

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim merupakan protein yang banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi sebagai katalisator dalam reaksi biokimia (*biokatalisator*)^[1,2,3,4,5]. Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang jauh lebih besar dari katalisator sintetik. Aktivitas enzim tergantung pada integritas struktur sebagai protein. Enzim mempunyai berat molekul antara 12.000 sampai lebih dari satu juta, oleh karena itu berukuran sangat besar bila dibandingkan dengan substrat^[2,3].

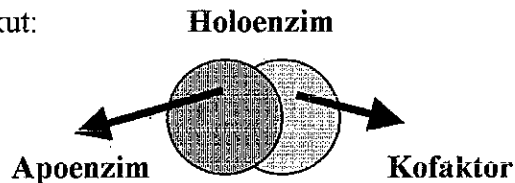
Oleh Commission on Enzyme of The International Union Biochemistry, enzim dibagi dalam enam golongan besar. Penggolongan berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis oleh enzim, sehingga dikelompokkan menjadi 6 golongan, yaitu *oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase*^[1,2,3,4].

2.1.1 Komponen enzim

Berdasarkan hasil penelitian para ahli biokimia, ternyata banyak enzim yang mempunyai gugus bukan protein sehingga dapat dikatakan enzim merupakan protein majemuk. Enzim terdiri dari protein (apoenzim) dan gugus bukan protein (kofaktor). Kofaktor ada dua macam, kofaktor yang terikat kuat pada protein dan sukar terurai dalam larutan disebut gugus

prostetik, sedangkan kofaktor yang lemah ikatannya dan mudah terurai dalam larutan disebut koenzim. Gugus prostetik maupun koenzim merupakan bagian enzim yang memungkinkan enzim bekerja terhadap substrat, yaitu zat-zat yang diubah atau direaksikan oleh enzim^[1,2,3,4].

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



Kofaktor bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein akan terdenaturasi oleh pemanasan. Kofaktor dapat berupa ion-ion seperti Fe^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} atau Zn^{2+} [2,3,8].

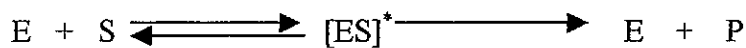
2.1.2. Fungsi dan Mekanisme Kerja Enzim

Enzim berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun luar sel. Enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 - 10^{11} kali lebih cepat daripada bila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Seperti katalis lainnya, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia^[1,2,3,4].

Enzim mempunyai sifat spesifik yaitu hanya dapat bereaksi terhadap substrat tertentu pada sisi aktif enzim. Enzim dapat bekerja pada suatu zat atau substrat bila terjadi hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat. Bagian enzim yang dapat menampung substrat disebut sisi aktif enzim. Tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat.

Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif enzim^[1,2,3,4].

Hubungan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat, yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Mekanisme pembentukan dan peruraian kompleks dapat digambarkan sebagai berikut:



Teori kunci dan anak kunci (*lock and key*) yang menyatakan bahwa bentuk ruang dan konformasi bagian aktif enzim adalah khusus sehingga molekul substrat dengan bentuk yang khusus pula akan dapat masuk pada bagian aktif enzim seperti sepasang kunci dan anak kuncinya^[1,2,3,4].

2.1.3 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Kerja Enzim

- *Konsentrasi Enzim*

Kecepatan reaksi berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi enzim sehingga kecepatan reaksi akan meningkat dengan bertambahnya jumlah enzim sebagai katalis pada suatu substrat^[1,2,3,4].

- *Konsentrasi substrat*

Kenaikan konsentrasi substrat, menyebabkan terjadinya peningkatan kecepatan reaksi, akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, peningkatan kecepatan reaksi sudah tidak terjadi lagi, walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Hal ini disebabkan karena enzim telah jenuh terhadap substrat^[1,2,3,4].

- *Suhu*

Reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang rendah, reaksi berlangsung sangat lambat, tetapi dengan adanya kenaikan suhu yang terus menerus akan menyebabkan enzim terdenaturasi^[1,2,3,4].

Enzim merupakan suatu protein, sehingga bila terjadi proses denaturasi maka bagian aktif enzim akan terganggu. Kenaikan suhu pada saat mulai terjadinya proses denaturasi akan mengurangi kecepatan reaksi, karena ada dua pengaruh yang berlawanan maka akan terjadi suatu titik optimum, yaitu suhu yang paling tepat untuk reaksi yang menggunakan enzim tersebut^[1,2,3,4].

- *Pengaruh pH*

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau bermuatan ganda (zwitter-ion). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap aktivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Selain berpengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah atau tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan hal ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim^[1,2,3,4].

- *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 pada suatu bagian enzim selain sisi aktif enzim. Kompleks yang terbentuk berupa kompleks enzim inhibitor atau enzim-substrat-inhibitor, keduanya bersifat inaktif^[1,2,3,4].

2.2. Selulase

Selulase merupakan nama umum atau trivial bagi enzim, sedang nama sistematiknya adalah β -1,4-glukan-4-glukanohidrolase (EC 3.2.1.4.). Istilah selulase mula-mula digunakan khusus untuk enzim yang dapat memecah selulosa kapas saja, tetapi sekarang digunakan dalam arti yang lebih luas yaitu suatu enzim yang dapat memecah ikatan glikosidik β -1,4^[1,8].

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler multikompleks yang terdiri dari 3 komponen, yaitu:

- Enzim C_1 (1,4- β -D-glukan selobiohidrolase atau selobiohidrolase atau eksoglukanase). Enzim ini bekerja pada daerah selulosa kristalin dan diubah menjadi selulosa amorf dengan susunan yang renggang.
- β -glukanase yang terbagi dalam dua jenis yaitu:
 1. Ekso- β -1,4-glukanase, merupakan glukoamilase

2. Endo- β -1,4-glukanase menghidrolisis molekul selulosa secara acak. Endo- β -1,4-glukanase inilah yang disebut faktor C_x .

- β -glukosidase: afinitasnya tinggi terhadap molekul kecil^[1,4,7,8].

Reaksi hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dijelaskan sebagai berikut.^[1,4,7,8]



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^[1,4,7,8]. Pelarutan selulosa menjadi produk terlarut diketahui sebagai gula pereduksi pada medium^[7]. Substrat selulosa mikrokristalin (*avicel*) digunakan untuk mengetahui aktivitas eksoglukanase terhadap kristal selulosa sedangkan untuk aktivitas enzim endoglukanase terhadap selulosa amorf digunakan substrat karboksi metil selulosa (CMC)^[11].

Struktur enzim selulase mempunyai 434 asam amino. Asam amino yang menyusun sisi aktif enzim adalah asam amino histidin, asam aspartat dan asam glutamat, sedangkan pada rantai polipeptidanya, asam amino yang bukan merupakan sisi aktif enzim adalah asam amino sistein, alanin, fenilalanin, glisin, isoleusin, metionin, asparagin, prolin, glutamin, arginin, serin, treonin, valin, triptofan dan tirosin^[12,13].

2.3. Rayap

Rayap adalah serangga pemakan selulosa, merupakan ordo isoptera dengan 1900 spesies di dunia. Rayap hidup dalam koloni-koloni, yang dibedakan dalam beberapa kasta yaitu kasta reproduktif, pekerja dan serdadu. Koloni kasta pekerja adalah individu yang paling banyak, 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 bagian-bagian yang mengandung selulosa^[5].

Rayap dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

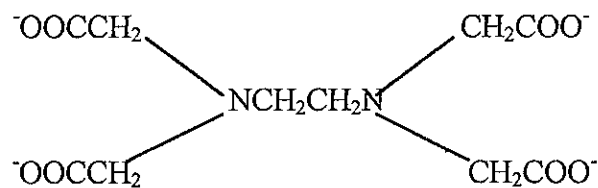
- Filum : *Arthropoda*
- Kelas : *Insecta*
- Subkelas: *Pterygota*
- Ordo : *Isoptera*
- Famili : *Rhinotermitidae*
- Genus : *Reticulitermes*
- Species : *Reticulitermes flavipes*

Dalam famili *Rhinotermitidae* terdapat kasta pekerja, famili ini banyak menimbulkan kerusakan dan penyebarannya sangat luas^[5,14].

2.4. EDTA^[15,16]

Etilen diamin tetra asetat (EDTA) merupakan ligan yang dapat berkoordinasi dengan suatu ion logam melalui kedua nitrogen dan keempat

gugus karboksilnya. Struktur Etilen Diamin Tetra Asetat adalah sebagai berikut:



2.5. Ion Tembaga(II)^[17]

Di antara berbagai kristal hidrat lainnya, sulfat biru, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang paling dikenal. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dapat terdehidrasi menjadi zat anhidrat yang berwarna putih. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bila dipanaskan, mula-mula hanya melepaskan empat molekul air, untuk melepaskan molekul air yang kelima diperlukan pemanasan dengan suhu yang lebih tinggi. Hal tersebut disebabkan karena molekul air yang terakhir diikat dengan ikatan hidrogen sehingga butuh energi yang lebih tinggi untuk memutuskannya. Penambahan ligan pada larutan sulfat biru menyebabkan pembentukan kompleks dengan pertukaran molekul air secara berurutan^[17].

Ligan-ligan *multidentat* yang mengoordinasi melalui O dan N, seperti asam amino, membentuk kompleks kupri yang stabil^[18].

2.6. Penentuan Aktivitas Enzim dengan Metode Nelson-Somougyi

Aktivitas enzim dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menghitung pengurangan substrat atau pembentukan produk yang diperoleh pada proses enzimatik. Metode Nelson-Somougyi dilakukan untuk analisis

gula pereduksi (glukosa, fruktosa, dan selobiosa) secara kuantitatif. Prinsip metode Nelson-Somougyi adalah reaksi reduksi ion tembaga oleh gula pereduksi^[19,20].

Aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan mmol produk glukosa yang terbentuk akibat proses hidrolisis CMC pada kondisi optimum enzim tersebut. Satu unit aktivitas enzim adalah aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan 1mmol substrat atau produk per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimumnya^[7,9,20].

2.7. Spektrofotometri

Metode yang digunakan dalam mengukur aktivitas enzim selulase dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri. Prosedurnya berupa penentuan produk (glukosa) dengan analisis serapan sinar. Sesuai hukum Lambert-Beer diperoleh:

$$-\log T = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana: T: Transmittansi

A: Absorbansi

ϵ : Koefisien ekstingsi molar produk

b: Tebal cuvet

c: Konsentrasi

Pada pengukuran, ϵ dan b dianggap konstan, dan penentuan absorbansi atau transmitansi dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi yang belum diketahui^[21,22].

Banyaknya produk glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Kuantitas glukosa dihitung berdasarkan rumus persamaan garis lurus dari kurva standar glukosa.

Metode spektrofotometri juga digunakan dalam penentuan kadar protein enzim. Kadar protein dihitung berdasarkan rumus persamaan garis dari kurva standar kasein. Nilai kadar protein digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim yang menunjukkan jumlah unit aktivitas per miligram protein yang menggambarkan tingkat kemurnian enzim.

2.8. Teknik Sentrifugasi

Teknik sentrifugasi merupakan 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 dan jarak radial atau jari-jari. Partikel yang akan dipisahkan biasanya disuspensikan dalam medium cair yang

dimasukkan dalam tabung sentifuga yang ditempatkan dalam rotor berpusing, yang terletak pada sumbu simetri^[19,23].

2.9. Presipitasi

Pengendapan protein dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda dari penambahan garam tersebut pada kelarutan protein. Proses tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi dan jumlah muatan ion-ion garam dalam larutan protein. Pada proses tersebut garam divalen seperti $MgCl_2$, $MgSO_4$, dan $(NH_4)_2SO_4$ 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 tersebut disebut *salting out*. Cara tersebut dapat dipakai untuk pemisahan protein dalam campuran, karena tiap jenis protein mempunyai respon yang berbeda pula terhadap konsentrasi garam netral^[19,23,24].

2.10. Dialisis

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk pemisahan biomolekul adalah dialisis. Dialisis dapat digunakan untuk memisahkan protein dari ion-ion garam dengan menggunakan membran semipermeabel yang dapat dilewati oleh ion-ion garam tetapi menahan molekul protein. Prinsip dialisis didasarkan pada sifat difusi aktif dari partikel-partikel atau ion-ion dalam

larutan karena adanya perbedaan konsentrasi larutan yang ada di dalam dan di luar membran. Membran yang digunakan biasanya berupa kantong selofan atau kantong dialisis^[25].

Proses dialisis dilakukan pada suhu rendah. Berdasarkan literatur, aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh pada proses dialisis dengan suhu 10°C ^[10].

