PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA

(TESIS)

Oleh

Putri Amalia

PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016

ABSTRACT

EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION ON STABILITY OF CELLULASE ENZYME LOCAL BACTERIA *Bacillus subtilis* ITBCCB148 USING CITRACONIC ANHYDRIDE

By

Putri Amalia

Cellulase enzymes are widely used in various industries to convert cellulose into glucose. In the industrial process requires an enzyme which is stable at extremes pH and temperature. To achieve these objectives, the research has been done to increase the stability cellulase enzymes from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by chemical modification method using citraconic anhydride. Steps have being taken in the research as follows; production, isolation, purification, chemical modification using citraconic anhydride and characterization purified and modified cellulase enzyme. The results showed that the specific activity of crude extract cellulase enzyme 4.263 U/mg and the specific activity of purified cellulase enzymes increased 8.4 times to 35.823 U/mg. The purified enzyme has optimum pH 6.0; optimum temperature 40°C; K_M = 101.583 mg/mL substrate; V_{maks} = 416.667 µmol/mL.min; k_i = 0.033 min^{-1}; $t_{1/2}$ = 21.000 min; and ΔG_i = 96.324 kJ/mol. The modified enzyme using citraconic anhydride (59, 66, 74, 81, and 86%) has optimum pH 6.0; optimum temperature 50°C; in a series K_M 54.349; 64.889; 114.136; 126.750; and 65.114 mg/mL substrate; in a series V_{maks} 232.558; 277.778; 454.545; 500.000; and 285.714 µmol/mL.min; in a series k_i 0.021; 0.020; 0.018; 0.016; and 0.015 min^{-1}; in a series $t_{1/2}$ 33.000; 34.650; 38.500; 43.312; and 46.200 min; in a series ΔG_i 101.342; 101.474; 101.758; 102.074; and 102.401 kJ/mol. The data shows the chemical modification of cellulase enzymes from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 using citraconic anhydride can increase the temperature and thermal stability.

Key words : *Bacillus subtilis* ITBCCB148, cellulase, chemical modification, citraconic anhydride.

ABSTRAK

PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA

Oleh

Putri Amalia

Enzim selulase banyak digunakan dalam berbagai industri untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa. Dalam proses industri diperlukan enzim yang stabil pada pH dan suhu ekstrim. Untuk mencapai tujuan tersebut, telah dilakukan penelitian untuk meningkatkan stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan metode modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. Tahapan yang dilakukan pada penelitian sebagai berikut: produksi, isolasi, pemurnian, modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida dan karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim selulase 4,263 U/mg dan aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian meningkat 8,4 kali menjadi 35,823 U/mg. Enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 6,0; suhu optimum 40°C; K_M = 101,583 mg/mL substrat; V_{maks} = 416,667 µmol/mL.menit; k_i = 0,033 menit^{-1}; $t_{1/2}$ = 21,000 menit; dan ΔG_i = 96,324 kJ/mol. Enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida (59, 66, 74, 81, dan 86%) memiliki pH optimum 6,0; suhu optimum 50°C; K_M secara berurutan 54,349; 64,889; 114,136; 126,750; dan 65,114 mg/mL substrat; V_{maks} secara berurutan 232,558; 277,778; 454,545; 500,000; dan 285,714 µmol/mL.menit; k_i secara berurutan 0,021; 0,020; 0,018; 0,016; dan 0,015 menit^{-1}; $t_{1/2}$ secara berurutan 33,000; 34,650; 38,500; 43,312; dan 46,200 menit; ΔG_i secara berurutan 101,342; 101,474; 101,758; 102,074; dan 102,401 kJ mol^{-1}. Data tersebut, menunjukkan modifikasi kimia enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan sitrakonat anhidrida dapat meningkatkan suhu dan stabilitas termal.

Kata kunci : *Bacillus subtilis* ITBCCB148, selulase, modifikasi kimia, sitrakonat anhidrida.

PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA

Oleh

PUTRI AMALIA

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS

Pada

Program Pascasarjana Magister Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung

PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016

Judul Tesis	: **PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA**
Nama Mahasiswa	: **Putri Amalia**
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1427011007
Program Studi	: Magister Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP 19540510 198803 2 001

2. Ketua Program Studi Magister Kimia
FMIPA Universitas Lampung

Prof. Sutopo Hadi, Ph.D.
NIP. 19710415 199512 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.**

Sekretaris : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**

Penguji
Bukan Pembimbing : **Mulyono, Ph.D.**

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP 19710212 199512 1 001

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Sudjarwo, M.S.
NIP 19530528 198103 1 002

Tanggal Lulus Ujian Tesis : 16 Juni 2016

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul **"PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA"** adalah karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya; saya bersedia dan sanggup dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 21 Juni 2016
Pembuat Pernyataan

Putri Amalia

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Pringsewu pada tanggal 22 Juli 1989, sebagai anak pertama dari enam bersaudara, yang merupakan putri dari Bapak Hanafi dan Ibu Fitri Yeni.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Islamiyah Sukoharjo pada tahun 1995 dan Sekolah Dasar di SDN 4 Sukoharjo pada tahun 2001. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama di SLTP PGRI 2 Sukoharjo pada tahun 2004 dan Sekolah Menengah Atas di SMAN 3 Pringsewu (sekarang menjadi SMAN 2 Pringsewu) pada tahun 2007. Pada tahun yang sama Penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SMPTN (Seleksi Masuk Perguruan Tinggi Negeri). Pada tahun 2010 Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan di BARISTAND Industri (Balai Industri Riset dan Standardisasi Industri). Pada tahun 2014 penulis melanjutkan pendidikan magister kimia jurusan kimia FMIPA Unila. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif sebagai asisten dan koordinator praktikum di Laboratorium Biokimia serta aktif sebagai peneliti dari dana hibah kompentensi yang diperoleh dosen pembimbing.

Motto

Jangan terpuruk ketika tengah berada dalam situasi terburuk,
hadapilah dengan kesabaran dan tersenyumlah,
seperti batu karang yang mampu menahan
amarah gulungan ombak yang datang bertubi-tubi.
Sesungguhnya Tuhan ingin menjadikan mu lebih kuat dari
sebelumnya.
(Penulis)

Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan
(Q.S Al. Insyirah;6).

Jangan pernah membalikan badan ke belakang, tegap dan pandanglah jalan di depan mu, masih panjang jalan untuk mencapai kesuksesan. Kesuksesan bukanlah suatu kebetulan, tetapi hasil dari perjuangan, kerja keras, disiplin dan sabar yang selalu diiringi do'a. Dan kegagalan bukanlah suatu hambatan, tapi kesuksesan yang tertunda. Kegagalan adalah sejarah perjalanan kehidupan dan acuhan perjalanan kehidupan sekarang dan masa akan datang.
(Penulis)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada :

ALLAH S.W.T sang pemilik jiwa dan ragaku yang telah menganugrahkan hidayah-Nya, dan Muhammad SAW sebagai suri tauladanku.

Kedua Orang tua ku,
Ibunda tercinta Fitri Yeni dan ayahanda Hanafi yang tak henti-hentinya memberikan kasih sayangnya, do'a, dan motivasi dalam segala hal. Dan terima kasih atas kepercayaan yang telah ibunda dan ayahanda berikan selama ini.

Kelima adikku:
Muhammad Fadhli, Camelia Hana Fitri, Nova Novitasari Hana Fitri, Bella Cantika Hana Fitri dan Ade Intan Permata Gia Hana Fitri

Mak uwo dan datuk;
Mak uwo Anisdar (Alm), Mak uwo Eti, Mak uwo Enek (uwo Tinggi) dan semua datukku tercinta yang telah kembali kepada Sang Maha Kuasa.

Pembimbing Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.

Guru-guru yang slalu membagi ilmunya untukku

Seluruh sahabat yang selalu menyemangatiku

SANWACANA

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah puji dan syukur penulis ucapkan kehadirat Allah S.W.T, serta sholawat dan salam selalu tercurah pada nabi Besar kita, Nabi Muhammad SAW. Atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis dengan judul **"PENGARUH MODIFIKASI KIMIA TERHADAP STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI LOKAL *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA".** Pada Kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku Kepala Laboratorium Biokimia dan Pembimbing I yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, bimbingan, bantuan, dukungan, arahan, saran dan kritik sehingga penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis ini.
2. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.Si., selaku Pembimbing II yang telah bersedia memberikan gagasan, saran dan kritik.
3. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Pembahas yang telah bersedia memberikan arahan, koreksi, saran dan kritik.
4. Bapak Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D., selaku Ketua Prodi Magister Kimia Jurusan Kimia FMIPA Unila.
5. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila.

6. Bapak Prof. Warsito, S.Si., D.E.A, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu Staf Administrasi FMIPA Universitas Lampung.
9. Ibunda Fitri Yeni dan Ayahanda Hanafi, terima kasih atas kasih sayang, do'a, nasehat, perhatian, kepercayaan dan dukungan yang tidak henti-hentinya.
10. Adik-adik tercinta Muhammad Fadhli, Camelia Hana Fitri, Nova Novitasari Hana Fitri, Bella Cantika Hana Fitri dan Ade Intan Permata Gia Hana Fitri.
11. Keluarga besarku tercinta mak uwo, datuk, mak nga, tante, om, uni, abang, ponakan, uni atau abang sepupu, dan semuanya.
12. Rekan *peer* grup biokimia dan angkatan 2014 atas dukungan, kerjasama dan kebersamaannya.
13. Adik-adik tingkat S1 angkatan 2011 dan 2012.
14. Semua pihak yang telah memberikan bantuannya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah mereka berikan kepada penulis. Amin. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi sedikit harapan semoga tesis yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat khususnya bagi rekan-rekan mahasiswa dan para pembaca umumnya. Amin.

Bandar Lampung, 16 Juni 2016

Putri Amalia

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL iv

DAFTAR GAMBAR v

DAFTAR LAMPIRAN vii

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang 1

B. Tujuan Penelitian 3

C. Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim 5

1. Klasifikasi enzim 5
2. Sifat-sifat katalitik khas dari enzim 8
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim 8
   a. Suhu 8
   b. pH 9
   c. Konsentrasi enzim 10
   d. Konsentrasi substrat 10
   e. Inhibitor 11
   f. Aktivator 11
   g. Waktu inkubasi 12
4. Teori pembentukan enzim-substrat 12
   a. Teori lock and key 12
   b. Teori induced-fit 12

B. Kinetika Reaksi Kimia 13

C. Stabilitas Enzim 15
1. Stabilitas termal enzim..... 16
2. Stabilitas pH enzim..... 17

D. *Bacillus subtilis*..... 17

E. Enzim Selulase 18

F. Selulosa..... 21

G. Isolasi dan Pemurnian Enzim..... 22
1. Sentrifugasi 22
2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat 23
3. Dialisis 24

H. Pengujian aktivitas selulase dengan metode *Mandels* 25

I. Penentuan kadar protein dengan metode *Lowry* 25

J. Modifikasi Kimia..... 26

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian..... 30

B. Alat dan Bahan..... 30

C. Prosedur Penelitian 31
1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi..... 31
2. Produksi enzim selulase..... 32
3. Isolasi enzim selulase..... 32
4. Pemurnian enzim selulase 32
a. Fraksinasi dengan ammonium sulfat 32
b. Dialisis 34
5. Uji aktivitas selulase 35
a. Metode *Mandels* 35
1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas selulase metode *Mandels*..... 35
2. Uji aktivitas selulase metode *Mandels* 35
b. Penentuan kadar protein metode *Lowry* 36
1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein metode *Lowry* 36
2. Uji kadar protein metode *Lowry*..... 36
6. Modifikasi Kimia 37
7. Karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi..... 37
a. Penentuan pH optimum 37

b. Penentuan suhu optimum 37
c. Penentuan nilai K_M dan V_{maks} 38
d. penentuan stabilitas termal dan stabilitas pH enzim 38
e. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) 38
8. Penentuan derajat modifikasi 39

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Produksi dan Isolasi Enzim Selulase 41

B. Pemurnian Enzim Selulase 42

C. Modifikasi Kimia Enzim Selulase Hasil Pemurnian Menggunakan Sitrakonat Anhidrida dan Penentuan Derajat Modifikasi 44

D. Karakterisasi Enzim Selulase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Modifikasi 47
1. Penentuan pH optimum enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi 47
2. Penentuan suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi 49
3. Penentuan stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi 51
4. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi 53

5. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Selulase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi 55
1. Kontanta laju inaktivasi termal (k_i) 55
2. Waktu paruh ($t_{1/2}$) 56
3. Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) 56

V. SIMPULAN DAN SARAN
A. Simpulan 58
B. Saran 59

DAFTAR PUSTAKA 60

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Mikroorganisme penghasil selulase 20
2. Pereaksi modifikasi lisin dalam protein 28
3. Pemurnian enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 44
4. Penentuan derajat modifikasi dengan menggunakan 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat 45
5. Nilai kontanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi 55
6. Sifat fisiko kimia enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida 57

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim 9
2. Hubungan pH dengan aktivitas enzim 9
3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim 10
4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim 11
5. Teori kunci-gembok dan kecocokan induksi 13
6. Kurva *Lineweaver-Burk* 15
7. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase 19
8. Struktur selulosa 21
9. Dialisis 25
10. Reaksi 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS) dan lisin 28
11. Modifikasi gugus amina pada residu lisin dalam protein dengan sitrakonat anhidrida 29
12. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat ... 33
13. Diagram alir penelitian 40
14. pH optimum enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 59, 66, 74, 81, dan 86% 48
15. Suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 59, 66, 74, 81, dan 86% 50

16. Stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 59, 66, 74, 81, dan 86% 52

17. Grafik *Lineweaver-Burk* enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan derajat modifikasi 59, 66, 74, 81, dan 86% 53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Hubungan aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada berbagai pH 69

2. Hubungan aktivitas sisa (%) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada berbagai pH 70

3. Hubungan aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada berbagai suhu 71

4. Hubungan aktivitas sisa (%) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada berbagai suhu 72

5. Hubungan aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian terhadap 1/V dan 1/[S] enzim hasil pemurnian berdasarkan persamaan *Lineweaver-Burk*..... 73

6. Hubungan aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian terhadap 1/V dan 1/[S] enzim hasil modifikasi berdasarkan persamaan *Lineweaver-Burk*..... 74

7. Hubungan aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan waktu interval 10 menit selama 60 menit pada suhu 50°C 75

8. Hubungan aktivitas sisa (%) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan waktu interval 10 menit selama 60 menit pada suhu 50°C 76

9. Hubungan aktivitas sisa (%) enzim selulase hasil pemurnian terhadap $Ln(E_i/E_0)$ dan waktu dengan interval 10 menit selama 60 menit pada suhu 50°C 77

10. Hubungan aktivitas sisa (%) enzim selulase hasil modifikasi terhadap $Ln(E_i/E_0)$ dan waktu dengan interval 10 menit selama 60 menit pada suhu 50°C 78

11. Grafik In (E_i/E_0) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 59, 66, 74, 81, dan 86% 79

12. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil pemurnian 80

13. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 59% 81

14. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 66% 82

15. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 74% 83

16. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 81% 84

17. Perhitungan ΔG_i enzim selulase hasil modifikasi dengan sitrakonat anhidrida 86% 85

18. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi dan kurva standar glukosa..... 86

19. Absorbansi serum albumin sapi (BSA) pada berbagai konsentrasi dan kurva standar protein..... 87

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Semakin berkembangnya teknologi, banyak pelaku industri pangan dan non-pangan memanfatkan enzim sebagai biokatalis dalam proses industri (Wilda *et al.*, 2013). Banyak enzim dengan peranan penting yang secara komersial diproduksi dalam jumlah besar salah satunya enzim selulase (Gunam *et al.*, 2004). Hal ini karena enzim selulase salah satu enzim ekstraseluler yaitu enzim yang dihasilkan dalam sel dan dikeluarkan pada media pertumbuhannya, sehingga dapat dengan mudah dipisahkan dari miselia melalui sentrifugasi (Onsori *et al.*, 2005).

Selulase banyak digunakan secara luas dalam berbagai industri seperti industri tekstil, deterjen, pulp, kertas (Aehle, 2004), makanan, pakan ternak (Nakari *and* Pentilla, 1996), asam organik (Luo *et al*., 1997) dan zat kimia lainnya (Cao, *et al*., 1997). Enzim ini dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa, yang merupakan bahan baku fermentasi pembentukan etanol (Shiratori *et al.*, 2006; Lin *and* Tanaka, 2006) untuk mengatasi defisiensi bahan bakar fosil (Coughlan, 1985; Beguin *and* Anbert, 1994). Selulosa menjadi salah satu alternatif bioetanol karena sangat stabil, efesien dan ekonomis (Yin *et al.*,2010). Secara umum enzim ini dapat diisolasi dari bakteri (Murashima *et al.*,2002; Saito *et al.*, 2003; Sonia,

2015) seperti *Bacillus* karena tidak bersifat patogen, mudah tumbuh, media pertumbuhan murah dan dapat menghasilkan enzim selulase dangan aktivitas yang tinggi (Robson *and* Glen, 1984).

Dalam proses industri, enzim bekerja pada suhu antara 60°-125°C (Vieille *and* Zeikus, 1996). Namun, pada kenyataannya enzim mudah terdenaturasi dan kehilangan aktivitas katalitik pada suhu tinggi dan pH ekstrim (Goddette *et al.*, 1993). Menurut Wagen (1984) dan Janecek (1993), enzim yang dengan stabilitas tinggi dapat diperoleh langsung dengan mengisolasi mikroorganisme termofilik pada habitatnya atau dengan meningkatkan stabilitas mikroorganisme mesofilik melalui modifikasi kimia.

Peningkatan stabilitas enzim selain dengan metode modifikasi kimia dapat juga dilakukan dengan amobilisasi dan mutagenesis terarah (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Namun, modifikasi kimia lebih menguntungkan dibandingkan dengan amobilisasi yang dapat menghalangi kontak enzim-substrat secara langsung (Nubarov *et al*., 1987), dan lebih menguntungkan dari mutagenesis terarah, karena tidak memerlukan informasi mengenai struktur primer dan struktur tiga dimensi (Mozhaev *and* Martinek, 1984).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan modifikasi kimia enzim protease menggunakan asam dimetil adipimidat (DMA) (Yandri *et al.*, 2009) dan modifikasi kimia enzim α-amilase menggunakan asam glioksilat (Yandri *et al.*, 2011) dan sitrakonat anhidrida (Yandri *et al.*, 2012) menunjukkan adanya

peningkatan stabilitas termal enzim modifikasi dibandingkan enzim hasil pemurnian. Sedangkan modifikasi kimia enzim selulase menggunakan sianurat klorida polietilenglikol (CC-PEG) (Fitriyanti, 2014) dan asam glioksilat (Sutisna, 2014) dapat meningkatkan stabilitas enzim terhadap pH dan suhu serta meningkatkan stabilitas termal enzim.

Pada penelitian ini dilakukan peningkatan stabilitas enzim dengan metode modifikasi kimia pada enzim selulase yang telah diisolasi dan dimurnikan dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan senyawa sitrakonat anhidrida yang secara spesifik dapat memodifikasi struktur residu lisin yang berada di permukaan enzim, sehingga dapat meningkatkan stabilitas enzim (Dixon *and* Perham, 1968; Khajeh *et al.*, 2004).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Memperoleh enzim selulase dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dari *B.subtilis* ITBCCB148.
2. Meningkatkan stabilitas enzim selulase melalui modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida dari *B. subtilis* ITBCCB148.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi peningkatan stabilitas enzim melalui modifikasi kimia.
2. Memberikan informasi terhadap pengaruh sitrakonat anhidrida sebagai zat modifikasi kimia untuk meningkatkan stabilitas enzim selulase dari *B. subtilis* ITBCCB148.
3. Stabilitas enzim selulase yang tinggi dapat digunakan dalam proses-proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan biokatalis yang dapat mengkatalisis proses biokimia dari molekul awal yaitu substrat menjadi pecahan molekul awal yang disebut produk. Enzim mempunyai berat molekul yang bervariasi antara 10^4 - 10^7 KDa (Dryer, 1993) yang dapat mempercepat reaksi 10^8 - 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis (Poedjiadi, 2006). Selain itu, enzim bersifat spesifikasi substrat yang tinggi, dapat bekerja pada kondisi tekanan dan suhu rendah (Bhat, 2000), tidak membentuk produk sampingan, produktivitas tinggi, mengurangi biaya purifikasi dan kerusakan lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990).

1. Klasifikasi enzim

Enzim dapat dilkasifikasikan menjadi 2 kelas berdasarkan fungsi dan ada tidaknya substrat dalam proses pembentuknya, yaitu:

a. Menurut Ngili (2009), enzim dapat diklasifikasi menjadi 6 kelas berdasarkan fungsinya dan tiap kelas mempunyai beberapa sub-kelas berdasarkan IUPAC dan menurut Page (1989) tiap enzim mempunyai nama trivial berdasarkan IEC:

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi suatu substrat, sambil mereduksi yang lain pada saat yang bersamaan. Enzim ini dibagi menjadi 6 sub-kelas, yaitu:
   1.1. Gugus >CH-OH
   1.2. Gugus >C=O
   1.3. Gugus >C=CH-
   1.4. Gugus >CH-NH_2
   1.5. Gugus >CH-NH-
   1.6. Donor NADH, NADPH
2. Transferase, mengkatalisis reaksi pemindahan gugus fungi. Enzim ini dibagi menjadi beberapa sub-kelas, yaitu:
   2.1. Gugus 1 karbon
   2.2. Gugus >C=O
   2.3. Gugus asil
   2.4. Gugus glikosil
   2.5. Gugus alkil
   2.6. Gugus N
   2.7. Gugus yang mengandung P
   2.8. Gugus yang mengandung S
3. Hidrolase, enzim yang berkerja menghidrolisis substrat yang dibagi menjadi beberapa sub-kelas, yaitu:
   3.1. Ikatan ester
   3.2. Ikatan glikosidik
   3.3. Ikatan eter
   3.4. Ikatan peptida
   3.5. Ikatan C-N lain
   3.6. Anhidrida asam
   3.7. Ikatan C-C
   3.8. Ikatan C-X / P-X
   3.9. Ikatan P-N
   3.10. Ikatan S-N
   3.11. Ikatan C-P
4. Liase, mengkatalisis pemecahan gugus dari satu substrat sehingga terbentuk ikatan rangkap atau sebaliknya. Enzim ini dibagi menjadi 3 sub-kelas, yaitu:

4.1. Ikatan >C=C<
4.2. Ikatan C=O
4.3. Ikatan C=N-
4.4. Ikatan C-S<
4.5. Ikatan C-X

5. Isomerase, mengkatalisis perubahan isomer ke lainnya seperti; isomer optik, geometrik (spasial) maupun posisi. Enzim yang sering digunakan dengan sub-kelas, yaitu:
   5.1. Rasemasa
   5.2. Isometase *cis-trans*

6. Ligase, mengkatalisis pembentukan ikatan kovalen seperti; karbon-oksigen, karbon-sulfur, karbon-nitrogen dan karbon-atom lainnya dengan adanya ATP. Enzim ini dibagi menjadi 4 sub-kelas, yaitu:
   6.1. Ikatan C-O
   6.2. Ikatan C-S
   6.3. Ikatan C-N
   6.4. Ikatan C-C

b. Menurut Pelczar dan Chan (2007), enzim dapat dibedakan berdasarkan ada tidaknya substrat dalam proses pembentuknya menjadi 2, yaitu:

1. Enzim adaptif, yaitu: enzim yang dihasilkan oleh sel sebagai respon terhadap adanya rangsangan substrat tertentu. Enzim ini disebut juga enzim terinduksi karena terjadi induksi pada enzim dan substrat yang menyebabkan pembentukan enzim tersebut yaitu induser.

2. Enzim konstitutif, yaitu: enzim yang dihasilkan oleh sel, dimana terbentuknya enzim ini tidak dirangsang oleh ada tidaknya substrat tertentu dalam medium dan dihasilkan secara terus menerus.

2. Sifat-sifat katalitik khas dari enzim

Menurut Page (1989) ada 3 sifat katalitik yang khas dari enzim dan jarang terjadi pada katalis-katalis lain, yaitu:

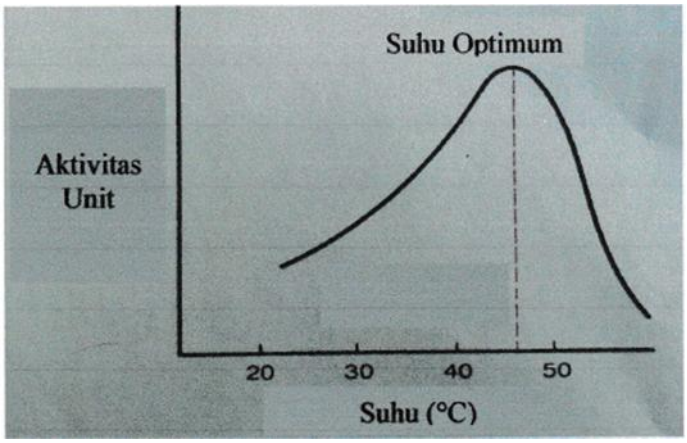
a. Enzim dapat meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
b. Enzim sangat selektivitas tinggi terhadap reaktan yang dikerjakan dan jenis reaksi yang dikatalisis.
c. Enzim dapat meningkatkan laju reaksi yang luar biasa dibandingkan katalis biasa.

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim terhadap substratnya, sebagai berikut:

a. Suhu

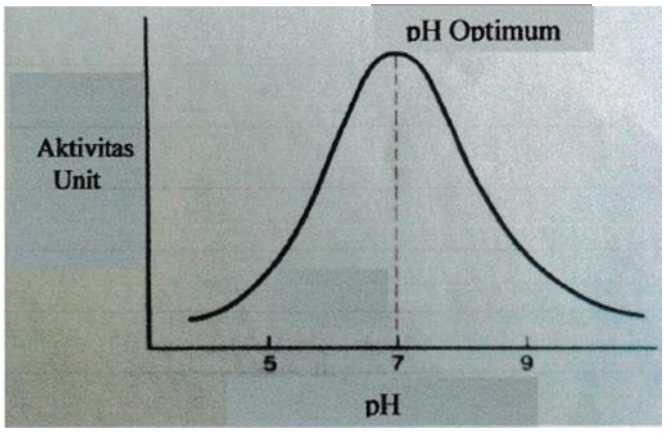
Meningkatnya suhu berbanding lurus dengan meningkatnya laju reaksi sampai pada titik akhir, dimana seluruh aktifitas hilang. Ini dapa dilihat pada Gambar 2. Secara umum, banyak enzim yang bekerja secara optimal antara suhu 25-37°C (Page, 1989). Jika enzim dipanaskan pada sekitar 50°C atau lebih, maka enzim akan terdenaturasi dan bersifat iriversibel. Sedangkan pada suhu 5°C, enzim dalam keadaan inaktif dan pada suhu normal enzim kembali aktif (Montgomery, 1993).



Gambar 1. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim (Armstrong, 1983).

b. pH

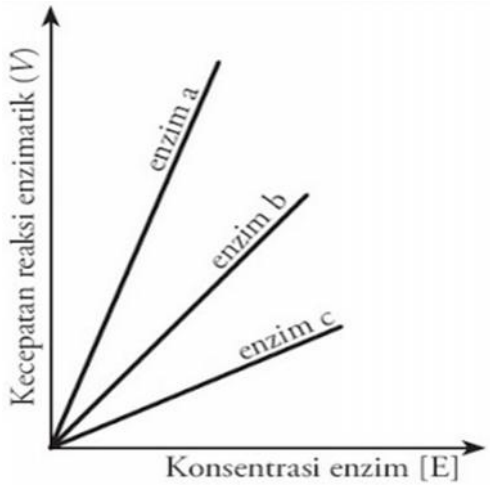
Enzim dapat bermuatan ion positif (+), ion negatif (-) atau bermuatan ganda (zwitter ion). Struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungan (Poedjiadi, 2006). Hal ini dapat menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim menjadi berubah. Sehingga akan mempengaruhi afinitas enzim terhadap substratnya, serta mempengaruhi laju reaksi (Ngili, 2009). Kebanyakan enzim mempunyai pH optimum antara pH 4–8. Jika enzim diberi pH ekstrim, maka akan terdenaturasi (Montgomery, 1993).



Gambar 2. Hubungan pH dengan aktivitas enzim (Armstrong, 1983).

c. Konsentrasi enzim

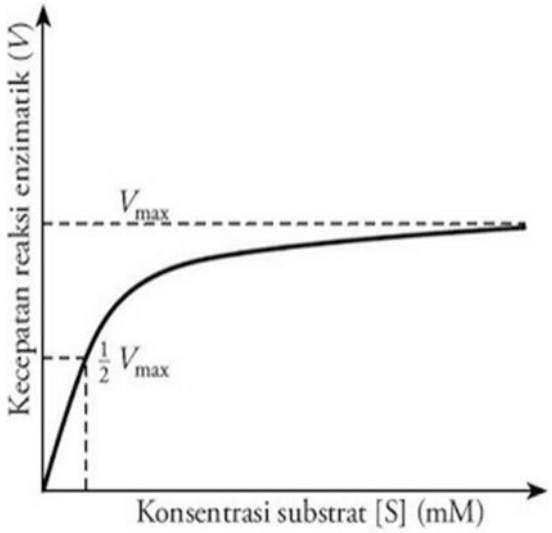
Menurut Poedjiadi (2006), meningkatnya konsentrasi enzim secara langsung akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik sampai batas konsentrasi tertentu. Hasil hidrolisis substrat akan tetap konstan dengan meningkatnya konsentrasi enzim, karena penambahan enzim tidak efektif lagi (Reed, 1975).



Gambar 3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Pelczar dan Chan, 2007).

d. Konsentrasi substrat

Jika konsentrasi substrat rendah dan konsentrasi enzim tetap, maka laju reaksi lambat dan kompleks enzim-substrat yang terbentuk sedikit karena tidak semua substrat diikat enzim. Jika konsentrasi substrat meningkat, maka laju reaksi akan meningkat (Lehninger, 2005). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4. Jika substrat dalam keadaan berlebih, maka akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga sebagian substrat tidak diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi (Kuchel dan Gregory, 2002).



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Armstrong, 1983).

e. Inhibitor

Menurut Mara (1999) dan Wirahadikusumah (1997), Inhibitor atau hambatan reaksi enzim adalah penurunan kecepatan reaksi enzimatik akibat adanya suatu senyawa kimia tertentu dalam larutan enzim substrat yang menyebabkan aktivitas enzim terhambat. Inhibitor bekerja dengan cara menyerang sisi aktif enzim sehingga fungsi katalitiknya terganggu dan enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substrat.

f. Aktivator

Aktivator merupakan suatu faktor yang dapat membantu meningkatkan aktivitas enzim. Aktivator yang umum dibutuhkan berupa ion-ion mono dan divalen seperti Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Na^{+}, K^{+}, NH_4^{+}, Cl^{-} dan lainnya (Rastogi, 1995).

g. Waktu inkubasi

Setiap enzim bekerja dengan waktu inkubasi optimum yang berbeda-beda untuk mencapai terbentuknya produk (Orten *and* Neuhaus, 1970).

4. Teori pembentukan enzim-substrat

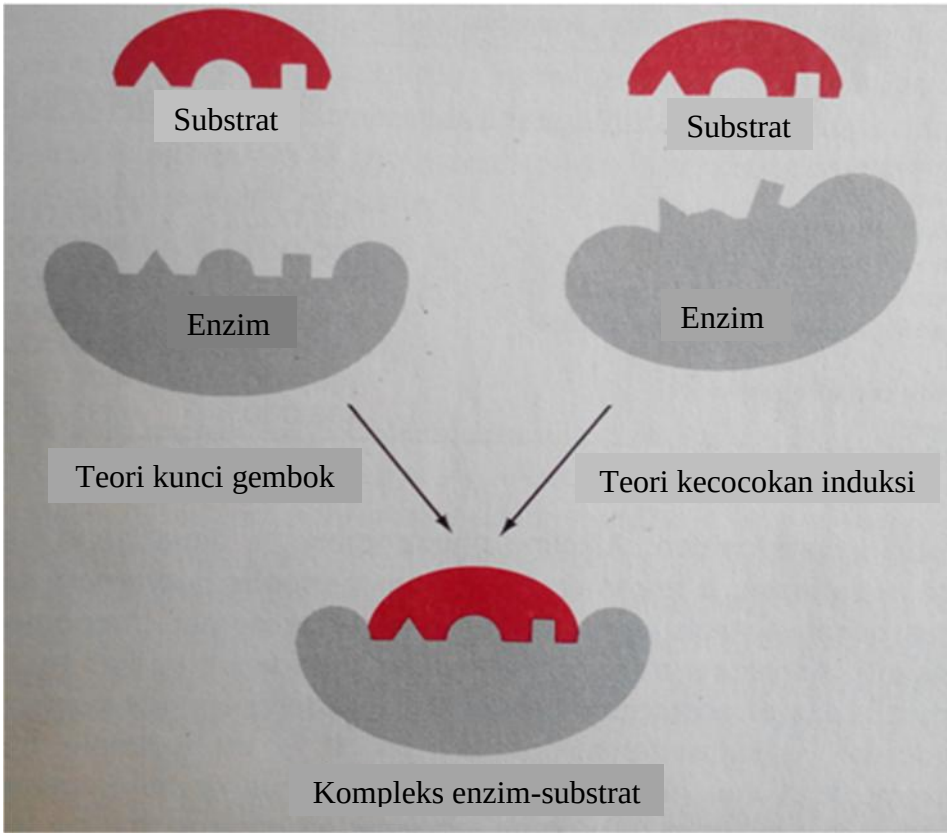
Ada 2 teori yang menerangkan pembentukan kompleks enzim-subtrat, yaitu :

a. Teori *lock and key* (gembok dan kunci)

Fischer mengusulkan model *lock and key* (gembok dan kunci), substrat sebagai kunci dan situs aktif sebagai gembok. Substrat akan langsung mengikat pasangan komplementer pada situs aktif. Substrat yang terlalu besar tidak dapat menempati situs aktif dan substrat yang terlalu kecil tidak dapat menempati dengan tepat (Armstrong, 1983).

b. Teori *induced-fit* (ketetapan induksi)

Daniel koshlan memodifikasi model *lock and key* dan menyarankan model tangan dan sarung tangan (kecocokan induksi), dimana situs aktif tidak rigit (kaku) atau fleksibel. Pada awalnya, bentuk situs aktif tidak sesuai dengan bentuk substrat. Ketika substrat menempel pada situs aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan bentuk substrat, sehingga terbentuk struktur yang komplemen seperti pada Gambar 5 (Rastogi, 1995).



Gambar 5. Teori kunci gembok dan teori induksi (Armstrong, 1983).

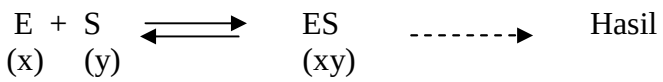
B. Kinetika Reaksi Enzim

Menurut Armstrong (1983), konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Konsentrasi substrat sangan mempengaruhinya. Untuk itu, kita perlu mempelajari mekanisme suatu enzim untuk mengetahui bagaimana tahapan terjadinya pengikatan substrat dan pelepasan produk oleh enzim.

Nilai K_M dapat diartikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah dari kecepatan maksimumnya. Nilai K_M dan V_{maks} untuk setiap enzim bervariasi dan sangat khas dengan substrat tertentu pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*,2005). Jika nilai K_M kecil, maka kompleks enzim-

substrat yang terbentuk memiliki afinitas yang tinggi. Jika nilai K_M besar, maka kompleks enzim-substrat yang terbentuk memiliki afinitas yang rendah (Armstrong, 1983).

Mekanisme Michaelis-Menten menjelaskan kekuatan reaksi-reaksi enzim sebagai berikut:

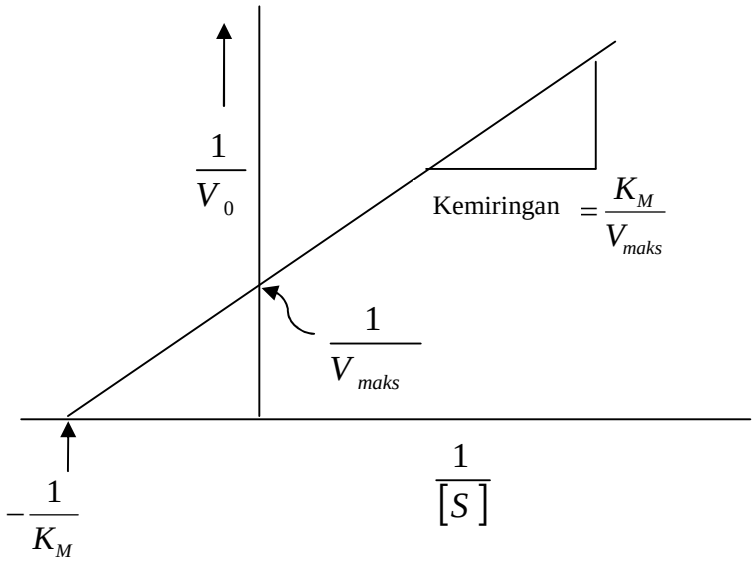


E = enzim, ES = kompleks enzim substrat, dan S = substrat, sedangkan [S] >> [E] dan [ES]. Transformasi persamaan Michaelis-Menten yang paling banyak digunakan adalah gabungan persamaan Michaelis-Menten dengan Lineweaver-Burk (Ngili, 2009). Persamaan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk beserta diagramnya dapat dilihat di bawah ini (Lehninger, 2005).

$$V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]} \longrightarrow$$ Persamaan Michaelis-Menten

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks}[S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow$$ Persamaan *Lineweaver-Burk*



Gambar 6. Diagram *Lineweaver-Burk* (Lehninger, 2005).

C. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan, penggunaan dan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa) (Wiseman 1985; Kazan *et al*., 1997), serta beberapa faktor yang mempengaruhinya, seperti pH, suhu, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al*., 2005), yang tidak sesuai dengan kondisi non-fisiologisnya.

Ada dua cara yang digunakan untuk mendapatkan stabilitas enzim yang tinggi, yaitu menggunakan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi secara alami dan melakukan peningkatan stabilitas enzim yang tidak/kurang stabil (Junita, 2002). Untuk meningkatkan stabilitas enzim dilakukan dengan penambahan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan rekayasa protein (Illanes, 1999).

1. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu tinggi kemantapan enzim rendah, tetapi aktivitasnya tinggi dan pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Daerah dengan kemantapan dan aktivitas enzim tinggi disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 1997).

Pada umumnya, pelaku industri menggunakan suhu antara 60°-125°C untuk proses pengolahan atau reaksi (Vieille *and* Zeikus, 1996). Hal ini bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan viskositas serta meningkatkan laju reaksi.

Ada dua tahap proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi, yaitu :

a. Adanya pembukaan partial (partial *unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987).

Adanya air sebagai pelumas menyebabkan konformasi molekul enzim menjadi sangat fleksibel. Jika dihilangkannya air dari molekul enzim, maka konformasi molekul enzim menjadi lebih kaku. Hal ini menunjukkan bahwa stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah (Virdianingsih, 2002).

2. Stabilitas pH enzim

pH merupakan faktor yang memegang peranan penting dalam kestabilan enzim. Karena semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Perubahan pH lingkungan dapat disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Keadaan muatan yang berubah akan mempengaruhi afinitas enzim-substrat dan laju reaksi (Ngili, 2009). Pada reaksi enzimatik yang jauh dari rentang pH optimum menyebabkan sebagian besar enzim kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel*. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.,* 1997).

D. Bacillus subtilis

Bacillus merupakan salah satu mikroba golongan bakteri. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* pada umumnya hidup di tanah, tumbuh pada kondisi mesofillik, yaitu pada kisaran temperatur 25-35°C dan pH 7-8. *Bacillus* yang hidup di tanah diantaranya adalah *B.subtilis*, *B.lincheniformis*, *B.megatarium*, *B.pumilis* dan *B.spaericus.* *Bacillus* yang hidup di lumpur dan di muara, seperti; *B.firmus* dan *B.lentus* serta yang hidup di laut, seperti; *B.marinus*, *B.cirroflagelosus*, *B.epiphytes* dan *B.filicolonicus* (Priest, 1993). *B.subtilis* merupakan bakteri yang mempunyai spora yang berbentuk batang pendek atau lonjong, beberap membentuk koloid yang berkembang menjadi lebih besar dalam daur hidup yang khas (Pelczar dan Chan, 2007). Mikroorganisme ini bersifat gram positif dan

bersifat aerob (Schlegel dan Schmidt, 1994). *B.subtilis* berukuran 1,5 x 4,5 µ, sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai bergerak dan tidak bersimpai (Gupte, 1990). Menurut Sastrodinoto (1980) dan Dwidjoseputro (2005), *B. subtilis* adalah jenis kelompok bakteri yang mampu mensekresikan antibiotik basitrasi dan subtilin dalam jumlah besar ke luar dari sel.

Klasifikasi *Bacillus* secara umum menurut Madigan (2005), sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

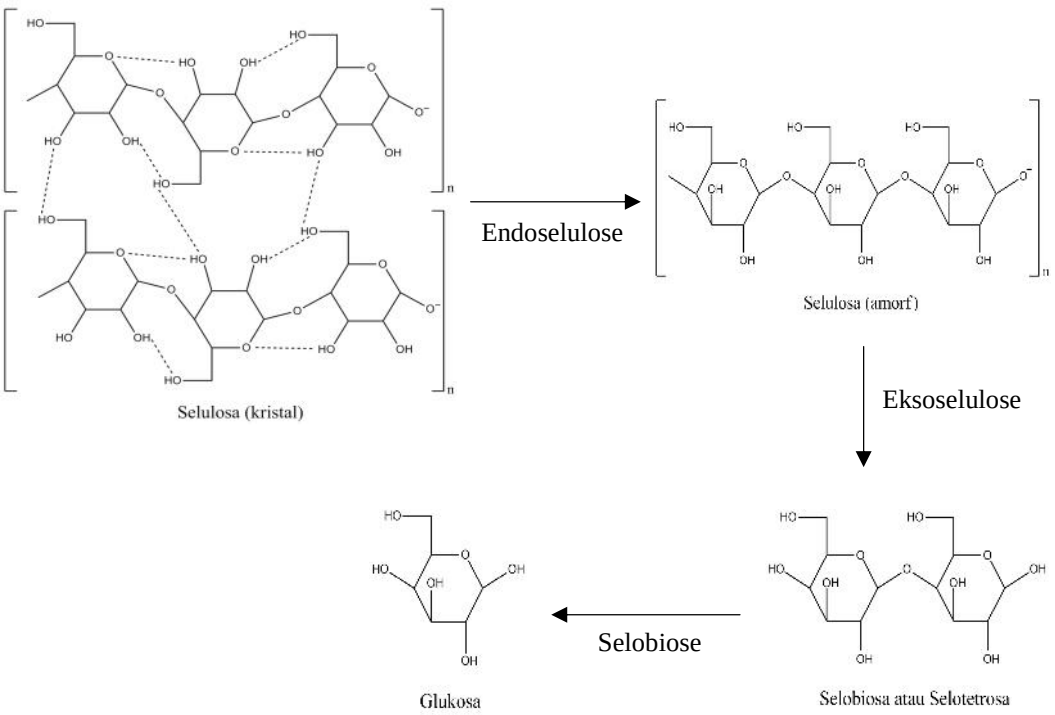
Spesies : *Bacillus subtilis*

E. Enzim Selulase

Menurut Lee *and* Koo (2001), selulase merupakan enzim induksi yang dihasilkan mikroorganisme dalam medium selulosa. Enzim ini bekerja secara bertahap untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Karena kebanyakan selulosa di alam dalam bentuk tidak murni atau bentuk kristal bersama lignin dan hemiselulosa serta tidak mudah larut dalam air, maka akan sangat sulit untuk dihidrolisis (Shiratori *et al.,* 2006).

Menurut Reese (1976), Ikram (2005) dan Belitz dkk (2008), sistem hidrolisis enzim ini berlangsung dengan adanya 3 enzim yang membantunya, yaitu:

1. Endo-1,4-β-D-glukanase, EC 3.2.1.4 (endoselulase, CMCase), mengurai selulosa dalam bentuk kristal secara acak pada ikatan β-1,4-glikosida menjadi oligodekstrin.
2. Ekso-1,4-β-D-glukanase, EC 3.2.1.91 (selobiohidrolase), mengurai selulosa pada ujung pereduksi dan non-pereduksi menjadi selobiosa.
3. β-D-glukosida glukohidrase, EC 3.2.1.21 (selobiose), mengurai selobiosa menjadi glukosa.



Gambar 7. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Ikram, 2005).

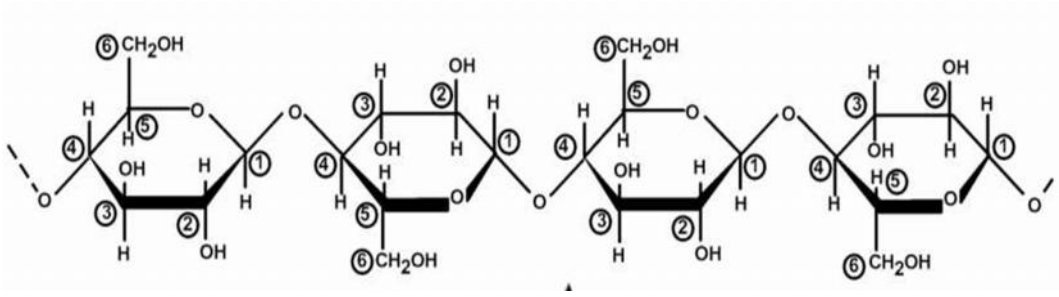
Menurut Sukumaran dkk. (2005), enzim selulase dapat dihasilkan dari berbagai mikroorganisme yang dapat dilihat pada Tabel 1. Tetapi hanya mikroorganisme tertentu yang digunakan secara komersial, seperti; *T. reesei, H. insolens, A. Niger, Thermomonospora* dan *Bacillus sp.*

Tabel 1. Mikroorganisme penghasil selulase (Sukumaran dkk., 2005).

Kelompok	Mikroorganisme	
	Genus	Spesies
Fungi	*Aspergillus*	*A. niger*
		A. nidulans
	Fusarium	*F. solani*
		F. oxysporum
	Humicola	*H. insolens*
		H. grisea
	Melanocarpus	*M. albomyces*
	Penicillium	*P. bracillianum*
		P. occitanis
		P. decumbans
	Trichoderma	*T. reesei*
		T. longibrachiatum
		T. harzianum
Bacteria	*Acidothermus*	*A. cellulolycitus*
	Bacillus	*Bacillus sp*
		Bacillus subtilis
	Clostridium	*C.acetobutylicum*
		C.thermocellum
	Pseudomonas	*P. cellulose*
	Rhodotermas	*R. Marinus*
Actinomycetes	*Cellulomonas*	*C.fimi*
		C.bioazotea
		C.uda
	Streptomyces	*S.drozdowiczii*
		S.sp
		S.lividans
	Thermomonospora	*T.fusca*
		T.curvata

F. Selulosa

Menurut Dini (2014) dan Fan *et al.* (1982), selulosa merupakan polisakarida yang tersusun dari polimer glukosa yang terikat satu sama lain oleh ikatan β-1,4-glukosida dalam rantai lurus. Rumus empiris selulosa yaitu $(C_6H_{10}O_5)n$, n adalah banyaknya glukosa yang membangun struktur selulosa berkisar 1.200-10.000 dengan panjang molekul 5.000 nm dan beratnya mencapai sekitar 400.000 (Sjostrom, 1995). Selulosa banyak terdapat di alam pada kayu, daun kering dan kapas (Koolman, 2001), karena selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tumbuh-tumbuhan tingkat tinggi dan tingkat rendah, serta ganggang dan oomiset (Schlegel *and* Schmidt, 1994). Umumnya selulosa terdiri dari 15% struktur amorf yang mudah dihidrolisis dan 85% struktur kristalin yang sulit dihidrolisis (Tsao *et al.*, 1978). Struktur kristalin yang kuat dan sangat teratur dikarenakan pembentukan ikatan hidrogen intramolekuler dan intermolekuler antar rantai dalam serat selulase (Sjostrom, 1995).



Gambar 8. Struktur selulosa (Sjostrom, 1995).

G. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Menurut Duff *and* Murray (1996), enzim selulase dihasilkan oleh mikroba selulolitik secara enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel. Enzim ini dikeluarkan dari sel, sehingga mudah untuk diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 2007).

Proses pengisolasian dan pemurnian enzim berlangsung beberapa tahapan sebagai berikut:

1. Sentrifugasi

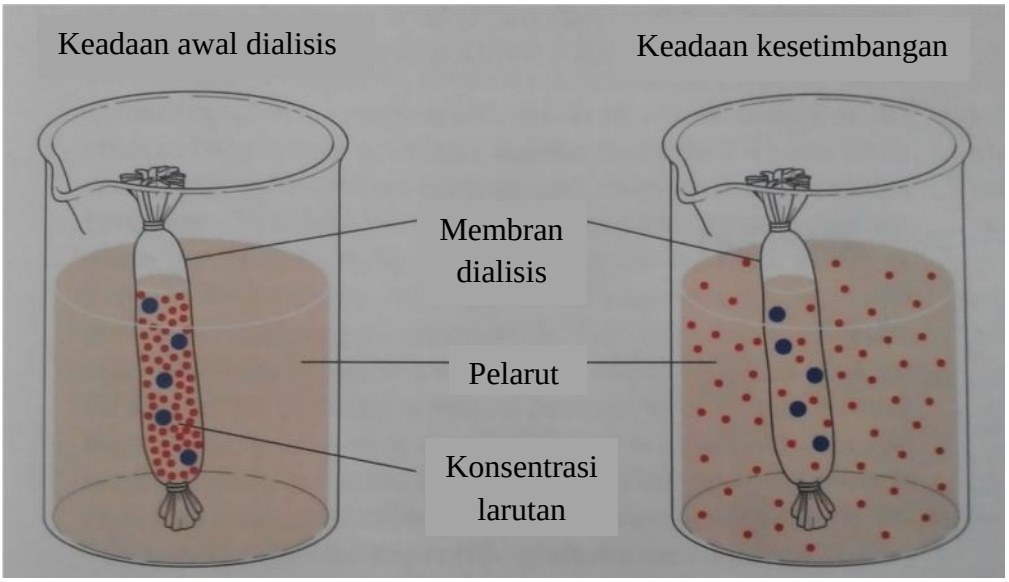
   Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim dari sisa-sisa dinding sel. Pada dasarnya molekul dengan berat molekul tinggi mengendap dibagian bawah tabung bila disentrifugasi dengan kecepatan tinggi, biasanya 5000 rpm selama 15 menit. Proses ini dapat menimbulkan panas, maka lebih baik dilakukan pada suhu 2-4°C (sentrifugasi dingin), sehingga terhindar dari denaturasi (Judoamidjojo, 1989). Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini tergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (cm) (Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat [$(NH_4)_2SO_4$]

Fraksinasi merupakan tahapan pemurnian dengan proses pengendapan secara bertahap menggunakan garam. Proses fraksinasi didasarkan pada *salting out* yaitu keadaan dengan garam berkonsentrasi tinggi yang menyebabkan kelarutan protein menurun dan membentuk endapan. Hal ini dikarenakan kehadiran garam yang lebih banyak dibandingkan protein, sehingga molekul air berpindah dari permukaan protein ke ion-ion garam. Garam yang sangat efektif dengan banyak anion seperti; sulfat, fosfat dan sitrat. Kemampuan anion mengikuti Hofmeister Series yaitu; $SCN^-<ClO_4^-<NO_3^-<Br^-<Cl^-$ <asetat<$SO_4^{2-}<PO_4^{3-}$, sedangkan kation terdiri dari monovalen yang biasa digunakan yaitu; $NH_4^+>K^+>Na^+$. Namun, hanya garam ammonium sulfat yang terbaik karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu: kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut (tidak terdenaturasi), memiliki kelarutan yang besar, memiliki daya pengendapan yang cukup besar, memiliki efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, tahan terhadap perubahan suhu (Scopes, 1982), dapat larut pada suhu rendah, memiliki densitas rendah dan biaya yang relatif murah (Price, 1996). Perlakuan penambahan ammonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, dengan pembagian fraksi: (0-20)% jenuh, (20-40)% jenuh, (60-80)% jenuh, dan (80-100)% jenuh (Judoamidjojo, 1989).

3. Dialisis

Menurut Boyer (1993) dan Pohl (1990), dialisis secara umum digunakan untuk menghilangkan garam-garam dan molekul kecil lainnya dari larutan makromolekul, selama pemisahan dan pemurnian dari pengendapan protein dengan penambahan garam ammonium sulfat. Dialisis berdasarkan pada ukuran molekul. Teknik ini melibatkan molekul kecil dan molekul besar dalam membran semipermeabel. Membran semipermeabel yang biasa digunakan terbuat dari bahan plastik bening dan selulosa, seperti kantong selofan yang berbentuk selang. Membran yang digunakan diletakkan dalam wadah yang berisi buffer dengan konsentrasi rendah. Pori-pori membran yang kecil memungkinkan molekul lebih kecil dari 10.000 Dalton berdifusi dengan bebas. Kesetimbangan akan dicapai setelah 4-6 jam, jika buffer diganti baru setelah kesetimbangan, maka konsentrasi molekul kecil akan lebih cepat berdifusi ke luar membran. Proses dialisis berlangsung selama 24 jam dengan penggantian buffer sebanyak 4-5 kali hingga konsentrasi molekul kecil di dalam dan di luar membran sama atau dapat diabaikan. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Pada suhu tinggi laju difusi meningkat, tetapi sebagian besar protein dan enzim akan terdenaturasi. Proses dialisis harus dilakukan pada suhu 4-8°C dalam ruang dingin, karena protein dan enzim stabil pada suhu tersebut. Beberapa keunggulan proses dialisis diantaranya; sederhana, murah dan sangat efektif untuk menghilangkan semua molekul kecil, ion-ion atau non-ion.



Gambar 9. Dialisis (Voet *and* Voet, 2004).

H. Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels

Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels berdasarkan pada pembentukan glukosa sebagai produk, dimana karboksimetilselulase (CMC) sebagai substrat. Karena berdasarkan pembentukan produk, maka absorbansi sampel semakin meningkat dengan banyaknya glukosa yang terbentuk dan akan memberikan intensitas warna yang semakin gelap (Mandels *et al.,* 1976).

I. Penentuan kadar protein dengan metode *Lowry*

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian dengan aktivitas yang tetap baik. Penentuan kadar protein dilakukan dengan Metode *Lowry* prinsipnya sama dengan Metode *Biuret*. Pada Metode *Biuret* dua atau lebih ikatan peptida bereaksi dengan

tembaga sulfat dalam lingkungan alkalin membentuk ikatan kompleks berwarna ungu. Dengan Metode *Lowry*, tahapan Metode *Biuret* mendapatkan tambahan tahap kedua, dimana Cu^{2+} tereduksi menjadi Cu^{+} yang bereaksi dengan pereaksi *folin-ciocalteu* (fosfomolibdat-fosfotungstat) dan mengikat protein sekitar pH 10 (Boyer, 1993). Reduksi pereaksi *folin-ciocalteu* dilakukan oleh residu tirosin dan triftofan dalam protein. Sehingga komplek fosfomolibdat-fosfotungstat menghasilkan *tungesteen blue* atau heteropolymolybdenum dari warna kuning menjadi biru, karena oksidasi gugus aromatik terkatalis Cu. Intensitas warna biru (muda atau tua) yang terbentuk tergantung pada komposisi tirosin dan triftofan dalam protein (Alexander *and* Griffith, 1993).

Menurut Lowry *et al.* (1951) dan Boyer (1993), Metode ini relatif sederhana, dapat diandalkan dan biayanya relatif murah serta sangat sensitif mendeteksi protein yang sangat rendah sekitar 5µg. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi.

J. Modifikasi Kimia

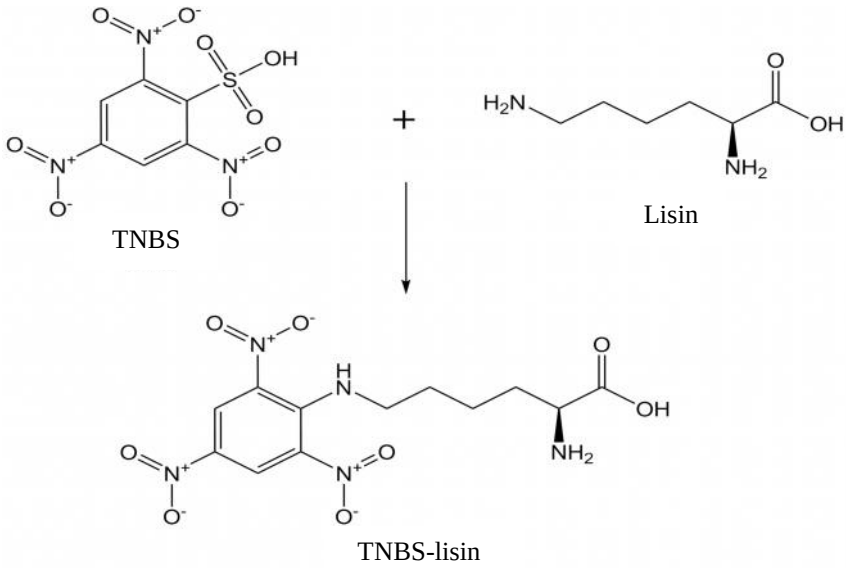
Menurut Mozhaev dan Martinek (1984), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu: amobilisasi, modifikasi kimia, dan mutagenesis terarah. Modifikasi kimia merupakan salah satu metode untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air (Janecek, 1993) dan memiliki keuntungan dibandingkan dengan amobilisasi, yaitu: interaksi enzim dengan

substrat tidak terhalangi matriks, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan (Nubarov *et al*., 1987). Menurut Price (1996), berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang paling mungkin bereaksi dengan zat pemodifikasi terletak pada permukaan, yang merupakan grup tiol seperti, sistein dan lisin karena gugus ini paling banyak membentuk folding dan paling banyak bereaksi dengan zat pemodifikasi.

Menurut Mozhaev *et al*. (1990), modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut: (1) Modifikasi dengan menggunakan pereaksi bifungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus-gugus fungsi pada permukaan protein), (2) Modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi non polar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) Penambahan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambah ikatan ionik atau hidrogen) dan (4) Hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukainya)

Hidrofilisasi dapat dilakukan dengan dua cara modifikasi langsung yaitu: (1) asam amino hidrofobik yang membentuk tapak-tapak hidrofobik pada permukaan enzim menggunakan pereaksi hidrofilik, (2) asam amino yang berada dekat dengan tapak hidrofobik dapat terlindungi dari lingkungan berair menggunakan pereaksi hidrofilisasi (Nubarov *et al.* 1987).

Menurut Price (1996), residu lisin dapat dimodifikasi dengan beberapa reagen yang ada pada Tabel 2. Asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS) merupakan reagen untuk menguji asam amino bebas pada protein yang tidak termodifikasi. Reaksi TNBS dengan lisin dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

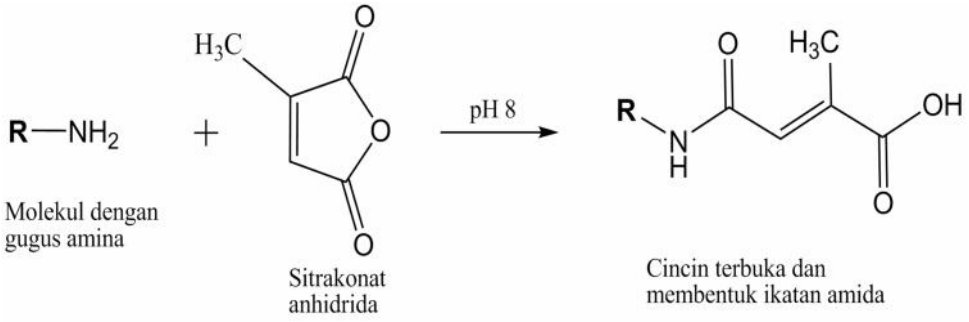


Gambar 10. Reaksi TNBS dan lisin.

Tabel 2. Pereaksi modifikasi lisin dalam protein (Price, 1996).

Pereaksi	Modifikasi asam amino
2,4-Dinitrofluorobenzena	Kelompok α-amino, histidin, sistein
Asetat anhidrida	Kelompok α-amino, tirosin
Metil asetil fosfat	Kelompok α-amino
Sitrakonat anhidrida	Kelompok α-amino, tirosin
Sianat	Kelompok α-amino, sistein
Imidoester	-
Piridoksal-5-fosfat	-
Reduksi alkil	-
Asam-2,4,6-trinitrobenzenasulfonat	Kelompok α-amino

Sitrakonat anhidrida merupakan salah satu reagen spesifik yang digunakan untuk memblok gugus amino pada residu lisin yang menghasilkan dua produk ikatan peptida dari kedua gugus karbonil pada struktur molekulnya. Reaksi modifikasi diawali dengan pembukaan cincin sitrakonat anhidrida pada suasana basa pH 8 dan gugus karbonil dari sitrakonat anhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin (Habibi *et al*., 2004).



Gambar 11. Modifikasi gugus amina pada residu lisin dalam protein dengan sitrakonat anhidrida.

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 - Maret 2016 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spritus, termometer, spatula, lemari pendingin Sanyo SF-C18K, mikropipet Eppendorff, *autoclave* model S-90N, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, neraca analitik Ainsworth AA-160, LABOR-50M WIFUG-Lab *centrifuge*, *shaker waterbath incubator* GFL1092, pH meter Metrohm Mobile 826, *waterbath* Haake W19, *waterbath* MEMMERT W350, penangas Precisterm JP' Selecta, *magnetic stirrer* STUART (*stir* CB161 dan *heat-stir* CB162), dan spektrofotometer UV-VIS Carry Win UV 32.

Adapun bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah NA *(Nutrient Agar)*, pepton, *yeast extract*, CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), urea,

ammonium sulfat, kalium dihidrogen fosfat, kalsium klorida 2-hidrat, magnesium sulfat 7-hidrat, akuades, alkohol, TNBS (asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat), DNS (*dinitrosalisilic acid*), BSA (*Bovine Serum Albumin)*, Glukosa, fenol, natrium sulfit, natrium karbonat, natrium hidroksida, tembaga sulfat 5-hidrat, reagen *follin ciocalteau*, natrium/kalium-tartrat, natrium dihidrogen fosfat hidrat, dinatrium hidrogen fosfat 2-hidrat, asam borat, $Na_2B_4O_7.10H_2O$, kantong selofan, kertas saring, dan sitrakonat anhidrat.

Penelitian ini menggunakan bakteri *B. subtilis* ITBCCB148 sebagai mikroorganisme penghasil enzim selulase yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari 0,5% pepton; 0,5% *yeast extract*; 0,5% CMC; 0,3% urea; 0,14% $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% KH_2PO_4; 0,02% $MgSO_4.7H_2O$; dan 0,1% $CaCl.2H_2O$ dilarutkan dalam buffer 0,1 M pH 6,0. Kemudian disterilkan dalam *autoclave* padu suhu 121^oC dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2. Produksi enzim selulase

Sebanyak 3 ose *B. subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis, lalu dikocok dalam *shaker waterbath incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 40°C selama 24 jam. Selanjutnya media inokulum dipindahkan ke dalam media fermentasi (2% dari volume media fermentasi) dan dikocok dalam *shaker waterbath incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 40°C selama 72 jam.

3. Isolasi enzim selulase

Media fermentasi yang berisi *B. subtilis* ITBCCB148, yang telah dikocok dalam *shaker waterbath incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 40°C selama 72 jam. Kemudian dilakukan pemisahan enzim dari komponen sel lainnya dengan sentrifugasi pada 5000 rpm suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas selulase dengan metode *Mandels* dan pengukuran kadar protein dengan metode *Lowry*.

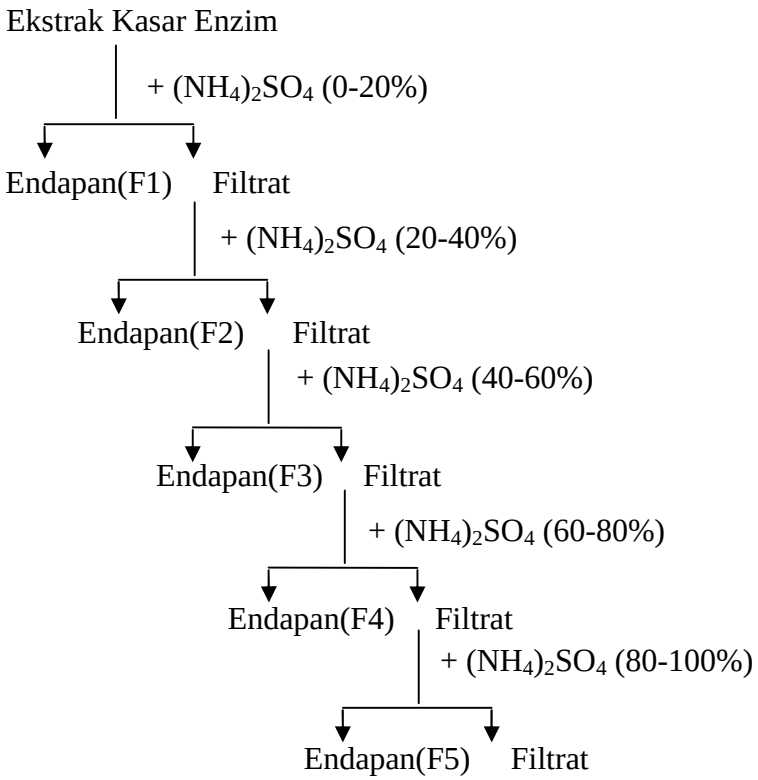
4. Pemurnian enzim selulase

Pada penelitiann ini, proses pemurnian enzim selulase dilakukan dengan 2 tahapan yaitu : fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis.

a. Fraksinasi menggunakan ammonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai

derajat kejenuhan yaitu (0-20)%; (20-40)%; (40-60)%; (60-80)%; dan (80-100)%. Proses ini bertujuan untuk mengetahui pada fraksi mana enzim selulase terendapkan dengan aktivitas tertinggi. Skema proses fraksinasi enzim dengan penambahan garam ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim selulase yang diperoleh ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirer* pada suhu 4°C. Setelah semua garam larut, dilakukan pemisahan filtrat dan endapan menggunakan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama ± 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji

aktivitasnya dengan metode *Mandels* serta diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry*. Filtrat yang diperoleh dari fraksi (0-20)% akan digunakan kembali untuk diendapkan dengan fraksi kejenuhan (20-40)% dan selanjutnya.

b. Dialisis

Endapan enzim selulase yang telah dilarutkan dengan aktivitas tertinggi pada proses fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0 selama $\pm$ 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama proses dialisis, dilakukan penggantian buffer fosfat setiap 6 jam sekali dengan tujuan agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini berlangsung secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengatahui ada tidaknya ion-ion garam dalam kantong selofan dapat dilakukan dengan menambahkan larutan $Ba(OH)_2$ atau $BaCl_2$. Bila masih ada ion sulfat dalam kantong selofan, maka akan terbentuk endapan putih $BaSO_4$. Semakin banyak ion sulfat, semakin banyak endapan yang terbentuk. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim dengan metode *Mandels* dan kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

5. Penentuan Aktivitas Selulase dan Kadar Protein

a. Penentuan aktivitas selulase

1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas selulase metode *Mandels*

   1% DNS (*dinitrosalisilic acid*); 1% NaOH; 0,2% fenol; 0,05% Na_2SO_3; dan 40% Na/K-tartarat dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan akuades hingga batas miniskus (Mandels *et al*., 1976). Larutan standar glukosa dengan kadar 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; dan 1,4 mg/mL.

2. Uji aktivitas selulase metode *Mandels*

   Metode *Mandels* berdasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al*., 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan CMC 0,5 % dicampur, lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Setelah dingin, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

b. Penentuan kadar protein

1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein metode *Lowry*

   Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N.

   Pereaksi B : 5 mL larutan $CuSO_4.5H_2O$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K-tartrat 1%.

   Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.

   Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1.

   Larutan standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

2. Uji kadar protein metode *Lowry* (1951)

   Sebanyak 0,1 mL enzim ditambah 0,9 mL akuades dan 5 mL pereaksi C, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu, ditambah 0,5 mL pereaksi D dan dihomogenkan, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Pada kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades dan semua perlakuannya sama seperti sampel. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim menggunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

6. Modifikasi Kimia

Secara spesifik residu lisin pada suatu enzim dapat dimodifikasi menggunakan reagen sitrakonat anhidrida (Dixon and Perham, 1968). Sebanyak 10 mL enzim hasil pemurnian dalam 10 ml larutan buffer borat pH 8 ditambahkan 30 µL reagen sitrakonat anhidrida secara bertahap. Setiap penambahan reagen, pH larutan dijaga konstan pada pH 8 dengan menambahkan larutan NaOH 2 M lalu diaduk menggunakan *magnetic stirer* selama 60 menit. Penambahan reagen sitrakonat anhidrida dilakukan dengan variasi volume sebagai berikut : 10 µL, 20 µL,30 µL, 40 µL, dan 50 µL yang dilakukan dengan prosedur sama (Khajeh *et al.*, 2001).

7. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian Dan Hasil Modifikasi

a. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi digunakan buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH, yaitu 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; dan 9,0. Suhunya dijaga tetap pada 50°C. Kemudian uji aktivitas enzim dengan metode *Mandels.*

b. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi digunakan variasi suhu yaitu 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; dan 80°C dengan pH optimum yang telah ditentukan. Selanjutnya uji aktivitas enzim dengan metode *Mandels.*

c. Penentuan nilai K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi ditentukan dari persamaan *Lineweaver-burk.* Kurva *Lineweaver-burk* dibuat dengan menguji aktivitas enzim selulase menggunakan metode *Mandels* dengan variasi konsentrasi substrat 0,5; 0,75; 1,0; dan 1,25% dalam buffer fosfat pH dan suhu optimum selama 60 menit.

d. Penentuan stabilitas termal dan stabilitas pH enzim (Yang *et al.*, 1996)

Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi ditentukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50; dan 60 menit pada pH dan suhu optimumnya. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100% (Virdianingsih, 2002).

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \text{ x } 100\%$$

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

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1:

$$1n\,(E_i/E_0) = -k_i\,t \qquad (1)$$

Persamaan penentuan nilai perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i):

$$\Delta Gi = -RT\ 1n(k_i\,h/k_B\,T) \qquad (2)$$

Keterangan :
R = konstanta gas (8,315 J K^{-1} mol^{-1})
T = suhu absolut (K)
k_i = konstanta laju inaktivasi termal
h = konstanta Planck (6,63 x 10^{-34} J det)
$k_{B=}$ konstanta Boltzman (1,381 x 10^{-23} JK^{-1})

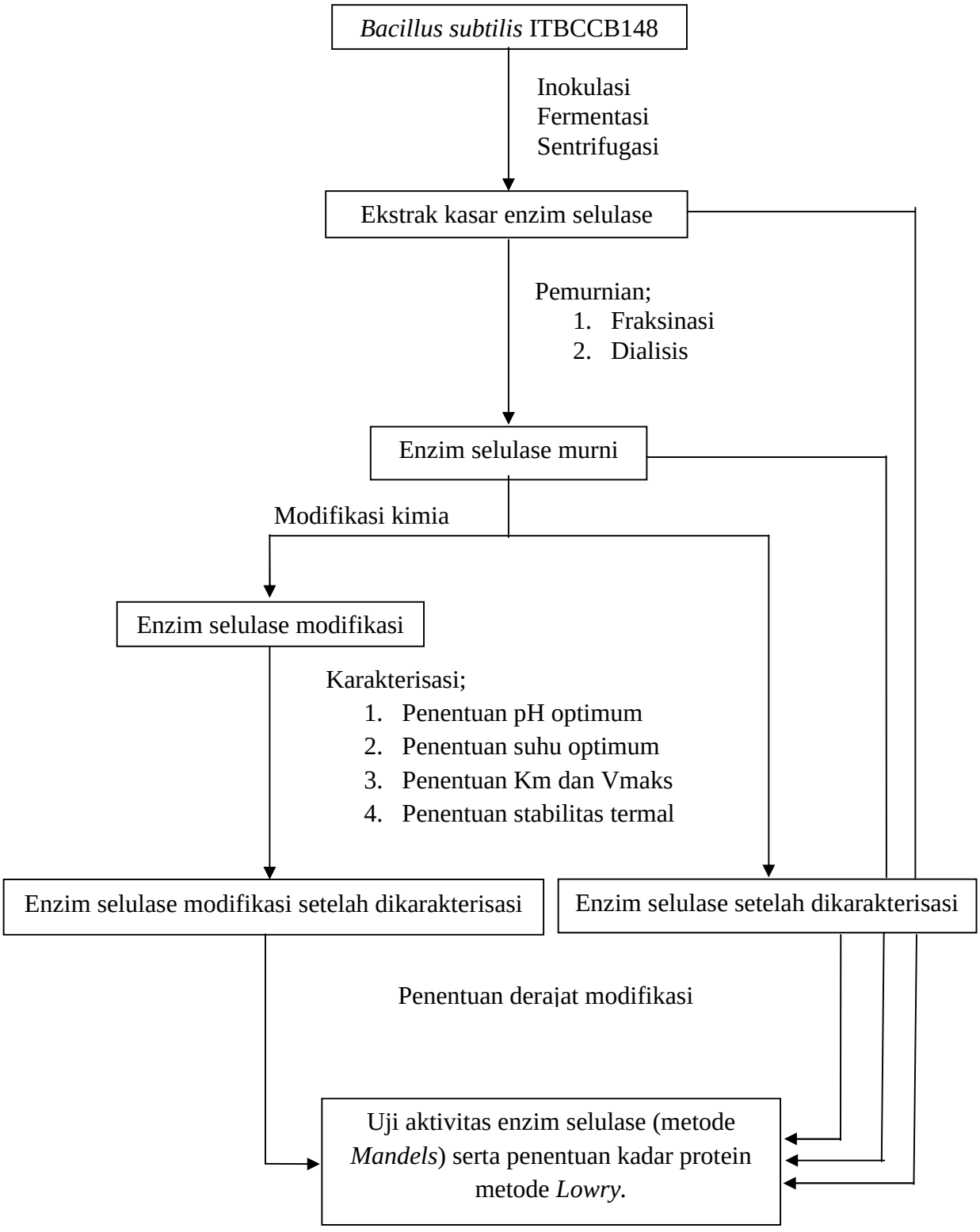
8. Penentuan derajat modifikasi (Snyder *and* Sobocinski, 1975)

Derajat modifikasi enzim merupakan perbandingan antara residu lisin pada enzim hasil pemurnian terhadap residu lisin pada enzim hasil modifikasi. Penentuan derajat modifikasi dapat dilakukan sebagai berikut : untuk sampel, sebanyak 0,1 mL enzim hasil modifikasi dilarutkan dalam 0,9 mL bufer borat (pH 9,0). Kemudian ditambahkan 25 µL 0,03 M asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS). Campuran dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Sebagai Standar digunakan enzim hasil pemurnian (sebelum dimodifikasi), cara kerjanya sama dengan sampel. Blanko terdiri dari 1 mL buffer borat pH 9,0 dan 25 µL TNBS 0,03 M. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 420 nm. Derajat modifikasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Derajat modifikasi} = \frac{\text{Jumlah residu lisin yang termodifikasi}}{\text{Jumlah residu lisin awal}} \times 100\%$$

$$= \frac{(A_{St} - A_{B1}) - (A_{Sp} - A_{B1})}{(A_{St} - A_{B1})} \times 100\%$$

Keterangan :
A_{St} = absorbansi larutan standar
A_{B1}= absorbansi larutan blanko
$A_{Sp=}$ absorbansi larutan sampel



Gambar 13. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Ada beberapa kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian, sebagai berikut :

1. Ekstrak kasar enzim selulase memiliki aktivitas spesifik sebesar 4,263 U/mg dan aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian meningkat 8,4 kali menjadi sebesar 35,823 U/mg.

2. Enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi (59, 66, 74, 81, dan 86%) memiliki pH optimum 6,0.

3. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 40°C dan enzim selulase hasil modifikasi (59, 66, 74, 81, dan 86%) memiliki suhu optimum 50°C.

4. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki K_m = 101,583 mg/mL dan V_{maks} = 416,667 µmol/mL.menit, sedangkan enzim selulase hasil modifikasi (59, 66, 74, 81, dan 86%) memiliki K_m secara berurutan 54,349; 64,889; 114,136; 126,750; dan 65,114 mg/mL, serta V_{maks} secara berurutan 232,558; 277,778; 454,545; 500,000; dan 285,714 µmol/mL.menit.

5. Uji stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian pada suhu 50°C selama 60 menit memiliki nilai k_i = 0,033 menit^{-1}, $t_{1/2}$ = 21 menit, dan ΔG_i = 96,324 kJ mol^{-1}, sedangkan uji stabilitas termal enzim selulase hasil modifikasi (59, 66, 74, 81, dan 86%) pada suhu 50°C selama 60 menit memiliki nilai k_i secara berurutan 0,021; 0,020; 0,018; 0,016; dan 0,015 menit^{-1}, $t_{1/2}$ secara berurutan 33,000; 34,650; 38,500; 43,312; dan 46,200 menit, ΔG_i secara berurutan 101,342; 101,474; 101,758; 102,074; dan 102,401 kJ mol^{-1}.

6. Modifikasi kimia enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan sitrakonat anhidrida lebih stabil terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian dan dapat meningkatkan stabilitas enzim terhadap suhu serta meningkatkan stabilitas termal enzim. Namun, enzim selulase yang diperoleh belum dapat digunakan dalam proses industri yang membutuhkan lingkungan ekstrim.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan mencari alternatif lain dalam proses pemurnian enzim, sehingga tidak menggangu aktivitas enzim. Selain itu, harus memastikan pH campuran sitrakonat anhidrida dan enzim tepat 8, karena sitrakonat anhidrida bersifat *reversible* yang akan terurai pada pH 3-5.

DAFTAR PUSTAKA

Aehle, W. 2004. *Enzyme in Industry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Germany. 175, 219, 232.

Ahern, T. J. and A. M. Klibanov. 1987. Why do Enzyme Irreversibly Inactive at High Temperature. *Biotec. 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Tecnology*. Gustav fischer. Stuttgart. New York. P. 131-136.

Alexander, R. R. and J. M. Griffith. 1993. *Basic Biochemical Methods*, 2nd ed. Wiley-Liss, Inc. New York. 28-29.

Armstrong, F. B. 1983. *Biochemistry, Second Edition*. Oxford University Press. 135-139, 142-143.

Belitz H. D., Grosch, W., dan Schieberle, P. 2008. Food Chemistry, 4th ed. *Springer-Verlag*. Berlin. 327-337.

Bequin, P. and Aubert, J. P. 1994. The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. **13** : 25-58.

Bhat M. K. 2000. Cellulase and Related Enzymes in Biotechnology. *Elsevier Biotechnology advances*. **18** : 355-383. United Kingdom.

Boyer, R. F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry* Benjamin Cumming Publising Company. Redwood City, California. 41-43, 48-49.

Cao, N., Y. Xia, C. S. Gang, and G. T. Tsao. 1997. Production of 2,3-butanediol from Pretreated Corn Cob by *Klebsiella oxytoca* in the Presence of Fungal Cellulase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65.

Chaplin, M. F. and Bucke. 1990. *Enzym Tecnology*. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain. 264p.

Coughlan, M. 1985. Cellulase: Production Properties and Applications. *Biochem. Soc. Trans*. **13** : 405-406.

Dini, I. R. dan I. Munifah. 2014. Produksi dan Karakterisasi Enzim Selulase Ekstrak Kasar dari Bakteri yang Diisolasi dari Limbah Rumput Laut. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. **6** (3).

Dixon, H. B. F. and R. N. Perham. 1968. Reversible Blocking of Amino Groups with Citraconic Anhydride. *Biochem. J.* **109** : 312-314.

Duff, S. J. B. and W. D. Murray. 1996. Bioconvertion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technology*. **55** : 1-33.

Dryer, R. L. 1993. *Biokimia*. Jilid 1. UGM Press. Yogyakarta. 180-181.

Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.

Eijnsink, G. H., G. Sirgit, B. Torben, and V. D B. Bertus. 2005. Directed Evolution of Enzym Stability. *Biomolecular Engineering*. Elsevier Science Inc. New York. **23** : 21-30.

Fan, L., Y. Lee and M. M. Gharpuray. 1982. The Nature of Lignocellulosics and their Pretreatment for Enzymztic Hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*. **23** : 158-187.

Fitriyanti. 2014 . Peningkatan Kestabilitas Enzim selulase dari Bacillus subtilis ITBCCB148 Dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG). (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

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.

Goddette, D. W., T. Christianson, B. F. Ladin, M. Lau, J. R. Mielenz, C. Paech, R. B. Reynolds, S. S. Yang, and C. R. Wilson. 1993. Srategy and Implementation of A System for Protein Engineering. *J. Biotechnol*. **28** : 41-54.

Gunam, I. B. W., Hardiman, and T. Utami. 2004. Chemical Pretreatments on Bagasse to Enhance Hydrolysis of its Cellulose Enzymatically. *The 3th Hokkaido Indonesian Student Association Scientific meeting (HISAS 3)*. Sapporo. 107-112.

Gupte, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Alih bahasa oleh Dr. Julius E. S. Binarupa Aksara. Jakarta. 246.

Habibi, A. E., K. Khajeh, and M. Nemat-Gorgani. 2004. Chemical Modification of Lysine Residue in *Bacillus lincheniformis* α-amylase : Conversion of an Endo to Exo Type Enzyme. *Journal Of Biochemistry and Molecular Biology*. **37** (1) : 642-647.

Heftamann, E. 1983. Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatograpic and Electrophoretic Methods. *Elsevier Scientific Publishing Company*. New York. B56-B57.

Illanes, A. 1999. Stability of biocatalysts. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Universitas Catolica de Valparaiso. Chile. **2** (1).

Ikram, U., M. M. Javed, T. S. Khan, and Z. Siddiq. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-Culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. J. Agric & Biol. Sci*. **1** (3) : 241-245.

Janecek, S. 1993. Strategies for Obtaining Stabel Enzymes. *Process Biochem*. **28** (4) : 35-445.

Judoamidjojo, M. 1989. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta. 128-132.

Junita. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus stearothermophillus Dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Kamelia, R., M. Sudumarta, dan D. Natalia 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termostabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase Agains Thermal Inactivation by Cross-Linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *Applied. Microbiol Biotechnol*. **48** : 191-197.

Khajeh, K., H. Naderi-Manesh, B. Ranjbar, A. A. Moosavi-Movahedi, and M. Nemat-Gorgani. 2001. Chemical Modification of Lysine Residues in *Bacillus Alpha-Amylases*: Effect on Activity and Stability. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 543-549.

Kuchel, P. W. dan Gregory B. R. 2002. *Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 55-56.

Koolman, J. 2001. *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia*. Penerbit Hipokrates. Jakarta.

Lee, S. M. and Y. Koo. 2001. Pilot Scale Production of Cellulose Using Trichoderma reesei Rut C-30 in fed-batch mode. *Journal of Microbiology and. Biotechnology*. **11** : 229-233.

Lehninger, A. L. 2005. *Principles of Biochemistry: Fourth Edition.* W. H. Freeman and Company. New York. 89-91.

Lin, Y. and S. Tanaka. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Appl. Microbial. Biotechnol*. **69** : 627-642.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275.

Luo, J., L. M. Xia, J. P. Lin, and P. L.Cen, 1997. Kinetics of Simultane ous Saccharification and Lactic Acid Fermentation Processes. *Biotechnol. Progr.* **13** : 762-767.

Madigan, M. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall.

Mandels, M., A. Raymond, and R. Charles. 1976. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotech. & Bioeng*. Symp., No. 6. John Wiley & Sons Inc.

Mara, A. 1999. *Penentuan Kondisi Optimum dan Pengaruh Ion Logam Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, dan Ca^{2+} pada Glukosa Isomerase yang telah Diambil dengan DEAE Selulosa untuk Produksi Sirup Fruktosa dari Singkong (Manihot utilisima)*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Montgomery, R. 1993. *Biokimia Berorientasi Kasus.* UGM Press. Yogyakarta. 198-199, 200.

Mozhaev, V. V. and K. Martinek. 1984. Structur-Stability Relationship in Protein: New Approaches to Stabilizing Enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. 50-59.

Mozhaev, V. V., N. S. Melik-Nubarov, V. A. Siksnis, and K. Martinek. 1990. Strategy for Stabilizing Enzymes. Part Two: Increasing Enzyme Stability by Selective Chemical Modication. *Biocatalysts*. **173** : 189-196.

Murashima, K., T. Nishimura, Y. Nakamura, J. Koga, T. Moriya, N. Sumida, T. Yaguchi, and T. Kono. 2002. Purification and Characterization of New endo-1,4-β-glucanses from *Rhizopus orizae*. *Enzyme Microb. Technol*. **30** : 319-326.

Nakari, S. T. and M. Pentilla. 1995. Production Containing Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3650-3655.

Ngili, Y. S. 2009. *Biokimia Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Graha Ilmu. Yogyakarta. 264-265, 282-283, 294-295.

Nubarov, N. S., V. V. Mozheav, V. A. Siksnis, and K. Martinek. 1987. Enzyme stabilization of α-chymotrypsin by reductive alkylation with glyoxylic acid. *Biotechnol. Lett*. **9** : 725-730.

Onsori, H., M. R. Zamani, M. Motallebi, dan N. Zarghami. 2005. Identification of over producer strain of endo-*β*-1,4-glucanase in *aspergillus* species :

characterization of crude *carboxymethyl cellulase*. *African Journal of Biotechnology*. **4** (1) : 26-30.

Orten, J. M. and Neuhaus, O. W. 1970. *Biochemistry*. C. V. Mosby Company. Saint Louis.

Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia.* Erlangga. Jakarta. 82-89, 112.

Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta. 180, 318, 330-331.

Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 143, 162-163.

Pohl, T. 1990. Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, *Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York. 182.

Price, N. C. 1996. *Protein LABFAX*. Academic Press. UK. 31, 43-48, 291.

Priest, F. G. 1993. *Biotecnology*. VCH Verlag sgesel shaft mbH. New York.

Rastogi, S. C. 1995. *Biochemistry*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi. 90, 132-133, 140.

Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York. 212

Reese, E. T. 1976. History of The Cellulase Program at The U.S. Army Natick Development Center. *Biotech and Bioeng. Symp. No. 6.* John Wiley and Sons Inc.

Robson, L. M. and G. H. Chambliss. 1984. Characterization of The Cellulolytic Activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. **47** (5) : 1039-1046.

Saito, K., Y. Kawammura, and Y. Oda. 2003. Role of Pectinolytic Enzyme in The Lactid Acid Fermentation of Potato Pulp by *Rhizopus orizae. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30** : 440-444.

Sariningsih, R. 2000. *Produksi Enzim Protease Oleh Bacillus subtilis BAC-4*. (Skripsi). Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Sastrodinoto, S. 1980. *Biokimia Umum I*. PT. Gramedia. Jakarta.

Schelege, H. G. dan K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM. Yogyakarta. 96-97.

Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York. 76-85.

Shiratori, H., H. Ikeno, S. Ayame, N. Kataoka, A. Miya, K. Hosono, T. Beppu, and K. Ueda. 2006. Isolation and Characteristaion of New *Clostridium sp.* That Perform Effective Cellulosic Waste Digestion in A Thermophilic Methanogenic Bioreactor. *Applied Environmental Microbiology*. **72** (5) : 3702-3709.

Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu*. UGM Press. Yogyakarta. 68-69.

Sukumaran R. K., R. R. Singhania, G. M. Mathew, dan A. Pandey. 2009. Cellulase Production Using Biomass Feed Stock and Its Application in Lignocellulose Saccharification for Bio-Ethanol Productio. *Renew Energy*. **34** (2) : 421–424.

Smith, J. E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. Diterjemahkan oleh U.F. Sumo, B. Sumantri, dan Subono. Penerbit Gramedia. Jakarta.

Sonia, N. M. O. dan J. Kusnadi. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger Desert. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3** (4) :11-19.

Stahl, S. 1999. Thermophilic Microorganism: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistence of Enzyme in *Thermostabilyty of Enzyme*. Gupta M. N editor. *Springer Verlag*. New Delhi. 59-60.

Sutisna, R. R. 2014. *Peningkatan Stabilitas Enzim Selulase dari Bacillus subtilis* ITBCCB148 *dengan Modifikasi Kimia menggunakan Asam Glioksilat.* (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Snyder, S. L. and P. Z. Sobocinski. 1975. An Improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Method for The Determination of Amines. *Anal, Biochem.* **64** (1) : 284-288.

Tsao, G. T., M. Ladisch, C. Ladisch, T. A. Hsu, B. Dale and T. Chou. 1978. Fermentation Substrates from Cellulosic Material. *Annual Report on Fermentation Process*. **2**.

Vieille, C. and J. G. Zeikus. 1996. Thermozymes: Identifying Molecular Determinant of Protein Structural and Functional Stability, *Tibtech*. **14** (6) : 183-189.

Virdianingsih, R. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus pumilus y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. (Skripsi). Institute Pertanian Bogor. Bogor.

Voet, D. and Voet, J. G. 2004. *Biochemistry 3rd Edition*. Wiley JOHN WILEY & SONS, INC. 139.

Wagen, E. S. 1984. Strategies for Increasing The Stability of Enzymes, in Enzyme Engineering. *The New York Academy of Sciences, New York*. **7**: 1-19.

Wilda, L. S., S. Syukur, and Jamsari. 2013. Optimization of Protease Activity from Lactic Acid Bakteria (Lab) *pediococcus pentosaceus* Isolated from Saursop Fermentasi (Annona muriatal). *Jurnal Kimia Unand*. **2** (1) : 2303-3401.

Wirahadikusumah, M. 1997. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung. 61-62.

Wiseman, A. 1985. *Hand Book of Enzyme Biotechnology*. Ellis Harwood Limited.

Yandri, D. Herasari, T. Suhartati, and S. Hadi. 2009. The Effect of Chemical Modification on The Thermal Stability of Protease from Local Isolate Bacteria, *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Nature and Scien*ce. **7** (2).

Yandri, T. Suhartati, and S. Hadi. 2010b. Purification and Characterization of Extracellular α-amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *EJSR*. **39** : 64-74.

Yandri, N. Anggraini, T. Suhartati, and S. Hadi. 2011. Chemical Modification of Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 With Glyoxylic Acid. *Oriental Journal of Chemistry*. **27** (3) : 985-990.

Yandri, E. S. Sundari, T. Suhartati, and S. Hadi. 2012. The Chemical Modification of α-amylase from Local Bacteria of *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Using Citraconic Anhydrida. *Oriental Journal of Chemistry*. **28** (4) : 1613-1618.

Yang, Z., M. Domach, R. Auger, F. X. Yang and A. J. Russell. 1996. Polyethylene Glycol-Induced Stabilization of Subtilisin. *Enzyme Microbiology and Technology*. **18** : 82-89.

Yin L., H. Lin, and Z. Xiao. 2010. Purification and Characterization of A Cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. Journal of Marine Science and Technology. **18** (3) : 466-471.