhadap suatu zat atau substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat. Suatu enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat. Oleh karena itu tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat disebut bagian aktif (*active site*). Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat dapat menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim.⁹⁾

Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang aktif yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi.

Mekanisme pembentukan dan peruraian kompleks dapat digambarkan sebagai berikut:



Ada dua teori yang dapat menerangkan mekanisme pengikatan substrat oleh enzim. Pertama, teori kunci dan anak kunci (*lock and key*) yang menyatakan bahwa bentuk ruang dan konformasi bagian aktif enzim adalah khusus sedemikian rupa sehingga molekul substrat dengan bentuk yang khusus pula akan dapat masuk pada bagian aktif seperti sepasang kunci dan anak kuncinya. Kedua, teori *induced fit* yang menyatakan bahwa perubahan konformasi molekul enzim terjadi untuk menyesuaikan dirinya dengan bentuk molekul substrat, jadi kompleks yang terjadi antara substrat dan enzim itu disebabkan oleh induksi substrat terhadap konformasi enzim. Dalam hal ini fleksibilitas konformasi enzim merupakan fungsi dari proses katalitik. Perubahan konformasi yang terjadi dapat ditentukan dengan berbagai cara pengukuran rotasi optik.⁽¹⁰⁾

2.2.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Konsentrasi Enzim

Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu (substrat yang digunakan berlebih), kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.⁽¹⁰⁾

Konsentrasi Substrat

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Keadaan ini telah diterangkan oleh Michaelis-Menten dengan hipotesis mereka tentang terjadinya kompleks enzim-substrat.⁹⁾

S u h u

Oleh karena reaksi kimia itu dapat dipengaruhi oleh suhu, maka reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Namun karena enzim adalah suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi maka bagian aktif enzim akan terganggu. Kenaikan suhu pada saat mulai terjadinya proses denaturasi akan mengurangi kecepatan reaksi. Oleh karena ada dua pengaruh yang berlawanan maka akan terjadi suatu titik optimum, yaitu suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim tersebut.⁹⁾

Pengaruh pH

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda (zwitter ion). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap

efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. Di samping berpengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.⁹⁾

Pengaruh Inhibitor

Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan irreversibel dan reversibel. Hambatan irreversibel umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan reversibel dapat berupa hambatan bersaing dan hambatan tidak bersaing. Hambatan bersaing disebabkan karena adanya molekul yang mirip dengan substrat yang dapat membentuk kompleks enzim-inhibitor pada bagian aktif enzim sehingga mengganggu pembentukan kompleks enzim-substrat. Hambatan tidak bersaing terjadi bila inhibitor bergabung dengan enzim pada suatu bagian enzim di luar bagian aktif. Kompleks yang terbentuk berupa kompleks enzim-inhibitor atau enzim-substrat-inhibitor, keduanya bersifat inaktif.⁹⁾

2.2.4 Persamaan Michaelis-Menten

Pada tahun 1913 Leonor Michaelis dan Maude Menten mengajukan suatu hipotesis bahwa dalam reaksi enzim terjadi lebih dahulu kompleks enzim-substrat yang kemudian menghasilkan produk dan enzim kembali. Secara sederhana hipotesis Michaelis dan Menten itu dapat dituliskan sebagai berikut :



Michaelis dan Menten berkesimpulan bahwa kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi kompleks enzim-substrat (ES), sebab apabila tergantung pada konsentrasi substrat (S), maka pada konsentrasi enzim yang konstan penambahan konsentrasi substrat akan menghasilkan penambahan kecepatan reaksi yang apabila digambarkan akan merupakan garis lurus. Jadi secara umum reaksi dengan enzim dituliskan sebagai berikut : \odot



k_1 , k_2 , dan k_3 masing-masing ialah tetapan (konstanta) kecepatan reaksi pembentukan kompleks ES, tetapan kecepatan reaksi pembentukan kembali E dan S, dan tetapan kecepatan reaksi penguraian kompleks ES menjadi enzim dan hasil reaksi.

Dalam keadaan keseimbangan maka kecepatan pembentukan ES sama dengan kecepatan penguraian ES. Berdasarkan prinsip tersebut maka diperoleh suatu persamaan Michaelis-Menten yaitu :

$$V = \frac{V_{maks}(S)}{Km + (S)} \dots \dots \dots (1)$$

Persamaan ini dapat pula dinyatakan sebagai:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km + (S)}{V_{maks}} \dots \dots \dots (2)$$

atau

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{maks}} \dots\dots\dots (3)$$

Persamaan (3) apabila dibuat grafik hubungan antara $1/V$ dan $1/(S)$ akan terjadi garis lurus. Persamaan (3) disebut persamaan Lineweaver-Burk. Persamaan ini dapat memberikan informasi mengenai reaksi enzim yang diinhibisi.⁹

2.2.5 Inhibisi Reaksi Enzimatik

Ada 2 macam inhibisi reversibel yaitu: inhibisi bersaing (competitive inhibition) dan inhibisi tak bersaing (noncompetitive inhibition). Inhibisi bersaing dapat dihilangkan dengan memperbesar konsentrasi substrat, sedangkan inhibisi tak bersaing tidak dapat.

Inhibisi bersaing

Persamaan Michaelis-Menten untuk reaksi inhibisi bersaing ialah :

$$V = \frac{V_{maks}(S)}{(S) + K_m \left\{1 + \frac{(I)}{K_i}\right\}} \quad \text{atau} \quad V = \frac{V_{maks}}{\left(1 + \frac{K_m}{(S)} \left\{1 + \frac{(I)}{K_i}\right\}\right)} \dots\dots\dots (4)$$

Persamaan tersebut bila diubah dalam persamaan Lineweaver-Burk diperoleh:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} \left\{ \frac{K_m}{V_{maks}} \left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right) \right\} + \frac{1}{V_{maks}} \dots\dots\dots (5)$$

Inhibisi Tak Bersaing

Persamaan Michaelis-Menten untuk reaksi inhibisi tak bersaing ialah: ⁽¹⁰⁾

$$V = \frac{V_{maks}}{\left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right)\left(1 + \frac{Km}{(S)}\right)} \dots\dots\dots(6)$$

Sedangkan persamaan Lineweaver-Burk didapatkan sebagai berikut:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{(S)} \left\{ \frac{Km}{V_{maks}} \left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right) \right\} + \frac{1}{V_{maks}} \left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right) \dots\dots\dots(7)$$

2.2.6 Penentuan Aktivitas Enzim

Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim adalah 1 μmol produk yang terbentuk dari substratnya per menit dalam keadaan optimal sistem tersebut. Aktivitas spesifik merupakan jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein enzim tersebut. ⁽¹⁰⁾

Menurut Cahyono, (1995) aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam banyaknya μmol produk (glukosa) yang terbentuk per satuan waktu inkubasi dalam keadaan optimalnya. ⁽²⁾

Dalam penelitian ini aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan satuan waktu inkubasi optimum, sehingga 1 unit aktivitas enzim selulase merupakan 1 μmol produk (glukosa) yang terbentuk dari substratnya per satuan waktu inkubasi dalam keadaan optimal sistem tersebut.

Karena produk yang terbentuk adalah glukosa, maka banyaknya μmol produk yang terbentuk dihitung berdasarkan rumus kurva standar larutan glukosa, sedangkan kadar protein dihitung sesuai rumus kurva standar larutan BSA (Bovine Serum Albumin). Kadar protein harus diketahui untuk menentukan aktivitas spesifik enzim selulase.

2.3 Enzim Selulase

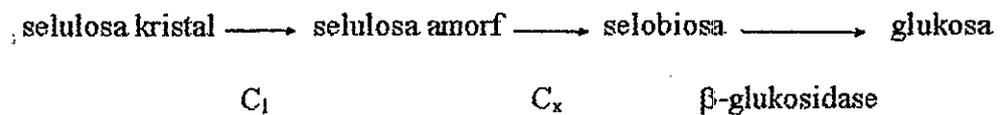
Enzim selulase merupakan enzim hidrolase yang bekerja mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan β (1,4)-glikosida dalam selulosa. Enzim selulase dihasilkan oleh mikroorganisme, hewan moluska, ketam, rayap, dan hewan memamah biak yang mengandung mikroorganisme selulolitik.

Enzim selulase adalah enzim ekstrasel multikompleks yang terdiri atas 3 komponen yaitu:

- Enzim C_1 (1,4- β -D-glukan 4-glukan selobiohidrolase atau selobiohidrolase atau eksoglukanase). Enzim ini bekerja pada daerah selulosa kristalin dan diubah menjadi selulosa amorf dengan susunan yang renggang.

- Enzim C_x (1,4- β -D-glukan 4-glukanhidrolase atau endoglukanase)
- Enzim β -glukosidase

Secara umum reaksinya sebagai berikut : ^(3,11)



Menurut Wood dan Sogar (1995), enzim C_x menghidrolisis selulosa amorf menjadi selobiosa, enzim β -glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa, dan enzim C_1 berperan dalam memecah bagian kristal rantai selulosa. Menurut Gordon dan Philips (1989), pelarutan selulosa menjadi produk terlarut diketahui sebagai gula pereduksi pada medium. Sedangkan untuk mengetahui aktivitas eksoglukanase terhadap kristal selulosa digunakan substrat selulosa mikrokristalin (avicel) dan untuk aktivitas enzim endoglukanase terhadap selulosa amorf digunakan substrat CMC (carboxymethyl cellulose). ⁽²⁾

Aktivitas enzim selulase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

a. Derajat keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) optimum enzim selulase pada umumnya antara 4,5 sampai 6,5. Harga pH optimum dari enzim yang sama dapat berbeda-beda tergantung dari substrat dan perbedaan harga pH dengan penggunaan substrat yang sama dipengaruhi oleh metode pengujian.

b. Temperatur

Enzim selulase sangat stabil dengan pemanasan sampai suhu tertentu. Sehingga enzim ini mampu tidak terdenaturasi pada kondisi temperatur tersebut. Aktivitas enzim selulase maksimum pada temperatur optimum antara 40-60°C.

c. Faktor Penghambat

Enzim selulase sangat dihambat aktivitasnya oleh glukanolakton. Pengaruh inhibisi oleh adanya logam berat, seperti garam-garam tembaga, perak, dan merkuri dapat dinetralkan dengan sistein. Setelah penetralan inhibisi maka aktivitas enzim mulai tampak lagi.

Meskipun kemungkinan kelarutan dan sakarifikasi selulosa dalam banyak tanaman kayu berserat sering terjadi, namun penggunaan selulase dalam industri makanan masih sedikit dilakukan. Alasan utama adalah tidak tersedianya preparasi enzim yang potensial, yang bereaksi dengan cepat pada substrat tak larut.^(1,12,13)

2.4 Teknik Sentrifugasi

Teknik sentrifugasi adalah suatu teknik pemisahan yang dilakukan berdasarkan sifat partikel dalam medan gaya sentrifugal. Partikel yang berbeda dalam berat jenis, ukuran, dan bentuk akan mengendap searah dengan gaya sentrifugal, dengan kecepatan yang berbeda. Kecepatan pengendapan tergantung gaya sentrifugal yang mengenai partikel searah dengan jari-jari radial ke arah luar (menjauhi sumbu).

Gaya sentrifugal ditentukan oleh kecepatan sudut (ω) dan jarak radial atau jari-jari (r). Gaya tersebut dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$G = \omega^2 r$$

Partikel yang akan dipisahkan biasanya disuspensikan dalam medium cair yang dimasukkan dalam tabung sentrifuge yang ditempatkan dalam rotor yang berputar. Rotor terletak pada pusat sumbu simetris. (14)

2.5 Presipitasi

Pengendapan protein dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda dari penambahan garam tersebut pada kelarutan protein. Proses ini dipengaruhi oleh konsentrasi dan jumlah muatan pada tiap ion dalam larutan. Dalam proses ini garam divalen seperti $MgCl_2$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ lebih efektif daripada garam monovalen seperti $NaCl$, NH_4Cl , dan KCl . Bila konsentrasi garam netral yang ditambahkan tersebut dinaikkan terus, maka kelarutan protein menjadi berkurang, sampai pada konsentrasi tertentu protein akan mengalami pengendapan, efek ini disebut *salting out*. Cara *salting out* ini dapat dipakai untuk pemisahan protein dalam campuran, karena tiap jenis protein mempunyai respon yang berbeda pula terhadap konsentrasi garam netral. (10)

Penambahan garam ammonium sulfat dalam proses pengendapan didasarkan pada rumus:

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}$$

di mana g = massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan pada larutan (gram)

S_1 = kadar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada penambahan pertama (%)

S_2 = kadar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada penambahan kedua (%)

Dari rumus tersebut telah dibuat suatu tabel penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada kejenuhan tertentu sehingga memudahkan dalam melakukan perhitungan untuk penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada fraksi berikutnya. ⁽¹⁵⁾

2.6 Dialisis

Salah satu cara yang dapat dilaksanakan untuk pemurnian suatu biomolekul adalah dialisis. Dialisis digunakan untuk memisahkan molekul besar dan kecil menggunakan membran semipermeabel (yang dapat dilewati molekul kecil tetapi menahan molekul besar). Membran yang digunakan biasanya berupa selofan atau kantong dialisis. Suatu campuran molekul besar dan kecil ditempatkan dalam sebuah kantong dialisis yang dimasukkan pada suatu pelarut dengan konsentrasi sangat rendah. Molekul kecil dapat melewati membran menuju cairan di luarnya (buffer) hingga kesetimbangan tercapai. Kecepatan dialisis tergantung pada beberapa faktor yaitu membran, preparasi, pelarut, larutan makromolekul dan lain-lain. ⁽¹⁶⁾

Selama proses dialisis suhu diatur sedemikian rupa sehingga adanya pengadukan menggunakan magnetic stirrer yang berlangsung selama 8-10 jam tidak menaikkan suhu. Suhu yang meningkat dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Untuk mencegah peningkatan suhu maka di sekeliling beaker glass yang berisi dialisat ditambahkan es. (6,17)

Menurut Agustini (1994) pada proses dialisis enzim selulase, suhu optimumnya adalah 10°C. Pada penelitian yang dilakukannya dengan variasi suhu 2,5; 7,5; 10 dan 15°C ternyata aktivitas tertinggi terdapat pada proses dialisis dengan suhu 10°C. (1)

