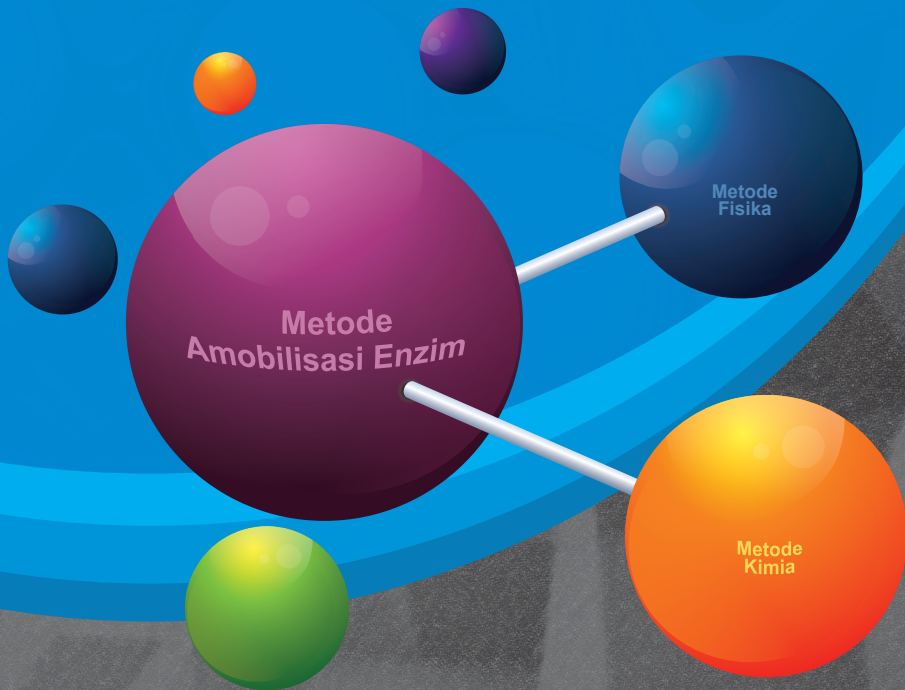


PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM



Yandri A.S.
Tati Suhartati

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM

**Yandri A.S.
Tati Suhartati**

AURA
ANUGRAH UTAMA RAHARJA

Hak cipta pada penulis
Hak penerbitan pada penerbit
Tidak boleh diproduksi sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun
Tanpa izin tertulis dari pengarang dan/atau penerbit

Kutipan Pasal 72 :

Sanksi pelanggaran Undang-undang Hak Cipta (UU No. 10 Tahun 2012)

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal (49) ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah)
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau hasil barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

**PENINGKATAN
KESTABILAN
ENZIM**

Perpustakaan Nasional RI:
Katalog Dalam Terbitan (KDT)

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM

Penulis:

Yandri A.S.
Tati Suhartati

editor:

Prof. Dr. Sutopo Hadi, M.Sc.

Desain Cover & Layout

Team Aura Creative

Penerbit

AURA

CV. Anugrah Utama Raharja

Anggota IKAPI

No.003/LPU/2013

xviii + 110 hal : 15,5 x 23 cm

Cetakan, Februari 2018

ISBN: 978-602-5636-32-5

Alamat

Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro, Komplek Unila

Gedongmeneng Bandar Lampung

HP. 081281430268

E-mail : redaksiaura@gmail.com

Website : www.aura-publishing.com

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

KATA PENGANTAR

Penulis mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT, karena dengan Rahmat dan Karunia -Nya, Penulis berhasil menyelesaikan penulisan buku dengan judul Peningkatan Kestabilan Enzim. Tujuan penulisan buku ini untuk membantu mahasiswa memahami proses-proses untuk meningkatkan kestabilan enzim khususnya melalui proses modifikasi kimia dan amobilisasi. Buku ini memuat hasil-hasil penelitian tentang peningkatan kestabilan enzim melalui proses modifikasi kimia dan amobilisasi. Mudah-mudahan dengan membaca buku ini, dapat membantu mahasiswa terutama yang dalam proses menyelesaikan tugas akhir dengan topik enzim.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Dit. Litabmas atas dukungan dana dalam bentuk Penelitian Hibah Kompetensi tahun anggaran 2014 - 2016. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Rektor dan Ketua LPPM Universitas Lampung atas dukungan dana dalam bentuk Hibah Penelitian Profesor Universitas Lampung tahun anggaran 2017.

Penulisan buku ini masih jauh dari sempurna, mohon kritik dan sarannya untuk penyempurnaan penulisan lebih lanjut.

Bandar Lampung, 5 Januari 2018
Penulis,

Yandri A.S.
NIP 195609051992031001

PENGANTAR EDITOR

Saya telah membaca dan menelaah buku referensi dengan judul Peningkatan Kestabilan Enzim yang ditulis oleh Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S. dan Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., dan saya temukan bahwa buku ini sangat menarik karena ditulis dengan cukup teliti dan isinya menjelaskan dengan lengkap tata cara untuk meningkatkan kestabilan enzim yang banyak digunakan dalam industri berdasarkan data-data terbaru dari hasil penelitian baik dari penulis sendiri maupun dari berbagai data sumber primer yang digunakan oleh penulis.

Dengan memperhatikan fakta tentang buku referensi ini, maka buku referensi ini merupakan buku yang sangat penting dan “sepertinya wajib” untuk dibaca kemudian dipelajari tidak hanya untuk mahasiswa, tetapi juga bagi teman sejawat dosen atau kalangan umum yang tertarik pada bidang penelitian enzim. Hal ini dikarenakan dengan mempelajari buku ini maka para pembaca dapat dengan jelas mengetahui tata cara untuk meningkatkan kestabilan enzim dengan secara lengkap dan menyeluruh.

Semoga buku ini akan memberikan banyak manfaat kepada para pembaca dan harapannya di masa yang akan datang akan ada revisi dan update dengan data-data dari penelitian yang terbaru, sehingga akan memberikan manfaat lebih kepada para pengguna buku

referensi ini. Selain itu semoga ada pengguna buku yang dapat memberikan masukan tambahan untuk perbaikan buku ini pada edisi revisi yang akan dicetak nantinya.

Bandar Lampung, 30 Januari 2018

Prof. Dr. Sutopo Hadi, M.Sc.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TERMOSTABILITAS ENZIM	4
2.1 Termostabilisasi.....	4
2.2 Mekanisme Termostabilisasi Enzim	7
BAB 3. STABILISASI ENZIM	18
3.1 Kestabilan Enzim.....	18
3.2 Amobilisasi.....	19
3.3 Modifikasi Kimia	23
3.4 Mekanisme Inaktivasi Termal Enzim Alami dan Termodifikasi	32

BAB 4. KARAKTERISASI ENZIM HASIL MODIFIKASI KIMIA DAN AMOBILISASI	36
4.1. Modifikasi Enzim α -amilase dengan CC-PEG dan NPC-PEG.....	36
4.2. Modifikasi Enzim α -amilase dengan Dimetiladipimidat.....	55
4.3. Modifikasi Enzim α -amilase dengan Asam Glioksilat....	61
4.4. Modifikasi Enzim α -amilase dengan Sitrakonat Anhidrida	67
4.5. Modifikasi Enzim Selulase dengan Asam Glioksilat	72
4.6. Modifikasi Enzim Selulase dengan Dimetiladipimidat .	77
4.7. Modifikasi Enzim Selulase dengan Nitrofenol Karbonat Polietilenglikol.....	81
4.8. Amobilisasi Enzim α -amilase dengan DEAE-selulosa ...	87
4.9. Amobilisasi Enzim α -amilase dengan CM-selulosa	94
4.10. Amobilisasi Enzim α -amilase dengan Kalsium Alginat	99
DAFTAR PUSTAKA.....	103

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi asam amino relatif dari protein mesofilik dan hipertermofilik	9
3.1 Aktivitas spesifik α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> tanpa modifikasi dan modifikasi selama inaktivasi termal	34
3.2 Konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan gugus amino bebas α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> tanpa modifikasi dan modifikasi	35
4.1 Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6-trinitrobenzen sulfonat	37
4.2 Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi	52
4.3 Perubahan aktivitas enzim pada proses modifikasi dengan CC-PEG.....	53
4.4 Perubahan aktivitas enzim pada proses modifikasi dengan NPC-PEG.....	54
4.5 Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi	

	(ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%, DMA 0,5%, dan DMA 0,7%	60
4.6	Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6- trinitrobenzena-sulfonat	61
4.7	Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi (asam glioksilat 67%, asam glioksilat 68%, asam glioksilat 82%)	66
4.8	Perubahan konstanta laju inaktivasi(k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi	71
4.9	Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat	73
4.10	Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 70,54; 78,68; 86,43%	75
4.11	Penentuan derajat modifikasi menggunakan TNBS	77
4.12	Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi	80
4.13	Penentuan derajat modifikasi menggunakan TNBS	81
4.14	Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi.....	86
4.15	Penurunan aktivitas enzim pada proses amobilisasi dengan DEAE-Selulosa	90

4. 16	Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	93
4. 17	Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	98
4. 18	Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	101

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Teknik umum yang digunakan untuk amobilisasi enzim	20
3.2. Mekanisme pengikatan PEG teraktivasi pada protein (Yang <i>et al.</i> , 1996).....	28
3.3 Struktur dimetiladipimidat (DMA)	29
3.4 Reaksi antara DMA dengan lisin	30
3.5 Reaksi antara asam glioksilat dengan lisin	31
3.6 Modifikasi gugus amina suatu residu lisin dalam protein oleh sitrakonatan anhidrida.....	32
4.1 Urutan asam amino α -amilase <i>Bacillus subtilis</i>	38
4.2 Struktur tiga dimensi α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> dengan residu lisin yang terpapar ke permukaan, ditunjukkan dengan warna merah	38
4.3 pH optimum enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23 %, CC-PEG 63 %, CC-PEG 67 %), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A	41
4.4 pH optimum enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%; NPC-PEG 76%; NPC-PEG 89%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A	42

4.5	Suhu optimum enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A	44
4.6	Suhu optimum enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%, NPC-PEG 76%, NPC-PEG 89%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A	44
4.7	Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian dan enzim tipe II A dari <i>Bacillus sp.</i>	45
4.8	Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil modifikasi CC-PEG 23%; C-PEG 63%; CC-PEG 67%	46
4.9	Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil modifikasi NPC-PEG 56%; NPC-PEG 76%; NPC-PEG 89%	47
4.10	Pusat aktif (residu Asp 176, Asp 269, Glu 208) α -amilase dan residu lisin nomor 179 yang terlibat dalam pengikatan substrat dari <i>Bacillus subtilis</i>	49
4.11	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian; α -amilase tipe II A; enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67%); pada suhu 60°C terhadap waktu	50
4.12	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian; α -amilase tipe II A; enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%, NPC-PEG 76%, NPC-PEG 89%); pada suhu 60°C terhadap waktu	51
4.13	pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%; DMA 0,5%; dan DMA 0,7%.	56
4.14	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%; DMA 0,5%; dan DMA 0,7%	57
4.15	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan hasil	

	modifikasi (DMA 0,3%, DMA 0,5%, 0,7%) pada suhu 60°C terhadap waktu	59
4.16	pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67,69 dan 82%.....	62
4.17	Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67, 69, dan 82%	63
4.18	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi (asam glioksilat 67%, asam glioksilat 69%, asam glioksilat 82%) pada suhu 60°C terhadap waktu	65
4.19	pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi (Sitrakonat anhidrida 45%, Sitrakonat anhidrida 73%, Sitrakonat anhidrida 82%, Sitrakonat anhidrida 83% dan Sitrakonat anhidrida 88%)	68
4.20	Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83 dan 88%	69
4.21	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 45%, 75%, 82%, 83% dan 88% pada suhu 60°C terhadap waktu	70
4.22	Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi untuk penentuan nilai k_i , waktu paruh dan ΔG_i	71
4.23	pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi: 70,54; 78,68; dan 86,43%	73

4.24	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi: 70,54; 78,68; dan 86,43%	74
4.25	Grafik stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi: 70,54(5 mg); 78,68(10 mg); dan 86,43%(15 mg)	75
4.26	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil Modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%)	78
4.27	pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%)	79
4.28	Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%), pada suhu 55°C terhadap waktu	80
4.29	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil Modifikasi (63, 70 dan 81%).....	82
4.30	pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%)	82
4.31	Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%)	83
4.32	Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) pada suhu 55°C terhadap waktu	85
4.33	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	88
4.34	Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian	89
4.35	Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil amobilisasi.....	89
4.36	Penggunaan enzim hasil amobilisasi secara berulang	91

4.37	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobilisasi, pada suhu suhu 60°C pH 9,0 terhadap waktu	92
4.38	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	94
4.39	Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian	95
4.40	Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil amobilisasi	95
4.41	Penggunaan enzim hasil amobilisasi secara berulang	96
4.42	Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobilisasi, pada suhu suhu 60°C pH 5,5 terhadap waktu	97
4.43	Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	99
4.44	Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi pada suhu 60°C terhadap waktu	100
4.45	Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi	102

I. PENDAHULUAN

Penggunaan enzim dalam bidang industri semakin meningkat seiring dengan pesatnya perkembangan industri, khususnya industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kulit dan industri kertas. Selain digunakan dalam proses industri, enzim juga dapat digunakan untuk mengolah limbah industri, misalnya enzim selulase yang memiliki kemampuan untuk mengubah selulosa limbah kayu dan kertas menjadi etanol (Vieille dan Zeikus, 1996). Hingga saat ini sebagian besar enzim yang digunakan dalam industri di Indonesia khususnya industri pangan masih diimpor. Keadaan ini tentunya sangat merugikan jika ditinjau secara ekonomi, padahal Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan sumber alam hayati, terutama mikroba penghasil enzim, termasuk enzim α -amilase dan selulase. Melihat kondisi ini sangatlah penting untuk mengembangkan teknik produksi enzim dan teknik-teknik untuk meningkatkan kestabilan enzim, sehingga dapat memenuhi tuntutan industri agar tidak selalu tergantung pada sumber dari luar.

Pada umumnya, enzim tidak stabil pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrim (Goddette *et al.*, 1993), kondisi yang umumnya diperlukan dalam proses-proses industri. Dalam industri diperlukan enzim termostabil, yaitu enzim yang bekerja secara optimum pada rentang suhu antara 60°–125°C (Vielle dan Zeikus, 1996) dan pada rentang pH yang lebar. Misalnya, pada proses pembuatan sirup gula cair, untuk mengubah pati menjadi dekstrin diperlukan enzim yang

stabil dan mempunyai aktivitas yang tinggi pada suhu sekitar 60°C (Godfrey dan Reichelt, 1983). Untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas dan aktivitas yang tinggi pada kondisi ekstrim, dapat dilakukan isolasi langsung dari organisme yang ada di alam dan hidup pada kondisi tersebut (ekstrimofilik) atau dengan modifikasi kimia terhadap enzim yang berasal dari organisme yang hidup pada kondisi tidak ekstrim (mesofilik) (Steelwagen, 1984). Menurut Mozhaev dan Martinek (1984) stabilisasi enzim yang berasal dari mikroba mesofilik merupakan cara yang lebih disukai untuk memperoleh enzim yang stabil. Sedangkan Mozhaev *et al.*, (1990) menyarankan penggunaan modifikasi kimia untuk meningkatkan kestabilan enzim.

Penggunaan amobilisasi enzim walaupun memiliki beberapa kelemahan hingga saat ini masih banyak digunakan dalam proses industri karena mempunyai keunggulan tertentu, selain dapat digunakan secara berulang dan terus menerus proses amobil dapat meningkatkan kestabilan enzim terutama terhadap suhu. Pada proses amobil sering terjadi penurunan aktivitas enzim akibat interaksi antara enzim dengan substrat terhalangi oleh adanya matriks yang tidak larut. Pemilihan zat pengamobil yang sesuai sangat penting sehingga peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dan kehilangan aktivitas dapat ditekan seminimal mungkin. Dietil amino etil selulosa (DEAE), dan karboksi metil selulosa (CM-selulosa), merupakan senyawa-senyawa yang sering digunakan terutama dalam proses pemurnian enzim. Penggunaan senyawa-senyawa tersebut pada proses amobilisasi diharapkan dapat meningkatkan kestabilan enzim dengan kehilangan aktivitas yang minimal.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan dengan amobilisasi dan modifikasi kimia menunjukkan enzim hasil amobilisasi dan modifikasi kimia meningkat kestabilannya terhadap pH dan suhu dibandingkan dengan enzim asli (Yandri *et al.*, 2008; Yandri *et al.*,

2009; Yandri *et al.*, 2010^a; Yandri *et al.*, 2010^b; Yandri *et al.*, 2011^a ; Yandri *et al.*, 2011^b ; Yandri *et al.*, 2012^a ; Yandri *et al.*, 2012^b ; Yandri *et al.*, 2013; Yandri *et al.*, 2014; Yandri *et al.*, 2015; Yandri *et al.*, 2017).

II. TERMOSTABILITAS ENZIM

2.1 Termozim

Termozim merupakan enzim yang bersifat termostabil dan berfungsi secara optimum antara 60°C dan 125°C (Vielle dan Zeikus, 1996). Enzim yang tergolong pada termozim merupakan enzim yang banyak diteliti, dengan tujuan utama untuk mempelajari stabilitas protein terutama enzim. Mekanisme stabilisasi-protein banyak ditunjang oleh: misalnya, interaksi hidrofobik, jembatan disulfida, efisiensi *packing*, ikatan hidrogen, reduksi strain konformasi, reduksi entropi *unfolding*, stabilisasi α -heliks, stabilisasi loop, dan resistensi terhadap destruksi kovalen. Kajian dalam mempelajari stabilitas enzim sudah banyak dilakukan dengan menggunakan model enzim enzim yang dihasilkan oleh bakteri mesofilik. Penelitian terakhir tentang kestabilan enzim dengan membandingkan antara struktur enzim yang berasal dari mikroorganisme mesofilik dan enzim yang berasal dari mikroorganisme termofilik membenarkan mekanisme stabilisasi protein.

Termozim adalah enzim yang dihasilkan oleh mikroorganismme yang bersifat termofilik yang tumbuh subur pada suhu 60-80°C dan hipertermofilik yang tumbuh subur pada $\geq 80^\circ\text{C}$. Bakteri atau *archaea* biasanya dikelompokkan sebagai organisme termofilik, walaupun sebagian besar *archaea* bersifat hipertermofilik. Sejak ditemukannya enzim-enzim yang mensintesis protein yang bersifat termostabil dalam *Thermus aquaticus* pada awal tahun 1970-an, sejumlah besar enzim termostabil baik yang berasal dari

mikroorganisme termofilik maupun mikroorganisme hipertermofilik telah dikarakterisasi untuk penggunaan di dalam industri-industri bioteknologi misalnya: *Taq polimerase* digunakan pada PCR, protease digunakan dalam industri deterjen, α -amilase dan glukosa isomerase digunakan dalam industri pemrosesan pati dan industri kertas (Vielle dan Zeikus, 1996).

Mekanisme stabilisasi enzim mulai dipelajari dengan menggunakan model enzim bermolekul kecil dan merupakan protein monomer seperti lisozim dan ribonuklease. Dengan demikian kita dapat menentukan sampai dimana alam menggunakan mekanisme stabilisasi ini, juga menentukan mekanisme tambahan yang berpartisipasi dalam stabilitas ekstrem termozim (Vielle dan Zeikus, 1996).

Termozim adalah sama dengan mesozim dengan tidak memperhatikan variasi *phylogenetic*, dalam hal: (1) 40 - 80% urutan asam amino sama, (2) struktur tiga dimensi *superposable*, (3) kedua enzim tersebut mempunyai mekanisme katalitik yang sama, kecuali termozim hasil kloning dapat diekspresikan dengan baik dalam organisme mesofilik dan termofilik rekombinan dalam *host* untuk mempertahankan semua sifat-sifat biokimiawi enzim natif, termasuk termostabilitas dan aktivitas optimal pada suhu tinggi, walaupun faktor-faktor intrinsik (garam, poliamin, atau glikosilasi) membantu menstabilkan termozim tertentu, sebagian besar termozim secara intrinsik termostabil. Kenaikan stabilitasnya dibandingkan mesozim sebagai akibat dari perbedaan dalam urutan asam amino spesifik (Vielle dan Zeikus, 1996).

Nilai ΔG_{stab} (energi bebas stabilisasi) mesozim globular adalah khas antara 5-15 kkal mol⁻¹ pada suhu 25°C. Termozim yang banyak dipelajari berasal dari organisme termofilik, dan nilai ΔG_{stab} dari termozim yang dipelajari berasal dari organisme termofilik. Walaupun kebanyakan termozim yang dipelajari berasal dari organisme termofilik, tetapi nilai ΔG_{stab} hanya diperoleh dari

sejumlah tertentu termozim yang ditentukan pada suhu 25°C, misalnya: nilai ΔG_{stab} sitokrom c-552 dan fosfoglisarat kinase *Thermus thermophilus* adalah 15 kkal mol⁻¹, 3 dan 6,5 kkal mol⁻¹ lebih tinggi dari nilai ΔG_{stab} mesofiliknya. Kajian stabilitas pada enzim mutan menunjukkan bahwa nilai $\Delta\Delta G_{\text{stab}}$ (perubahan dalam ΔG_{stab}) sekitar 3 dan 6,5 kkal mol⁻¹ pada kenaikan temperatur 12°C. Data ini memperkuat bahwa perbedaan dalam energi stabilitas termozim dan mesozim adalah kecil, biasanya sekitar 5-15 kkal mol⁻¹. Nilai ΔG_{stab} termozim yang berasal dari hipertermofilik belum pernah ditentukan. Dengan tambahan, jika suhu stabilitas maksimum termozim berbeda dari bagian mesozim, perbedaan ΔG_{stab} pada 25°C tidak berarti. Untuk pembandingan-pembandingan yang berkaitan, diperlukan informasi lebih lanjut dari kedua enzim tersebut (suhu untuk stabilitas maksimum, ΔG_{stab} pada suhu tersebut, serta suhu leleh). Ikatan hidrogen tunggal, jembatan-jembatan garam, interaksi hidrofobik, atau tidak adanya tegangan konformasi lokal dapat meningkatkan ΔG_{stab} hingga 5 kkal mol⁻¹. Perbedaan nilai ΔG_{stab} antara mesozim dan termozim dapat dijelaskan dengan terjadinya akumulasi akibat penambahan hanya beberapa ikatan hidrogen, jembatan garam, atau interaksi hidrofobik di dalam termozim (Vielle dan Zeikus, 2001).

Karena termozim masih aktif secara optimum pada kondisi yang lebih ekstrem dimana pada kondisi tersebut mesozim sudah terdenaturasi, menunjukkan bahwa termozim lebih rigid dari mesozim. Peningkatan rigiditas ini penting untuk mempertahankan struktur katalitik aktifnya, dan untuk mempertahankannya dari proses *unfolding*. Rigiditas ini ditunjukkan dengan menurunnya laju pertukaran-hidrogen dan sifat tidak mudah mengalami degradasi proteolitik serta *unfolding* akibat denaturasi secara kimiawi atau termal (Kanaya dan Itaya, 1992). Walaupun tidak ada sistematika substitusi asam amino yang bertanggung jawab untuk peningkatan stabilitas termal, akan tetapi dari pengamatan pada sekelompok

besar enzim ditunjukkan bahwa stabilisasi substitusi cenderung meningkatkan efisiensi pengepakan enzim (melalui pengisian rongga dan peningkatan hidrofobitas bagian pusat), dan meningkatkan seluruh rigiditas enzim (misalnya melalui stabilisasi α -heliks, optimasi interaksi-elektrostatik dan reduksi tegangan konformasi)

2.2 Mekanisme Termostabilisasi Enzim

Dill, (1990) menyatakan interaksi hidrofobik menjadi faktor utama dalam pelipatan protein. Pelipatan protein ini juga ditunjang oleh semua jenis kekuatan lainnya (antara lain: ikatan hidrogen, pasangan ion, dan interaksi Van der Waals). Dill (1990) menjelaskan bukti-bukti yang menunjang pernyataan ini: (i) pelarut-pelarut non polar mendenaturasi protein, (ii) residu hidrofobik mengelompok di bagian pusat protein, untuk menghindari kontak yang luas dengan air (iii) residu hidrofobik di dalam pusat protein lebih kuat dipelihara dan lebih berkaitan dengan struktur secara langsung dibandingkan dengan jenis residu lainnya, dan (iv) *unfolding* protein berkaitan dengan peningkatan kapasitas panas yang besar. Urutan asam amino, struktur, dan informasi mutagenesis yang terkumpul dalam 20 tahun terakhir memperkuat dugaan bahwa hidrofobitas adalah kekuatan utama dalam kestabilan protein. Dua penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa homolog mesofilik dan hipertermofilik mempunyai dasar stabilitas yang sama, yang diberikan oleh pusat protein yang terpelihara: (i) interaksi hidrofobik dan residu pusat yang terlibat dalam pembentukan struktur sekunder lebih terpelihara dari pada daerah permukaan, dan (ii) sejumlah substitusi yang menstabilkan ditemukan pada daerah yang terpapar ke permukaan.

Hasil penelitian (antara lain penentuan urutan asam amino, mutagenesis terarah, struktur, dan termodinamika) yang terkumpul pada protein hipertermofilik dalam tahun-tahun terakhir menyimpulkan bahwa tidak ada mekanisme tunggal yang

bertanggung jawab terhadap stabilitas protein hipertermofilik yang luar biasa (Vieille dan Zeikus, 2001).

2. 2. 1 Komposisi asam amino dan kecenderungan intrinsik

Komposisi asam amino dalam protein sudah lama diperkirakan berhubungan dengan stabilitas termal protein. Kajian statistik pertama dengan membandingkan komposisi asam amino dalam protein mesofilik dan protein termofilik menunjukkan kecenderungan ke arah pergantian seperti Gly dengan Ala dan Lys dengan Arg. Jumlah alanin yang lebih tinggi dalam protein termofilik mencerminkan fakta dugaan bahwa Ala merupakan residu pembentuk heliks terbaik. Berdasarkan data percobaan yang terkumpul, (khususnya, urutan genom lengkap), menyimpulkan bahwa ketentuan adaptasi termofilik tidak dapat dibatasi dalam batasan perbedaan signifikan dalam komposisi asam amino (Bohm dan Jaenicke, 1994). Perbandingan kandungan residu dalam protein hipertermofilik dan mesofilik berdasarkan pada penentuan urutan genom dari delapan organisme mesofilik dan tujuh organisme hipertermofilik menunjukkan kecenderungan perbedaan yang kecil (Tabel 2.1). Residu bermuatan lebih banyak ditemukan dalam protein hipertermofilik (+ 3,24%) dibandingkan dengan protein mesofilik yang kebanyakan mempunyai residu polar tidak bermuatan (-4,98%, khususnya Gln, -2,21%). Protein hipertermofilik juga mengandung lebih banyak residu hidrofobik dan aromatik dari pada protein mesofilik. Data yang diperoleh dari penentuan urutan genom ini tidak dapat digeneralisasi, karena terdapat variasi yang lebar di antara genom hipertermofilik itu sendiri: kumpulan protein dari *Aeropyrum pernix* mengandung residu bermuatan lebih sedikit (23,64%), residu hidrofobik lebih banyak (27,29%), dan residu aromatik sangat sedikit (7,42%) dibandingkan dengan mesofilik (Tabel 2. 1).

Tabel 2.1 Komposisi asam amino relatif dari protein mesofilik dan hipertermofilik

Residu	Komposisi asam amino(%)		Variasi komposisi dalam protein hipertermofilik relatif terhadap mesofilik
	Protein Mesofilik ^a	Protein Hipertermofilik ^b	
A	8,09 ± 1,54	6,82 ± 1,42	- 1,27
C	1,10 ± 0,18	0,86 ± 0,27	- 0,24
D	5,06 ± 0,18	4,63 ± 0,54	- 0,43
E	6,45 ± 0,54	8,55 ± 0,95	+ 2,10
F	4,61 ± 0,78	4,40 ± 0,82	- 0,21
G	6,70 ± 0,96	7,16 ± 0,68	+ 0,46
H	2,04 ± 0,21	1,57 ± 0,16	- 0,47
I	7,40 ± 1,69	7,82 ± 1,64	+ 0,42
K	6,81 ± 2,00	7,61 ± 2,16	+ 0,80
L	10,43 ± 0,55	10,21 ± 0,68	- 0,22
M	2,42 ± 0,28	2,29 ± 0,25	- 0,13
N	4,90 ± 1,20	3,52 ± 0,94	- 1,38
P	3,77 ± 0,77	4,36 ± 0,99	+ 0,59
Q	3,99 ± 0,75	1,78 ± 0,22	- 2,21
R	4,33 ± 0,98	5,57 ± 1,16	+ 1,24
S	6,08 ± 0,57	5,54 ± 1,01	- 0,54
T	5,09 ± 0,57	4,34 ± 0,23	- 0,75
V	6,35 ± 0,75	8,05 ± 0,68	+ 1,70
W	1,02 ± 0,31	1,06 ± 0,20	+ 0,04
Y	3,30 ± 0,43	3,82 ± 0,33	+ 0,52
A,G	14,79	13,98	- 0,81
D,E	11,51	13,18	+ 1,67
K,R,H	13,18	14,75	+ 1,57
S,T	11,17	9,88	- 1,29
N,Q	8,99	5,3	- 3,69
I,L,M,V	26,60	28,37	+ 1,77
F,W,Y	8,93	9,28	+ 0,35

(Sumber Deckert et al., 1998; Dams et al., 2000)

Keterangan:

^a Dari deret genom *B subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Rickettsia prowazekii*, dan *Synechocystis*.

^b Dari deret genom *A. fulgidus*, *A. aeolicus*, *A. pernix*, *M. jannaschii*, *P. abyssi*, *P. horikoshii*, dan *T. maritima*.

Protein yang berasal dari *A. pernix* mengandung lebih banyak residu Ala, Gly, Pro, Ser, dan Thr. Dengan demikian, kecenderungan komposisi asam amino dalam protein hipertermofilik yang terlihat sering secara evolusi relevan, dan bukannya suatu indikasi adaptasinya pada suhu tinggi. Dibandingkan dengan komposisi asam amino, maka mungkin yang lebih relevan adalah distribusi

residu-residu dan interaksinya dalam protein yang menunjang stabilitas termal suatu protein. Dua homolog protease subtilisin *Bacillus amyloliquefaciens* BPN dan termitase *Thermoactinomyces vulgaris* mengandung jumlah residu bermuatan yang sama, tetapi enzim termofilik termitase mengandung delapan pasangan ion lebih banyak (Teplyakov *et al.*, 1990).

Ide dasar yang melandasi bahwa stabilitas protein dibatasi oleh kestabilan dan kecenderungan pembentukan kekuatan pada bagian pusat, kecenderungan masing-masing residu secara individu memberikan andil dalam struktur heliks dan lembaran telah diamati sebagai mekanisme penstabilan yang sangat potensial. Dalam perbandingan struktur protein mesofilik dan termofilik, Facchiano *et al.*, (1998) mengamati bahwa heliks dari protein termofilik umumnya lebih stabil dari pada protein mesofilik. Kecenderungan yang mereka dapatkan adalah pengurangan kandungan residu cabang- β (Val, Ile, dan Thr) dalam heliks protein termofilik (residu cabang- β tidak dibiarkan dengan baik dalam heliks sebagai residu linier).

Beberapa sifat residu Arg menunjukkan mempunyai adaptasi yang lebih baik ke suhu tinggi dari pada residu Lys: Bagian Arg δ -guanido lebih menurunkan reaktivitas kimia yang disebabkan pK_a yang tinggi dan stabilitas resonansinya. Bagian δ -guanido mempunyai luas permukaan yang lebih untuk interaksi muatan dari pada gugus amino Lys. Karena rantai samping Arg mengandung satu gugus metilen lebih sedikit dari pada Lys, ia mempunyai kemampuan mengembangkan kontak yang rendah dengan pelarut. Akhirnya, karena pK_a Arg. (kira-kira 12) 1 unit di atas Lys (11,1), Arg lebih mudah mempertahankan pasangan ion dan muatan neto positif pada peningkatan suhu (nilai pK_a turun dengan naiknya suhu, Mrabet *et al.*, 1992; Volkin dan Middaugh, 1992). Perbandingan rata-rata Arg/Lys dalam kumpulan protein mesofilik dan hipertermofilik dalam Tabel 1 (masing-masing $0,73 \pm 0,37$ dan $0,87 \pm 0,60$),

berhubungan dengan besarnya standar deviasi (di antara hipertermofilik, perbandingan Arg/Lys bervariasi dari 0,52 dalam protein *Aquifex aerolicus* hingga 2,19 dalam protein *Aeropyrum pernix*). Hasil ini menyarankan bahwa peningkatan kandungan Arg sesungguhnya adalah mekanisme stabilisasi. Mekanisme ini tidak berlaku secara universal di antara hipertermofilik.

Tingginya kesensitifan sistein terhadap oksidasi pada suhu tinggi menyarankan bahwa enzim hipertermofilik mengandung lebih sedikit sistein dari pada mesofilik. Sedangkan Tabel 2.1 menunjukkan bahwa protein hipertermofilik rata-rata mengandung lebih sedikit sistein dari pada protein mesofilik, terdapat variasi besar di antara semua spesies. Protein dari *Archaeoglobus fulgidus* dan *Methanococcus jannaschii* mengandung lebih banyak sistein (masing-masing 1,17 dan 1,27%) dibandingkan rata-rata gabungan protein mesofilik (1,10%). Dari tujuh organisme hipertermofilik dalam Tabel 1, *A. aeolicus* dan *A. pernix* masing-masing adalah organisme mikroaerofilik dan aerofilik, sedangkan lainnya anaerob. Yang menarik, protein *A. aeolicus* dan *A. pernix* mengandung lebih banyak sistein (masing-masing 0,79 dan 0,93%) dibandingkan protein dari *Pyrococcus abyssi*, *P. horikoshii*, dan *T. maritima* (masing-masing 0,55; 0,63; dan 0,71%). Sistein yang berada dalam protein hipertermofilik aerobik sering terlibat dalam interaksi penstabilan spesifik (misalnya, jembatan disulfida dan peliganan logam) dan/atau tidak mudah berinteraksi terhadap pelarut. Kondisi denaturasi yang drastis diperlukan (2 jam pada 70°C dengan adanya 6 M guanidinium HCl) untuk 10 mM ditionitritol yang mereduksi 6 jembatan disulfida intersubunit dalam fosforilase 5'-metiltioadenosin *S. solfataricus* (Cacciapuoti *et al.*, 1994).

2. 2. 2 Jembatan Disulfida

Jembatan disulfida diperkirakan menstabilkan protein melalui pengaruh entropi, dengan pengurangan entropi keadaan *unfolding* protein (Matsumura *et al.*, 1989). Karena sifat dari sistein dan jembatan disulfida yang mudah dipengaruhi sehingga menjadi rusak pada suhu tinggi, yaitu 100°C, diyakini merupakan batas tertinggi untuk stabilitas protein yang mengandung jembatan disulfida (Volkin dan Klibanov, 1987). Pengertian ini didasarkan pada fakta dari penelitian sebelumnya tentang karakterisasi mekanisme inaktivasi protein yang dilakukan pada enzim yang digunakan pada waktu itu, yaitu enzim mesofilik. Penelitian ini menentukan bahwa semua protein yang diteliti mengandung jembatan disulfida mempunyai kecepatan eliminasi- β yang sama pada 100°C. Kecepatan ini tidak bergantung pada struktur protein dan kecepatan menjadi lebih tinggi pada pH 8,0 ($t_{1/2}$ 1 jam) dari pada pada pH 6,0 ($t_{1/2}$ 12,4 jam). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada suhu 100°C semua protein berada dalam keadaan tidak melipat. Pada karakterisasi terbaru terhadap protein yang mengandung jembatan disulfida menunjukkan bahwa protein tersebut aktif secara optimum dan stabil di atas suhu 100°C yang menunjukkan bahwa jembatan disulfida dapat menjadi strategi kestabilan di atas 100°C dan bahwa lingkungan konformasional dan kemudahan dimasuki pelarut merupakan faktor penentu dalam perlindungan jembatan disulfida melawan kerusakan. Bila diekspresikan dalam *E. coli*, 5'-metiltioadenosinfosforilase *S. solfataricus* tidak baik, terjadi destabilisasi jembatan sulfida. Pengamatan ini secara tidak langsung menyarankan bahwa adanya jembatan disulfida dalam enzim natif merupakan penstabil (Cacciapuoti *et al.*, 1994). Serin protease *Aquifex pyrophilus* pada penelitian terakhir ini diketahui mengandung 8 sistein (tidak ada dalam subtilisin BPN'). Pada perlakuan dengan ditiotreititol menurunkan $t_{1/2}$ -nya pada 85°C dari 90 jam menjadi kurang dari 2 jam. Destabilisasi oleh ditiotreititol

pada suhu tinggi menyarankan bahwa enzim ini juga mengandung jembatan disulfida dan mereka tidak mudah dimasuki oleh pelarut. Enzim dengan $t_{1/2}$ -6 jam pada suhu 105°C dan pH 9, yang lebih besar dibandingkan dengan $t_{1/2}$ -nya yang dihitung untuk jembatan disulfida dalam protein tak terlipat pada pH 8,0 (1 jam), menunjukkan bahwa jembatan disulfida enzim ini dilindungi dari kerusakan oleh tidak mudah dimasuki oleh pelarut. Dengan demikian, tidak semua jembatan disulfida mempunyai pengaruh yang setara pada kerusakan termal.

2. 2. 3 Interaksi hidrofobik

Interaksi hidrofobik diperkirakan memberikan energi yang diperlukan protein untuk pelipatan (*folding*) dalam air. Pace (1992), menyatakan interaksi hidrofobik berperan dalam termofilisitas dan termostabilitas enzim, contoh: bila residu asam amino hidrofobik (Leu 246 dan Val 249) pada antar muka dimer enzim 3-isopropil malat dehidrogenase dari *Thermus thermophilus* diganti dengan residu asam amino yang kurang hidrofobik (Glu dan Met) seperti yang terdapat pada *Escherichia coli*, maka enzim pada *E. coli* tersebut lebih mudah terdisosiasi dan terdenaturasi. Pemasukan residu asam amino hidrofobik (Leu 246 dan Val 249) pada enzim yang terdapat pada *E. coli* dapat menstabilkan enzim terhadap disosiasi dan denaturasi. Penelitian ini memperkuat peran Leu 246 dan Val 249, dan interaksi hidrofobik dalam stabilitas enzim 3-isopropil malat dehidrogenase dari *T. thermophilus*. Interaksi cincin-cincin aromatik yang tegak lurus secara berdekatan dalam protein mewakili satu jenis interaksi hidrofobik, potensial stabilitasnya kira-kira 1 kkal/mol (Burley dan Petsko, 1985).

2. 2. 4 Ikatan hidrogen

Ikatan hidrogen secara khusus dihasilkan oleh donor H dan akseptor H dengan jarak kurang dari 3 Å. Pengaruh ikatan hidrogen pada

stabilitas RNase T1 dipelajari secara mendalam (Shirley *et al.*, 1992). RNase T1 mengandung 86 ikatan hidrogen dengan panjang rata-rata jarak 2,95 Å. Kontribusi mereka terhadap stabilitas RNase T1 (kira-kira 110 kkal/mol, ditentukan dengan mutagenesis dan percobaan ketidakterlipatan), didapatkan dan dibandingkan dengan kontribusi interaksi hidrofobik. Setiap ikatan hidrogen memberikan kontribusi rata-rata 1,3 kkal/mol untuk stabilisasi (Shirley *et al.*, 1992).

Satu kajian yang dilakukan oleh Tanner *et al.*, (1996) menunjukkan hubungan yang kuat antara stabilitas termal enzim glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) dan jumlah ikatan hidrogen bermuatan netral (misal, antara atom rantai samping dari residu bermuatan dan atom rantai utama suatu residu lain atau atom rantai samping dari residu netral). Tanner *et al.*, (1996), menyatakan dua alasan mengapa jenis ikatan hidrogen ini bisa menjadi penstabil terutama secara termodinamika: (i) hukum desolvasi yang berhubungan dengan terkuburnya sejumlah ikatan hidrogen lebih rendah dibandingkan dengan hukum desolvasi untuk pasangan ion yang terkubur (yang melibatkan dua residu yang bermuatan), dan (ii) nilai entalpi ikatan hidrogen netral-bermuatan adalah lebih besar dari ikatan hidrogen netral-netral karena interaksi dipol-bermuatan. Hubungan antara ikatan hidrogen netral-bermuatan dengan stabilitas GAPDH ini menunjukkan bahwa peran residu bermuatan dalam stabilitas protein tidak hanya dibatasi oleh pembentukan pasangan ion. Peningkatan jumlah ikatan hidrogen netral-bermuatan juga ditemukan dalam feredoksin *T. maritima*. Kedua ikatan hidrogen ini juga menstabilkan perubahan struktur atau perubahan jangkar satu dengan lainnya

2. 2. 5 Interaksi aromatik

Interaksi aromatik (pasangan aromatik) digambarkan oleh jarak yang kurang dari 7,0 Å antara pusat cincin fenil. Karakteristik pasangan aromatik berikut disarikan dari analisis 272 pasangan aromatik

dalam 34 struktur resolusi tinggi protein mesofilik: dua per tiga pasangan tersebut, interaksi antar cincin tidak jauh dari garis tegak; kebanyakan terlibat dalam bentuk jaringan; banyak yang tergabung sebagai bagian dari struktur sekunder (misalnya, interaksi non lokal); banyak yang memiliki energetika yang baik (80% mempunyai energi potensial antara 0 – 2 kkal/mol); dan banyak yang menempatkan diri sebagai residu yang terkubur atau residu yang terkubur secara parsial (Burley dan Petsko, 1985). Di antara protein hipertermofilik yang strukturnya sudah diketahui, sedikitnya satu struktur sangat distabilkan oleh interaksi aromatik ini. α -Amilase *P. furiosus* juga mengandung 5% lebih residu aromatik dari homolognya *Bacillus licheniformis*, tetapi tidak diketahui apakah residu tambahan ini dilibatkan dalam interaksi penstabilan (Dong *et al.*, 1997). Beberapa contoh juga terdapat di antara protein termofilik lainnya. Termitase, proteinase serin yang diproduksi *Thermoactinomyces vulgaris*, mengandung 16 residu aromatik terlibat dalam pasangan aromatik; homolog mesofiliknya subtilisin BPN' dari *Bacillus amyloliquefaciens* hanya mengandung 6 pasangan aromatik (Teplyakov *et al.*, 1990).

2. 2. 6 Pasangan ion

Karena pasangan ion biasanya terdapat dalam jumlah yang sedikit dalam protein dan karena tidak terpelihara, maka mereka bukan sebagai kekuatan utama dalam pelipatan protein (Dill, 1990). Penelitian yang dilakukan oleh Perutz (1978) memberikan gambaran bagaimana interaksi elektrostatik menghasilkan daya penstabilan yang signifikan dalam pelipatan protein. Ia menyatakan bahwa pasangan ion lebih kuat di dalam protein dibandingkan di dalam pelarut, karena mereka terbentuk di antara muatan yang tetap (dalam jumlah air yang besar, solvasi membuat stabilitas muatan yang berlawanan hampir tidak bergantung pada jarak). Pasangan

ion tunggal dihitung memberikan andil dalam stabilisasi sebesar 3 hingga 5 kkal/mol dari lisozim T4 (Anderson *et al.*, 1990).

Metil aminopeptidase *P. furiosus* menunjukkan kandungan pasangan ion dan jaringan pasangan ion yang lebih banyak dari enzim pada *E. coli*. Stabilitas enzim dari *P. furiosus* menurun pada pH rendah (ketika residu asam diprotonasi dan merusak interaksi ionik) dan pada konsentrasi garam yang tinggi (garam diketahui mendestabilasi pasangan ion protein). Hasil ini menunjukkan bahwa pasangan ion sangat penting dalam mempertahankan stabilitas enzim ini pada suhu tinggi (Ogasahara *et al.*, 1998). Pada percobaan yang sama, NaCl menunjukkan mendestabilasi karboksipeptidase *S. solfataricus* pada pH 7,5, tetapi tidak pada pH 9,0 (ketika pasangan ion yang melakukan stabilisasi sudah tidak ada lagi), hal ini menunjukkan bahwa pasangan ion dilibatkan dalam stabilisasi enzim *S. solfataricus* (Villa *et al.*, 1993). Semua enzim lain dari *S. solfataricus* didestabilasi oleh NaCl, pembentukan pasangan ion mungkin menggambarkan strategi stabilisasi secara umum dalam organisme ini (seperti strain *Sulfolobale* yang tidak tumbuh pada konsentrasi garam yang tinggi).

Penelitian yang dilakukan Tomschy *et al.*, (1994), mencoba memindahkan dua pasangan ion yang terletak pada permukaan dua α -heliks dalam GDPDH *T. maritima*. Karena mutasi ini tidak mempengaruhi stabilitas enzim, penulis berkesimpulan bahwa permukaan pasangan ion tidak dapat dipertimbangkan sebagai strategi adaptasi termal umum. Kedua pilihan pasangan ion dalam kajian ini adalah pasangan ion intraheliks. Dua pasangan ini dapat diletakkan dalam daerah protein yang lebih dipaksakan dan tidak ada di antara daerah protein yang paling mudah terpengaruh untuk unfolding. Kebalikannya, contoh lain menjelaskan ilustrasi di atas pengaruh stabilisasi termal pasangan ion non-lokal dan jaringan pasangan ion, yang mengikat residu yang tidak berdekatan (dan

struktur sekunder) dalam urutan. Tambahan, bukti tidak langsung untuk peran pasangan ion dalam stabilitas termal berasal dari penentuan urutan genome. Hasil yang diamati dalam Tabel 2.1 menunjukkan ke arah jumlah residu bermuatan yang meningkat dalam protein hipertermofilik dibandingkan dengan protein mesofilik, umumnya pada residu polar tak bermuatan.

III. STABILISASI ENZIM

3.1 Kestabilan Enzim

Untuk mempelajari kestabilan suatu enzim dapat dilakukan dengan menentukan waktu paruh dan data termodinamika lain yang sangat berhubungan dengan kestabilan yaitu: konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) (Kazan *et. al.*, 1997). Nilai waktu paruh yang tinggi menunjukkan semakin lama enzim tersebut mengalami proses inaktivasi dan enzim tersebut semakin stabil. Makin kecil laju inaktivasi enzim maka laju denaturasi enzim juga semakin lama dan enzim tersebut semakin stabil. Begitu juga semakin tinggi ΔG_i , maka enzim tersebut semakin sulit mengalami denaturasi dan semakin stabil enzim tersebut. Untuk mempelajari pengaruh modifikasi kimia terhadap stabilitas termal suatu enzim, maka data-data termodinamika enzim tersebut perlu diteliti.

Steelwagen, 1984, menyarankan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas dan aktivitas yang tinggi pada kondisi ekstrim, dapat dilakukan dengan mengisolasi langsung dari mikroorganisme yang ada di alam dan hidup pada kondisi tersebut (ekstrimofilik) atau dengan modifikasi kimia terhadap enzim yang berasal dari organisme yang hidup pada kondisi tidak ekstrim (mesofilik). Menurut Mozhaev dan Martinek (1984) stabilisasi enzim yang berasal dari mikroba mesofilik merupakan cara yang lebih disukai untuk memperoleh enzim yang stabil.

Tiga cara untuk meningkatkan stabilitas enzim menurut Mozhaev dan Martinek (1984), yaitu amobilisasi, modifikasi kimia, dan mutagenesis terarah. Mozhaev *et al.*, (1990) menyarankan penggunaan modifikasi kimia untuk meningkatkan kestabilan enzim. Penggunaan amobilisasi enzim hingga saat ini masih banyak digunakan dalam proses industri karena mempunyai keunggulan tertentu. Menurut Wang *et al.*, (1979), penggunaan enzim amobil dalam industri mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya adalah pemakaian yang dapat dilakukan berulang kali, produknya tidak terkontaminasi oleh enzim, memudahkan proses pengendalian reaksi, dapat digunakan untuk analisis, dan pada proses amobilisasi tertentu dapat meningkatkan stabilitas enzim.

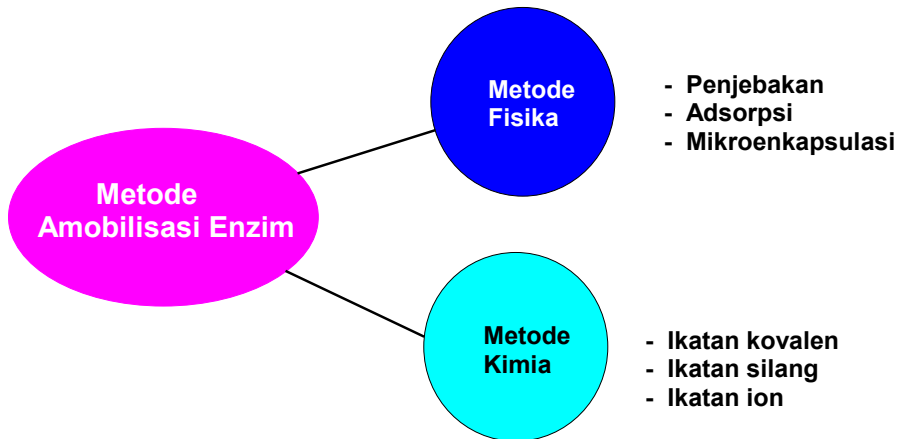
3. 2 Amobilisasi

Enzim amobil dapat didefinisikan sebagai enzim yang secara fisik ditempatkan pada suatu ruang tertentu sedemikian rupa sehingga aktivitas katalitiknya masih tetap ada, dan karenanya dapat digunakan kembali (Chibata, 1978). Amobilisasi enzim berarti proses penahanan atau penempatan molekul enzim pada fase tertentu yang enzim dapat berinteraksi dengan matriks tertentu (Trevan, 1980). Menurut Wang *et al.*, (1979), penggunaan enzim amobil dalam industri mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya adalah pemakaian yang dapat dilakukan berulang kali, produknya tidak terkontaminasi oleh enzim, memudahkan proses pengendalian reaksi, dapat digunakan untuk analisis, dan pada proses amobilisasi tertentu dapat meningkatkan stabilitas enzim.

3.2. 1 Metode amobilisasi enzim (Dwevedi, 2016)

a. Metode fisik

Enzim terikat pada matriks tertentu melalui kekuatan fisik yang melibatkan kekuatan Van der Waals, interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Prosesnya bersifat reversibel (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Teknik umum yang digunakan untuk amobilisasi enzim (Dwevedi, 2016)

1. Metode penjebakan

Metode penjebakan melibatkan ikatan silang antara enzim dengan polimer (poliakrilamida, alginat, dll) di setiap arah, meliputi hampir setiap rantai samping enzim yang ada di permukaan, enzim mengalami penjebakan secara fisik di dalam polimer. Hal ini memungkinkan terjadinya interaksi substrat dengan enzim dan pelepasan produk yang terbentuk, dan memungkinkan terjadinya interaksi berikutnya. Metode ini hanya bisa digunakan dalam jumlah enzim yang terbatas. Metode ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu kesederhanaan, tidak ada perubahan sifat enzim intrinsik, tidak melibatkan modifikasi kimia, kebutuhan enzim minimal, dan matriks tersedia dalam berbagai bentuk; juga memiliki berbagai kerugian, yaitu lepasnya interaksi enzim dengan matriks, hanya substrat/produk berukuran kecil yang bisa digunakan, membutuhkan keseimbangan antara sifat mekanik matriks dan efeknya pada aktivitas enzim.

2. Adsorpsi

Pada metode adsorpsi enzim terikat pada bahan pendukung dengan hubungan ikatan non-kovalen termasuk interaksi ion atau interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan interaksi Van der Waals . Matriks yang digunakan adalah senyawa organik maupun senyawa anorganik, yaitu: keramik, alumina, karbon aktif, kaolin, bentonit, kaca berpori, kitosan, dekstran, gelatin, selulosa, pati. Metode amobilisasi meliputi optimasi variabel termasuk pH, suhu, sifat pelarut, kekuatan ion, konsentrasi enzim dan adsorben. Disini enzim tersebut langsung ditambahkan ke permukaan (adsorben aktif) tanpa penghilangan enzim yang tidak teradsorpsi selama pencucian. Metode ini sederhana dan mudah dengan berbagai macam matriks yang sangat membantu pemurnian simultan serta amobilisasi enzim (misalnya Asparaginase pada CM-selulosa) tanpa perubahan konformasi, tetapi melibatkan optimasi yang intensif karena adanya keterlibatan sejumlah faktor yang berperan dalam desorpsi enzim setelah adanya sedikit perubahan pada lingkungan (misalnya, pH, suhu, pelarut, kekuatan ion dan konsentrasi substrat yang tinggi).

3. Mikroenkapsulasi

Pada metode ini enzim tidak bergerak dengan mengikatkannya pada membran polimer semi permeabel. Membran semi permeabel dapat bersifat permanen atau tidak permanen berdasarkan konstituennya. Membran permanen terbuat dari selulosa nitrat dan polistiren sedangkan membran non-permanen terbuat dari surfaktan cair. Membran ini juga digunakan dalam enkapsulasi pewarna, obat-obatan terlarang, dan bahan kimia lainnya. Enzim diamobilisasi dengan enkapsulasi yang memiliki luas permukaan yang sangat besar karena memiliki efisiensi katalitik yang tinggi. Namun, ada beberapa laporan tentang terjadinya inaktivasi enzim, meskipun konsentrasi enzimnya tinggi.

b. Metode kimia

Metode ini melibatkan interaksi enzim dengan matriks yang berbeda dengan menggunakan ikatan kovalen atau ikatan ionik dan prosesnya ireversibel (Gambar 3. 1).

1. Interaksi kovalen

Enzim terikat pada matriks dengan cara membentuk ikatan kovalen (diazotasi, ikatan amino, pembentukan basa Schiff, reaksi amidasi, tiol-disulfida, ikatan peptida, dan reaksi alkilasi). Molekul enzim terikat secara langsung ke gugus reaktif (misalnya gugus hidroksil, amida, amino, karboksil) yang ada pada matriks, yang secara artifisial terikat pada matriks melalui berbagai reaksi kimia (misalnya terbentuknya diazotasi, basa Schiff, ikatan imina). Matriks yang biasa digunakan berupa bahan alam (misalnya kaca, Sephadex, Agarose, Sepharosa) atau senyawa sintesis (misalnya akrilamida, asam metakrilat, stirena). Pemilihan matriks tertentu tergantung pada biaya, ketersediaan, kapasitas pengikatan, hidrofilitas, kekakuan struktur dan daya tahan selama berbagai aplikasi. Metode amobilisasi ini melibatkan asam amino yang tidak berperan pada pusat aktif enzim maupun sisi aktif enzim. Hal ini meminimalkan perubahan konformasi struktur tiga dimensi enzim dan membantu meningkatkan ketahanan enzim amobil terhadap kondisi fisik dan kimia yang ekstrim terhadap suhu, denaturasi, dan pelarut organik.

2. Ikatan silang

Amobilisasi dengan cara ini melibatkan pembentukan sejumlah ikatan kovalen antara enzim dan matriks menggunakan pereaksi bi- atau multifungsional (misalnya, glutardialdehida, glutaraldehida, glioksal, diisosianat, heksametilena diisosianat, toluena diisosianat). Umumnya, gugus amino pada lisin, sulfhidril pada sistein, gugus OH fenolik pada tirosin, atau gugus imidazol pada histidin digunakan

untuk mengikat enzim dalam kondisi lunak. Keuntungan utama dari metode ini adalah kesederhanaannya. Kerugian dalam pemakaian cara ini adalah dapat terjadinya inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang.

3. Ikatan Ionik

Metode ini berdasarkan pada interaksi ionik antara molekul enzim dengan matriks bermuatan. Dalam metode ini, semakin tinggi kerapatan muatan permukaan pada matriks, semakin besar jumlah enzim yang terikat pada matriks. Kemungkinan lain, selain interaksi ionik, molekul enzim juga bisa teradsorpsi dengan matriks secara fisik. Metode amobilisasi enzim dengan cara ini mirip dengan metode amobilisasi secara fisik, yaitu adsorpsi fisik. Enzim terikat melalui interaksi ionik selama amobilisasi tergantung pada pH larutan, konsentrasi enzim, dan suhu. Biasanya matriks yang digunakan adalah: turunan polisakarida (misalnya, dietilaminoetilselulosa, dekstran, karboksimetilselulosa, kitosan), polimer sintetis (misalnya turunan polistiren, polietilena vinilalkohol) dan bahan anorganik (misalnya, amberlite, alumina, silikat, bentonit, sepiolit, silika gel).

3.3 Modifikasi Kimia

Modifikasi kimia adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Keuntungan yang didapat dengan metode ini dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim adalah: (1) Interaksi antara enzim dengan substrat tidak terhalangi oleh adanya matriks yang tidak larut, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. (2) Pada proses amobil, mekanisme kerja enzim yang digunakan dalam bidang klinik selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari membran seluler, kemungkinan berubah karena keberadaan matriks pendukung (Janecek, 1993).

Mozhaev *et al.*, (1990), menyarankan modifikasi kimia enzim dengan senyawa berbobot molekul rendah merupakan metode paling sederhana yang dapat dilakukan. Proses modifikasi dilakukan dengan cara menginkubasi larutan enzim dengan larutan pemodifikasi, jika perlu enzim yang telah termodifikasi dipisahkan dari campuran dengan cara dialisis atau kromatografi kolom penyaringan molekul. Berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang kemungkinannya paling besar bereaksi dengan zat pemodifikasi adalah gugus fungsi yang terletak pada permukaan. Sedangkan gugus ϵ -amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim (Janecek, 1993).

Cara untuk mendapatkan enzim hasil modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil menurut Mozhaev *et al.*, (1990), adalah: (1) Modifikasi dengan pereaksi bifungsional (ikatan silang dari gugus fungsi pada permukaan). (2) Modifikasi dengan pereaksi nonpolar (peningkatan interaksi hidrofobik). (3) Penambahan gugus bermuatan atau gugus polar baru (penambahan ikatan hidrogen atau ionik). (4) Hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan air yang tidak disukai).

a. Modifikasi dengan pereaksi bifungsional (ikatan silang dari gugus fungsi pada permukaan) (Yandri 2006)

Lenders dan Crichton (1988) melakukan penelitian dengan proses modifikasi kimia menggunakan enzim glukamilase dari *Aspergillus niger*, dengan metode ikatan silang menggunakan dekstran. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan metode ini menghasilkan enzim hasil modifikasi dengan sifat sama dengan enzim asli. Sedangkan modifikasi dengan penambahan gugus amino pada glukamilase teraminasi menunjukkan peningkatan stabilitas

termal enzim hasil modifikasi sebesar dua kali dibandingkan dengan enzim aslinya pada suhu 70°C. Peningkatan stabilitas termal ini diperkirakan karena ada peningkatan kekakuan enzim hasil modifikasi akibat tambahan ikatan kovalen antara enzim dengan dekstran.

Kazan *et al.*, (1996) melakukan modifikasi kimia pada enzim penisilin G asilase dari mutan *E. coli* dengan metode ikatan silang menggunakan dimetiladipimidat. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi meningkat kestabilannya terhadap pH dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi. Kazan *et al.*, (1997) juga telah memodifikasi kimia enzim penisilin G asilase dari mutan *E. coli* menggunakan dekstran 71.000 dialdehida (metode ikatan silang). Hasil penelitian menunjukkan peningkatan stabilitas termal enzim hasil modifikasi hampir 9 kali dibandingkan enzim asli. Peningkatan stabilitas termal ini disebabkan peningkatan ikatan silang antara enzim dengan dekstran dialdehida. Pada proses modifikasi ini tidak terjadi perubahan temperatur optimum enzim (dibandingkan dengan enzim asli). Modifikasi kimia juga tidak mengubah harga K_m dan V_{maks} enzim.

Germain dan Robert (1988), melakukan modifikasi kimia pada enzim β -amilase dengan cara alkilasi reduktif menggunakan dekstran periodat teroksidasi (metode ikatan silang). Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan aktivitas enzim hasil modifikasi sebesar 57% karena terjadi halangan sterik dekat pusat aktif enzim. Penurunan aktivitas enzim ini dapat dikurangi menjadi 53% dengan penambahan substrat pada proses modifikasi untuk melindungi pusat aktif enzim. Konyugat dekstran β -amilase yang larut mempunyai stabilitas termal yang tinggi dibandingkan dengan enzim asli, dan terjadi peningkatan suhu optimum enzim sebesar 5°C dibandingkan dengan enzim asli. Peningkatan stabilitas termal

ini disebabkan karena adanya peningkatan kekakuan enzim hasil modifikasi.

b. Modifikasi dengan pereaksi nonpolar (peningkatan interaksi hidrofobik) (Yandri 2006)

Urabe *et al.*, (1973) melakukan modifikasi kimia pada enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis*, dengan proses asetilasi (peningkatan interaksi hidrofobik). Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi meningkat stabilitas termalnya pada suhu di atas 70°C, sedangkan pada suhu di bawah 70°C enzim hasil modifikasi mengalami penurunan stabilitas termalnya. Tsai *et al.*, (1974) melakukan modifikasi kimia pada enzim alkohol dehidrogenase dengan proses metilasi (peningkatan interaksi hidrofobik). Hasil penelitian menunjukkan metilasi pada 26 dari 60 residu lisin dapat meningkatkan aktivitas dan stabilitas enzim.

c. Modifikasi dengan penambahan gugus bermuatan atau gugus polar baru (penambahan ikatan hidrogen atau ionik) (Yandri 2006)

Janecek *et al.*, (1992) melakukan modifikasi kimia pada enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* menggunakan d-glukono- δ -lakton (penambahan gugus bermuatan). Hasil yang diperoleh juga menunjukkan bahwa enzim hasil modifikasi meningkat stabilitas termalnya pada suhu di atas 70°C, sedangkan di bawah 70°C enzim hasil modifikasi mengalami penurunan stabilitas termalnya dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi. Khajeh *et al.*, (2001), melakukan modifikasi kimia pada enzim α -amilase dari *Bacillus amiloliquefaciens* dan *B. licheniformis* menggunakan sitrakonatan anhidrat (penambahan gugus bermuatan). Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi dari *B. amiloliquefaciens* meningkat stabilitas termalnya hanya pada suhu 80°C. Enzim hasil modifikasi dari *B. licheniformis* pada suhu 96°C menunjukkan hasil

yang sama dengan enzim tanpa modifikasi, tidak terjadi peningkatan stabilitas termal. Sedangkan pada suhu 70°C, enzim hasil modifikasi lebih rendah stabilitas termalnya dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi.

d. Modifikasi dengan hidrofisisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan air yang tidak disukai) (Yandri 2006)

Hernaiz *et al.*, (1999) melakukan modifikasi kimia pada lipase dari *Candida rugosa* menggunakan PEG teraktivasi (hidrofisisasi permukaan protein). Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi meningkat stabilitas termalnya. Makin tinggi derajat modifikasi enzim semakin tinggi penurunan aktivitasnya. Lozano *et al.*, (1994) mempelajari efek dari senyawa-senyawa poliol terhadap stabilitas termal α -kimotripsin (hidrofisisasi permukaan protein). Hasil penelitian menunjukkan keberadaan senyawa poliol dapat meningkatkan stabilitas termal α -kimotripsin, menurunkan laju inaktivasi termal (k_i) dan meningkatkan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i).

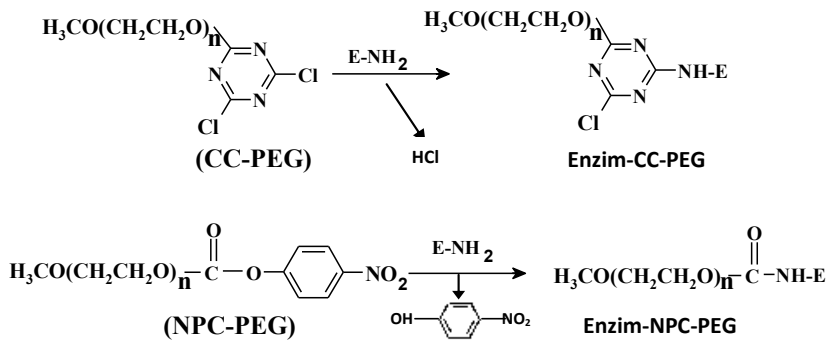
Beberapa proses modifikasi kimia menggunakan zat pemodifikasi dengan bobot molekul besar dan bobot molekul kecil

a. Modifikasi kimia dengan polietilenglikol (PEG) (Yandri 2006)

PEG dapat digunakan dalam berbagai berat molekul. Dengan beberapa pengecualian, berat molekul PEG yang digunakan untuk sintesis konjugat aktif berada dalam daerah 1000-20000 Da. PEG ini merupakan polimer yang homogen ($M_w/M_n \leq 1,1$) dengan struktur umum $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$.

Pengikatan PEG teraktivasi pada protein

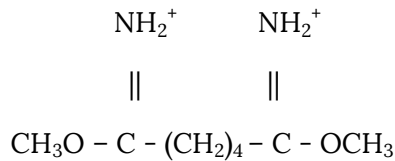
Yang *et al.*, (1996), menjelaskan bahwa ide dasar yang digunakan dalam sediaan protein PEG adalah mensintesis PEG teraktivasi, yang mengandung gugus terminal reaktif yang dapat dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam protein, seperti gugus ϵ -amino dari residu lisin. Untuk meningkatkan stabilitas substilisin, Yang *et al.*, (1996), menggunakan PEG yang diaktifkan dengan sianurat klorida dan *p*-nitrofenilkloroformat. Monometoksi polietilenglikol direaksikan dengan sianurat klorida atau *p*-nitrofenilkloroformat. Jika hanya satu atom Cl pada sianurat klorida yang disubstitusi dengan PEG maka dihasilkan PEG1 teraktivasi, yaitu sianurat klorida polietilenglikol (CC-PEG). Sedangkan pada *p*-nitrofenilkloroformat atom Cl disubstitusi untuk menghasilkan PEG1 teraktivasi, yaitu *p*-nitrofenolkarbonat polietilenglikol (NPC-PEG). PEG1 teraktivasi masing-masing lalu bergabung dengan berbagai macam protein, melalui substitusi satu atom Cl pada tiap molekul turunan sianurat klorida dan substitusi gugus *p*-nitrofenoksi pada tiap molekul turunan *p*-nitrofenilkloroformat (Gambar 3. 2).



Gambar 3. 2 . Mekanisme pengikatan PEG teraktivasi pada protein (Yang *et al.*, 1996)

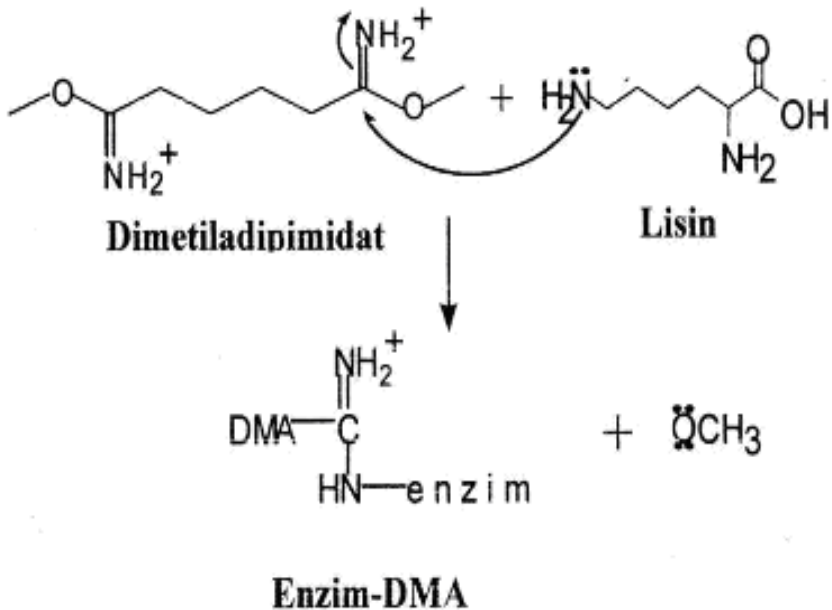
b. Modifikasi kimia dengan dimetiladipimidat (DMA)

Dimetiladipimidat (DMA) adalah senyawa agen penyambung silang (*cross-linking agent*) yang merupakan pereaksi bifungsional dengan dua gugus fungsi reaktif yang sama dalam strukturnya (Gambar 3. 3).



Gambar 3.3 Struktur dimetiladipimidat (DMA)

Dimetiladipimidat merupakan senyawa yang memiliki dua gugus reaktif, dan dapat digunakan untuk membentuk ikatan silang antar-maupun intra-molekular pada enzim. Selain dapat menstabilkan struktur tersier, pereaksi ini dapat pula untuk menghasilkan berbagai model ikatan silang untuk mempelajari interaksi protein-protein. Rantai samping asam amino yang reaktif yang dapat bereaksi dengan DMA adalah gugus amina primer pada lisin membentuk senyawa bismidoester, dan reaksinya akan berjalan lebih cepat pada pH basa (Soemitro, 2005). Pada Gambar 3. 4, terjadi reaksi nukleofilik antar enzim dan DMA. Gugus NH_2 ujung pada molekul enzim yang bersifat nukleofilik akan menyerang karbokation (C^+) pada molekul DMA. Hal ini mengakibatkan terjadinya ikatan antara DMA dengan enzim dengan melepaskan satu ion H^+ sementara karbokation (C^+) yang lain pada molekul DMA tersebut dapat pula diserang oleh gugus NH_2 ujung dari molekul enzim lain. Maka, terjadilah ikatan silang antara DMA dengan molekul enzim membentuk ikatan molekul enzim-DMA-molekul enzim.



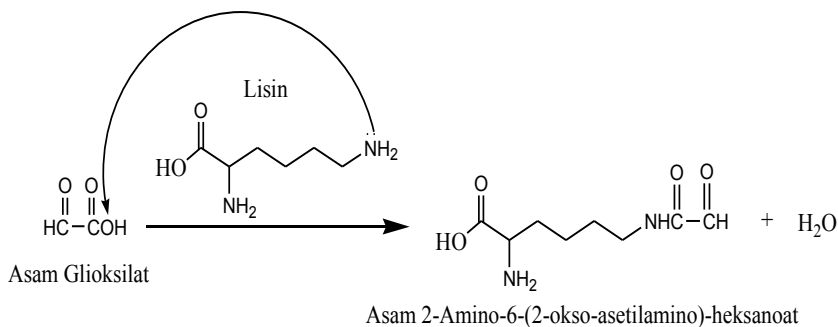
Gambar 3.4 Reaksi antara DMA dengan lisin

Mekanisme penstabilan struktur enzim oleh DMA terjadi melalui pengikatan silang inter- dan antarmolekuler DMA sehingga membentuk bulatan-bulatan kecil enzim dan mencegah tidak dapat melipatnya (unfolding) struktur tersier enzim dan disosiasi protein oligomer ke dalam subunit-subunit. Ikatan silang terhadap residu lisin di permukaan akan melindungi tapak hidrofobik enzim sehingga mengurangi kontak tapak hidrofobik dengan pelarut. Selain itu juga terjadi penambahan ikatan hidrogen antara atom nitrogen gugus amina pada molekul DMA dengan atom hidrogen gugus karboksil pada molekul enzim.

Kazan *et al.*, (1996), telah melakukan modifikasi kimia pada enzim penisilin G asilase dari mutan *E. coli* dengan metode ikatan silang menggunakan dimetiladipimidat. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi meningkat kestabilannya terhadap pH dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi. Hal ini karena telah terjadi perubahan tingkat ionisasi gugus-gugus organik pada enzim yang terkait dengan pembentukan ikatan hidrogen, dan menyebabkan bertambahnya rigiditas struktur penisilin G asilase. Peningkatan rigiditas ini akan meningkatkan kestabilan enzim terhadap pH maupun suhu lingkungan.

c. Modifikasi dengan asam glioksilat

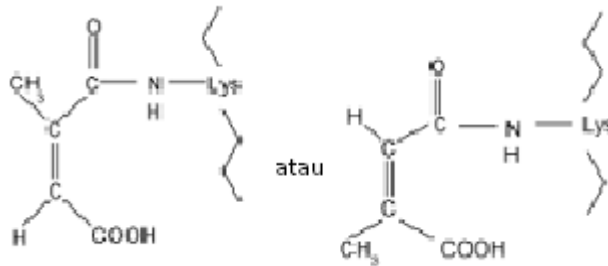
Melik-Nubarov *et al.*, (1987) melaporkan hidrofiliisasi α -kimotripsin menggunakan asam glioksilat (AG) dengan reduktor NaBH_4 , dapat meningkatkan kestabilan enzim tersebut secara nyata. Modifikasi dilakukan pada pH 8,4 sehingga gugus amina primer pada rantai samping lisin di permukaan enzim dengan mudah bereaksi dengan asam glioksilat (Gambar 3. 5).



Gambar 3.5. Reaksi antara asam glioksilat dengan lisin

d. Modifikasi dengan sitrakonat anhidrida

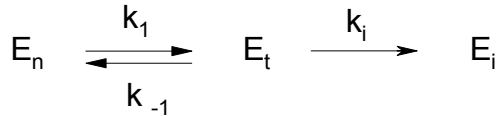
Sitrakonat anhidrida merupakan reagen spesifik yang digunakan untuk memblokir gugus amino pada residu lisin seperti yang dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2001). Reaksi modifikasi ini diawali dengan pembukaan cincin sitrakonat anhidrida dengan suasana basa yakni pada pH 8 dan kemudian gugus karbonil dari sitrakonat anhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin. Gambar 3. 6 menunjukkan reaksi yang terjadi antara sitrakonat dengan gugus amino suatu protein seperti yang telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2001).



Gambar 3.6. Modifikasi gugus amina suatu residu lisin dalam protein oleh sitrakonat anhidrida Khajeh *et al.*, (2001).

3. 4 Mekanisme Inaktivasi Termal Enzim Alami dan Termodifikasi

Mekanisme inaktivasi termal dari penisilin G asilase (PGA) alami dan hasil modifikasi menggunakan dekstran-dialdehida dari mutan *E. coli* telah dipelajari oleh Kazan *et. al.*, (1997). Berdasarkan hasil penelitiannya kinetika inaktivasi termal disarankan mengikuti reaksi orde-satu. Menurut mekanisme ini, enzim mengalami inaktivasi ireversibel dengan reaksi dua-tahap sebagai berikut:



E_n , E_t , dan E_i adalah bentuk PGA awal (alami), transisi, dan inaktivasi; dan k_i adalah konstanta laju inaktivasi enzim (menit⁻¹). Tahap pertama reaksi menghasilkan enzim keadaan transisi yang lebih sensitif pada inaktivasi termal ireversibel dari pada keadaan awal. Pada tahap kedua, bentuk transisi enzim diinaktivasi secara ireversibel berdasarkan reaksi kinetika orde-satu. Waktu inaktivasi enzim dapat diperoleh dari persamaan linier: $\ln(E_i/E_o) = - k_it$, bila $\ln(E_i/E_o)$ dialurkan terhadap t . Konstanta laju inaktivasi (nilai k_i) pada suhu berbeda untuk tiap PGA alami dan termodifikasi dihitung dari kemiringan garis regresi linier. Sedangkan waktu paruh (*half-life*) dapat dihitung dari persamaan tersebut.

Nilai k_i semua PGA termodifikasi-dekstran-dialdehida lebih rendah dari PGA alami, dan *half-life* untuk inaktivasi PGA termodifikasi-dekstran-dialdehida secara signifikan lebih tinggi dari PGA alami. Nilai ΔG_i PGA termodifikasi-dekstran-dialdehida pada suhu berbeda, dihitung dengan persamaan termodinamika $\Delta G_i = - RT \ln (k_i h/k_B T)$ [k_i = konstanta laju inaktivasi (menit⁻¹), k_B = konstanta Boltzmann ($1,4 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h = konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J menit}$), R = konstanta gas ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) dan T = suhu absolut (K)].

Janecek *et al.*, (1992), juga telah mempelajari mekanisme inaktivasi termal pada α -amilase alami dan enzim hasil modifikasi menggunakan d-glukono- δ -lakton dari *B. subtilis*. Aktivitas spesifik α -amilase hasil modifikasi menggunakan d-glukono- δ -lakton selama inaktivasi termal dapat dilihat pada Tabel 3. 1. Sedangkan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan gugus amino bebas α -amilase tanpa modifikasi dan hasil modifikas dapat dilihat pada Tabel 3. 2.

Tabel 3.1 Aktivitas spesifik α -amilase dari *Bacillus subtilis* tanpa modifikasi dan modifikasi selama inaktivasi termal

Suhu (°C)	α -Amilase		E (%)					
	Perbandingan Molar (GLL/gugus NH ₂)	Pati	Waktu inaktivasi (menit)					
			0	1,5	3	5	8	10
65	1000	+	100	99	77	37	19	9
	2000	+	100	69	41	33	16	10
	1000	-	100	97	64	29	20	9
	2000	-	100	87	75	51	31	15
	0	-	100	70	42	26	13	9
70	1000	+	100	86	48	27	8	--
	2000	+	100	56	39	9	8	--
	1000	-	100	84	48	21	10	--
	2000	-	100	64	60	14	12	--
	0	-	100	59	24	7	5	--
75	1000	+	100	65	39	17	5	--
	2000	+	100	41	26	14	5	--
	1000	-	100	54	27	15	5	--
	2000	-	100	62	47	25	10	--
	0	-	100	31	13	0	0	--
80	1000	+	100	27	18	8	--	--
	2000	+	100	21	14	11	--	--
	1000	-	100	32	20	11	--	--
	2000	-	100	36	32	19	--	--
	0	-	100	25	11	0	--	--

(Sumber Janecek et al., 1992)

Keterangan: GLL = d-glukono- δ -laktone

(% E) = aktivitas sisa

(+) = pada proses modifikasi ditambahkan pati

(-) = pada proses modifikasi tanpa penambahan pati

Tabel 3.2 Konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan gugus amino bebas α -amilase dari *Bacillus subtilis* tanpa modifikasi dan modifikasi

Sampel		k_i (menit ⁻¹)				Gugus amino bebas ($\times 10^{-17}$ /mg protein)
Perbandingan Molar (GLL/gugus NH ₂)	Pati	Suhu (°C)				
		65	70	75	80	
1000	+	0,25	0,32	0,38	0,48	5,27
2000	+	0,23	0,32	0,35	0,41	5,52
1000	-	0,25	0,31	0,36	0,43	3,82
2000	-	0,23	0,26	0,29	0,31	4,67
0	-	0,24	0,40	0,68	0,73	2,86

(Sumber Janecek *et al.*, 1992)

Keterangan: (+) = pada proses modifikasi ditambahkan pati

(-) = pada proses modifikasi tanpa penambahan pati

IV. KARAKTERISASI ENZIM HASIL MODIFIKASI KIMIA DAN AMOBILISASI

4.1 Modifikasi Enzim α -amilase dengan CC-PEG dan NPC-PEG

a. Derajat modifikasi enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dan NPC-PEG

Penentuan derajat modifikasi berdasarkan pada perbandingan jumlah residu lisin sesudah dimodifikasi dengan sebelum dimodifikasi (Synder dan Sobocinski, 1975) (Tabel 1). Bila terjadi modifikasi, gugus amina pada residu lisin yang tidak termodifikasi (tidak berikatan dengan CC-PEG atau NPC-PEG) akan bereaksi dengan molekul asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS) yang akan menghasilkan kompleks berwarna kuning. Semakin banyak gugus amina pada residu lisin terikat oleh CC-PEG dan NPC-PEG (semakin tinggi derajat modifikasi), semakin sedikit gugus amina bebas yang bereaksi dengan TNBS, kompleks warna kuning akan semakin sedikit terbentuk. Pengujian secara kualitatif dapat dilihat dari warna kuning yang semakin pudar yang menunjukkan derajat modifikasi semakin tinggi.

Tabel 4.1 Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6-trinitrobenzen sulfonat

Sampel	ΔA_{420nm}	Modifikasi (%)
Enzim hasil pemurnian	0,070	0
CC-PEG 1 : 10	0,054	23
CC-PEG 1 : 20	0,026	63
CC-PEG 1 : 40	0,023	67
NPC-PEG 1 : 20	0,031	56
NPC-PEG 1 : 40	0,017	76
NPC-PEG 1 : 60	0,008	89

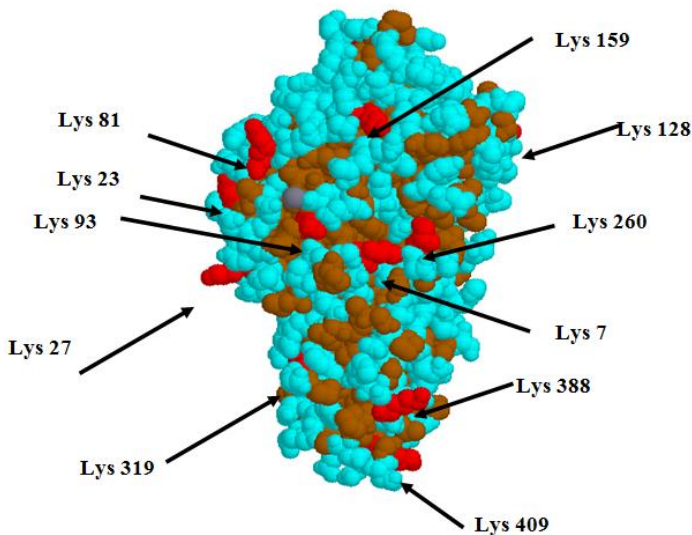
(Sumber Yandri et al., 2004)

Tabel 4. 1 menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dengan perbandingan molar antara enzim dengan CC-PEG (1 : 10, 1 : 20, dan 1 : 40) menghasilkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi berturut-turut: 23, 63, dan 67%. Sedangkan modifikasi dengan NPC-PEG dengan perbandingan molar antara enzim dan NPC-PEG (1 : 20 , 1 : 40, dan 1 : 60) menghasilkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi berturut-turut: 56, 76, dan 89%.

Dari model struktur tiga dimensi α -amilase *Bacillus subtilis* dapat diperkirakan lisin yang mengalami proses modifikasi. Gambar struktur primer enzim α -amilase dari *B. subtilis* menunjukkan ada 17 residu lisin (Gambar 4.1) (Yandri, 2007; Yandri et al., 2004). Sedangkan pada gambar struktur tiga dimensi (Gambar 4.2) menunjukkan posisi-posisi residu lisin yang terpapar ke permukaan dan paling mudah berinteraksi dengan zat pemodifikasi (Yandri, 2007; Yandri et al., 2004).

1 LTAPSIKSGT ILHAWNWSFN TLKHNMKDIH DAGYTAIQTS
 PINQVKEGNQ
 51 GDKSMSNWYW LYQPTSYQIG NRYLGTEQEF KEMCAAEEY
 GIKVIVDAVI
 101 NHTTFDYAAI SNEVKSIPNW THGNTQIKNW SDRWDVTQNS
 LLGLYDWNTO
 151 NTQVQSYLKR FLERALNDGA DGFRFDAAKH IELPDDGSYG
 SQFWPNITNT
 201 SAEFYQGQIL QDSASRDAAY ANYMDVTASN YGHSIRSALK
 NRNLGVSNIS
 251 HYASDVSAK LVTWVESHDT YANDDEESTW MSDDDIRLGW
 AVIASRSGST
 301 PLFFSRPEGG GNGVRFPGKS QIGDRGSALF EDQAITAVNR
 FHNVMAGQPE
 351 ELSNPNGNNQ IFMNQRGSHG VVLANAGSSS VSINTATKLP
 DGRYDNKAGA
 401 GSFQVNDGKL TGTINARVA VLYPD

Gambar 4.1 Urutan asam amino α -amilase *Bacillus subtilis* (Fujimoto et al., 1998)



Gambar 4.2 Struktur tiga dimensi α -amilase dari *Bacillus subtilis* dengan residu lisin yang terpapar ke permukaan, ditunjukkan dengan warna merah (Fujimoto et al., 1998)

Gambar 4.2 (warna merah) menunjukkan posisi residu lisin yang terpapar ke permukaan dan diperkirakan paling mudah berikatan dengan zat pemodifikasi. Dari 17 residu lisin yang terdapat dalam α -amilase dari *Bacillus subtilis*, hanya 11 residu lisin yang terpapar ke permukaan, yaitu: Lys 7, Lys 23, Lys 27, Lys 81, Lys 93, Lys 128, Lys 159, Lys 260, Lys 319, Lys 388, Lys 409 dan residu lisin inilah yang kemungkinan mengalami proses modifikasi.

b. Pengaruh modifikasi terhadap pH optimum

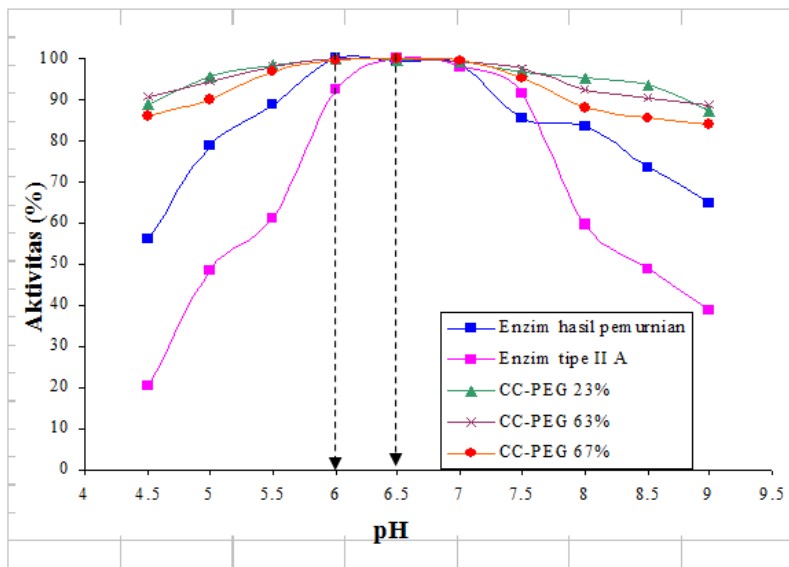
Enzim hasil modifikasi (CC-PEG dan NPC-PEG), mempunyai stabilitas terhadap pH dengan rentang yang lebih lebar dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, yaitu antara pH 4,5 - 9,0 (Yandri *et al.*, 2004), sedangkan enzim hasil pemurnian stabil pada pH antara 5,5 - 8,0 (Gambar 4. 3 dan Gambar 4. 4). Gambar IV.3 menunjukkan pH optimum enzim hasil pemurnian 6,0, pH optimum α amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.* 6,5. Sedangkan pH optimum enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG adalah: CC-PEG-23% mempunyai pH optimum 6,0; CC-PEG 63% dan CC-PEG 67% mempunyai pH optimum 6,5. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 23% mempunyai pH optimum yang sama dengan enzim hasil pemurnian, enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 63% dan 67% masing-masing mengalami kenaikan pH optimum setengah unit menjadi 6,5. Gambar 4.3 juga menunjukkan enzim hasil pemurnian stabil antara pH 5,0 - pH 9,0. Aktivitas (%) enzim hasil pemurnian pada pH 5,0 adalah 79,0, dan pada pH 9,0 adalah 64,9. Enzim α -amilase tipe II A dari *Bacillus sp.* mempunyai aktivitas (%) pada pH 5,0 48,4 lebih rendah dari enzim hasil pemurnian. Sedangkan pada pH 9,0 aktivitas (%) enzim ini adalah 38,9, juga lebih rendah dari enzim hasil pemurnian. Semua enzim hasil modifikasi meningkat stabilitasnya terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil modifikasi stabil terhadap pH antara

4,5 – 9,0. Aktivitas (%) enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%) pada pH 4,5 adalah 88,7, sedangkan pada pH 9,0 adalah 87,4; CC-PEG 63% pada pH 4,5 adalah 90,9; sedangkan pada pH 9,0 adalah 88,8; dan CC-PEG 67% pada pH 4,5 adalah 86,0, pada pH 9,0 adalah 84,2. Hasil ini menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG lebih stabil terhadap pH asam dan basa dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, maupun enzim tipe II A sebagai pembanding.

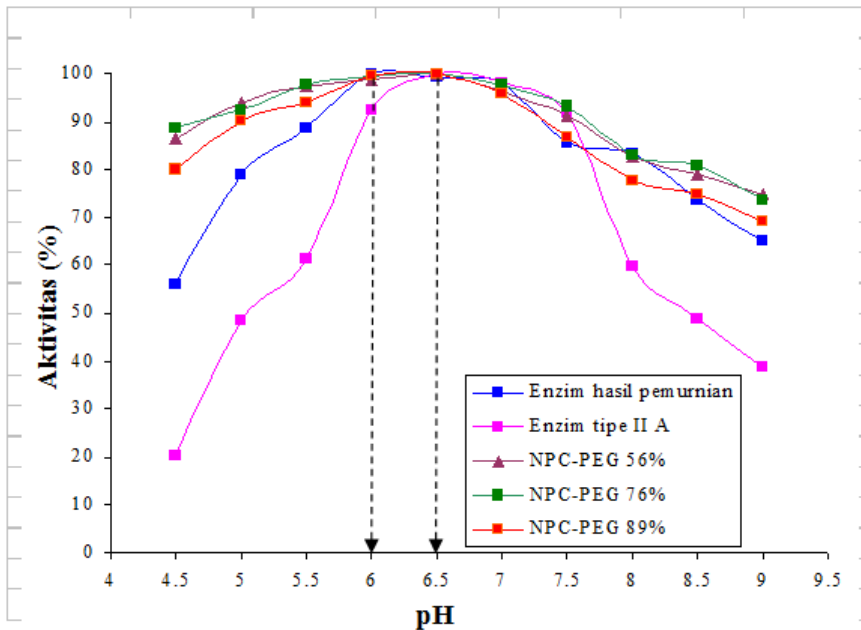
Gambar 4. 4 menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG mempunyai pH optimum 6,5. Semua enzim hasil modifikasi meningkat stabilitasnya terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil modifikasi stabil antara pH 4,5 – 9,0. Aktivitas (%) enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%) pada pH 4,5 adalah 86,6, sedangkan pada pH 9,0 adalah 74,8; NPC-PEG 76% pada pH 4,5 adalah 88,2, sedangkan pada pH 9,0 adalah 75,4; NPC-PEG 89% pada pH 4,5 adalah 80,2, sedangkan pada pH 9,0 adalah 69,1. Aktivitas (%) enzim hasil pemurnian pada pH 4,5 adalah 56,0, sedangkan pada pH 9,0 64,9. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG lebih stabil terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian terutama pada pH asam (antara 4,5 sampai 5,5). Sedangkan terhadap enzim tipe II A lebih stabil pada pH asam (antara 4,5 sampai 6,0) dan pH basa (antara 7,5 sampai 9,0).

Peningkatan stabilitas enzim hasil modifikasi terhadap pH diperkirakan karena gugus NH_2 bebas pada gugus R terutama yang terpapar ke permukaan berikatan dengan CC-PEG dan NPC-PEG sehingga terjadi perubahan muatan pada struktur enzim. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan stabilitas enzim hasil modifikasi terhadap pH khususnya pada kondisi asam, hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: gugus NH_2 merupakan gugus yang akan mengalami perubahan menjadi NH_3^+ , jika enzim tersebut berada dalam suasana asam. Pada proses modifikasi sebagian gugus NH_2 mengalami proses modifikasi, maka dalam suasana asam gugus NH_2

yang seharusnya berubah (menjadi bermuatan positif), tidak terjadi. Kondisi ini menyebabkan enzim hasil modifikasi lebih stabil terhadap pH pada kondisi asam dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Pada pH basa juga terjadi peningkatan rentang stabilitas enzim hasil modifikasi terhadap pH, walaupun tidak sebaik peningkatan kestabilan pada kondisi asam. Dengan demikian modifikasi ini telah berhasil meningkatkan stabilitas enzim terhadap pH baik pada kondisi asam maupun basa dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Kazan *et al.*, (1996), melakukan modifikasi kimia pada enzim penisilin G asilase dari mutan *E. coli* dengan metode ikatan silang menggunakan dimetiladipimidat. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi meningkat kestabilannya terhadap pH dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi.



Gambar 4.3. pH optimum enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23 %, CC-PEG 63 %, CC-PEG 67 %), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A (Yandri *et al.*, 2004)



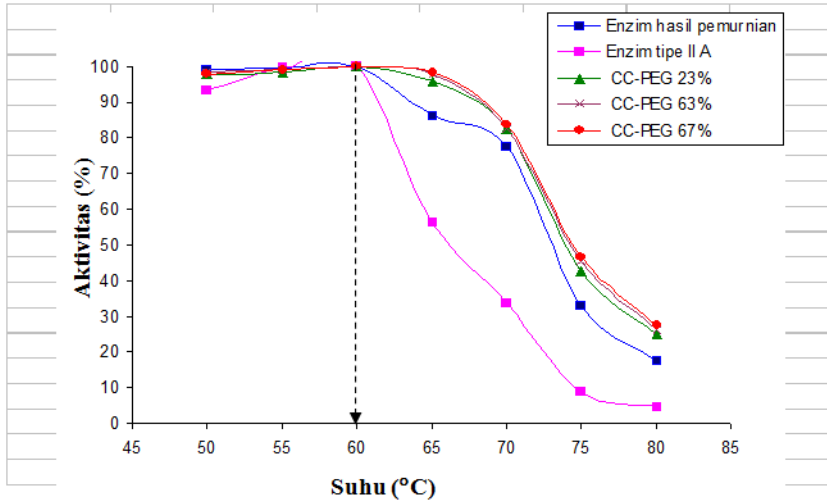
Gambar 4.4 pH optimum enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%; NPC-PEG 76%; NPC-PEG 89%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A (Yandri et al., 2004)

c. Pengaruh modifikasi terhadap suhu optimum

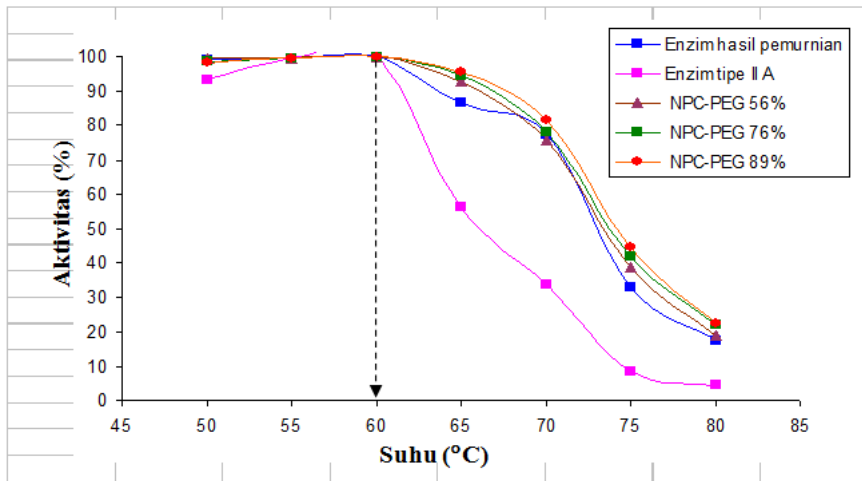
Suhu optimum enzim hasil pemurnian berdasarkan Gambar 4. 5 adalah 60°C. Demikian pula suhu optimum α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.* 60°C. Sedangkan suhu optimum enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG juga sama yaitu 60°C. Walaupun suhu optimum enzim hasil modifikasi tidak mengalami kenaikan dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, akan tetapi stabilitas enzim hasil modifikasi tersebut meningkat, terutama pada suhu antara 65 – 70 °C. Pada suhu 65°C enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas 86,4%. Sedangkan enzim hasil modifikasi CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67% mempunyai aktivitas berturut-turut: 95,8%; 97,9%; dan 98,2%. Gambar 4. 6 menunjukkan suhu optimum enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG adalah sama, yaitu 60°C. Gambar di atas juga menunjukkan bahwa

stabilitas enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG relatif lebih baik dibandingkan stabilitas enzim hasil pemurnian dan enzim tipe II A.

Tidak terjadinya perubahan suhu optimum antara enzim hasil modifikasi dengan enzim hasil pemurnian, diperkirakan karena ukuran molekul PEG yang besar, sehingga tidak dapat memasuki celah menuju pusat aktif enzim dan modifikasi kimia hanya terjadi pada residu lisin yang hanya dipermukaan. Kondisi ini tidak menyebabkan struktur tiga dimensi enzim mengalami banyak perubahan sehingga energi aktivasinya tidak berubah, dan suhu optimumnya juga tidak berubah. Hasil ini juga sesuai dengan asumsi tujuan modifikasi enzim yang hanya di targetkan terjadi pada gugus NH_2 rantai samping lisin yang terletak dipermukaan enzim. Kazan *et al.*, (1997), dan Francis *et al.*, (1992) melaporkan bahwa modifikasi kimia tidak selalu menyebabkan terjadinya perubahan suhu optimum enzim hasil modifikasi. Walaupun tidak terjadi perubahan suhu optimum, akan tetapi aktivitas enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dan NPC-PEG pada suhu yang lebih tinggi menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2005^b). Kondisi ini diperkirakan karena proses modifikasi menyebabkan rigiditas dari enzim hasil modifikasi meningkat, sehingga enzim hasil modifikasi lebih tahan terhadap suhu. Kazan *et al.*, (1997), juga telah memodifikasi kimia enzim penisilin G asilase dari mutan *E. coli* menggunakan dekstran 71.000 dialdehida (metode ikatan silang). Hasil penelitian menunjukkan peningkatan stabilitas termal enzim hasil modifikasi hampir 9 kali dibandingkan enzim asli akan tetapi pada proses modifikasi ini tidak terjadi perubahan temperatur optimum enzim (dibandingkan dengan enzim asli). Modifikasi kimia juga tidak mengubah harga K_m dan V_{maks} enzim.



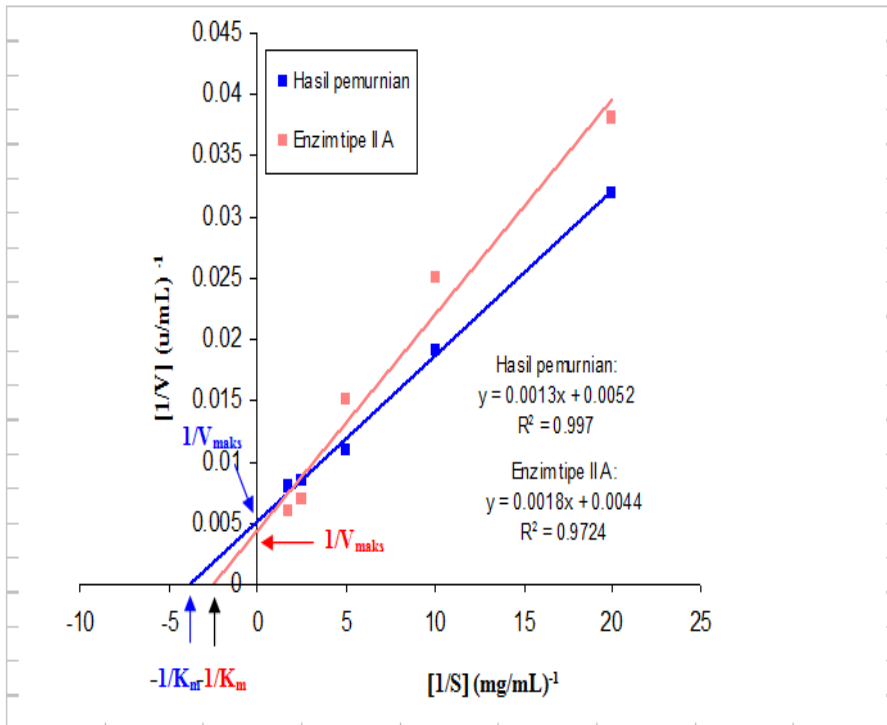
Gambar 4.5 Suhu optimum enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A (Yandri et al., 2004; Yandri et al., 2005^b)



Gambar 4.6 Suhu optimum enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%, NPC-PEG 76%, NPC-PEG 89%), enzim hasil pemurnian, dan enzim tipe II A (Yandri et al., 2004; Yandri et al., 2005^b)

d. Pengaruh modifikasi terhadap data kinetika

Grafik penentuan harga K_m dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.7.

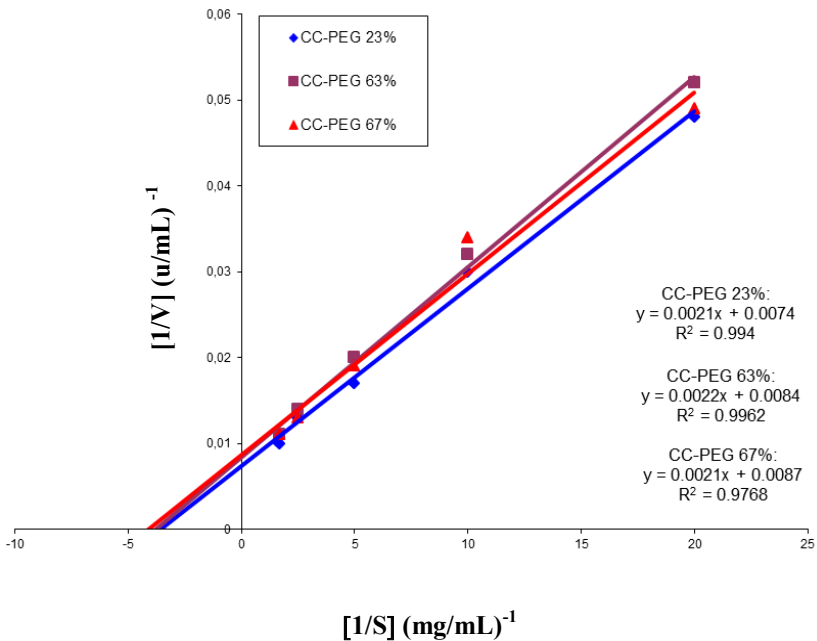


Gambar 4.7 Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian dan enzim tipe II A dari *Bacillus sp.* (Yandri et al., 2004).

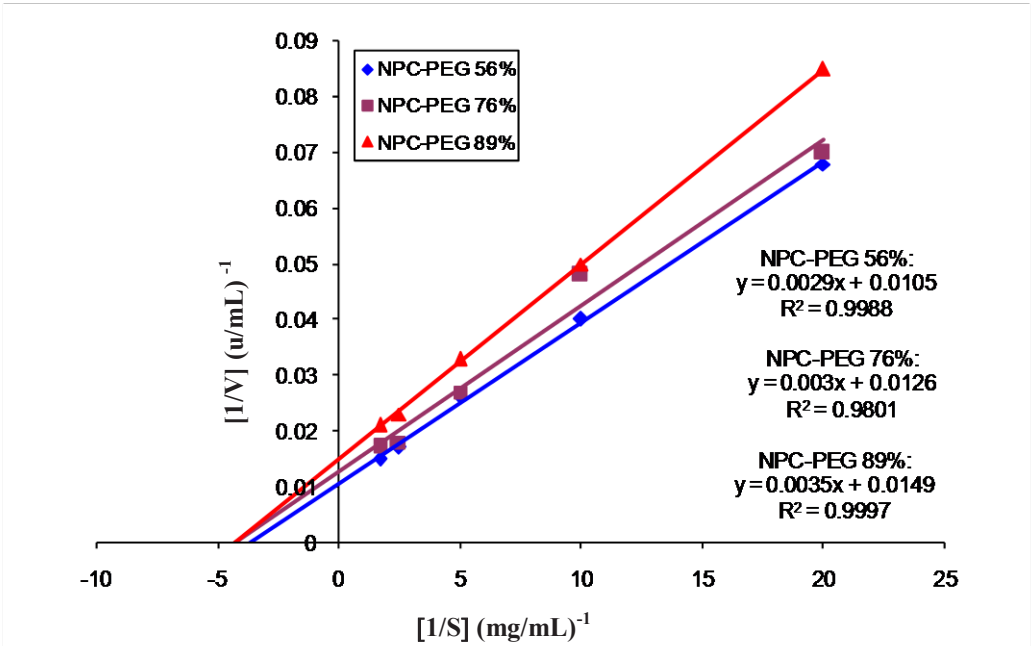
Dari persamaan Lineweaver-Burk diperoleh harga V_{maks} enzim hasil pemurnian $192,3 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, sedangkan K_m enzim hasil pemurnian $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat (Lampiran 16). Sedangkan V_{maks} α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.* adalah $227,2 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, dan $K_m = 4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat. Hasil ini menunjukkan harga V_{maks} enzim hasil pemurnian tidak berbeda jauh dengan V_{maks} α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.*, tetapi harga K_m enzim hasil pemurnian berbeda dengan K_m α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A

dari *Bacillus sp.* dan K_m α -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* pada penggunaan substrat yang sama, yaitu pati terlarut. Harga K_m enzim dari *Bacillus stearothermophilus* $1,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (Srivastava, 1987).

Hasil penentuan K_m enzim hasil modifikasi (CC-PEG dan NPC-PEG), menunjukkan tidak terjadi perubahan yang besar antara K_m enzim hasil modifikasi dibandingkan enzim hasil pemurnian (Yandri, 2005^a) (Gambar 4. 8 dan 4. 9).



Gambar 4.8 Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil modifikasi CC-PEG 23%; CC-PEG 63%; CC-PEG 67% (Yandri et al., 2004; Yandri, 2005^a)



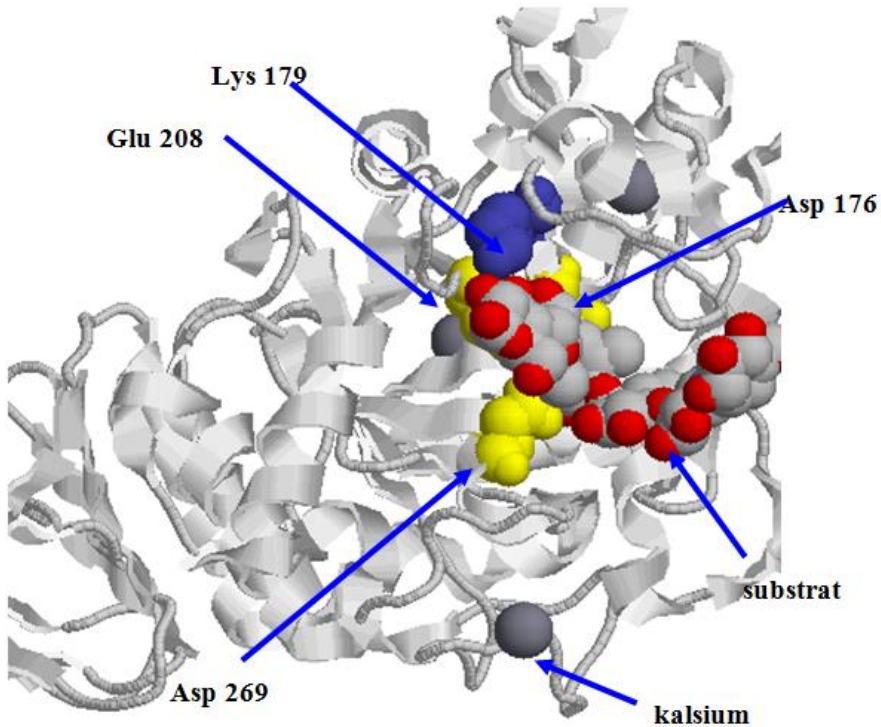
Gambar 4.9 Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil modifikasi NPC-PEG 56%; NPC-PEG 76%; NPC-PEG 89% (Yandri *et al.*, 2004; Yandri, 2005^a)

Grafik penentuan K_m dan V_{maks} enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG pada Gambar 4.8 menunjukkan harga V_{maks} dan K_m enzim hasil modifikasi sebagai berikut: CC-PEG 23% $V_{maks} = 135,1 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_m = 2,8 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat ; CC-PEG 63% $V_{maks} = 119,1 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_m = 2,6 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat ; CC-PEG 67% $V_{maks} = 114,9 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_m = 2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat. Hasil tersebut menunjukkan tidak terjadi perubahan harga K_m untuk semua enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG. Sedangkan V_{maks} semua enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG mengalami penurunan.

Dari persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 4. 9) diperoleh harga V_{maks} dan K_m enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG sebagai berikut: enzim modifikasi NPC-PEG 56% $V_{maks} = 95,2 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_m = 2,7 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat; NPC-PEG 76% $V_{maks} = 79,4 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_m = 2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat; sedangkan NPC-PEG 89%

$V_{\text{maks}} = 67,1 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $K_m = 2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat. Hasil ini menunjukkan tidak terjadi perubahan harga K_m untuk semua enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG. Sedangkan V_{maks} semua enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG juga mengalami penurunan.

Diperkirakan tidak terjadi perubahan pada struktur enzim, khususnya pada daerah pusat aktif enzim sehingga afinitas enzim terhadap substrat juga tidak mengalami perubahan. Hasil ini diperkuat dengan gambar struktur tiga dimensi enzim α -amilase dari *B. subtilis* (Yandri *et al.*, 2004). Gambar tersebut menunjukkan bahwa hanya ada satu residu lisin yang terlibat pada proses pengikatan substrat yaitu residu lisin nomor 179 (Gambar 4.10). Berdasarkan Gambar 4. 10 tersebut residu lisin ini merupakan residu yang sulit untuk mengalami modifikasi karena tidak terpapar ke permukaan dan berada pada celah sehingga sulit untuk dimasuki oleh PEG dengan bobot molekul yang besar. Harga V_{maks} semua enzim hasil modifikasi menurun dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Yandri, 2005^a). Hal ini disebabkan modifikasi kimia dengan CC-PEG dan NPC-PEG dengan rantai yang panjang pada permukaan molekul enzim diperkirakan membuat enzim kurang fleksibel dalam larutan air (Yang *et al.*, 1996). PEG juga mempengaruhi *proximity* dan orientasi enzim. Enzim pada kondisi tanpa dimodifikasi dapat berinteraksi dengan mudah dengan substrat, dengan adanya rantai PEG yang panjang menyebabkan kondisi ini berubah sehingga V_{maks} menjadi turun. Kazan *et al.*, (1997) dan Francis *et al.*, (1992), melaporkan modifikasi kimia tidak selalu menyebabkan terjadinya perubahan nilai K_m dan V_{maks} enzim hasil modifikasi.



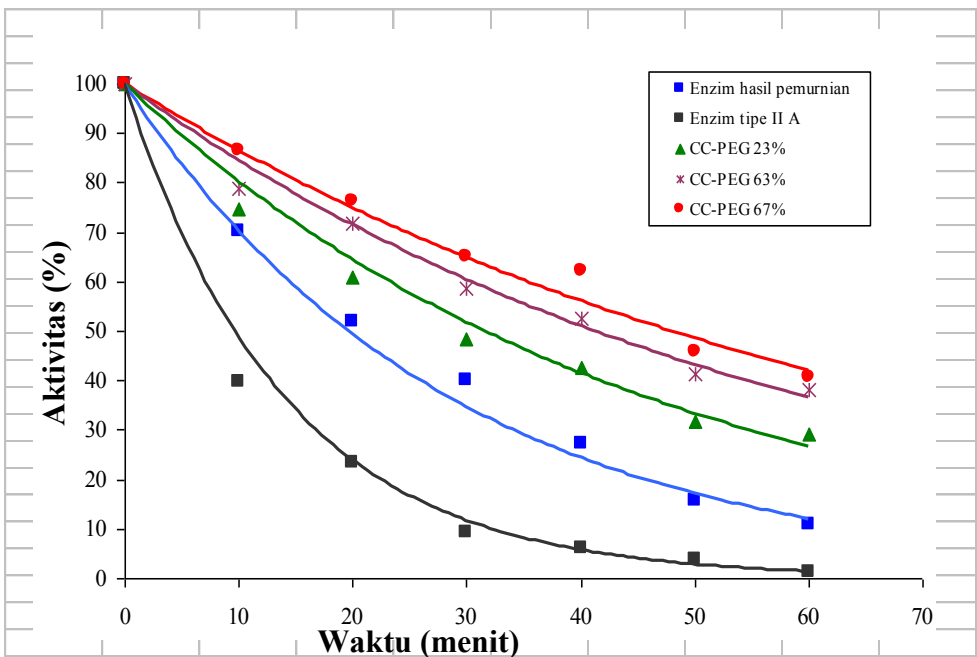
Gambar 4.10 Pusat aktif (residu Asp 176, Asp 269, Glu 208) α -amilase dan residu lisin nomor 179 yang terlibat dalam pengikatan substrat dari *Bacillus subtilis* (Fujimoto *et al.*, 1998)

e. Pengaruh modifikasi terhadap stabilitas termal

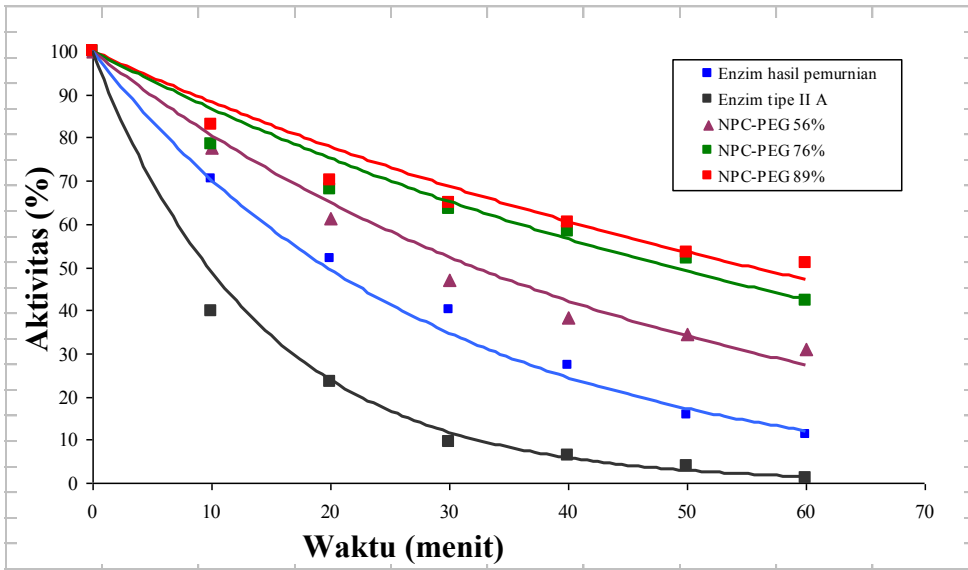
Aktivitas sisa (*residual activity*), enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dan NPC-PEG ditentukan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60°C selama 60 menit. Pada interval waktu tertentu masing-masing enzim ditentukan aktivitasnya. Kurva uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dapat dilihat pada Gambar IV.11. Gambar tersebut menunjukkan aktivitas sisa masing-masing enzim pada suhu 60°C selama 60 menit. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa sebesar 11%, α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus*

sp. mempunyai aktivitas sisa sebesar 1,22%. Enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67%) mempunyai aktivitas sisa berturut-turut: 29,1%; 38%; dan 40,6%. Terlihat jelas bahwa enzim hasil modifikasi mempunyai stabilitas termal yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian maupun α -amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari *Bacillus sp.*. Semakin tinggi derajat modifikasi semakin tinggi pula stabilitas termal enzim tersebut.

Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG pada Gambar 4.12 menunjukkan aktivitas sisa enzim selama penyimpanan pada suhu 60°C selama 60 menit. Aktivitas sisa enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%, NPC-PEG 76%, NPC-PEG 89%) berturut-turut 31%; 42,3%; 51%. Grafik menunjukkan aktivitas sisa enzim hasil modifikasi jauh lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian dan enzim tipe II A.



Gambar 4.11 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian; α -amilase tipe II A; enzim hasil modifikasi (CC-PEG 23%, CC-PEG 63%, CC-PEG 67%); pada suhu 60°C terhadap waktu ((Yandri et al., 2004)



Gambar 4.12 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian; α -amilase tipe II A; enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%, NPC-PEG 76%, NPC-PEG 89%); pada suhu 60°C terhadap waktu (Yandri et al., 2004)

Semua enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dan NPC-PEG dengan derajat modifikasi yang berbeda-beda mempunyai waktu paruh yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi (Yandri et al., 2005^b). Modifikasi kimia dengan PEG teraktivasi terhadap residu lisin khususnya yang terpapar ke permukaan menyebabkan tapak hidrofobik pada permukaan enzim terlindungi sehingga kontakannya dengan pelarut semakin menurun, kondisi ini sangat menguntungkan bagi struktur enzim α -amilase.

f. Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim sebelum dan sesudah modifikasi serta α -amilase tipe II A sebagai pembanding

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) α -amilase hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde satu (Kazan et al., 1997) dengan persamaan:

$$\ln(E_i / E_0) = -k_i t \quad (1)$$

Sedangkan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi dilakukan dengan menggunakan persamaan (Kazan *et al.*, 1997):

$$\Delta G_i = -RT \ln(k_i h / k_B T) \quad (2)$$

R = konstanta gas (8,315 J K⁻¹ mol⁻¹)

T = suhu absolut

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck (6,63 x 10⁻³⁴ J det)

k_B = konstanta Boltzmann (1,381 x 10⁻²³ J/K)

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian, α -amilase tipe II A, dan enzim hasil modifikasi

Enzim	k_i .menit ⁻¹	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i kJ.mol ⁻¹
α -Amilase (EC 3.2.1.1) tipe II A dari <i>Bacillus sp.</i>	0,067	7,4	100,7
Hasil pemurnian	0,038	21,2	102,3
CC-PEG 23%	0,019	30,7	104,2
CC-PEG 63%	0,016	41,3	104,7
CC-PEG 67%	0,015	47,6	104,9
NPC-PEG 56%	0,018	30,3	104,4
NPC-PEG 76%	0,011	49,6	105,7
NPC-PEG 89%	0,009	59,1	106,3

(Sumber Yandri *et al.*, 2004)

Semua enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dan NPC-PEG meningkat waktu paruhnya antara dua sampai tiga kali dibandingkan enzim tanpa dimodifikasi. Menurut Stahl (1999), stabilitas termal enzim ditentukan dengan menentukan waktu paruh dari enzim tersebut. Peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi dengan

CC-PEG dan NPC-PEG ini hampir sama dengan yang dilaporkan Hernaiz *et al.*, (1999), akan tetapi kehilangan aktivitas enzim yang jauh berbeda (Tabel 4. 3 dan 4. 4). Enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG dengan derajat modifikasi 67% mampu meningkatkan waktu paruh enzim hasil modifikasi dari 21,2 menit menjadi 47,6 menit, dan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 75,2%. Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 89% mampu meningkatkan waktu paruh enzim hasil modifikasi menjadi 59,1 menit, dan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 70,3%. Sedangkan Hernaiz *et al.*, (1999), yang melakukan modifikasi kimia pada enzim lipase dari *Candida rugosa* menggunakan PEG teraktivasi, yaitu NPC-PEG melaporkan terjadi peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi pada suhu 50°C dibandingkan enzim tanpa dimodifikasi. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 60%, waktu paruhnya meningkat dari 12 jam menjadi 25 jam. Sedangkan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 21%. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 68% mampu meningkatkan waktu paruh enzim menjadi 60 jam dan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 13%. Hasil ini menunjukkan modifikasi enzim hasil pemurnian dengan CC-PEG dan NPC dapat meningkatkan waktu paruh enzim yang tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Hernaiz *et al.*, (1999), akan tetapi kehilangan aktivitas enzim hasil modifikasi jauh lebih baik.

Tabel 4. 3 Perubahan aktivitas enzim pada proses modifikasi dengan CC-PEG

Sumber enzim	Volume (mL)	Aktivitas (u mL ⁻¹)	Perolehan (%)
Hasil pemurnian	5	1975,2	100,0
CC-PEG (23%)	5	1641,6	83,1
CC-PEG (63%)	5	1590,4	80,5
CC-PEG (67%)	5	1485,6	75,2

(Sumber Yandri *et al.*, 2004)

Keterangan: Data pada tabel dihitung berdasarkan kadar protein yang sama (0,05 mg mL⁻¹).

Tabel 4.4 Perubahan aktivitas enzim pada proses modifikasi dengan NPC-PEG

Sumber enzim	Volume (mL)	Aktivitas (u mL ⁻¹)	Perolehan (%)
Hasil pemurnian	5	1975,2	100,0
NPC-PEG (56%)	5	1899,2	96,2
NPC-PEG (76%)	5	1420,0	71,9
NPC-PEG (89%)	5	1388,0	70,3

(Sumber Yandri et al., 2004)

Keterangan: Data pada tabel dihitung berdasarkan kadar protein yang sama (0,05 mg mL⁻¹).

Khajeh et al., (2001), melakukan modifikasi kimia pada enzim α -amilase dari *Bacillus amiloliquefaciens* dan *Bacillus licheniformis* menggunakan sitrakonat anhidrat. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil modifikasi dari *B. amiloliquefaciens* meningkat stabilitas termalnya hanya pada suhu 80°C. Akan tetapi, jika dihitung berdasarkan waktu paruh, enzim hasil modifikasi dan yang tidak dimodifikasi menunjukkan nilai waktu paruh yang sama. Enzim hasil modifikasi dari *B. licheniformis* pada suhu 96°C menunjukkan hasil yang sama dengan enzim tanpa modifikasi, yang berarti tidak terjadi peningkatan stabilitas termal. Sedangkan pada suhu 70°C, enzim hasil modifikasi lebih rendah stabilitas termalnya dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi.

Tabel 4.2 menunjukkan terjadi penurunan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) untuk masing-masing enzim hasil modifikasi, ini berarti terjadi penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim berdasarkan penurunan nilai k_i adalah antara 2-4 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Pada penelitian ini pengamatan dilakukan terutama pada pengaruh modifikasi kimia terhadap nilai k_i enzim hasil modifikasi menggunakan CC-PEG dan NPC-PEG. Penurunan nilai k_i diperkirakan karena terbentuknya ikatan antara molekul PEG dengan rantai yang panjang dengan

gugus NH_2 rantai samping residu lisin pada molekul enzim yang terletak di permukaan. Kondisi ini membuat enzim kurang fleksibel dalam larutan air, oleh karena itu ketidakterlipatan (*unfolding*) protein menjadi berkurang, dan meningkatkan kestabilan enzim (Yang *et al.*, 1996). Kazan *et al.*, (1997) melaporkan bahwa konstanta kecepatan inaktivasi (k_i) enzim hasil modifikasi dengan dekstran-71000-dialdehid selalu lebih rendah dari konstanta kecepatan inaktivasi (k_i) Penisilin G asilase (PGA) alami. Penurunan konstanta kecepatan inaktivasi (k_i) PGA yang dimodifikasi dengan dekstran-71000-dialdehid adalah 7 kali. Hasil ini lebih baik dari modifikasi menggunakan CC-PEG dan NPC-PEG yang dilakukan. Akan tetapi penurunan nilai k_i enzim hasil modifikasi pada penelitian ini lebih baik dari penurunan nilai k_i enzim α -amilase dari *B. subtilis*, hasil modifikasi menggunakan d-glukono- δ -lakton yang dilaporkan Janecek *et al.*, (1992).

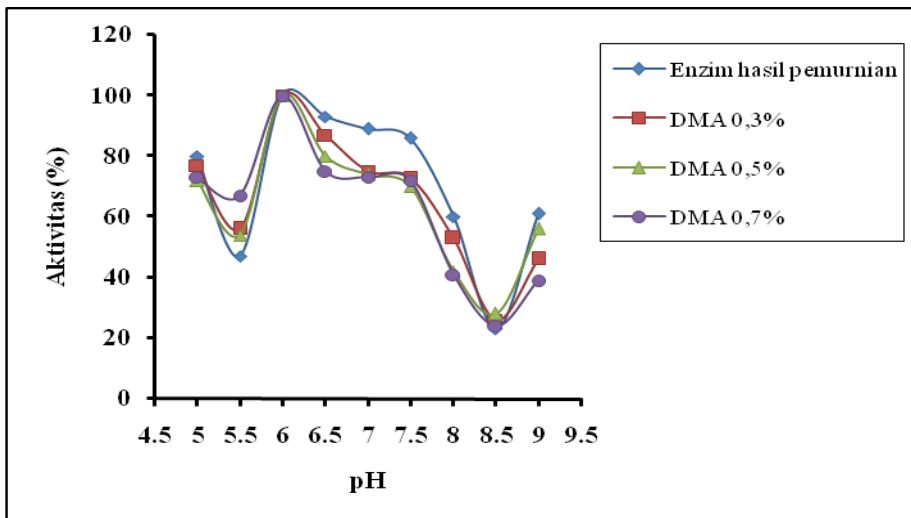
4.2 Modifikasi Enzim α -amilase dengan Dimetiladipimidat

Modifikasi kimia enzim hasil pemurnian menggunakan dimetiladipimidat (DMA) dilakukan dengan tiga variasi perbandingan % DMA dalam campuran yaitu: 0,3% ; 0,5%; dan 0,7%.

a. Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi terhadap berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 4.13. Gambar 4.13 menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 6,0. Sedangkan pH optimum untuk enzim hasil modifikasi dengan DMA dengan konsentrasi 0,3%; 0,5% dan 0,7% juga sama, yaitu pH 6,0 (Yandri *et al.*, 2010^a). Tidak terjadi pergeseran pH optimum pada enzim α -amilase hasil pemurnian maupun enzim α -amilase dimodifikasi dengan DMA. Enzim hasil pemurnian stabil antara pH 6,5-7,5, lebih baik dibandingkan enzim hasil modifikasi. Enzim hasil modifikasi (DMA 0,3%; 0,5% dan 0,7%) juga cukup stabil pada pH

6,5-7,5. Enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi mengalami penurunan aktivitas yang tinggi pada pH 8,0. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil modifikasi dengan DMA tidak mengalami perubahan rentang pH kerja enzim, hampir sama dengan enzim hasil pemurnian.

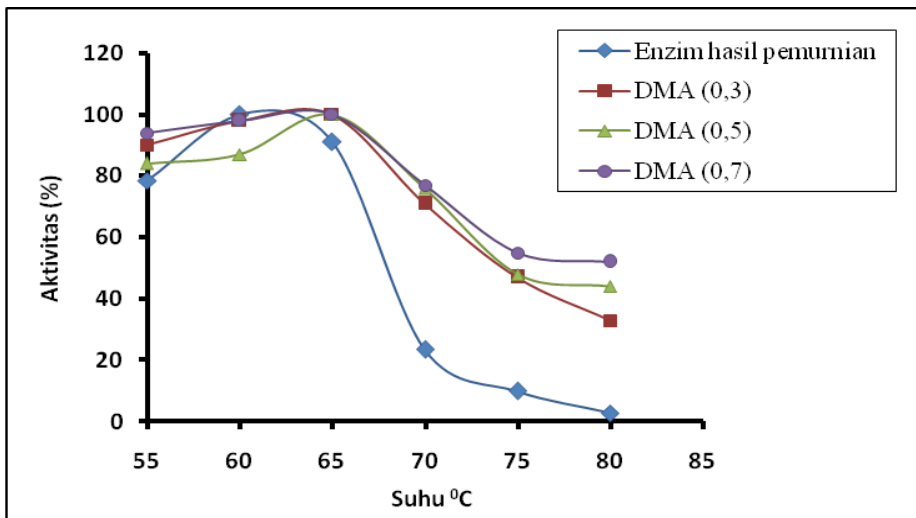


Gambar 4.13 pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%; DMA 0,5%; dan DMA 0,7%. (Yandri *et al.*, 2010^a)

b. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 4. 14. Gambar tersebut menunjukkan bahwa suhu optimum enzim hasil pemurnian adalah 60^oC. Sedangkan enzim hasil modifikasi (DMA 0,3%, DMA 0,5%, dan DMA 0,7%) mengalami pergeseran suhu optimum dari 60^oC menjadi 65^oC (Yandri *et al.*, 2010^a). Pergeseran suhu optimum enzim hasil modifikasi kemungkinan terjadi karena interaksi antara enzim dengan molekul DMA yang menyebabkan adanya tambahan ikatan kovalen dan nonkovalen, terutama tambahan interaksi hidrofobik yang menyebabkan struktur tiga

dimensi enzim sedikit mengalami perubahan sehingga energi aktivasinya juga mengalami perubahan. Kazan *et al.*, (1997) melaporkan bahwa modifikasi kimia dapat menyebabkan terjadinya perubahan suhu optimum enzim hasil modifikasi.



Gambar 4.14 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%; DMA 0,5%; dan DMA 0,7% (Yandri *et al.*, 2010^a)

Enzim α -amilase hasil modifikasi dengan DMA (0,3%, 0,5% dan 0,7%) memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian terutama pada suhu 70-80°C. Enzim hasil pemurnian mengalami penurunan aktivitas yang besar pada suhu 70°C. Aktivitas (%) enzim hasil modifikasi (DMA 0,3%, DMA 0,5%, dan DMA 0,7%) pada suhu 70°C berturut-turut adalah 71%, 76%, dan 77%. Sedangkan aktivitas (%) enzim untuk enzim hasil pemurnian pada suhu 70°C adalah 23,4%. Pada suhu 80°C enzim hasil pemurnian mengalami penurunan aktivitas yang sangat besar. Sedangkan semua enzim hasil modifikasi masih memiliki aktivitas yang cukup tinggi. Aktivitas (%) enzim hasil modifikasi (DMA 0,3%, DMA 0,5%, dan DMA 0,7%) berturut-turut adalah 33%, 44%, dan 52%.

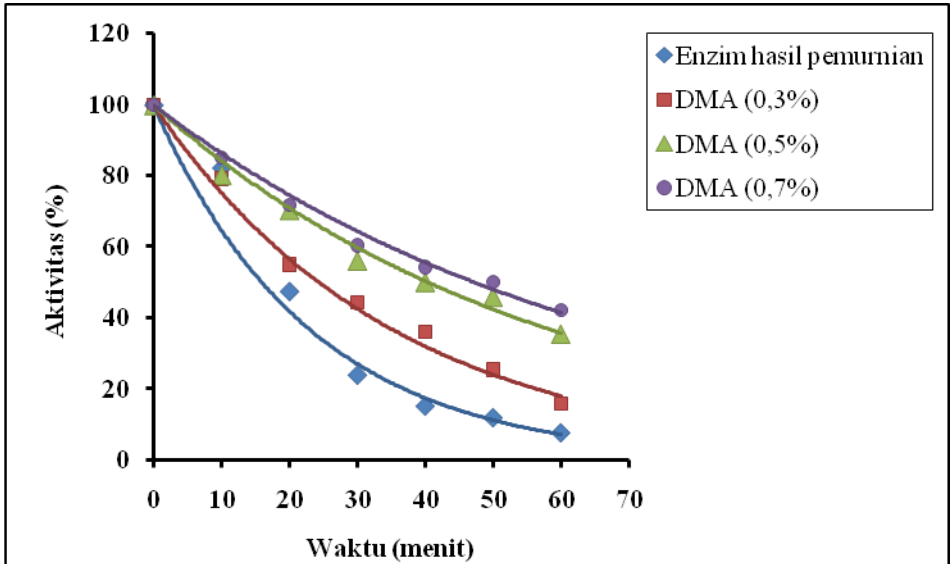
Sedangkan aktivitas (%) enzim untuk enzim hasil pemurnian adalah 2,8%.

c. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Hasil penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi menunjukkan tidak terjadi perubahan yang besar antara K_M enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2010^a). Diperkirakan tidak terjadi perubahan pada struktur enzim, khususnya pada daerah pusat aktif enzim sehingga afinitas enzim terhadap substrat juga tidak mengalami perubahan. Sedangkan untuk harga V_{maks} semua enzim hasil modifikasi menurun dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Hal ini disebabkan karena modifikasi kimia enzim dengan DMA menyebabkan interaksi antara enzim dengan substrat tidak berlangsung dengan baik. Pada kondisi tanpa zat modifikasi, enzim dapat berinteraksi dengan mudah dengan substrat. Sedangkan pada kondisi termodifikasi, adanya molekul DMA menyebabkan interaksi antara substrat dengan enzim tidak optimal sehingga V_{maks} menjadi turun. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Kazan *et al.*, (1997) dan Francis *et al.*, (1992), bahwa modifikasi kimia dapat menyebabkan terjadinya perubahan atau tidak menyebabkan perubahan nilai K_M dan V_{maks} .

d. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Aktivitas sisa (*residual activity*) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan DMA (0,3%; 0,5%; 0,7%) ditentukan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60^oC selama 60 menit. Aktivitas enzim diukur setiap interval 10 menit (Gambar 4. 15).



Gambar 4.15 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi (DMA 0,3%, DMA 0,5%, 0,7%) pada suhu 60°C terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2010^a).

Semua enzim hasil modifikasi dengan DMA mempunyai aktivitas sisa (%) yang lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa (%) sebesar 7,724% dan enzim hasil modifikasi DMA (0,3%; 0,5%; dan 0,7%) mempunyai aktivitas sisa (%) berturut-turut : 15,9%; 35,5%; dan 42,5% setelah diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60°C. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semua enzim hasil modifikasi dengan DMA dengan konsentrasi yang berbeda-beda mempunyai stabilitas termal yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Semakin tinggi konsentrasi DMA maka semakin tinggi pula stabilitas termal enzim (Yandri *et al.*, 2010^a). Peningkatan stabilitas termal ini disebabkan peningkatan ikatan silang antara enzim dengan DMA (Kazan *et al.*, 1996).

e. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi.

Terjadi peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi dengan DMA antara 1,5 – 3,5 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2010^a) (Tabel 4. 5).

Tabel 4.5 Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi DMA 0,3%, DMA 0,5%, dan DMA 0,7%

Enzim	k_i (menit)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ mol ⁻¹)
Hasil pemurnian	0,045	15,4	101,793
DMA 0,3%	0,029	23,9	103,01
DMA 0,5%	0,016	43,31	104,657
DMA 0,7%	0,013	53,31	105,189

(Sumber Yandri *et al.*, 2010^a)

Menurut Stahl (1999), waktu paruh enzim akan menentukan stabilitas enzim tersebut. Berdasarkan penelitian, waktu paruh enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi dengan DMA 0,3% meningkat dari 15,4 menit menjadi 23,9 menit, DMA 0,5% waktu paruh meningkat dari 15,4 menit menjadi 43,31 menit, dan DMA 0,7% waktu paruh meningkat dari 15,4 menit menjadi 53,31 menit.

Terjadinya penurunan nilai k_i untuk masing-masing enzim hasil modifikasi menunjukkan bahwa terjadinya penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi bila dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim sesudah modifikasi berdasarkan penurunan nilai k_i adalah antara 1,5 – 3,5 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian. Hasil ini sama seperti yang dilaporkan oleh Kazan *et al.*, (1996), dimana konstanta laju inaktivasi DMA yang berikatan silang dengan penisilin G asilase selalu lebih rendah dibandingkan penisilin G asilase asli.

Enzim hasil modifikasi dengan DMA mengalami peningkatan ΔG_i dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Makin tinggi konsentrasi DMA, ΔG_i makin tinggi. Enzim yang terdenaturasi mengalami perubahan pada struktur tersiernya. ΔG_i yang semakin besar mengindikasikan suatu enzim memerlukan energi yang semakin besar untuk mengalami denaturasi. ΔG_i yang rendah mengindikasikan enzim tersebut mudah terdenaturasi. Menurut Kazan *et al.*, (1996), nilai ΔG_i yang semakin tinggi pada penisilin G asilase yang berikatan silang dengan DMA mengindikasikan terjadinya stabilisasi penisilin G asilase oleh ikatan silang pada suhu ekstrim. Enzim hasil pemurnian memiliki ΔG_i sebesar 101,793 kJ mol⁻¹ dan enzim hasil modifikasi DMA dengan konsentrasi DMA 9% memiliki $\Delta G_i = 103,01$ kJ mol⁻¹, DMA 41% memiliki $\Delta G_i = 104,657$ kJ mol⁻¹ dan DMA 67% memiliki $\Delta G_i = 105,189$ kJ mol⁻¹ (Yandri *et al.*, 2010^a).

4.3 Modifikasi Enzim α -amilase dengan Asam Glioksilat

a. Derajat modifikasi enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat

Modifikasi enzim hasil pemurnian dengan asam glioksilat dengan tiga variasi konsentrasi glioksilat yang dicampurkan masing-masing kedalam 10 mL enzim hasil pemurnian dalam buffer borat pH 8,4. Variasi konsentrasi asam glioksilat yang diberikan yaitu 3,7 mg, 7,4 mg, dan 14,8 mg asam glioksilat. Hasil penentuan derajat modifikasi ditunjukkan pada Tabel 4. 6.

Tabel 4.6 Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6- trinitrobenzena-sulfonat

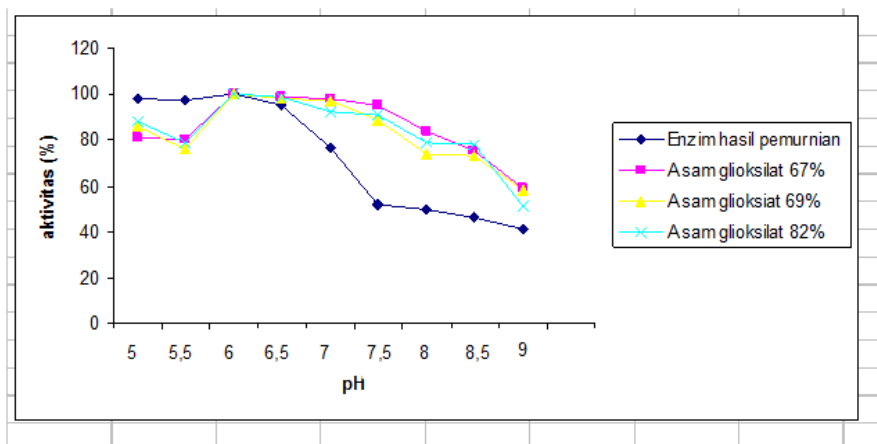
Sampel	ΔA_{420} nm	Modifikasi (%)
Enzim sebelum modifikasi	0,883	0
Asam glioksilat 3,7 mg	0,817	67
Asam glioksilat 7,4 mg	0,816	69
Asam glioksilat 14,8	0,803	82

(Sumber Yandri *et al.*, 2011^a).

Tabel 4. 6 menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat menghasilkan derajat modifikasi berturut-turut yaitu 67, 69, 82%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak konsentrasi asam glioksilat yang ditambahkan ke dalam larutan enzim, semakin tinggi pula derajat modifikasi enzim tersebut.

b. Pengaruh modifikasi terhadap pH optimum

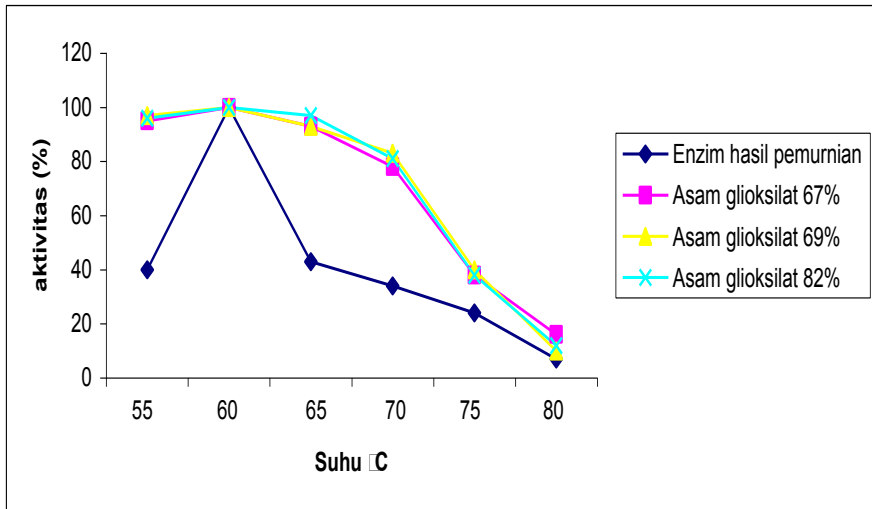
Dari data yang diperoleh, enzim α -amilase hasil pemurnian mempunyai pH optimum 6,0. (Gambar 4. 16). Enzim hasil modifikasi menggunakan asam glioksilat dengan derajat modifikasi (67, 69, dan 82%) juga mempunyai pH optimum yang sama yaitu pH 6,0. Tidak ada pergeseran pH optimum pada enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat. Enzim hasil pemurnian stabil antara pH 5,0 - 7,0. Enzim hasil modifikasi menggunakan asam glioksilat dengan derajat modifikasi (67, 69, dan 82%) stabil antara pH 5,0 - 8,5. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil modifikasi dengan asam glioksilat memiliki rentang pH kerja yang lebih baik dibandingkan dengan dengan enzim hasil pemurnian.



Gambar 4.16. pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67, 69 dan 82% (Yandri et al., 2011^a).

c. Pengaruh modifikasi terhadap suhu optimum

Enzim hasil modifikasi dengan asam gliksilat dengan derajat modifikasi 67, 69, dan 82% memiliki suhu optimum yang sama dengan enzim hasil pemurnian, namun aktivitas (%) yang dimiliki enzim hasil modifikasi terutama pada suhu 55, 65, dan 70 °C lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Gambar 4. 17).



Gambar 4.17 Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan enzim hasil modifikasi dengan asam gliksilat dengan derajat modifikasi 67, 69, dan 82% (Yandri et al., 2011^a).

Menurut Soemitro (2005), peningkatan aktivitas yang terjadi akibat peningkatan suhu tidak merubah ketepatan struktur tersier enzim (sebelum dan sesudah modifikasi) yang mendekatkan gugus rantai samping sejumlah asam amino pembentuk kisi pengikat substrat yang stereospesifik maupun asam amino pendukung kisi katalitik. Sehingga suhu optimum enzim tidak mengalami perubahan. Gambar 4. 17 menunjukkan semua enzim hasil modifikasi dengan asam gliksilat lebih stabil dibandingkan enzim hasil pemurnian terutama pada suhu 65 dan 70 °C (Yandri et al., 2011^a).

d. Pengaruh modifikasi terhadap data kinetika

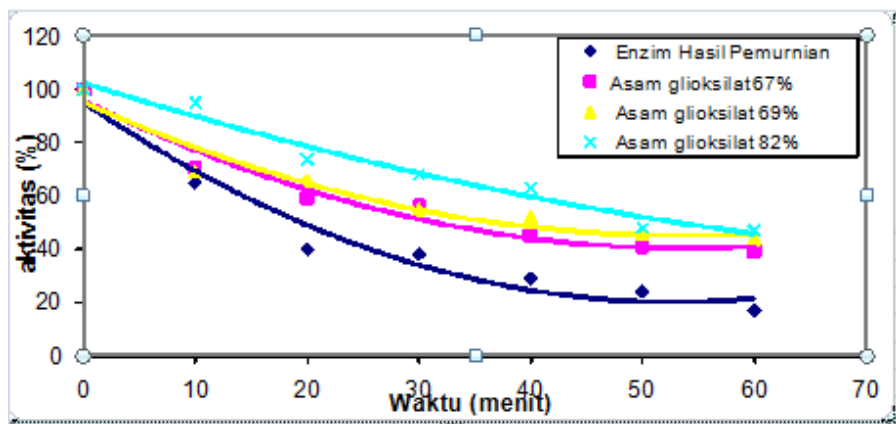
Data kinetika enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi (Yandri *et al.*, 2011^a), menunjukkan tidak terjadi perubahan yang besar antara K_M enzim hasil modifikasi dengan enzim hasil pemurnian. Diperkirakan tidak terjadi perubahan pada struktur enzim, khususnya pada pusat aktif enzim sehingga afinitas enzim terhadap substrat juga mengalami perubahan. Sedangkan untuk harga V_{maks} enzim hasil modifikasi mengalami penurunan dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Pada kondisi tanpa modifikasi, enzim dapat berinteraksi dengan mudah dengan substrat. Sedangkan pada kondisi termodifikasi, adanya molekul asam glioksilat menyebabkan kondisi ini berubah sehingga V_{maks} menjadi turun.

e. Pengaruh modifikasi terhadap stabilitas termal

Pengujian pengaruh stabilitas termal terhadap enzim hasil modifikasi dilakukan dengan menghitung persentase aktivitas sisa (*residual activity*) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi. Aktivitas sisa ini ditentukan dengan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60°C selama 10 menit. Aktivitas enzim diukur setiap interval 10 menit dan dilakukan hingga inkubasi 60 menit. Gambar 4. 18. menunjukkan aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi asam glioksilat (67, 69, 82%).

Gambar 4. 18 menunjukkan aktivitas sisa (%) masing-masing enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 60 menit. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa (%) sebesar 17% dan enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67, 69, dan 82% mempunyai aktivitas sisa (%) berturut-turut : 39, 44, dan 47 . Berdasarkan Gambar tersebut, menunjukkan semua enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat memiliki stabilitas termal yang jauh lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian. Semakin tinggi derajat modifikasi maka semakin

tinggi pula stabilitas termal enzim. Mekanisme penstabilan struktur enzim oleh asam glioksilat terjadi melalui pembentukan ikatan silang inter- dan antar molekuler asam glioksilat. Ikatan silang terhadap residu lisin di permukaan akan melindungi tapak hidrofobik dengan pelarut. Menurut Kazan *et al.*, (1996) makin tinggi derajat modifikasi makin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk sehingga rigiditas enzim semakin meningkat. Hal ini mendukung hasil yang telah diperoleh, bahwa makin besar konsentrasi senyawa pemodifikasi makin tinggi pula stabilitas termal enzim tersebut.



Gambar 4.18 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi (asam glioksilat 67%, asam glioksilat 69%, asam glioksilat 82%) pada suhu 60°C terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2011^a).

f. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi dengan asam glioksilat ditunjukkan pada Tabel 4. 7.

Tabel 4.7 Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi (asam glioksilat 67%, asam glioksilat 68%, asam glioksilat 82%)

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (Kj mol ⁻¹)
Sebelum modifikasi	0,027	25,3	103,18
Asam glioksilat 67%	0,014	46,2	104,83
Asam glioksilat 69%	0,013	53,3	105,18
Asam glioksilat 82%	0,013	49,5	105,06

(Sumber Yandri *et al.*, 2011^a).

Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i)

Tabel 4.7 menunjukkan enzim hasil modifikasi mengalami peningkatan waktu paruh antara 1,8 – 2,1 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian. Hasil ini hampir sama dengan yang dilakukan oleh Soemitro (2005), terhadap enzim α -amilase dari *Saccharomyces fibuligera* menggunakan zat pemodifikasi yang sama mengalami peningkatan waktu paruh sebesar 1,2 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian. Berdasarkan hasil penelitian, waktu paruh enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67% meningkat dari 25,38 menit menjadi 46,2 menit, asam glioksilat 69% waktu paruh meningkat dari 25,38 menit menjadi 53,3 menit, dan asam glioksilat 82% waktu paruh meningkat dari 25,38 menit menjadi 49,5 menit.

Tabel 4.7 menunjukkan semua enzim hasil modifikasi mengalami penurunan nilai k_i yang berarti terjadi penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi bila dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim hasil modifikasi berdasarkan penurunan nilai k_i adalah antara 1,2 – 1,4 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

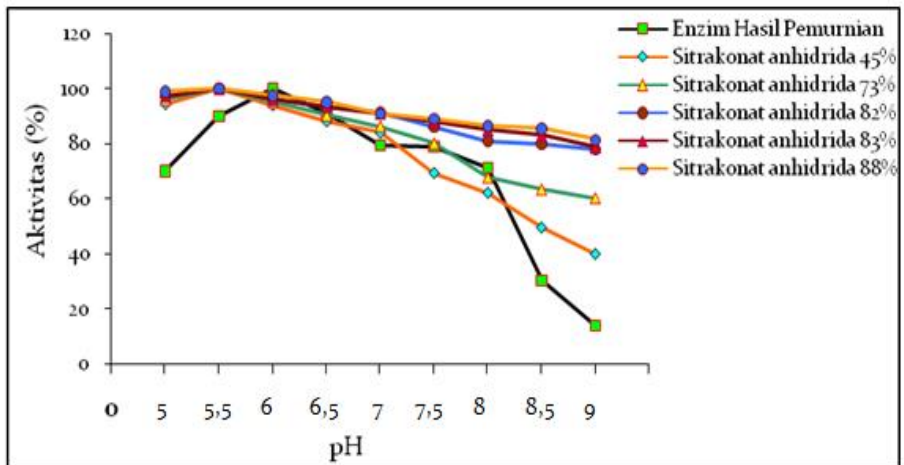
Tabel 4.7 menunjukkan terjadinya peningkatan ΔG_i enzim hasil modifikasi dibandingkan enzim hasil pemurnian. ΔG_i enzim yang

semakin besar menunjukkan bahwa enzim tersebut semakin stabil, perlu energi yang lebih besar untuk mendenaturasi enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil pemurnian memiliki ΔG_i sebesar $103,18 \text{ KJ mol}^{-1}$ dan enzim hasil modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 67% memiliki $\Delta G_i = 104,83 \text{ KJ mol}^{-1}$, asam glioksilat 69% memiliki $\Delta G_i = 105,18 \text{ KJ mol}^{-1}$, asam glioksilat 82% memiliki $\Delta G_i = 105,06 \text{ KJ mol}^{-1}$. Kenaikan kestabilan enzim semakin besar sebesar semakin besar seiring dengan meningkatnya derajat modifikasi, meskipun kenaikan harga ΔG_i tidak terlalu besar (kestabilan termal enzim meningkat 1,2- 1,4).

4.4 Modifikasi Enzim α -amilase dengan Sitratonat Anhidrida

a. Penaruh modifikasi kimia terhadap pH optimum

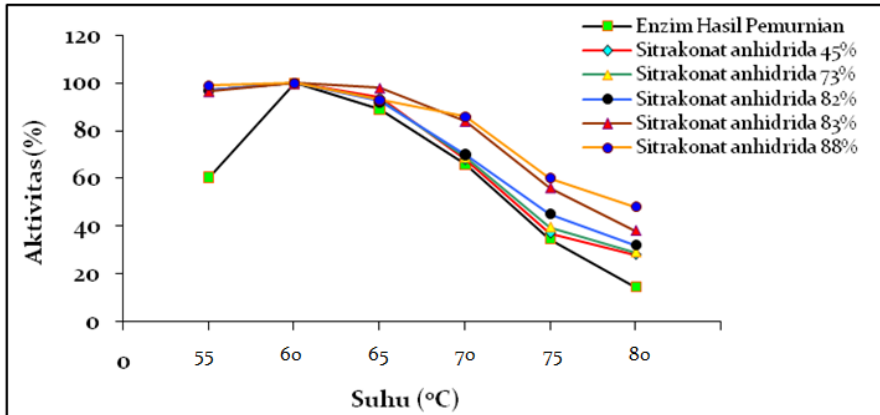
Gambar 4. 19 menunjukkan enzim α -amilase hasil pemurnian mempunyai pH optimum 6,0. Enzim α -amilase hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83, dan 88% mempunyai pH optimum 5,5 (Yandri *et al.*, 2012^a). Enzim hasil modifikasi memiliki rentang pH kerja yang lebih lebar yaitu antara pH 5,0 - 9,0 terutama untuk enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 82, 83, dan 88%. Enzim hasil pemurnian memiliki rentang pH kerja antara pH 5,5 - 8,0. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 82, 83, dan 88% memiliki aktivitas sisa yang lebih baik pada rentang pH 7,5 - 9,0 dibandingkan dengan enzim pada derajat modifikasi 45, dan 73% serta enzim hasil pemurnian (Gambar 4. 19). Modifikasi kimia menggunakan sitratonat anhidrida dapat meningkatkan stabilitas enzim hasil modifikasi terhadap pH, hal ini dimungkinkan karena gugus NH_2 bebas pada residu lisin terutama yang terpapar ke permukaan berinteraksi dengan sitratonat anhidrida (Janecek, 1993), sehingga terjadi perubahan muatan pada struktur enzim.



Gambar 4.19 pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi (Sitrakonat anhidrida 45%, Sitrakonat anhidrida 73%, Sitrakonat anhidrida 82%, Sitrakonat anhidrida 83% dan Sitrakonat anhidrida 88%) (Yandri et al., 2012^a).

b. Pengaruh modifikasi kimia terhadap suhu optimum

Gambar 4. 20 menunjukkan bahwa enzim hasil modifikasi mempunyai suhu optimum yang sama dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil modifikasi mempunyai aktivitas yang lebih baik pada suhu 70 dan 80°C dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Pada suhu 70°C enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa sebesar 66%, sedangkan pada enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83 dan 88% memiliki aktivitas sisa berturut turut sebesar : 68%, 69%, 70%, 84% dan 86%. Pada suhu 80°C enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa sebesar 14,5%, sedangkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83 dan 88% memiliki aktivitas sisa berturut turut sebesar : 28%, 29%, 32%, 38% dan 48%.

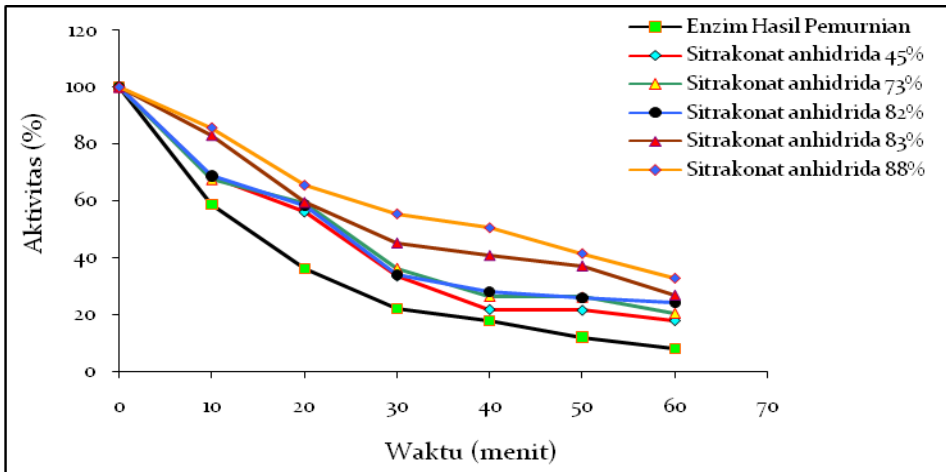


Gambar 4.20 Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83 dan 88% (Yandri et al., 2012³).

Hasil penelitian menunjukkan walaupun tidak terjadi kenaikan suhu optimum enzim hasil modifikasi, namun semua enzim hasil modifikasi lebih baik aktivitasnya pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

c. Pengaruh modifikasi kimia terhadap stabilitas termal enzim hasil modifikasi

Gambar 4. 21 menunjukkan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida pada suhu 60°C selama 60 menit. Enzim hasil pemurnian pada menit ke-60 memiliki aktivitas sisa sebesar 8% dan enzim hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida pada derajat modifikasi 45, 73, 82, 84, dan 88% memiliki aktivitas sisa berturut-turut : 17,70%; 20,24%; 24,18%; 26,70% dan 32,6%.



Gambar 4.21 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa(%) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 45%, 75%, 82%, 83% dan 88% pada suhu 60°C terhadap waktu (Yandri et al., 2012^a).

Gambar 4. 21 menunjukkan terjadi peningkatan stabilitas termal enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas termal ini dapat dihitung dengan membandingkan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi setelah diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60°C. Modifikasi kimia yang dilakukan terhadap enzim α -amilase hasil pemurnian dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 memberi pengaruh terhadap stabilitas struktur tiga dimensi enzim. Kemungkinan mekanisme stabilitas struktur tiga dimensi enzim yang terjadi akibat modifikasi kimia dengan sitrakonat anhidrida dapat dijelaskan sebagai berikut : Sitrakonat anhidrida merupakan senyawa asam dikarboksilat dengan bobot molekul 112,08 g/mol, gugus karboksilat ini dapat mengikat gugus amin pada residu lisin di permukaan enzim α -amilase (Janecek, 1993), sehingga memperkecil kemungkinan kontak antara gugus hidrofilik dengan pelarut (air) dan menyebabkan enzim terutama pusat aktif enzim lebih terlindungi dan kestabilan enzim menjadi meningkat.

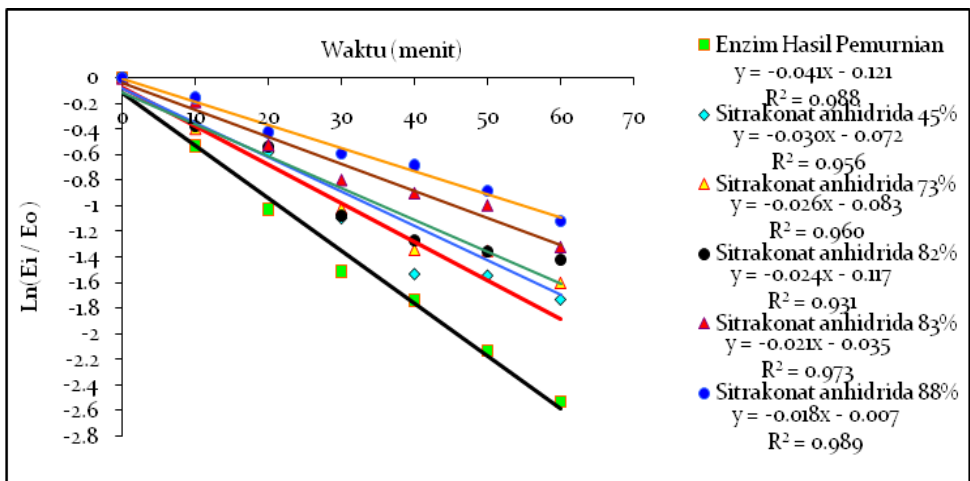
d. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi.

Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.8. Penentuan nilai k_i menggunakan kurva pada Gambar 4.22.

Tabel 4.8 Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi

Enzim	k_i (1/menit)	$t_{1/2}$ (menit)	(ΔG_i) (kJ/mol)
Enzim hasil pemurnian	0,041	17	102,08
Sitrakonat anhidrida 45%	0,030	23	102,91
Sitrakonat anhidrida 73%	0,026	27	103,31
Sitrakonat anhidrida 82%	0,024	29	103,53
Sitrakonat anhidrida 83%	0,021	33	103,90
Sitrakonat anhidrida 88%	0,018	39	104,33

(Sumber Yandri et al., 2012^a)



Gambar 4.22 Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi untuk penentuan nilai k_i , waktu paruh dan ΔG_i (Yandri et al., 2012^a).

Tabel 4. 8 menunjukkan terjadinya penurunan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) pada masing-masing enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Hasil ini menunjukkan terjadinya penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim berdasarkan penurunan nilai k_i adalah antara 2-3 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

Waktu paruh enzim hasil modifikasi dengan sitrkonat anhidrida dengan derajat modifikasi 45%; 73%; 82%; 83%; dan 88% berturut-turut: 23 menit, 27 menit, 29 menit, 33 menit dan 39 menit. Semakin besar harga ΔG_i maka enzim semakin stabil dan memerlukan energi yang lebih besar untuk mendenaturasi. ΔG_i untuk enzim hasil pemurnian ialah sebesar 102,08 kJ/mol. Sedangkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 45, 73, 82, 83, dan 88% adalah berturut-turut sebagai berikut: 102,9 kJ/mol, 103,31 kJ/mol, 103,51 kJ/mol, 103,9 kJ/mol dan 104,33 kJ/mol. Nilai ΔG_i yang semakin besar menunjukkan stabilitas suatu enzim semakin meningkat.

4.5 Modifikasi Enzim Selulase dengan Asam Glioksilat

a. Penentuan derajat modifikasi enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi:

Derajat modifikasi ditentukan berdasarkan pada perbandingan jumlah residu lisin sesudah dan sebelum modifikasi. Hasil pengamatan menunjukkan semakin pudar kompleks berwarna kuning maka semakin tinggi derajat modifikasi. Enzim hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan variasi konsentrasi 5 mg, 10 mg dan 15 mg, menghasilkan derajat modifikasi berturut-turut yaitu 70,54; 78,68; 68,43% (Yandri *et al.*, 2014). Hasil penentuan derajat modifikasi dapat dilihat pada Tabel 4. 9.

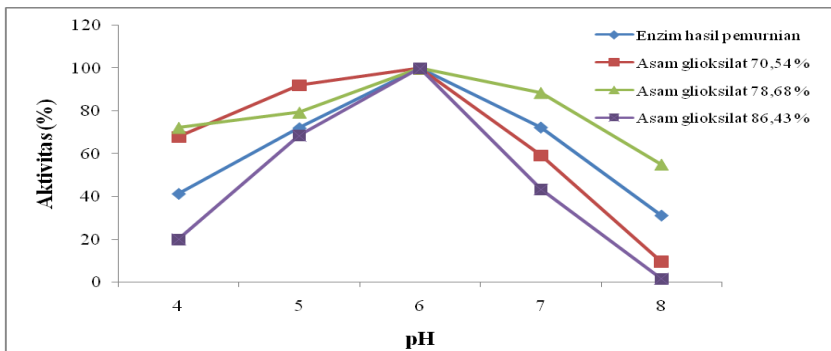
Tabel 4.9 Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat

Sampel	ΔA_{420} nm	Modifikasi (%)
Enzim hasil pemurnian	0,884	0
Asam glioksilat 5 mg	0,702	70,54
Asam glioksilat 10 mg	0,681	78,68
Asam glioksilat 15 mg	0,661	86,43

(Sumber Yandri *et al.*, 2014)

b. Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi :

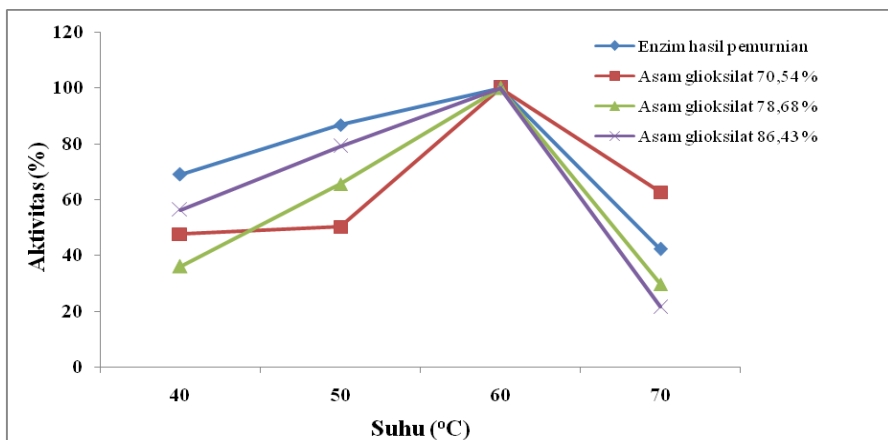
Gambar 4. 23 menunjukkan enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi memiliki pH optimum yang sama yaitu pH 6,0. Walaupun tidak terjadi perubahan pH optimum enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, akan tetapi enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 78,68% menunjukkan kestabilan yang lebih baik dari enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi 70,54% dan 86,43% terutama pada daerah basa. Sedangkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 70,54% menunjukkan kestabilan yang lebih baik pada kondisi asam, hal ini kemungkinan karena proses modifikasi mengakibatkan terjadinya perubahan muatan pada enzim hasil modifikasi sehingga interaksi yang terjadi antara muatan dapat meningkatkan kestabilan enzim hasil modifikasi (Yandri *et al.*, 2014).



Gambar 4.23 pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi: 70,54; 78,68; dan 86,43% (Yandri *et al.*, 2014).

c. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi :

Hasil penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi memiliki suhu optimum yang sama yaitu 60°C yang ditunjukkan pada Gambar 4. 24. Tidak terjadinya perubahan suhu optimum sebelum dan sesudah modifikasi menunjukkan bahwa struktur tiga dimensi enzim hasil modifikasi tidak mengalami banyak perubahan. Hal ini dikarenakan modifikasi enzim banyak terjadi pada residu lisin yang ada pada permukaan saja, sehingga asam glioksilat tidak berinteraksi dengan daerah pusat aktif enzim. Karena struktur tiga dimensinya tidak mengalami banyak perubahan, maka energi aktivasinya juga tidak berubah. Kondisi ini menyebabkan suhu enzim hasil modifikasi tidak mengalami perubahan.

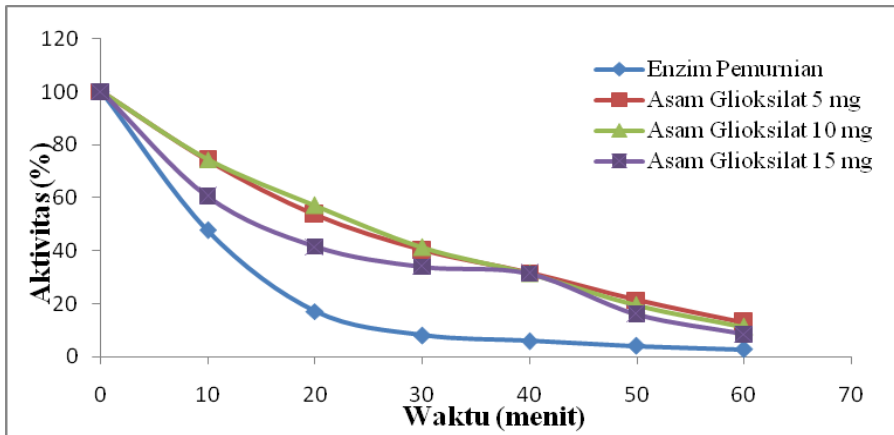


Gambar 4. 24 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam glioksilat dengan derajat modifikasi: 70,54; 78,68; dan 86,43% (Yandri et al., 2014).

d. Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Grafik pada Gambar 4. 25 menunjukkan aktivitas sisa (%) masing-masing enzim pada suhu 60°C selama 60 menit. Enzim hasil pemurnian memberikan aktivitas sisa (%) sebesar 3% dan enzim hasil modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 70,54;

78,68; dan 86,43% menunjukkan aktivitas sisa(%) berturut-turut sebesar : 13, 11, dan 9%. Hasil ini menunjukkan enzim hasil modifikasi terutama enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 70,54 dan 78,68% lebih stabil dibandingkan dengan enzim tanpa dimodifikasi.



Gambar 4. 25 Grafik stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan asam gliksilat dengan derajat modifikasi: 70,54 (5 mg); 78,68 (10 mg); dan 86,43% (15 mg) (Yandri *et al.*, 2014).

e. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam gliksilat ditunjukkan pada Tabel 4. 10 (Yandri *et al.*, 2014).

Tabel 4.10 Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam gliksilat dengan derajat modifikasi 70,54; 78,68; 86,43%

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (Kj mol ⁻¹)
Enzim Pemurnian	0,066	10,50	100,7330
Asam Gliksilat 70,54%	0,031	22,35	102,8253
Asam Gliksilat 78,68%	0,033	21,00	102,6522
Asam Gliksilat 86,43%	0,037	18,72	102,3354

(Sumber Yandri *et al.*, 2014)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) :

Semua enzim hasil modifikasi mengalami kenaikan waktu paruh dibandingkan enzim hasil pemurnian. Terjadinya penurunan nilai k_i (Tabel 4. 10) untuk masing-masing enzim hasil modifikasi menunjukkan bahwa terjadinya penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi bila dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim hasil modifikasi berdasarkan penurunan nilai k_i dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian adalah sebesar 1,8 – 2,1 kali (Yandri *et al.*, 2014). Pembentukan ikatan antara asam glioksilat dengan gugus NH_2 pada rantai samping residu lisin yang ada dipermukaan ((Janecek, 1993), menyebabkan nilai k_i semakin rendah dan enzim menjadi lebih stabil.

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) :

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) (Tabel 4. 10) menunjukkan terjadinya peningkatan ΔG_i enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Harga ΔG_i enzim yang meningkat menunjukkan bahwa enzim tersebut semakin rigid dan memiliki ikatan yang lebih kuat sehingga konformasi enzim tidak mudah terbuka dan memerlukan energi yang lebih besar untuk mendenaturasi. Enzim hasil pemurnian memiliki ΔG_i sebesar $100,7330 \text{ kJ mol}^{-1}$ dan enzim hasil modifikasi asam glioksilat dengan derajat modifikasi 70,54% memiliki $\Delta G_i = 102,8253 \text{ kJ mol}^{-1}$, asam glioksilat dengan derajat modifikasi 78,68% memiliki $\Delta G_i = 102,6522 \text{ kJ mol}^{-1}$, dan asam glioksilat dengan derajat modifikasi 86,43% memiliki $\Delta G_i = 102,3354 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Yandri *et al.*, 2014). Terjadi peningkatan kestabilan enzim hasil modifikasi seiring dengan meningkatnya derajat modifikasi terutama untuk enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 70,54% dan 78,68%, meskipun kenaikan harga ΔG_i tidak terlalu besar.

4.6 Modifikasi Enzim Selulase dengan Dimetiladipimidat

a. Penentuan derajat modifikasi

Modifikasi enzim hasil pemurnian menggunakan DMA dilakukan dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 5 mg, 10 mg dan 15 mg yang dapat dilihat pada Tabel 4. 11. Penentuan derajat modifikasi berdasarkan pada perbandingan jumlah residu lisin sesudah dimodifikasi dengan sebelum dimodifikasi. Tabel 4. 11 menunjukkan enzim hasil modifikasi dengan DMA dengan konsentrasi yaitu 5 mg, 10 mg dan 15 mg menghasilkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi berturut-turut: 64,5, 69,5, dan 82% (Yandri *et al.*, 2015). Tabel 4. 11 menunjukkan semakin besar konsentrasi DMA, maka semakin besar derajat modifikasi.

Tabel 4.11 Penentuan derajat modifikasi menggunakan TNBS

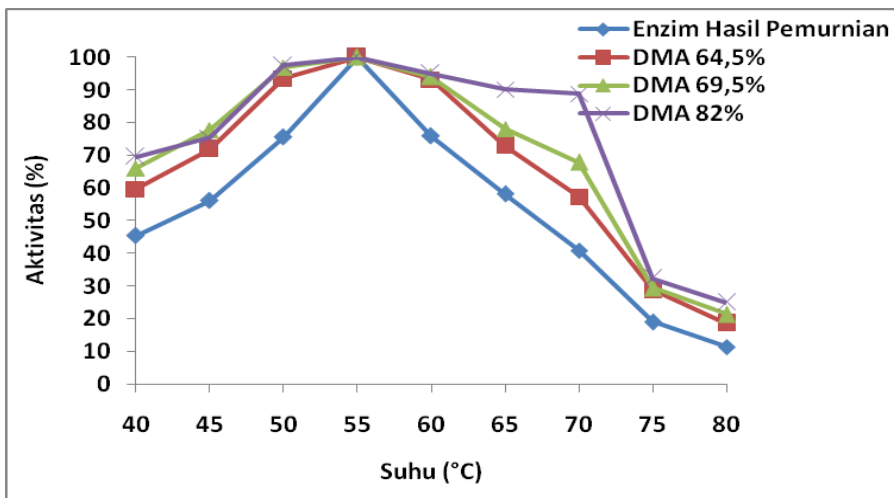
Sampel	$\Delta A_{420} \text{ nm}$	Modifikasi (%)
Enzim sebelum modifikasi	0,5858	0
Modifikasi dengan DMA 5 mg	0,5714	64,5
Modifikasi dengan DMA 10 mg	0,5703	69,5
Modifikasi dengan DMA 15 mg	0,5675	82

(Sumber Yandri *et al.*, 2015)

b. Penentuan suhu optimum

Gambar 4. 26 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi sama yaitu 55°C. Semua enzim hasil modifikasi menunjukkan stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian terutama pada suhu antara suhu 50-65 °C. Data pada Gambar 4. 26 menunjukkan semua enzim hasil modifikasi pada suhu 60 °C mempunyai aktivitas (%) sebesar 97, 94 dan 95 % untuk enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 64,5 ; 69,5 dan 82 %. Sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas (%) 76 %. Pada suhu 65 °C juga menunjukkan hasil yang sama, enzim hasil modifikasi mempunyai aktivitas (%) sebesar 72, 78, dan 90 % untuk enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 64,5 ; 69,5 dan 82 %, sedangkan enzim hasil

pemurnian mempunyai aktivitas (%) sebesar 58%. Pada suhu 70 °C enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 64,5 ; 69,5 dan 82 % menunjukkan aktivitas yang jauh lebih baik dibandingkan enzim hasil pemurnian yaitu: 64, 68, dan 89 %, sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sebesar 39%. Hasil yang diperoleh menunjukkan terjadinya peningkatan stabilitas enzim hasil modifikasi pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, walaupun tidak terjadi kenaikan suhu optimum enzim.

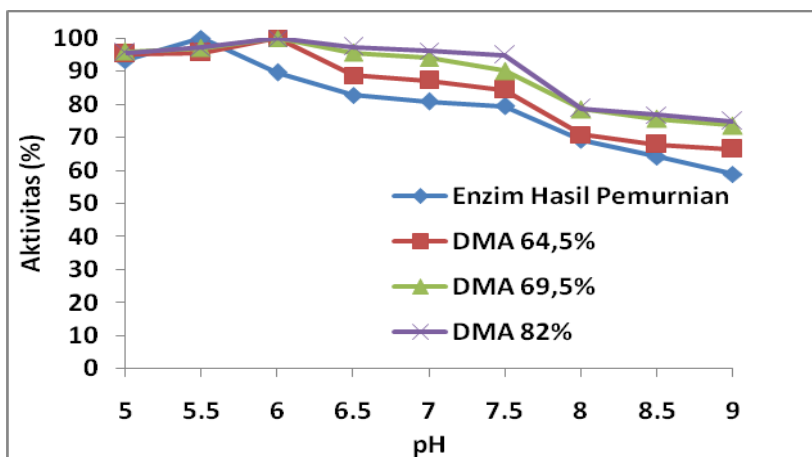


Gambar 4.26 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%) (Yandri *et al.*, 2015).

c. Penentuan pH optimum

Gambar 4. 27 menunjukkan enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi memiliki rentang pH kerja antara 5 - 7,5. pH optimum enzim hasil pemurnian yaitu 5,5 dan enzim hasil modifikasi yaitu 6. Terjadi perubahan pH optimum enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Data pada Gambar 4. 27 juga menunjukkan terjadi peningkatan kestabilan enzim hasil modifikasi dibandingkan enzim hasil pemurnian terutama enzim hasil

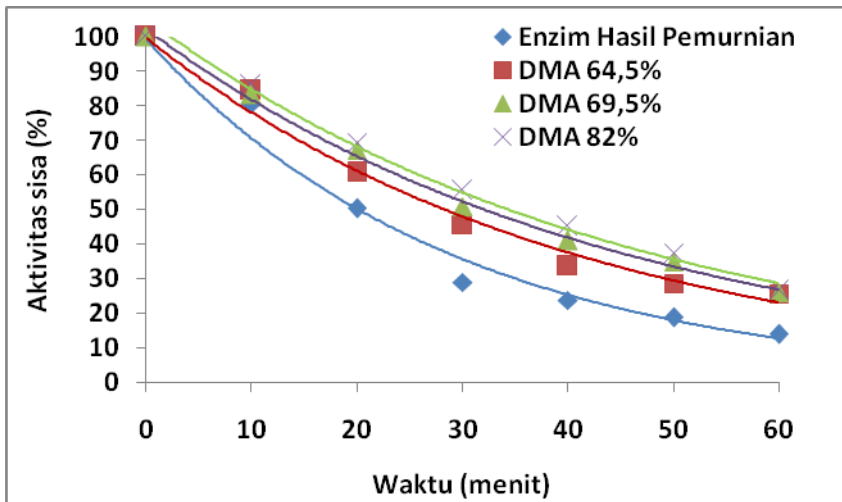
modifikasi dengan derajat modifikasi 69,5 dan 82%. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 69,5 dan 82% mempunyai aktivitas (%) pada pH 6,5 sebesar 96 dan 97%, sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas (%) sebesar 82%. Pada pH 9 enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 69,5 dan 82% mempunyai aktivitas sebesar 73 dan 75%, sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas (%) sebesar 59%. Dari data ini dapat disimpulkan modifikasi kimia dengan pembentukan ikatan silang menggunakan DMA dapat meningkatkan stabilitas enzim hasil modifikasi terhadap pH.



Gambar 4.27 pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%) (Yandri et al., 2015).

d. Stabilitas termal enzim

Data pada Gambar 4. 28 menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa (%) setelah diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit yaitu 14,1 dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%) secara berurutan yaitu 25,7; 26,1 dan 26,7. Semua enzim hasil modifikasi meningkat kestabilannya terhadap suhu dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.



Gambar 4.28 Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (64,5; 69,5 dan 82%), pada suhu 55°C terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2015).

e. Waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta inaktivasi termal (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Tabel 4.12 Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ/mol)
Enzim sebelum modifikasi	0,034	20,4	100,9
DMA 64,5%	0,024	28,9	101,9
DMA 69,5%	0,021	33,0	102,3
DMA 82%	0,022	31,5	102,2

(Sumber Yandri *et al.*, 2015)

Dari Tabel 4. 12 dapat dilihat bahwa waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil modifikasi meningkat 1,4 - 1,6 kali dari enzim hasil pemurnian. Berdasarkan data tersebut, maka enzim hasil modifikasi mengalami peningkatan stabilitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian.

4.7 Modifikasi Enzim Selulase dengan Nitrofenol Karbonat Polietilenglikol

a. Penentuan derajat modifikasi

Modifikasi enzim hasil pemurnian menggunakan NPC-PEG dilakukan dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 5 mg, 10 mg dan 15 mg, menghasilkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi berturut-turut 63, 70, dan 81% (Tabel 4.13).

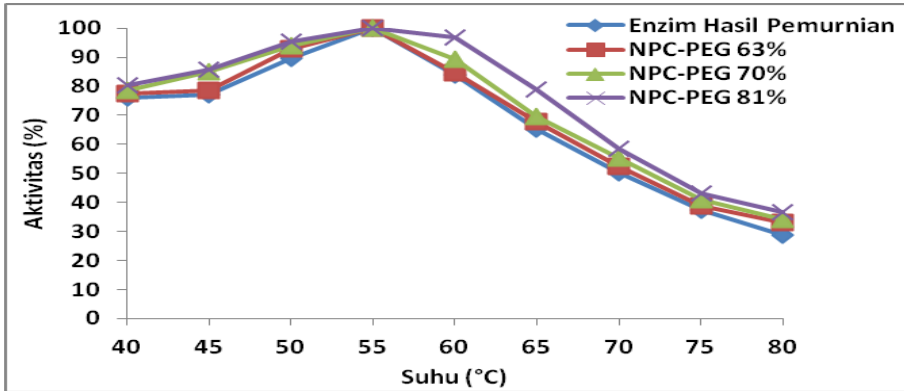
Tabel 4.13 Penentuan derajat modifikasi menggunakan TNBS

Sampel	$\Delta A_{420} \text{ nm}$	Modifikasi (%)
Enzim sebelum modifikasi	0,5991	0
Modifikasi dengan NPC-PEG 5 mg	0,5867	63
Modifikasi dengan NPC-PEG 10 mg	0,5853	70
Modifikasi dengan NPC-PEG 15 mg	0,5834	81

(Sumber Yandri *et al.*, 2017)

b. Penentuan suhu optimum

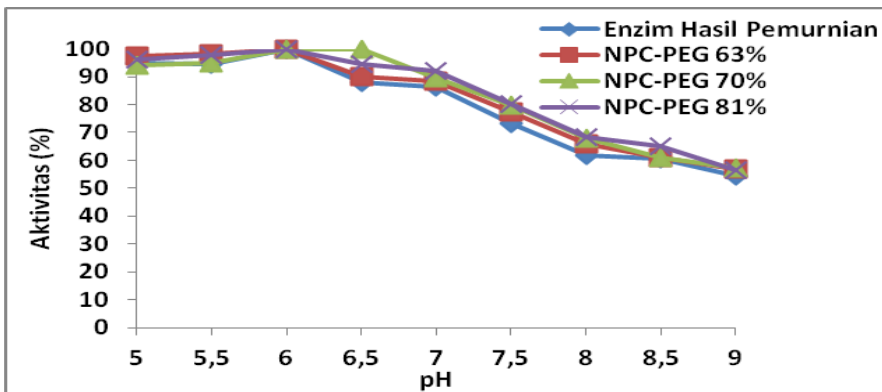
Semua enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 63, 70, dan 81% mempunyai suhu optimum 55°C (Yandri *et al.*, 2017) sama dengan suhu optimum enzim sebelum dimodifikasi (Gambar 4. 29) . Gambar 4. 29 menunjukkan aktivitas enzim hasil modifikasi pada suhu yang lebih tinggi menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian terutama enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 81% dan 70%. Kondisi ini diperkirakan karena proses modifikasi menyebabkan rigiditas dari enzim hasil modifikasi meningkat, sehingga enzim hasil modifikasi lebih tahan terhadap suhu.



Gambar 4.29 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) (Yandri et al., 2017)

c. Penentuan pH optimum

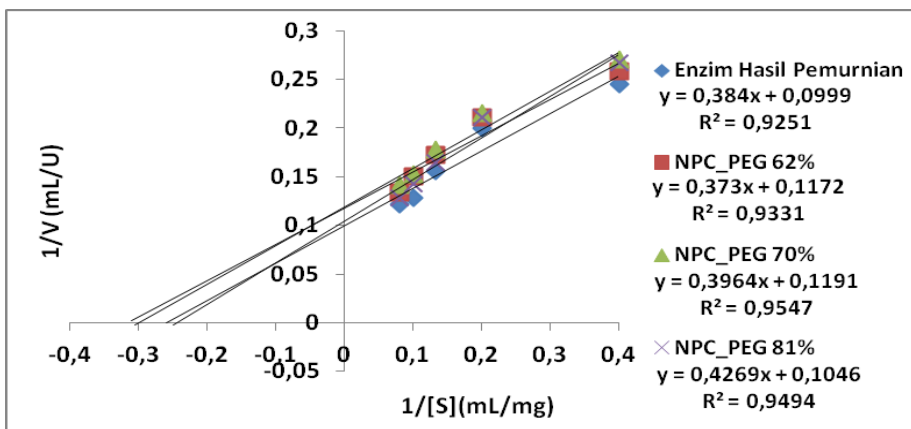
Gambar 4. 30 menunjukkan tidak terjadi perubahan pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi yaitu pada pH 6. Enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi stabil pada rentang pH 5 – 8. Gambar 4. 30 juga menunjukkan walaupun pH optimum enzim hasil modifikasi tidak mengalami perubahan, akan tetapi ezim hasil modifikasi mempunyai aktivitas yang lebih baik dibandingkan enzim hasil pemurnian terutama pada pH antara 6,5 dan 8,5.



Gambar 4.30 pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) (Yandri et al., 2017).

d. Penentuan K_M dan V_{maks}

Dari persamaan *Lineweaver-Burk* dapat ditentukan nilai V_{maks} enzim hasil pemurnian sebesar $10,101 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$ dan harga K_M sebesar $3,878 \text{ mg/mL}$ substrat. Nilai V_{maks} enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) secara berurutan sebesar 8,547; 8,403 dan 9,615 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$. Harga K_M enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) secara berurutan sebesar 3,188; 3,327 dan 4,096 mg/mL substrat (Gambar 4. 31) (Yandri *et al.*, 2017). Hasil penentuan K_m enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 63, 70, dan 81%, menunjukkan tidak terjadi perubahan yang besar antara K_m enzim hasil modifikasi dibandingkan enzim hasil pemurnian. Harga V_{maks} semua enzim hasil modifikasi menurun dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Hal ini disebabkan modifikasi kimia dengan NPC-PEG dengan rantai yang panjang pada permukaan molekul enzim diperkirakan membuat interaksi enzim dengan substrat tidak maksimal. Enzim pada kondisi tanpa dimodifikasi dapat berinteraksi dengan mudah dengan substrat, dengan adanya rantai PEG yang panjang menyebabkan kondisi ini berubah sehingga V_{maks} menjadi turun.



Gambar 4.31 Grafik *Lineweaver-Burk* enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) (Yandri *et al.*, 2017).

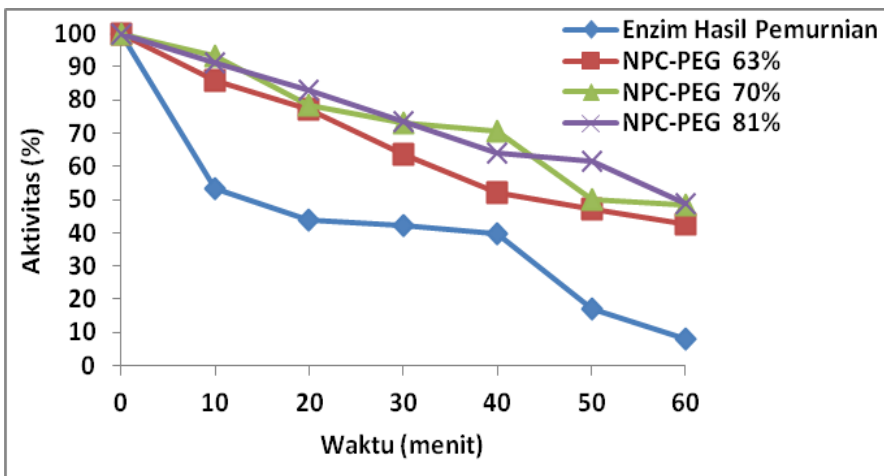
e. Stabilitas termal enzim

Pada Gambar IV. 32 dapat dilihat bahwa enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa (%) setelah diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit yaitu 8.071 dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) secara berurutan yaitu 42,633; 48,415 dan 48,616 (Yandri *et al.*, 2017).

Gambar 4. 32 menunjukkan terjadi peningkatan stabilitas termal enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Semua enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi yang berbeda-beda mempunyai waktu paruh yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim tanpa modifikasi. Modifikasi kimia yang dilakukan terhadap enzim selulase hasil pemurnian dari *B. subtilis* ITBCCB148 menunjukkan pengaruh yang baik terhadap stabilitas struktur. Mekanisme stabilitas struktur yang terjadi pada enzim selulase akibat modifikasi kimia menggunakan PEG teraktivasi dapat dijelaskan sebagai berikut: (1) penurunan kontak antara tapak hidrofobik dengan pelarut (luasnya kontak antara tapak hidrofobik permukaan dengan pelarut menyebabkan destabilisasi struktur enzim), (2) penambahan ikatan hidrogen (PEG dengan rantai yang panjang dapat membentuk ikatan hidrogen terutama pada permukaan enzim).

Modifikasi PEG terhadap residu lisin khususnya yang terpapar ke permukaan menyebabkan tapak hidrofobik pada permukaan enzim terlindungi sehingga kontakannya dengan pelarut semakin menurun, kondisi ini sangat menguntungkan bagi struktur enzim selulase. Janecek dan Balaz (1992) menyatakan bahwa pola modifikasi yang menggunakan senyawa dengan bobot molekul besar (seperti PEG), memungkinkan senyawa tersebut untuk melindungi tapak hidrofobik dan mencegahnya untuk kontak dengan air. PEG dengan bobot molekul 5000 sangat memungkinkan mengikuti mekanisme stabilisasi ini.

Gaetner dan Puigserver (1992), melaporkan bahwa kestabilan enzim tripsin yang dimodifikasi menggunakan PEG teraktivasi diperkirakan karena banyaknya pembentukan ikatan hidrogen pada struktur enzim yang disebabkan oleh panjangnya rantai PEG. Data ini mendukung hasil yang telah diperoleh, makin tinggi derajat modifikasi makin tinggi stabilitas termal enzim hasil modifikasi. Hal ini diperkirakan makin banyaknya terbentuk ikatan hidrogen pada struktur enzim dengan bertambahnya derajat modifikasi sehingga rigiditas enzim semakin meningkat.



Gambar 4.32 Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi (63, 70 dan 81%) pada suhu 55°C terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2017)

f. Waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta inaktivasi termal (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dapat dilihat pada Tabel 4. 14.

Tabel 4.14 Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ/mol)
Enzim sebelum modifikasi	0,035	19,80	100,908
NPC-PEG 63%	0,014	49,50	103,407
NPC-PEG 70%	0,012	57,75	103,828
NPC-PEG 81%	0,011	63,00	104,065

(Sumber Yandri *et al.*, 2017)

Tabel 4. 14 menunjukkan bahwa waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian yaitu 19,80 menit nilai k_i sebesar 0,035 menit⁻¹ dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) sebesar 100,908. Sedangkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 63, 70 dan 81% memiliki waktu paruh ($t_{1/2}$) berturut-turut: 49,50; 57,75 dan 63,00 menit; dengan nilai k_i berturut-turut: 0,014; 0,012 dan 0,011 menit⁻¹; dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) berturut-turut: 103,407; 103,828 dan 104,065kJ/mol.

Semua enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG meningkat waktu paruhnya antara dua sampai tiga kali dibandingkan enzim tanpa dimodifikasi. Peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG ini hampir sama dengan yang dilaporkan Hernaiz *et al.*, (1999). Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 63% mampu meningkatkan waktu paruh enzim hasil modifikasi dari 19,8 menit menjadi 49,50 menit. Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 70% mampu meningkatkan waktu paruh enzim hasil modifikasi menjadi 57,75 menit. Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG dengan derajat modifikasi 81% mampu meningkatkan waktu paruh enzim hasil modifikasi menjadi 63,00 menit. Sedangkan Hernaiz *et al.*, (1999), yang melakukan modifikasi kimia pada enzim lipase dari *Candida rugosa* menggunakan PEG teraktivasi, yaitu NPC-PEG melaporkan

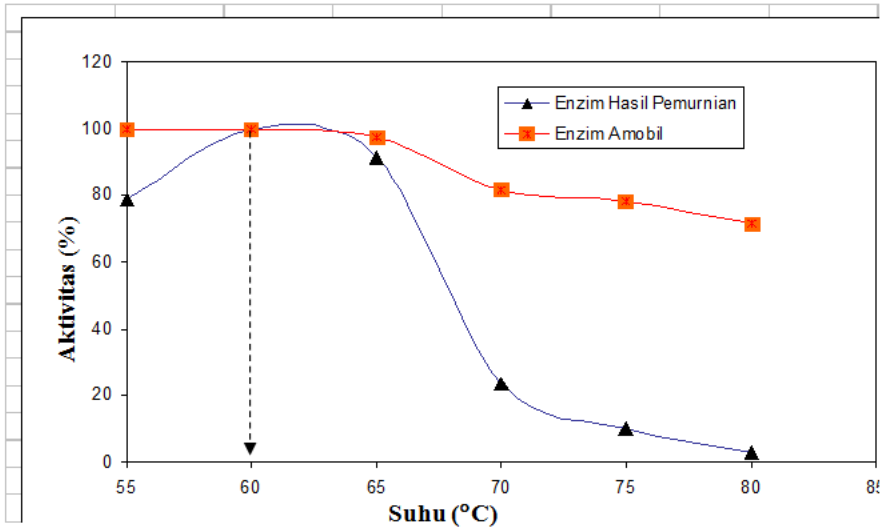
terjadi peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi pada suhu 50°C dibandingkan enzim tanpa dimodifikasi. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 60%, waktu paruhnya meningkat dari 12 jam menjadi 25 jam. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 68% mampu meningkatkan waktu paruh enzim menjadi 60 jam. Hasil ini menunjukkan modifikasi enzim hasil pemurnian dengan NPC dapat meningkatkan waktu paruh enzim yang tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Hernaiz *et al.*, (1999).

Tabel 4. 14 menunjukkan terjadi penurunan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) untuk masing-masing enzim hasil modifikasi, ini berarti terjadi penurunan laju denaturasi enzim hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim berdasarkan penurunan nilai k_i adalah antara 2,5 – 3,2 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Tabel 4. 14 juga menunjukkan ΔG_i enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG mengalami peningkatan dibandingkan enzim hasil pemurnian. Makin tinggi derajat modifikasi makin tinggi ΔG_i yang diperoleh, ini menunjukkan enzim hasil modifikasi semakin rigid dan kurang fleksibel sehingga energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut juga semakin tinggi. ΔG_i yang rendah menunjukkan enzim tersebut lebih fleksibel dalam larutan yang menyebabkan enzim tersebut lebih mudah terdenaturasi.

4.8 Amobilisasi Enzim α -amilase dengan DEAE-selulosa

a. Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Aktivitas (%) enzim sebelum dan sesudah amobilisasi pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 4. 33 (Yandri *et al.*, 2010^b).

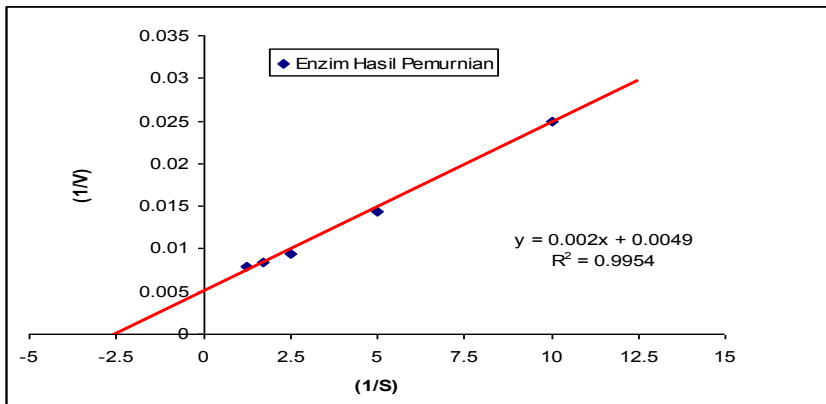


Gambar 4.33 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2010^b)

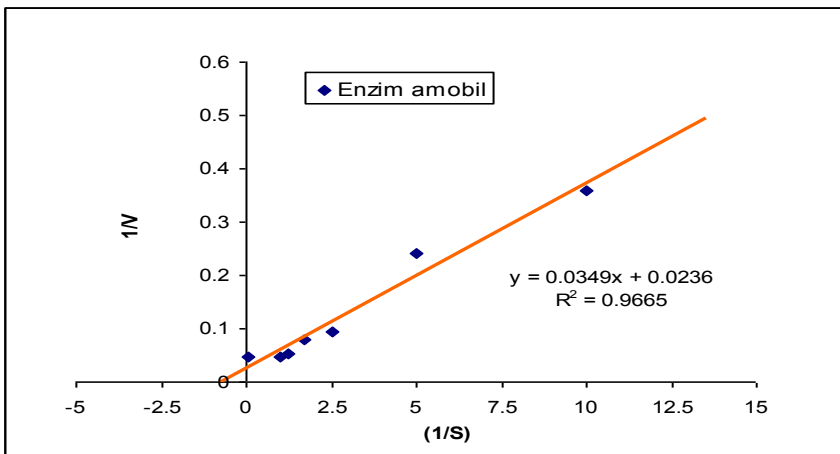
Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi adalah sama yaitu 60°C. Germain dan Robert (1988) melaporkan bahwa modifikasi kimia dan amobilisasi tidak selalu menyebabkan terjadinya perubahan suhu optimum enzim hasil modifikasi dan amobilisasi. Gambar 4. 33 menunjukkan stabilitas enzim hasil amobilisasi meningkat, terutama pada suhu yang lebih tinggi antara 70 – 80 °C. Pada suhu 65°C enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas 91,1%. Sedangkan enzim hasil amobilisasi mempunyai aktivitas 97,4%. Pada suhu 75 dan 80 °C enzim amobil mempunyai aktivitas 78,4 dan 71,7%, sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas 9,9 dan 2,8% (Yandri *et al.*, 2010^b). Kondisi ini diperkirakan karena proses amobilisasi menyebabkan pusat aktif enzim terlindungi karena adanya matriks pengamobil, sehingga enzim hasil amobilisasi lebih tahan terhadap suhu.

b. Data kinetika enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Dari persamaan Lineweaver-Burk diperoleh harga V_{maks} enzim hasil pemurnian $204 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, sedangkan K_m enzim hasil pemurnian $4,08 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat. Sedangkan V_{maks} enzim hasil amobilisasi dari persamaan Lineweaver-Burk adalah $42,4 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, dan $K_m = 14,8 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat (Yandri *et al.*, 2010^b) (Gambar 4. 34 dan 4. 35) (Yandri *et al.*, 2010^b).



Gambar 4.34 Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2010^b)



Gambar 4.35 Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2010^b)

Gambar 4. 34 dan 4. 35 menunjukkan harga V_{maks} enzim hasil pemurnian berbeda jauh dengan V_{maks} α -amilase amobil. Penurunan nilai V_{maks} enzim amobil yang sangat tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian disebabkan adanya halangan sterik matrik pengamobil yang tidak larut, sehingga interaksi substrat dengan enzim terhalangi. Harga K_m enzim hasil pemurnian juga menunjukkan perbedaan yang sangat besar dibandingkan dengan enzim amobil. Hal ini disebabkan pengaruh zat pengamobil menyebabkan afinitas enzim amobil terhadap substrat semakin berkurang, dan terjadi penurunan aktivitas yang tinggi. Penurunan aktivitas enzim setelah amobilisasi dibandingkan enzim sebelum amobilisasi dapat dilihat pada Tabel 4. 15.

Tabel 4. 15 Penurunan aktivitas enzim pada proses amobilisasi dengan DEAE-Selulosa

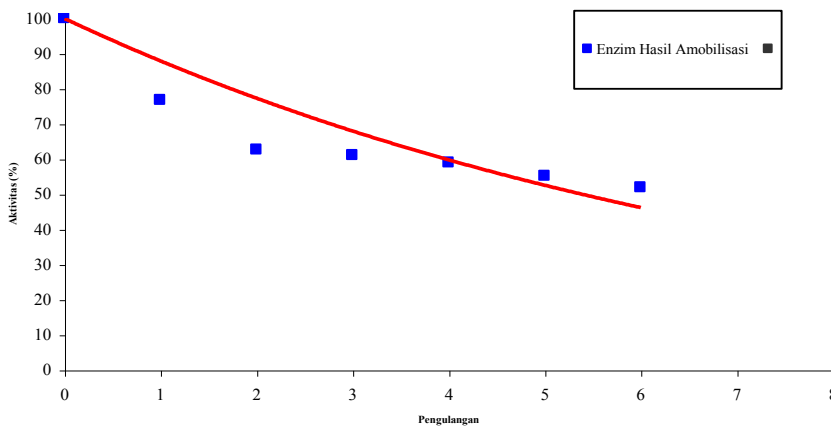
Sumber enzim	Volume (mL)	Aktivitas ($u\ mL^{-1}$)	Perolehan (%)
Sebelum amobilisasi: Hasil pemurnian	5	45,6	100,0
Sesudah amobilisasi: DEAE-Selulosa-amilase	5	21,6	47,4

(Sumber Yandri *et al.*, 2010^b)

Penurunan aktivitas enzim yang cukup besar pada proses amobilisasi ini hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Germain dan Robert (1988). Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan terjadi penurunan aktivitas enzim β -amilase sebesar 57% yang dimodifikasi menggunakan silika. Sedangkan Gaetner dan Puigserver (1992), melaporkan bahwa enzim tripsin hasil modifikasi mengalami penurunan aktivitas sebesar 10 kali dibandingkan dengan enzim yang tidak dimodifikasi. Hal ini disebabkan karena adanya halangan sterik dari PEG pada keaktifan enzim hasil modifikasi terhadap substrat. Pengaruh ini juga menyebabkan berkurangnya laju autolisis enzim hasil modifikasi, sehingga kestabilan enzim meningkat.

c. Konversi enzimatis pati menjadi glukosa menggunakan enzim hasil amobilisasi menggunakan DEAE-Selulosa pada pemakaian berulang

Konversi enzimatis pati menjadi glukosa menggunakan enzim amobil pada pemakaian berulang dapat dilihat pada Gambar 4. 36.



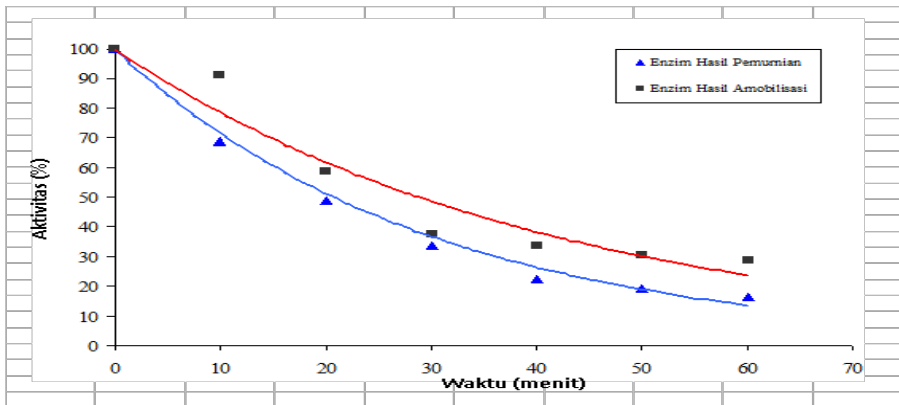
Gambar 4.36 Penggunaan enzim hasil amobilisasi secara berulang (Yandri et al., 2010^b)

Gambar 4. 36 menunjukkan enzim hasil amobil masih mempunyai aktivitas yang cukup tinggi setelah penggunaan selama 6 kali. Enzim amobil mempunyai aktivitas sebesar 51,9%. Hasil ini menunjukkan penggunaan enzim amobil masih efektif pada konversi enzimatis pati menjadi glukosa, walaupun pada proses amobilisasi enzim kehilangan aktivitas sebesar 52,6% (Yandri et al., 2010^b).

d. Stabilitas termal enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Aktivitas sisa (*residual activity*), enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobil ditentukan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60°C selama 60 menit. Pada

interval waktu tertentu masing-masing enzim ditentukan aktivitasnya. Kurva uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobilisasi dapat dilihat pada Gambar 4. 37 (Yandri *et al.*, 2010^b).



Gambar 4.37 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobilisasi, pada suhu 60°C pH 9,0 terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2010^b)

Gambar 4. 37 menunjukkan aktivitas sisa masing-masing enzim pada suhu 60°C dan pH 9,0 selama 60 menit. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa sebesar 16,1 %. Sedangkan α -amilase hasil amobilisasi mempunyai aktivitas sisa sebesar 28,6. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim hasil amobilisasi mempunyai stabilitas termal yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil.

e. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi.

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi dengan DEAE-Selulosa dapat dilihat pada Tabel 4. 16.

Tabel 4.16 Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi

Enzim	k_i .menit ⁻¹	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i kJ.mol ⁻¹
Hasil pemurnian	0,0299	23,2	102,9
Enzim Hasil Amobilisasi	0,0224	30,9	103,7

(Sumber Yandri et al., 2010^b)

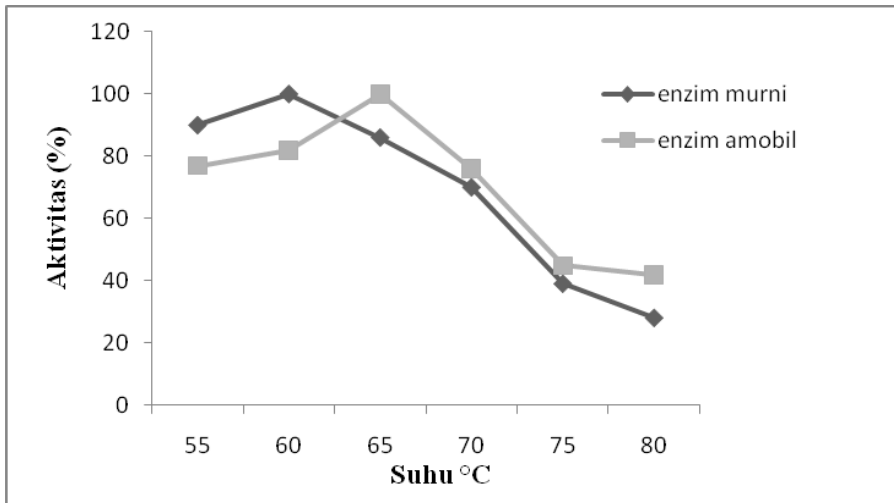
Enzim hasil amobilisasi dengan DEAE-Selulosa meningkat waktu paruhnya sekitar satu setengah kali dibandingkan enzim tanpa diamobilisasi dengan perolehan aktivitas enzim hasil amobilisasi 47,7%. Peningkatan waktu paruh enzim hasil amobilisasi ini hampir sama dengan yang dilaporkan Hernaiz et al., (1999). Hernaiz melaporkan enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 60%, waktu paruhnya meningkat dari 12 jam menjadi 25 jam. Sedangkan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 21%. Enzim hasil modifikasi dengan derajat modifikasi 68% mampu meningkatkan waktu paruh enzim menjadi 60 jam dan aktivitas enzim yang diperoleh kembali adalah 13%. Hasil ini menunjukkan amobilisasi enzim hasil pemurnian dengan DEAE-Selulosa dapat meningkatkan waktu paruh enzim yang tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Hernaiz et al., (1999), akan tetapi kehilangan aktivitas enzim hasil amobilisasi dengan DEAE-Selulosa jauh lebih baik.

ΔG_i enzim hasil amobilisasi dengan DEAE-Selulosa mengalami peningkatan dibandingkan enzim hasil pemurnian. ΔG_i yang rendah menunjukkan enzim tersebut lebih fleksibel dalam larutan yang menyebabkan enzim tersebut lebih mudah terdenaturasi. ΔG_i yang tinggi menyebabkan aktivitas enzim semakin turun karena fleksibilitas enzim semakin berkurang, begitu juga sebaliknya ΔG_i kecil menunjukkan enzim terlalu fleksibel dan mudah terdenaturasi, tetapi aktivitasnya lebih tinggi.

4.9 Amobilisasi Enzim α -amilase dengan CM-selulosa

a. Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Aktivitas (%) enzim sebelum dan sesudah amobilisasi pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 4. 38 (Yandri *et al.*, 2012^b).

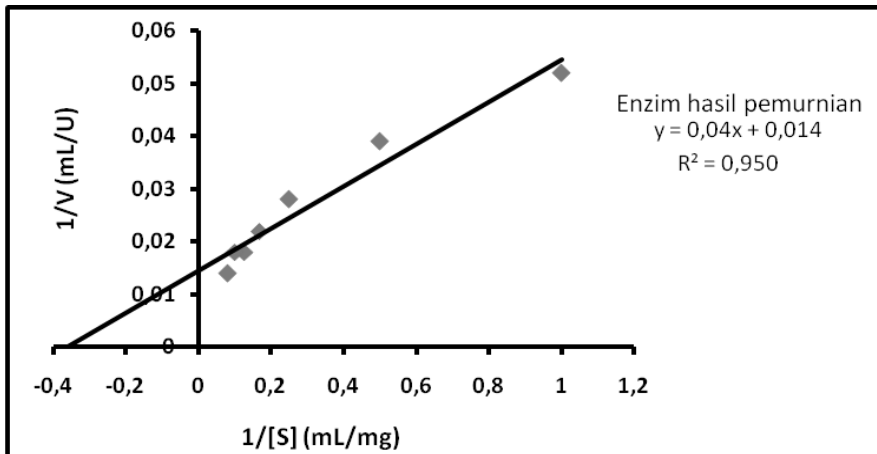


Gambar 4.38 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2012^b).

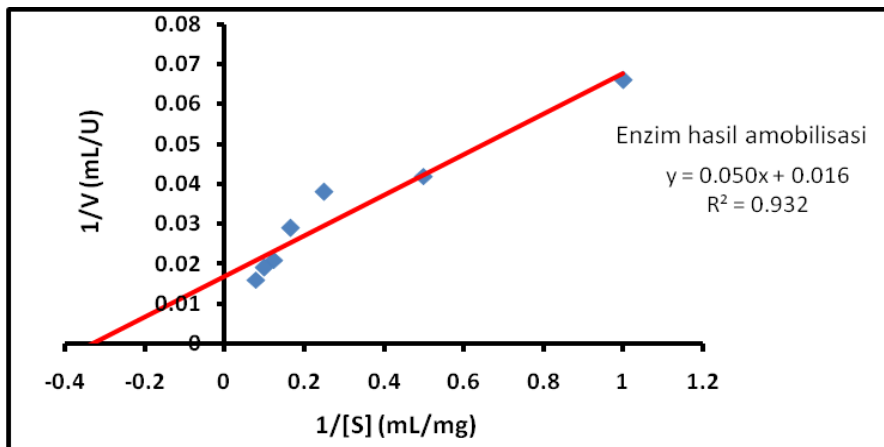
Suhu optimum enzim hasil pemurnian pada Gambar 4. 38 adalah 60°C. Sedangkan suhu optimum enzim hasil amobilisasi mengalami pergeseran dari 60°C menjadi 65°C. Pergeseran suhu optimum ini disebabkan halangan ruang yang ditimbulkan bahan pendukung pada molekul enzim sehingga dapat melindungi enzim dari pengaruh denaturasi panas. Enzim hasil amobil memerlukan suhu reaksi yang lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian untuk mengubah substrat menjadi produk. Stabilitas enzim hasil amobilisasi pada suhu yang lebih tinggi lebih baik dibandingkan enzim hasil pemurnian. Kondisi ini diperkirakan karena proses amobilisasi menyebabkan rigiditas dari enzim hasil amobilisasi meningkat, sehingga enzim hasil amobilisasi lebih tahan terhadap suhu.

b. Penentuan data kinetika enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Grafik penentuan harga K_m dan V_{maks} enzim sebelum dan sesudah amobilisasi dapat dilihat pada Gambar 4. 39, dan 4. 40.



Gambar 4.39 Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2012^b)



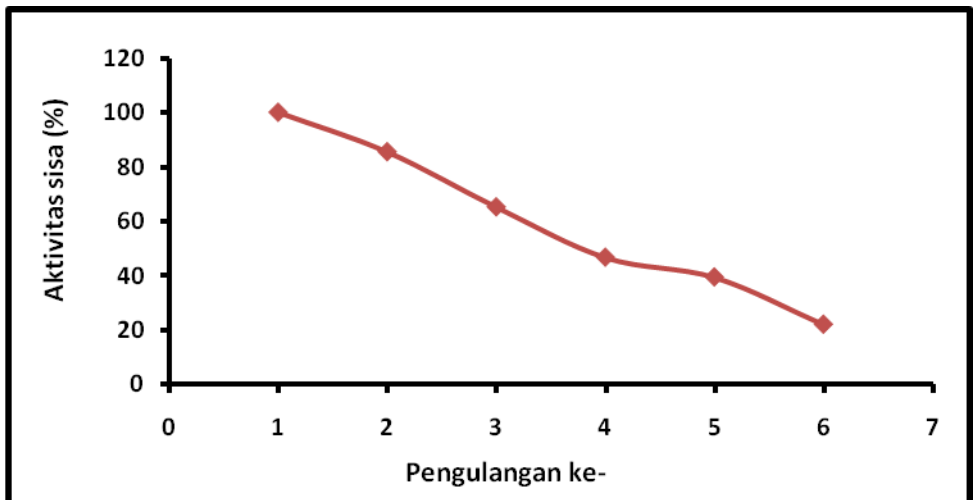
Gambar 4.40 Grafik Lineweaver-Burk α -amilase hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2012^b)

Dari persamaan Lineweaver-Burk pada Gambar 4. 39 dan Gambar 4. 40 diperoleh harga V_{maks} enzim hasil pemurnian sebesar 71,428 $\mu\text{mol/mL/menit}$ dan K_M sebesar 2,85 mg/mL substrat. Sedangkan enzim hasil amobilisasi memiliki nilai V_{maks} sebesar 62,5

$\mu\text{mol/mL/menit}$ dan nilai K_M sebesar $3,125 \text{ mg/mL}$ substrat. Penurunan nilai V_{maks} enzim amobil dibandingkan enzim hasil pemurnian disebabkan adanya halangan sterik matrik pengamobil yang tidak larut, sehingga interaksi substrat dengan enzim terhalangi. Kenaikan nilai K_M pada enzim hasil amobilisasi menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat semakin berkurang dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2012^b).

c. Konversi enzimatis pati menjadi glukosa menggunakan enzim hasil amobilisasi menggunakan CM-Selulosa pada pemakaian berulang

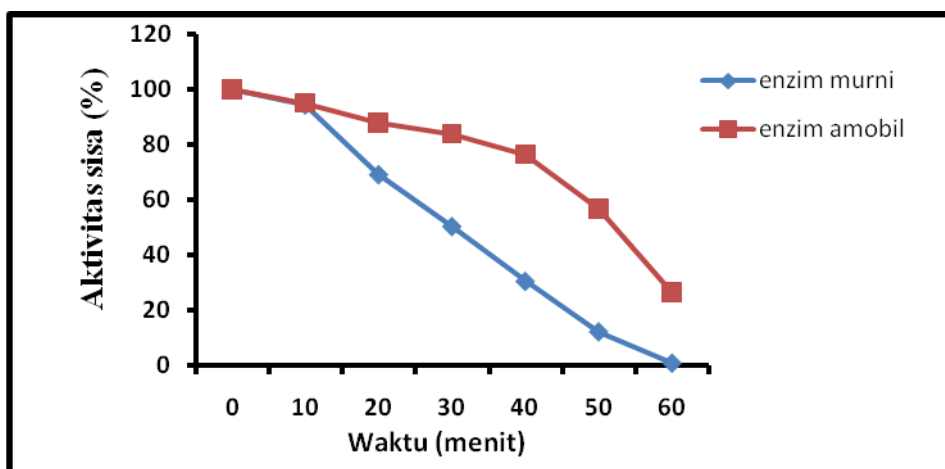
Konversi enzimatis pati menjadi glukosa menggunakan enzim amobil pada pemakaian berulang dapat dilihat pada Gambar 4. 41. Enzim amobil dapat digunakan sebanyak enam kali pengulangan. Pada pengulangan keenam kali enzim amobil memiliki aktivitas sisa (%) sebesar 22%. Enzim amobil hanya efektif pada pengulangan ke 5 dengan aktivitas sisa sebesar 39,4%. Terjadinya penurunan aktivitas pada pemakaian berulang dapat disebabkan karena kehilangan secara fisik akibat pencucian.



Gambar 4. 41 Penggunaan enzim hasil amobilisasi secara berulang (Yandri *et al.*, 2012^b)

d. Stabilitas termal enzim sebelum dan sesudah amobilisasi

Aktivitas sisa (*residual activity*), enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobil ditentukan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60°C selama 60 menit. Pada interval waktu tertentu masing-masing enzim ditentukan aktivitasnya. Kurva uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobil dapat dilihat pada Gambar 4. 42 (Yandri *et al.*, 2012^b).



Gambar 4.42 Stabilitas termal dinyatakan dengan grafik antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan α -amilase hasil amobilisasi, pada suhu 60°C pH 5,5 terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2012^b)

Gambar 4. 42 menunjukkan aktivitas sisa masing-masing enzim pada suhu 60°C dan pH 5,5 selama 60 menit. Aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian adalah 0,9%, sedangkan aktivitas sisa (%) enzim hasil amobilisasi jauh lebih besar yaitu sebesar 26%. Hal ini disebabkan enzim yang diamobilisasi lebih terlindungi dari pengaruh luar yang dapat menyebabkan denaturasi protein, sehingga enzim amobil lebih stabil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

e. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi.

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi dengan CM-Selulosa dapat dilihat pada Tabel 4. 17.

Tabel 4.17 Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan nilai k_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ mol ⁻¹)
Hasil pemurnian	0,088	7,875	99,95
Hasil amobilisasi	0,024	28,875	103,53

(Sumber Yandri et al., 2012^b)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil amobilisasi meningkat bila dibandingkan hasil pemurnian. Menurut Stahl (1999) menyatakan bahwa waktu paruh enzim akan menentukan stabilitas enzim tersebut. Waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim amobilisasi meningkat dari 7,875 menit menjadi 28,875 menit. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi pada Tabel 10 menunjukkan terjadi penurunan nilai k_i untuk enzim hasil amobilisasi. Peningkatan stabilitas enzim amobilisasi berdasarkan penurunan nilai k_i adalah 3,67 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian.

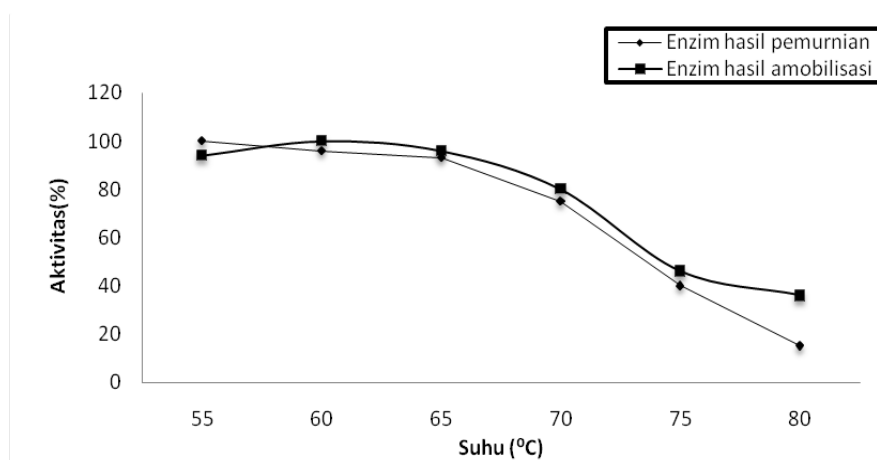
Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi pada Tabel 4. 17, menunjukkan enzim hasil pemurnian memiliki ΔG_i sebesar 99,95 kJ mol⁻¹ dan enzim hasil amobilisasi memiliki ΔG_i sebesar 103,53 kJ mol⁻¹. Kenaikan ΔG_i enzim hasil amobilisasi menunjukkan bahwa enzim hasil amobilisasi semakin rigid, sehingga energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut semakin tinggi. Struktur enzim yang semakin rigid memiliki ikatan yang lebih kuat sehingga konformasi

enzim tidak mudah membuka dan struktur tersier enzim lebih dipertahankan. Untuk mendenaturasi enzim tersebut dibutuhkan energi yang lebih tinggi, maka ΔG_i akan semakin besar. Sebaliknya, harga ΔG_i yang rendah mengindikasikan suatu enzim tersebut kurang rigid, lebih fleksibel, dan mudah terdenaturasi.

4.10 Amobilisasi Enzim α -amilase dengan Kalsium Alginat

a. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi

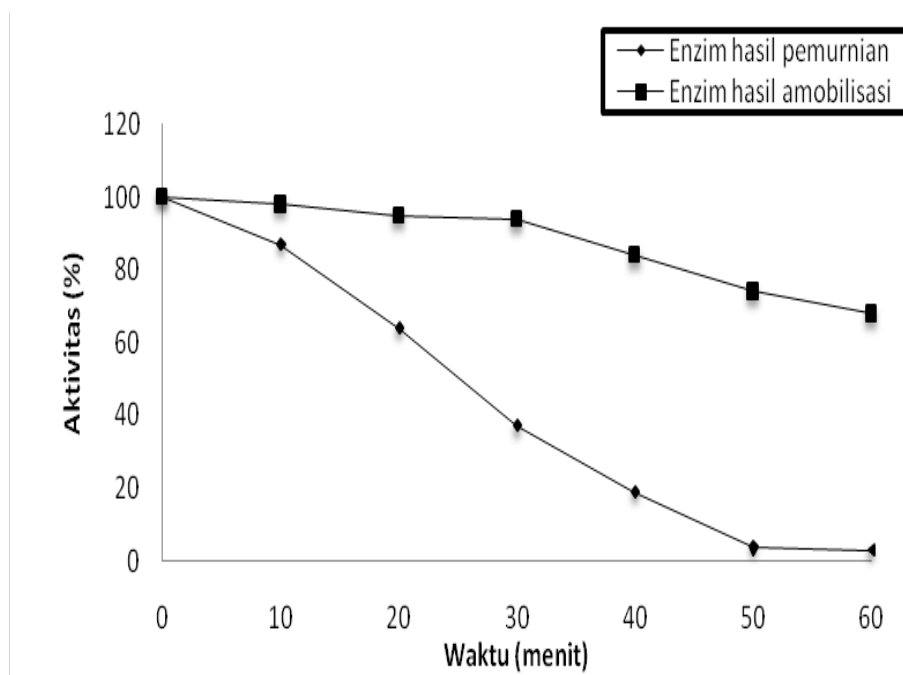
Gambar 4. 43 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim hasil pemurnian yaitu 55°C. Sedangkan suhu optimum enzim hasil amobilisasi yaitu 60°C (Yandri *et al.*, 2013).. Enzim hasil amobilisasi memerlukan suhu reaksi lebih tinggi dibandingkan dengan suhu reaksi enzim hasil pemurnian untuk mengubah substrat menjadi produk. Hal ini dikarenakan adanya halangan ruang, di mana enzim terjebak di dalam matrik kalsium alginat. Gambar 4. 43 juga menunjukkan enzim hasil amobil lebih stabil pada suhu yang lebih tinggi yaitu suhu 70, 75 dan 80°C.



Gambar 4.43 Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2013)

b. Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi

Gambar 4. 44 menunjukkan hubungan antara aktivitas sisa terhadap waktu enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi yang disimpan pada suhu 60 °C selama 60 menit. Enzim hasil amobilisasi memiliki aktivitas sisa (%) yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian setelah diinkubasi selama 60 menit yaitu 3% . Sedangkan aktivitas sisa (%) enzim hasil amobilisasi setelah diinkubasi selama 60 menit adalah 68%. Hal ini disebabkan enzim amobilisasi berada di dalam matriks yang dapat melindungi enzim dari pengaruh fisik yang dapat menyebabkan denaturasi protein sehingga enzim hasil amobilisasi jauh lebih stabil dibandingkan enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2013).



Gambar 4.44 Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi pada suhu 60°C terhadap waktu (Yandri *et al.*, 2013)

c. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Amobilisasi

Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi yang dapat dilihat pada Tabel 4. 18.

Tabel 4.18 Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ/mol)
Hasil hasil pemurnian	0,063	11	100,859
Hasil hasil amobilisasi	0,006	115,5	107,369

(Sumber Yandri et al., 2013)

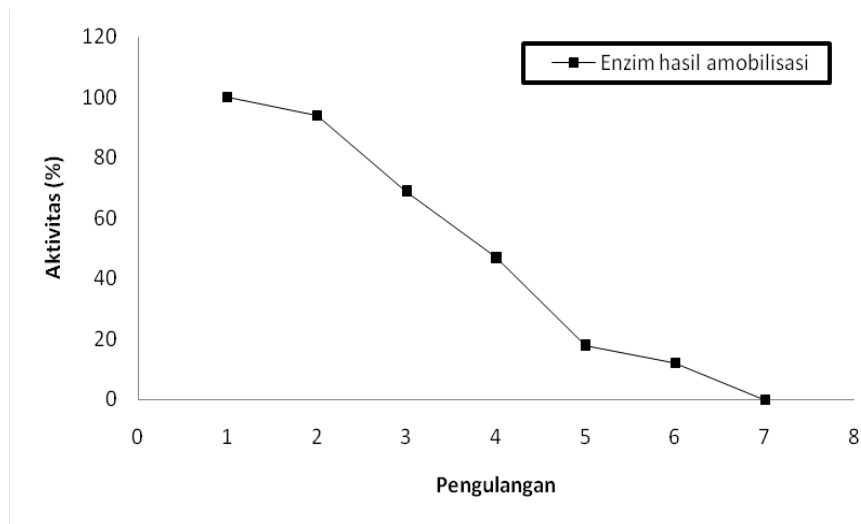
Dari Tabel 4. 18 dapat dilihat bahwa waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil amobilisasi meningkat 10,5 kali dari enzim hasil pemurnian. Waktu paruh enzim amobilisasi meningkat dari 11 menit menjadi 115,5 menit. Ini berarti enzim hasil amobilisasi memiliki tingkat stabilitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian. Untuk nilai k_i (Tabel 4. 18) enzim hasil amobilisasi mengalami penurunan hampir 10,5 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Penurunan nilai k_i yang besar ini menunjukkan enzim hasil amobil jauh lebih stabil dibandingkan enzim hasil pemurnian. Enzim amobil lebih sulit mengalami *unfolding* sehingga kestabilan enzim meningkat (Yang et al., 1996).

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) pada Tabel 4. 18 menunjukkan terjadinya peningkatan ΔG_i enzim hasil amobilisasi sebesar 107,369 kJ mol⁻¹ dibandingkan ΔG_i enzim hasil pemurnian sebesar 100,859 kJ mol⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa enzim hasil amobilisasi rigid, sehingga energi denaturasi enzim lebih besar (Yandri et al., 2013). Semakin rigid enzim maka ikatan yang dimiliki lebih kuat sehingga konformasi (struktur tersier enzim) enzim tidak

mudah membuka dan struktur tersier lebih dipertahankan (Kazan *et al.*, 1997).

d. Pemakaian berulang enzim amobilisasi

Enzim hasil amobilisasi dapat digunakan secara berulang sebanyak enam kali. Pada pengulangan keempat enzim amobilisasi masih memiliki aktivitas sisa sebesar 47%. Sedangkan pada pengulangan keenam enzim hasil amobilisasi memiliki aktivitas sisa sebesar 12% dan pengulangan ketujuh enzim hasil amobilisasi memiliki aktivitas sisa sebesar 0%. Penurunan aktivitas enzim amobilisasi disebabkan karena kehilangan enzim secara fisik akibat pencucian. Data ini menunjukkan enzim amobilisasi hanya efektif digunakan sebanyak 4 kali pengulangan (Gambar 4.45).



Gambar 4.45 Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi (Yandri *et al.*, 2013)

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D. E., W. J. Becktel, and F. W. Dahlquist (1990), pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3–5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme, *Biochemistry* **29**, 2403–2408.
- Bohm, G., and R. Jaenicke (1994), Relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **43**, 97–106.
- Burley, S. K., and G.A. Petsko (1985), Aromatic-aromatic interaction: a Mechanism of protein structure stabilization, *Science* **229**, 23–28.
- Cacciapuoti, G., M. Porcelli, C. Bertoldo, M. De Rosa, and V. Zappia (1994), Purification and characterization of extremely thermophilic and thermo-stable 59-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for in-tersubunit disulfide bonds, *J. Biol. Chem.*, **269**, 24762–24769.
- Chibata, I. (1978), *Immobilized Enzymes, Research and Development*. Halsted Press Book. New York. Pp 298.
- Dams, T., G. Auerbach, G. Bader, U. Jacob, T. Ploom, R. Huber, and R. Jaenicke (2000), The crystal structure of dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima*: molecular features of thermostability, *J. Mol. Biol.* **297**, 659–672.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen, and R. V. Swanson. (1998), The complete genome of the

- hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Nature* **392**, 353–358.
- Dill, K. A. (1990), Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, **29**, 7133–7155.
- Dong, G., C. Vieille, A. Savchenko, and J. G. Zeikus (1997), Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3569–3576.
- Dwevedi. A. (2016), *Enzyme Immobilization*, Springer International Publishing Switzerland 21 – 25
- Facchiano, A. M., G. Colonna, and R. Ragone (1998), Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study, *Protein Eng.*, **11**, 753–760.
- Francis, G.E., C. Delgado, and D. Fisher (1992), PEG-modified proteins in *Stability of Protein Pharmaceuticals Part B*, Ahern, T.J. and M. C. Manning editor, Plenum Press, New York, 246–247.
- Fujimoto, Z., K. Takase, N. Doui, M. Momma, T. Matsumoto, and H. Mizuno (1998), Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose, *J. Mol. Biol.*, **277**, 393–407.
- Gaertner, H. F. and A.J. Puigserver (1992), Increased activity and stability of poly (ethylene glycol) modified trypsin, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 150–155.
- Germain, P. and R.C. Robert (1988), Characterization of a chemically modified β -amylase immobilized on porous silica, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **41**, 297–315.
- Goddettee, D.W., C. Terri, F.L. Beth, L. Maria , R.M. Jonathan, P. Christian, B.R. Robert, S.Y. Shiow, and C.R. Wilson (1993), Strategy and implementation of a system for protein engineering, *J. Biotechnol.*, **28**, 41–54.
- Godfrey, T. and J. Reichelt (1983), *The Application of Enzymes in Industry*, Macmillan, Hampshire, 5–6.
- Hernaiz, M.J., J.M.S. Montero, and J.V. Sinisterra (1999), Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene

- glycol: A systematic study, *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 181-190.
- Janecek, S. and S. Balaz (1992), α -Amylase and approaches leading to their enhanced stability, *Febs Lett.*, **304** (1), 1-3.
- Janecek, S., S. Balaz, M. Rosenberg, M. Stredansky (1992), Chemical stabization of *Bacillus subtilis* α -amylase by modification with D-glucono-delta-lactone, *J. Biotechnol. Tech.*, **6**, 173-176.
- Janecek, S. (1993), Strategies for obtaining stable enzymes, *Process Biochem.*, **28**, 435-445.
- Kanaya, S., and M. Itaya (1992), Expression, purification, and characterization of a recombinant ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10184-10192.
- Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan (1996), Stabilization of Penicillin G acylase against pH by chemical cross-linking, *Process Biochem.*, **31** (2), 135-140.
- Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan (1997), Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 191-197.
- Khajeh, K., H.N. Manesh, B. Ranjbar, A.M. Movahedi, and M.N. Gorgani (2001), Chemical modification of lysine residues in bacillus α -amylase: Effect on activity and stability, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 543-549.
- Lenders, J.P. and R.R. Crichton (1988), Chemical stabilization of glucoamylase from *Aspergillus niger* against thermal inactivation, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 267-277.
- Lozano, P., D. Combes, and J.L. Iborra (1994), Effect of polyols on α -chymotrypsin thermostability: A mechanistic analysis of the enzyme stabilization, *J. Biotechnol.*, **35**, 9-18.
- Matsumura, M., G. Signor, and B. W. Matthews (1989), Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds, *Nature*, **342**, 291-293.
- Melik-Nubarov, N.S., V.V. Mozheav, V.A. Siksniis, and K. Martinek (1987), Protein stabilization via hydrophilization:

Stabilization of α -chymotrypsin by reductive alkylation with glyoxylic acid *Biotechnol. Lett.* **9**:725-730.

- Mozhaev, V. V., K. Martinek (1984), Structure-stability relationship in proteins: New approaches to stabilizing enzymes, *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 50-59
- Mozhaev, V. V., N.S. Melik-Nubarov, V. Siksnis and K. Martinek (1990), Strategy for stabilizing enzymes. Part two: Increasing enzyme stability by selective chemical modification, *Biocatalysis*, **3**, 189-196.
- Mrabet, N. T., A. Van den Broeck, I. Van den Brande, P. Stanssens, Y. Laroche, A. M. Lambeir, G. Matthijssens, J. Jenkins, M. Chiadmi, H. van Tilbeurgh, F. Rey, J. Janin, W. J. Quax, I. Lasters, M. De Maeyer, and S. J. Wodak (1992), Arginine residues as stabilizing elements in proteins, *Biochemistry*, **31**, 2239-2253.
- Ogasahara, K., E. A. Lapshina, M. Sakai, Y. Izu, S. Tsunasawa, I. Kato, and K. Yutani (1998), Electrostatic stabilization in methionine aminopeptidase from hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*, *Biochemistry*, **37**, 5939-5946.
- Pace, C.N. (1992), Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability, *J. Mol. Biol.*, **226**, 29-35.
- Perutz, M. F. (1978), Electrostatic effects in proteins, *Science*, **201**, 1187-1191.
- Shirley, B. A., P. Stanssens, U. Hahn, and C. N. Pace (1992), Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1, *Biochemistry* **31**, 725-732.
- Soemitro, S. (2005). Pengaruh Modifikasi Kimiawi Selektif Terhadap Kestabilan α -amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Bionatura*. **7** (3) : 259-273
- Srivastava, R.A.K. (1987), Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*, *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 749-754.
- Stahl, S. (1999), Thermophilic microorganisms: The biological background for thermophily and thermoresistance of enzymes in *Thermostability of Enzymes* (Gupta, M.N. editor), Springer Verlag, New Delhi, 59-60.

- Steelwagen, E. (1984), Strategies for increasing the stability of enzymes, in *Enzyme Engineering 7*, The New York Academy of Sciences, New York, 1-19.
- Snyder, S.L. and P.Z. Sobocinski (1975), An Improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Method for The Determination of Amines. *Anal. Biochem.* **64**: 284-288.
- Tanner, J. J., R. M. Hecht, and K. L. Krause (1996), Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å resolution, *Biochemistry* **35**, 2597-2609.
- Teplyakov, A. V., I. P. Kuranova, E. H. Harutyunyan, B. K. Vainshtein, C. Frommel, W. E. Hohne, and K. S. Wilson (1990), Crystal structure of thermitase at 1.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **214**, 261-279.
- Tomschy, A., G. Böhm, and R. Jaenicke (1994), The effect of ion pairs on the thermal stability of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Eng.*, **7**, 1471-1478.
- Trevan, M.D. (1980), *Immobilized Enzymes, an Introduction and Application in Biotechnology*. John Wiley and Sons. New York. 138 pp.
- Tsai, C.S., Y.H. Tsai, G. Lauzon, and S.T. Cheng (1974), Structure and activity of methylated horse liver alcohol dehydrogenase, *Biochem.*, **13** (3), 440 -443.
- Urabe, I., H. Nanjo, and H. Okada (1973), Effect of acetylation of *Bacillus subtilis* α-amylase on the kinetics of heat inactivation, *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 73-79.
- Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001), Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65** (1), 1-43.
- Vieille, C. and J. G. Zeikus (1996), Thermozyms: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability, *Tibtech.*, **14** (6), 183-189.
- Villa, A., L. Zecca, P. Fusi, S. Colombo, G. Tedeschi, and P. Tortora (1993), Structural features responsible for kinetic thermal

stability of a carboxypeptidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*, *Biochem. J.*, **295**, 827–831.

- Volkin, D. B., and C. R. Middaugh (1992), The effect of temperature on protein structure, p. 215–247. In T. J. Ahern and M. C. Manning (ed.), *Stability of protein pharmaceuticals. A Chemical and physical pathways of protein degradation*, Plenum Press, New York, N.Y.
- Volkin, D. B., and A. M. Klivanov (1987), Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2945–2950.
- Wang, D.I., (1979), *Fermentation and Enzymes Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Yandri , P. Amalia, T. Suhartati, Mulyono, S. Hadi (2017), Increasing Stability of Cellulase, Obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Chemical Modification Using p-Nitrophenolcarbonate-Polyethylenglycol (NPC-PEG) *Oriental Journal Of Chemistry*, **33**, (5): Pg. 2524-2529
- Yandri , P. Amalia, T. Suhartati, S. Hadi (2015), The Chemical Modification of Cellulase Obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 With Dimethyladimidate, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **12** (3), 2089-2093
- Yandri, R. Rachmawati, T. Suhartati, S. Hadi (2014), The Chemical Modification of Cellulase from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Glyoxylic Acid, *Journal Of Pure And Applied Microbiology*,, **8** (5), p. 3675-3680
- Yandri, P. Amalia, T. Suhartati, S. Hadi (2013), Effect of Immobilization Towards Thermal Stability of α -Amylase Isolates from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Calcium Alginate, *Asian Journal of Chemistry*, **25** (12), 6897 – 6899.
- Yandri, E. S. Sundari, T. Suhartati, S. Hadi (2012^a), The Chemical Modification of α -amylase from Locale Bacteria of *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Using Citraconic Anhydride, *Oriental Journal of Chemistry*, **28** (4), 1613 – 1618.
- Yandri, D. Susanti, T. Suhartati, S. Hadi (2012^b), Immobilization of α -Amylase from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis*

- ITBCCB148 with Carboxymethyl Cellulose (CM-Cellulose), *Modern Applied Science, Canada*, **6** (3), 81 – 86.
- Yandri, N. Anggraini, T. Suhartati, S. Hadi (2011^a), Chemical Modification of α -amylase from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Glyoxylic Acid, *Oriental Journal of Chemistry* **27** (3), Pg. 985 – 990
- Yandri , T. Suhartati, D. Herasari, S. Hadi (2011^b), The Chemical Modification of Protease Isolated from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Nitrophenolcarbonate-Polyethylene Glycol (NPC-PEG), *Modern Applied Science, Canada*, **5** (4), 253 – 258.
- Yandri, Apriyanti, T. Suhartati, S. Hadi (2010^a), The increase of thermal stability of α -amylase from locale bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by chemical modification with dimethyladipimidate, *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, **07** (2): 713-718.
- Yandri, T. Suhartati, S. Hadi (2010^b), Immobilization of α -Amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-Cellulose), *Material Science Research India* **7**(1), 123-128.
- Yandri, D. Herasari, T. Suhartati, S. Hadi (2009), The effect of chemical modification on the thermal stability of protease from local isolate bacteria, *Bacillus substillis* ITBCCB148, *Nature and Science*, **7** (2), 68-75.
- Yandri , D. Herasari, T. Suhartati, S. Hadi (2008), The chemical modification of protease enzyme isolated from locale bacteria isolate, *Bacillus substillis* ITBCCB148 with cyanuric chloride-polyethylenglycol, *European Journal of Scientific Research* **23** (1), 177-186.
- Yandri AS (2007), Analisis stabilisasi struktur α -amilase hasil modifikasi dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Aplikasi dan Metode Analisis Kimia*, Suatu seri monograf, 13 – 22.

- Yandri, A.S. (2006), Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Modifikasi Kimia dari Bakteri Isolat Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Analisis dan Karakterisasi Senyawa Kimia*, Suatu seri monograf, 83-99.
- Yandri, A.S. (2005^a), Pengaruh modifikasi kimia terhadap data kinetika enzim α -amilase dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Jurnal Ilmiah MIPA*, **8** (1), 16 - 23.
- Yandri, A.S. , C. Radiman., M. Sindumarta, S. Soemitro, (2005^b), Pengaruh modifikasi kimia terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Jurnal Sains dan Teknologi*, **9** (1), 9-16.
- Yandri, A.S. , C. Radiman., M. Sindumarta, S. Soemitro, (2004), Karakterisasi dan modifikasi kimia α -amilase dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, Disertasi, ITB, Bandung.
- Yang, Z., D. Michael, A. Robert, X.Y. Fang, and J.R. Alan (1996), Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 82-89.

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM



Yandri A.S., menjadi dosen tetap di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung sejak tahun 1992. Pendidikan S1 di Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik Universitas Pasundan Bandung diselesaikan pada tahun 1987. S2 di Jurusan Kimia Fakultas Pasca Sarjana ITB diselesaikan pada tahun 1991. Pendidikan S3 di ITB diselesaikan Yandri A.S. pada tahun 2004, dalam bidang Biokimia. Dalam menjalankan Tridarma Perguruan Tinggi, Yandri A.S., melakukan Penelitian yang berhubungan dengan protein khususnya enzim. Yandri A.S., mendapatkan bantuan Hibah Penelitian dari Dikti (BBI, Penelitian Dasar, Hibah Bersaing, Fundamental, Hibah Publikasi Internasional, Bantuan Publikasi Internasional, Hibah Strategis Unila, Hibah Strategis Nasional, dan Hibah Kompetensi).



Tati Suhartati saat ini menjadi dosen tetap di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dengan pangkat Pembina Utama Madya, Golongan Ruang IVd, dalam jabatan akademik sebagai Guru Besar Tetap Bidang Kimia Organik. Pendidikan S1 di Jurusan Kimia ITB diselesaikan pada tahun 1983. Pendidikan S2 di Jurusan Kimia ITB diselesaikan pada tahun 1986, dan Pendidikan S3 diselesaikan Tati Suhartati pada tahun 2001 di Jurusan yang sama. Dalam menjalankan Tridarma Perguruan Tinggi, Tati Suhartati melakukan Penelitian dengan memanfaatkan sumber daya alam Indonesia dengan fokus pada isolasi senyawa-senyawa kimia yang berpotensi untuk pengobatan terutama penyakit kanker dan malaria.