



**ISOLASI DAN OPTIMASI PURIFIKASI PARSIAL  
ENZIM ENDO- $\beta$ -1,4—D-XILANASE DARI BAKTERI  
SISTEM ABDOMEN RAYAP**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains  
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

Asal:	Halaman Pembelian	Klasa
Terima Tgl : 08. NOV. 2007		S76.1
Oleh : duk :		SAP
KLA. / PENYALIN :	SRS	2

**Joko Saptana**  
NIM. 031810301051

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

2007



**ISOLASI DAN OPTIMASI PURIFIKASI PARSIAL  
ENZIM *ENDO- $\beta$ -1,4-D-XILANASE* DARI BAKTERI  
SISTEM ABDOMEN RAYAP**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains  
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

**Oleh :**

**Joko Saptana  
031810301051**

**DPU : Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si  
DPA : drh.Wuryanti Handayani, M.Si**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2007**

## MOTTO

“Suatu ilmu tidak dipelajari kecuali karena tiga hal,  
dan tidak pula ditinggalkan karena tiga hal.

*Pertama*, tidak dipelajari karena ingin pandai berdebat.

*Kedua*, tidak pula untuk berbangga diri dan tidak juga untuk dilihat orang lain. *Ketiga*, tidak ditinggalkan karena malu menuntutnya, tidak juga karena berlaku zuhud, dan tidak pula karena ridha atas kebodohan.”

(Umar bin Khattab)

Jangan menjadi pohon yang menancap jika bisa jadi air  
yang mengalir dan jangan jadi air jika bisa menjadi batu  
kayang yang memecah arus

(Anonymous)

Barang siapa yang menempuh suatu jalan untuk mencari ilmu  
pengetahuan, pasti Allah akan memudahkan jalannya kesurga  
(HR. Imam Muslim dan Abu Hurairah)

berkatalah jujur sekalipun perkataan itu sangat  
menyakitkan hati, sesungguhnya ini kunci keberhasilan  
untuk hidup

(reni)



## PERSEMBAHAN

### *Bismillaahirrahmaanirrahiim*

Segala puji bagi Allah SWT. yang telah memberikan rahmat, nikmat, dan karunia berupa kesehatan, kekuatan dan kesempatan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

- ☞ Kedua orang tua tercinta, yang secara tulus membimbing dengan sabar dan penuh kasih sayang yang tak pernah henti.
- ☞ Kakak dan mbak yang selalau memberikan pertimbangan dikala aku kesusahan, terutama pada mas rin yang telah membimbingku sampai sekarang.
- ☞ Tak lupa karya ini kupersembahkan pada anak malang yang selalu mendampingi baik suka maupun duka (reni).
- ☞ Keluarga besar kost Jl. Kalimantan I/062.
- ☞ Keluarga besar xilanase 2003 UNEJ
- ☞ Temen-temen 03 yang telah bersamaku berjuang dibangku kuliah selama 4 tahun, kenangan yang tak bisa kulupakan bersama kalian.
- ☞ Guru-guruku yang terhormat mulai dari TK sampai Perguruan Tinggi, yang telah memberikan ilmu, nasehat, bimbingan dan motivasi.
- ☞ Keluarga besar MIPA UNER yang telah membantu terselesainya penelitian ini
- ☞ Almamaterku tercinta Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.



## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Joko Saptana

NIM : 031810301051

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: Isolasi dan optimasi purifikasi parsial enzim endo-  $\beta$ -1,4-D-xilanase dari bakteri sistem abdomen rayap adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, September 2007

Yang menyatakan,



Joko Saptana  
NIM. 031810301051

SKRIPSI

ISOLASI DAN OPTIMASI PURIFIKASI PARSIAL  
ENZIM *ENDO- $\beta$ -1,4-D-XILANASE* DARI BAKTERI  
SISTEM ABDOMEN RAYAP

Oleh :

**Joko Saptana**  
**031810301051**

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama : Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si**

**Dosen Pembimbing Anggota : drh.Wuryanti Handayani, M.Si**

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Isolasi dan optimasi purifikasi parsial enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari bakteri sistem abdomen rayap* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari : **SELASA**  
Tanggal : **06 NOV 2007**  
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua

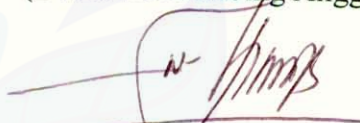
(Dosen Pembimbing Utama)



Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si.  
NIP. 132 162 523

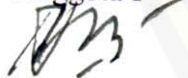
Sekretaris

(Dosen Pembimbing Anggota)



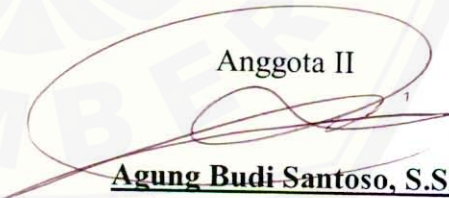
drh. Wuryanti Handayani, M.Si  
NIP. 131 459 744

Anggota I



Drs. Busroni, M.Si  
NIP.131 945 865

Anggota II



Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si  
NIP. 132 207 812



Mengesahkan

Dekan Fakultas MIPA,

Ir. Sumadi M.S.  
NIP. 130 368 784



## RINGKASAN

**Isolasi dan optimasi purifikasi parsial enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari bakteri sistem abdomen rayap;** Joko Saptana; 031810301051; 2007; 88 Halaman; Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember.

Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase merupakan enzim yang mempunyai kemampuan mendegradasi xilan (salah satu hemiselulosa). Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase bermanfaat untuk mengatasi masalah sampah yang berbahan dasar kayu. Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase, misalnya bakteri yang hidup di dalam abdomen rayap. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang diproduksi oleh bakteri yang hidup didalam abdomen rayap. Penelitian ini menggunakan isolat bakteri yang dihasilkan oleh penelitian sebelumnya, dimana isolat bakteri diambil dari rayap *Reticulitermes sp.*, *Oat-spelt xylan* digunakan sebagai substrat. Manfaat dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang dihasilkan oleh bakteri yang hidup didalam abdomen rayap.

Media cair yang digunakan untuk pembiakkan isolat bakteri ditambah dengan xilan 1%. Supernatan yang dihasilkan dari pembiakkan bakteri digunakan sebagai ekstrak kasar enzim. Aktivitas spesifik dari ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase sebesar 0,65 Unit.mg<sup>-1</sup>.

Pemurnian enzim ekstrak kasar dilakukan secara berurutan mulai dari fraksinasi dengan garam (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dialisis, kromatografi kolom. Optimasi dilakukan di setiap tahap pemurnian kecuali pada tahap dialisis. Fraksinasi yang dilakukan dengan konsentrasi kejenuhan garam 10-100% dengan rentang 10% menunjukkan pada konsentrasi kejenuhan garam (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% mempunyai aktivitas spesifik 0,74 Unit.mg<sup>-1</sup>. Dialisis yang dilakukan selama 24 jam menghasilkan enzim endo- $\beta$ -

1,4-D-xilanase dengan aktivitas spesifik  $0,95 \text{ U.mg}^{-1}$ . Pemurnian dengan kromatografi penukar ion menghasilkan pelepasan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase terbanyak pada konsentrasi kejenuhan NaCl 0,5 M, yaitu eluat ke 21, aktivitas spesifik yang dihasilkan sebesar  $1,62 \text{ U.mg}^{-1}$ , sedangkan pada optimasi kromatografi hidrofobik diperoleh aktivitas spesifik sebesar  $6,93 \text{ U.mg}^{-1}$  yaitu pada eluat ke 6 pada penjenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40%.

Berat molekul enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang disekresikan oleh bakteri dalam abdomen rayap berada pada kisaran 45.000 – 66.200. Dari berat molekul enzim yang diperoleh dan pola pelepasan enzim dari kromatografi kolom yang dilakukan, kromatografi hidrofobik dipilih untuk pemurnian enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase skala besar. Penelitian lebih lanjut diharapkan peneliti pada waktu melakukan optimasi fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan kromatografi kolom memakai rentang konsentrasi penjenuhan garam  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang lebih sempit.

## PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga penulisan Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik. Tugas Akhir ini diajukan sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak yaitu:

1. Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan izin selama penelitian untuk menyelesaikan skripsi ini.
2. I Nyoman Adi Winata S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik.
3. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan drh.Wuryanti Handayani, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan semangat, motivasi, waktu, dan kesabaran dalam membimbing penulis dari awal sampai akhir.
4. Drs. Busroni, M.Si selaku Dosen Penguji I dan Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji II yang banyak memberikan saran dan kritik demi perbaikan skripsi ini.
5. Seluruh staff dosen, administrasi, dan teknisi Jurusan Kimia
6. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat terhadap perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kimia.

Penulis

Jember, September 2007



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN MOTTO .....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PENYESAHAN .....	vii
HALAMAN RINGKASAN .....	viii
HALAMAN PRAKATA .....	x
HALAMAN DAFTAR ISI .....	xi
HALAMAN DAFTAR TABEL .....	xv
HALAMAN DAFTAR GAMBAR .....	xvi
HALAMAN DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Batasan Masalah .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	5
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Rayap.....	6
2.1.1 Taksonomi Rayap .....	6
2.1.2 Rayap Sebagai Organisme Dekomposer Penghasil Enzim.....	7
2.2 Bakteri dalam Usus Rayap .....	8

2.2.1	Karakteristik Makroskopik .....	8
2.2.2	Karakteristik mikroskopik.....	9
2.2.2.a	Morfologi bakteri.....	9
2.2.2.b	Susunan sel bakteri .....	10
2.3	Enzim .....	11
2.3.1	Klasifikasi Enzim .....	11
2.3.2	Spesifitas Enzim .....	13
2.3.3	Mekanisme Kerja Enzim .....	14
2.4	Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	15
2.4.1	Lokasi <i>In Vivo</i> Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	16
2.4.2	Produksi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	16
2.4.3	Karakteristik Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	17
2.4.4	Aktivitas Katalitik Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	18
2.4.5	Metode Penentuan Aktivitas Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	20
2.4.6	Metode Penentuan Kadar Protein Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	21
2.4.7	Aplikasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	22
2.5	Xilan.....	23
2.6	Pemurnian Enzim.....	25
2.7	Elektroforesis .....	27

### III. METODE PENELITIAN

3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	29
3.2	Alat Penelitian .....	29
3.3	Bahan Penelitian .....	30
3.4	Desain dan Diagram Alir Penelitian .....	30
3.5	Isolasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-Xilanase .....	33
3.6	Optimasi Purifikasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	33

3.6.1	Fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan Dialisis.....	33
3.6.2	Kromatografi Interaksi Hidrofobik .....	34
3.6.3	Kromatografi Penukar Ion .....	34
3.7	Penentuan Massa Molekul Relatif Enzim	
	Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	35
3.7.1	Preparasi Gel .....	35
3.7.2	Preparasi Sampel Protein .....	36
3.7.3	Running SDS-PAGE .....	36
3.7.4	Staining Gel.....	37
3.7.5	Destaining Gel.....	37
3.8	Penentuan Aktivitas Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	37
3.9	Penentuan Kadar Protein Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	38

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Ekstrak Kasar Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	39
4.2	Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase	
	Hasil Fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	41
4.3	Dialisat Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	44
4.4	Optimasi Fraksi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase	
	Kromatografi Hidrofobik .....	45
4.5	Optimasi Fraksi Penukar Ion	
	Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	51
4.6	Elektroforegram Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	56

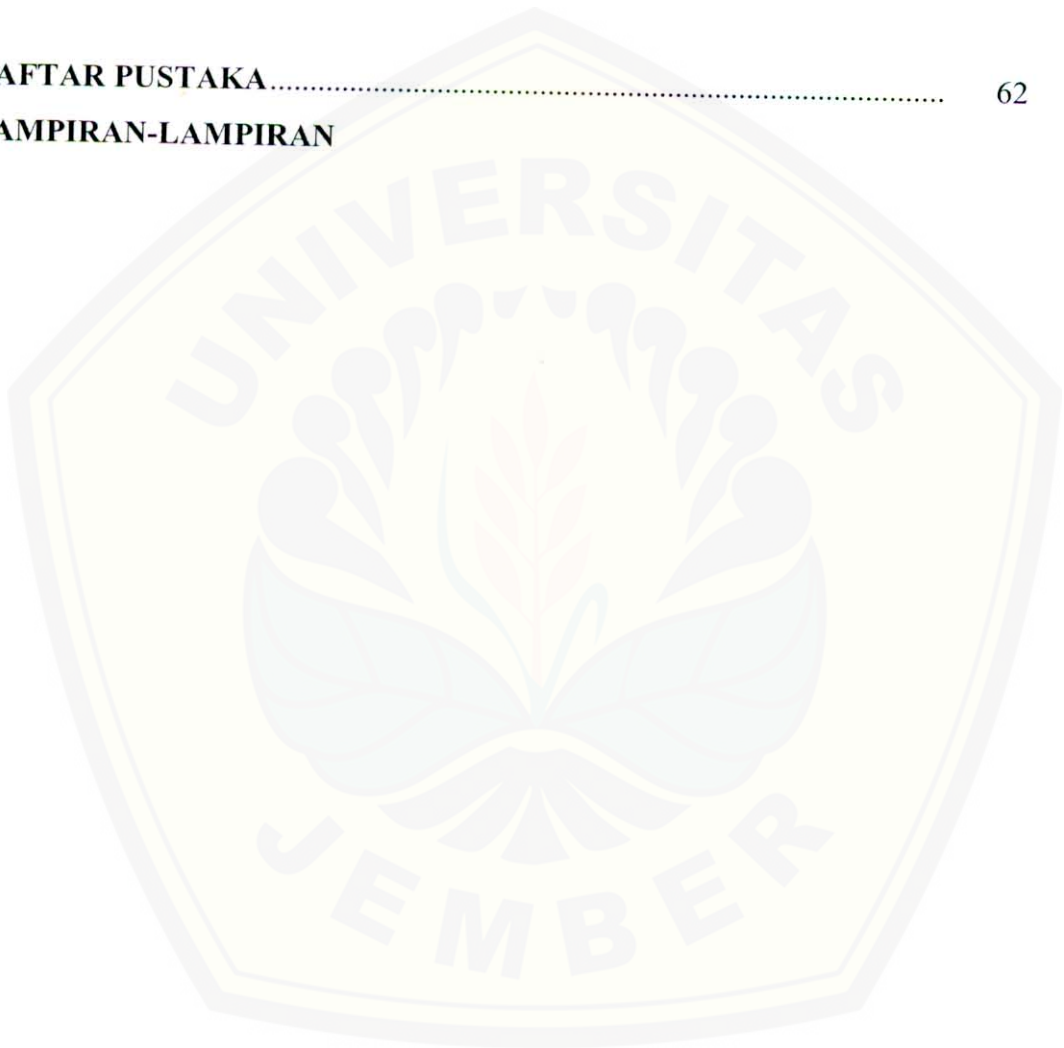


**V. KESIMPULAN**

5.1	Kesimpulan .....	60
5.2	Saran .....	61

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	62
-----------------------------	----

**LAMPIRAN-LAMPIRAN**



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Klasifikasi Enzim.....	12
4.1 Aktivitas dan kadar protein ekstrak kasar endo- $\beta$ -1,4- <i>D</i> -xilanase .....	40
4.2 Aktivitas dan Kadar Protein Fraksi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10–100% .....	42
4.3 Data Tingkat Kemurnian Fraksi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50%.....	44
4.4 Data Tingkat Kemurnian Dialisat Enzim endo- $\beta$ -1,4- <i>D</i> -xilanase.....	45
4.5 Data Tingkat Kemurnian Fraksi Hidrofobik Enzim Endo- $\beta$ -1,4- <i>D</i> -Xilanase .....	50
4.6 Data Pemurnian Enzim endo- $\beta$ -1,4- <i>D</i> -xilanase .....	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Rayap retikulitermes. sp.....	7
2.2 Berbagai bentuk, tepian , dan elevasi koloni bakteri .....	9
2.3 Berbagai bentuk basil, kokus dan spiril, (A) streptobasil, (B) diplobasil, (C) basil lepas, (D) berbagai koloni kokus, (E) bentuk spiril.....	10
2.4 Struktur xylanase famili 11.....	15
2.5 Lokasi Hidrolisis Xilan oleh Enzim Xilanolitik .....	18
2.6 Mekanisme reaksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari <i>Bacillus circulans</i> .....	19
2.7 Struktur Xilan Tumbuhan .....	25
3.1 Diagram Alir Penelitian.....	31
4.1 Isolat 6k dengan zona bening yang dihasilkan (isolat ditunjukkan dengan bentuk bulat seperti noda hitam).....	40
4.2 fraksinasi ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-100% secara diskontinyu .....	41
4.3 Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik 10-0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	47
4.4 Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik 20-0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	48
4.5 Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik 30-0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	49
4.6 Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik 40-0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	49



4.7	Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik 50-0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	50
4.8	Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik gabungan .....	51
4.9	Profil elusi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada pemurnian dengan kromatografi penukar anion.....	53
4.10	Elektroforegram protein enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Lajur 1 : <i>marker</i> . Lajur 2 : ekstrak kasar enzim. Lajur 3 : fraksi fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50%. Lajur 4 : dialisat. Lajur 5 : fraksi kromatografi hidrofobik 40-0% .....	57
4.11	Elektroforegram protein enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Lajur 1 : <i>marker</i> . Lajur 2 : fraksi kromatografi penukar ion.....	58

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Teknik-Teknik Pemisahan dan Purifikasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	67
2. Prosentase Kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Pada Tahap Fraksinasi 0 – 4 °C.....	68
3. Pembuatan Buffer dan Substrat.....	69
4. Preparasi Kantung Dialisis.....	74
5. Formulasi SDS-PAGE.....	75
6. Spesifikasi Reagen-reagen Penelitian.....	76
7.1. Preparasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	83
7.2. Kromatografi Hidrofobik 10%.....	84
8. Kromatografi Hidrofobik 20%.....	84
9. Kromatografi Hidrofobik 30%.....	85
10. Kromatografi Hidrofobik 40%.....	86
11. Kromatografi Hidrofobik 50%.....	87
12. Kromatografi Penukar Ion.....	88
13. Kurva Standar Xilosa.....	89
14. Kurva standar BSA.....	90



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Eksistensi riset mengenai protein sebagai enzim sangat menonjol dalam dunia teknologi. Perkembangan enzim sudah sangat lama yaitu dimulai sejak awal tahun 1800an hingga saat ini, ternyata dengan rentang waktu yang lama enzim masih strategis untuk dieksplorasi, diproduksi dan diaplikasikan disegala bidang yang memungkinkan.

Kapabilitas enzim didalam sektor perindustrian sangat menguntungkan dalam proses produksi. Keuntungan yang diperoleh industri diantaranya, penurunan biaya produksi, peningkatan efisiensi dan *recovery* produk, serta mengurangi penggunaan kemikalia toksik.

Berdasarkan mekanisme kinerja dan aktivitas yang diketahui, mayoritas enzim komersial adalah hidrolase (termasuk protease, karbohidrolase, dan esterase) dan oksidoreduktase. Pemasaran enzim industrial tersebut mencapai sekitar US \$  $2 \times 10^9$  tiap tahunnya berupa lebih dari 500 produk. Walaupun hanya menempati porsi yang sangat kecil untuk seluruh market kemikalia spesifik, enzim industrial diproyeksikan berkembang pesat dimasa depan. Berdasarkan aplikasinya, sekitar 65% enzim komersial berupa enzim teknis (untuk aplikasi bahan deterjen, tekstil, dan pati), hampir 25% adalah enzim pangan, dan sekitar 10% merupakan enzim pakan (Xu, 2005).

Pengetahuan tentang enzim xilanolitik masih relatif baru di Indonesia, sehingga belum banyak dikenal di kalangan konsumen industri maupun peneliti walaupun aplikasinya sangat luas dan memiliki dampak positif terhadap lingkungan atau *clean processing* (Richana, 2002). Enzim xilanolitik merupakan kompleks enzim yang terdiri dari endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase (EC 3.2.1.8), endo- $\beta$ -1,3-D-xilanase (EC 3.2.1.32), ekso- $\beta$ -1,4-D-xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -D-glukuronidase (EC 3.2.1.1/139),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), eksoxilanase, asetil xilan



esterase (EC 3.1.1.6/41/72), asam *p*-kumarat esterase (EC 3.1.1.73), dan asam ferulat esterase (EC 3.1.1.73).

Merebaknya masalah lingkungan seperti terkurasnya sumber daya alam bahan bakar, pengelolaan limbah pertanian dan kehutanan, hingga pengembangan teknologi biodegradasi dan biokonversi, menjadikan enzim xilanolitik mendapat perhatian besar dengan perannya yang mampu mengkatalisis reaksi yang menghasilkan bahan bakar ramah lingkungan seperti etanol, mengkatalisis perombakan limbah pertanian dan kehutanan (Puspaningsih, 2004).

Salah satu enzim xilanolitik yaitu enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Kinerja enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase telah diketahui berupa katalisis hidrolisis acak xilan menjadi xilooligosakarida (xiloheptaosa, xiloheksaosa, xilopentaosa, xilotetraosa, xilotriosa, xilobiosa) dan sedikit xilosa (Roy *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000). Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase telah diisolasi dan dimurnikan dari berbagai organisme terutama dari bakteri, jamur, rayap, serangga, moluska, bahkan tumbuhan. Telah banyak dilaporkan bahwa mikroba dalam sistem digesti rayap mampu menghasilkan kompleks enzim xilanolitik (Purwadaria dkk., 2004).

Pemanfaatan endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase mulai mendapat perhatian sejak tahun 1980-an dan hingga sekarang masih menjadi topik utama dalam penelitian untuk dimanfaatkan lebih jauh. Beberapa produk komersial telah diperkenalkan dengan sukses diseluruh dunia pada beberapa tahun yang lalu, seperti Ecopulp<sup>®</sup> (Finlandia) dan Optipulp L-8000<sup>®</sup> (USA) untuk *bleaching* pulp, Multifect Xylanase<sup>®</sup> (Swiss) dan Enzeco Xylanase<sup>®</sup> (USA) untuk proses *baking*, Sanzyme PX<sup>®</sup> (Jepang) dan Biofeed Beta<sup>®</sup> (Denmark) untuk pakan, serta Xylanase<sup>®</sup> (Jepang) untuk riset (Beg *et al.*, 2001). Bertolak dari uraian tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan pemurnian salah satu enzim xilanolitik dari sistem abdomen rayap, yaitu endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase.

## 1.2. Rumusan Masalah

Penelitian ini berupaya untuk mengisolasi dan optimasi pemurnian parsial enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari sistem abdomen rayap skala laboratorium. Beberapa hal yang akan diungkap mengenai enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari mikroba sistem abdomen rayap, diantaranya yaitu :

1. Berapakah aktivitas dan kadar protein ekstrak kasar endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang disekresi bakteri sistem abdomen rayap dalam medium yang mengandung xilan?
2. Fraksi kejenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  keberapakah pada tahap fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang menghasilkan aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase tertinggi?
3. Berapakah besar aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi dengan dialisis?
4. Fraksi kejenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  keberapakah pada kromatografi hidrofobik yang menunjukkan pola pelepasan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang sesuai harapan?
5. Fraksi kejenuhan NaCl keberapakah pada kromatografi penukar ion yang menunjukkan pola pelepasan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang sesuai harapan?
6. Bagaimana kondisi optimum purifikasi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menuju tahap purifikasi skala makro ditinjau dari hasil kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion?
7. Berapakah kisaran berat molekul relatif yang dimiliki endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi berdasarkan visualisasi pita elektroforesis SDS-PAGE ?

## 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kondisi optimum pemurnian parsial enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dalam skala laboratorium, yaitu dengan cara:

1. Mengetahui aktivitas dan kadar protein yang dimiliki ekstrak kasar endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil sekresi bakteri sistem abdomen rayap dalam medium yang mengandung xilan,
2. Mengevaluasi aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi dengan fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,



3. Mengevaluasi aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi dengan dialisis,
4. Mengevaluasi aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi dengan kromatografi interaksi hidrofobik,
5. Mengkaji aktivitas dan kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi dengan kromatografi penukar ion,
6. Memperoleh kondisi optimum purifikasi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menuju tahap purifikasi skala makro ditinjau dari hasil kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion, serta
7. Mengetahui kisaran berat molekul relatif yang dimiliki endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil purifikasi berdasarkan visualisasi pita elektroforesis SDS-PAGE.

#### 1.4. Batasan Masalah

Beberapa batasan teknis dalam ruang lingkup penelitian ini meliputi :

1. Rayap yang digunakan untuk penelitian adalah rayap pekerja *Reticulitermes sp.*
2. Isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini merupakan isolat yang menghasilkan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dan tidak mempunyai aktivitas enzim ekso- $\beta$ -1,4-D-xilanase (isolat terpilih)
3. Isolasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dilakukan dengan sentrifugasi biakkan bakteri xilanolitik setelah diinkubasi dalam medium yang mengandung substrat *oat-spelt xylan*,
4. Purifikasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase merupakan serangkaian tahap untuk memperoleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang relatif murni, didalamnya termasuk fraksinasi dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dialisis dalam kantung dialisis, kromatografi dengan resin interaksi hidrofobik dan penukar ion,
5. *Oat-spelt xylan* (Fluka-Biochemika, Jerman) digunakan sebagai substrat enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang merepresentasikan xilan penyusun hemiselulosa.



### 1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan merupakan salah satu upaya pemanfaatan rayap selain sebagai asupan pakan ternak, juga sebagai sumber enzim endo- $\beta$ -1,4-D xilanase yang potensial. Hasil dari penelitian ini selain dapat dimanfaatkan untuk kontinuitas riset berikutnya, juga bermanfaat pula bagi sektor industri khususnya pengolahan pangan dan pakan yang memerlukan penguraian hemiselulosa dalam prosesnya.





## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Rayap

Studi mengenai rayap diawali sejak akhir abad ke-19 melalui riset yang dilakukan oleh Grassi dan Sandias pada tahun 1893. Rayap merupakan serangga yang merugikan karena merusak apapun (makan) yang berbahan kayu dan pola hidupnya (habitat dan proses makan) yang tersembunyi (kriptobiotik). Diseluruh dunia telah dikenal sekitar 2000 spesies rayap (diidentifikasi dan dideskripsikan; sekitar 120 spesies merupakan hama), sedangkan di Indonesia dari kurang lebih 200 spesies yang dikenal baru sekitar 20 spesies yang diketahui berperan sebagai hama perusak kayu serta hama hutan atau pertanian (Tarumingkeng, 2001).

#### 2.1.1 Taksonomi Rayap

Rayap mempunyai sebaran dari daerah tropik sampai subtropik. Didaerah tropik, rayap ditemukan mulai dari pantai hingga ketinggian 3000 m diatas permukaan laut. Seluruh jenis rayap memakan kayu dan bahan berselulosa lainnya, namun perilaku makan (*feeding behavior*) jenis-jenis rayap sangat beragam (Tarumingkeng, 2001).

Rayap memiliki ciri-ciri spesifik yang dapat digunakan untuk membedakan dengan ordo lain dalam filum Arthropoda, misalnya mempunyai tubuh yang lembek, kepala besar dan berkitin, hidup dalam koloni yang besar, rahang besar dan menonjol, dalam satu koloni rayap dapat dikelompokkan ke dalam rayap pekerja, rayap prajurit dan ratu. Pengelompokan ini berdasarkan pada aktivitas masing-masing kelompok (Tarumingkeng, 2001).

*Reticulitermes sp.* merupakan salah satu genus rayap yang dikelompokkan ke dalam famili rhinotermitidae. Ciri-ciri rayap *Reticulitermes sp.* yang dapat dijadikan sebagai dasar pengelompokan dalam famili rhinotermitidae diantaranya, hidup didalam tanah dan juga dapat hidup didalam pohon yang diserang, rayap dewasa

berukuran 6-8 mm, warna tubuh pucat untuk rayap yang tidak bersayap dan berwarna tubuh hitam untuk rayap yang bersayap. Kepala rayap berwarna coklat dan pada bagian dahi ada tonjolan. Tonjolan ini merupakan ciri spesifik yang hanya dimiliki oleh rayap *Reticulitermes sp.*, secara detail dapat dilihat klasifikasi famili rhinotermitidae (Myles, 2007) sebagai berikut ;

Filum : Arthropoda  
Subfilum : Uniramia  
Kelas : Insecta  
Subkelas : Pterygota  
Ordo : Isoptera/Archyptera  
Famili : Rhinotermitidae  
Subfamili : Rhinotermitinae  
Genus : *Reticulitermes sp.*



Gambar 2.1 Rayap pekerja *Reticulitermes sp.*

### 2.1.2 Rayap Sebagai Organisme Dekomposer

Berdasarkan perilaku makannya rayap termasuk golongan makhluk hidup perombak bahan berkayu yang sudah mati (dekomposer). Rayap merupakan konsumen primer dalam rantai makanan yang berperan dalam kelangsungan siklus



beberapa unsur penting seperti karbon (C) dan nitrogen (N) (Tarumingkeng, 2001). Menurut Rismayadi (2000), rayap merupakan penghubung rangkaian siklus biogeokimia (dekomposisi bahan organik) yang sangat penting dalam biosfer, seperti siklus karbon (C), oksigen (O), nitrogen (N), belerang (S), dan fosfor (P).

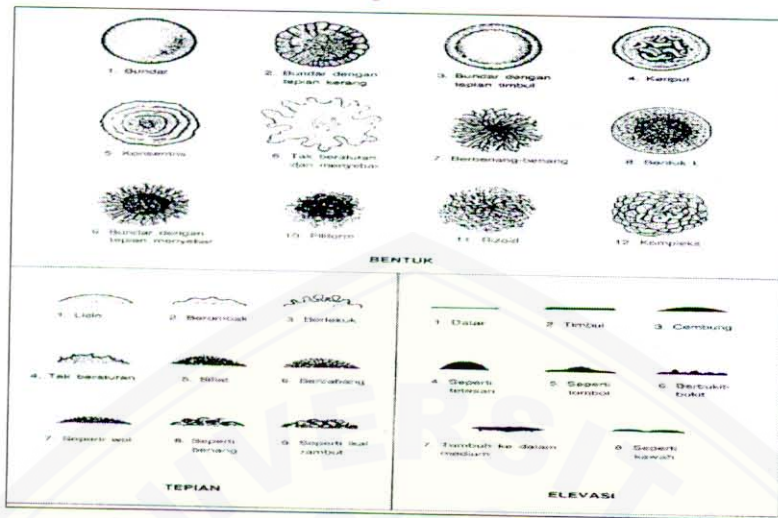
Rayap mampu melumatkan bagian berkayu dan menyerap selulosanya sehingga sebagian besar ekskremen hanya tersisa lignin (Tarumingkeng, 2001). Kemampuan digesti rayap terhadap selulosa, hemiselulosa, dan lignin tersebut menjadi gula-gula sederhana disebabkan adanya enzim-enzim pendegradasi (selulase, hemiselulase, dan lignoselulase) (Nandika dkk., 1995).

## **2.2 Bakteri dalam Usus Rayap**

Rayap sangat tergantung pada mikroba dalam saluran digestinya karena enzim pendegradasi (selulase dan hemiselulase) secara parsial atau seluruhnya disekresi oleh mikroba tersebut (Nandika dkk., 1995), mikroba jenis bakteri lebih umum ditemukan dan lebih mudah untuk diisolasi. Secara umum bakteri dapat dicirikan dengan dua cara yaitu berdasarkan karakteristik makroskopik dan karakteristik mikroskopik

### **2.2.1 Karakteristik Makroskopik**

Pengamatan terhadap karakteristik makroskopik suatu bakteri dilakukan dengan pengamatan terhadap koloni tunggal bakteri yang meliputi warna, elevasi, tepian, serta bentuk koloni.



Gambar 2.2 Berbagai bentuk, tepian, dan elevasi koloni bakteri (Dwidjoseputro, 2003).

## 2.2.2 Karakteristik mikroskopik

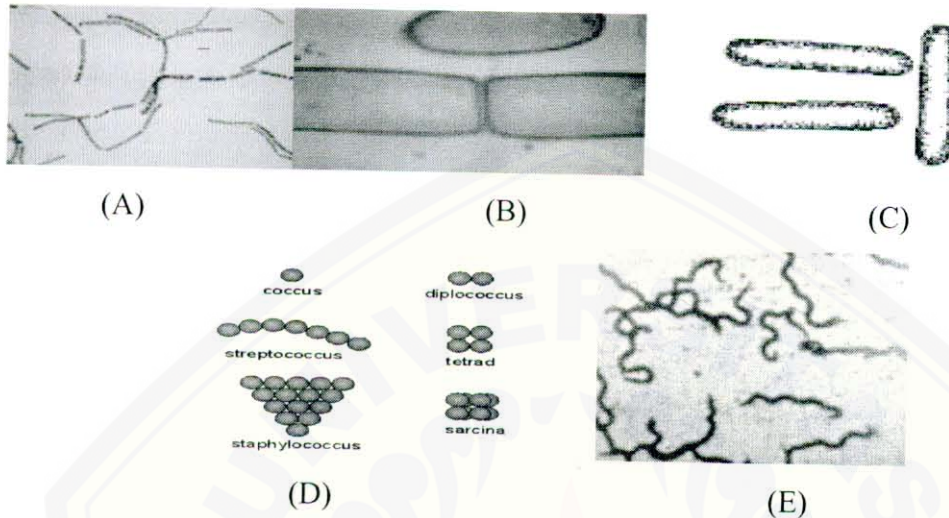
Karakteristik mikroskopik bakteri meliputi pengamatan bentuk morfologi dan susunan sel bakteri

### 2.2.2.a Morfologi Bakteri

Berdasarkan bentuk morfologinya, bakteri dibagi dalam tiga golongan yaitu: basil, kokus, dan spiral (Dwidjoseputro, 2003). Basil (dari *bacillus*) berbentuk seperti tongkat pendek silindris. Basil dapat membentuk susunan yang bergandengan panjang disebut streptobasil, bergandengan dua-dua disebut diplobasil, atau dapat pula terlepas satu sama lain. Kokus (dari *coccus*) adalah bakteri yang bentuknya seperti bola-bola kecil. Jumlah dari golongan ini tidak sebanyak bakteri golongan basil. Koloni bakteri kokus terdiri dari beberapa tipe yaitu: *Streptokokus* yaitu kokus yang bergandengan panjang menyerupai tali leher, *diplokokus* yaitu kokus yang bergandengan dua-dua, *tetrakokus* yaitu kokus yang mengelompok empat-empat, *stafilokokus* yaitu kokus yang mengelompok menyerupai untaian, dan *sarsina* yaitu kokus yang mengelompok menyerupai kubus. Golongan bakteri yang ketiga adalah *spiril* (dari *spirillum*), merupakan bakteri yang bentuknya bengkok menyerupai spiral.



Golongan ini merupakan yang paling sedikit jumlahnya dibandingkan *basil* dan *kokus*. (Dwidjoseputro, 2003).



Gambar 2.3 Berbagai bentuk basil, kokus dan spiril, (A) streptobasil, (B) diplobasil, (C) basil lepas, (D) berbagai koloni kokus, (E) bentuk spiril

### 2.2.2.b Susunan Sel Bakteri

Secara umum sel bakteri terdiri dari dinding sel, sitoplasma, dan inti sel. Dinding sel berperan memberikan bentuk pada bakteri, perlindungan, untuk mengatur keluar masuknya zat-zat kimia serta memegang peranan dalam pembelahan sel. Dinding sel bakteri sangat penting artinya bagi pertumbuhan dan pembelahan. Komposisi dari dinding sel bakteri merupakan ciri yang dapat membedakan bakteri dengan protista lainnya, dan juga dapat membedakan satu kelompok bakteri dengan kelompok lainnya (Sri R *et al.*, 1986). Keberadaan dinding sel dapat diperlihatkan dengan teknik pewarnaan tertentu atau dengan mengusahakan terjadinya plasmolisis pada sel bakteri. Membran sitoplasma merupakan pembungkus protoplasma. Membran ini ikut menyusut seiring dengan menyusutnya protoplasma pada waktu mengalami plasmolisis. Membran sitoplasma terdiri dari protein dan lipida. (Dwidjoseputro, 2003).

Pengetahuan mengenai sifat-sifat bakteri tidak hanya membantu dalam identifikasi spesies suatu bakteri, tetapi juga dapat memberikan keterangan yang tak



ternilai harganya bagi bidang lain, terutama dalam hal penelaahan, penggunaan, serta pengendalian bakteri yang dianalisis (Dwidjoseputro, 2003).

### 2.3 Enzim

Enzim merupakan biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teregulasi dan tetap. Enzim memegang peranan sangat penting dalam berbagai reaksi intra sel. sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi termasuk konversi energi dan metabolisme defensif sel.

Kata *enzyme* atau enzim berasal dari kata Yunani, *en* (in) dan *zyme* yang berarti sesuatu di dalam sel. Istilah *enzyme* dikemukakan untuk pertama kalinya oleh Kuhne yang banyak mengadakan penyelidikan tentang fermentasi pada tahun 1878. Selanjutnya Büchner menemukan bahan cairan sel ragi yang masih mampu melakukan fermentasi seperti yang dilakukan oleh sel hidupnya (Lehninger, 1997). Enzim dihasilkan oleh sel hidup (eukariota dan prokariota) dan berfungsi sebagai katalis biologis yang spesifik, namun aktivitasnya dipengaruhi oleh kondisi fisik dan kimia. Enzim dapat bereaksi dengan substansi asam atau basa, memiliki sensitifitas tinggi dan termolabil, akan mengalami denaturasi karena panas, asam, basa, garam organik, radiasi, pelarut organik, dan dapat mengalami presipitasi (Pandey and Sinha, 1997).

#### 2.3.1 Klasifikasi Enzim

Sejak tahun 1961, penamaan dan pengklasifikasian enzim secara sistematis dilakukan oleh suatu badan internasional yang bernama *Commision on Enzymes of the International Union of Biochemistry* (CEIUB). Berdasarkan klasifikasi tersebut, enzim dikelompokkan menjadi enam kelas utama seperti yang ditunjukkan pada tabel 2.2, dimana setiap kelas terbagi menjadi sub-sub kelas. Klasifikasi enzim secara internasional tersebut meliputi nama kelas atau golongan, nomor kode, dan jenis

reaksi yang dikatalis. Setiap kelas utama terbagi lagi menjadi kelompok-kelompok enzim berdasarkan gugus substrat yang diserang (Lehninger, 1997).

**Tabel 2.2** Klasifikasi Enzim

Nomor Kelas	Enzim	Fungsi Katalitik/Jenis Reaksi yang Dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Reaksi oksidasi-reduksi atau transfer elektron, beraktivitas pada gugus-gugus kimia untuk memberikan atau melepaskan atom-atom hidrogen
2	Transferase	Reaksi transfer gugus fungsi antara molekul-molekul donor dan akseptor
3	Hidrolase	Reaksi hidrolitik, pemindahan gugus fungsi ke air
4	Liase	Reaksi eliminasi, penambahan gugus ke ikatan ganda atau sebaliknya
5	Isomerase	Reaksi yang melibatkan isomerisasi, pemindahan gugus di dalam molekul untuk menghasilkan bentuk isomer
6	Ligase	Reaksi yang menggabungkan 2 molekul dengan hidrolisis ikatan piropospat berenergi tinggi, pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

Penomoran secara resmi dari enzim secara spesifik diidentifikasi melalui nomor resmi dan melalui nomor empat komponen, misalnya alkohol dehidrogenase diidentifikasi dalam laporan ilmiah sebagai alkohol: NAD<sup>+</sup> oksidoreduktase, E.C. 1.1.1.1 (notasi E.C mengacu pada *Enzyme Commission*). Nomor pertama mengacu pada kelas 1 (oksidoreduktase), nomor kedua mengacu pada jenis gugusan yang dioksidasi (1 = alkohol), yang ketiga mengacu pada agen pengoksidasi (1 = enzim NAD<sup>+</sup>), dan yang keempat mengacu pada reaksi spesifik (1 = alkohol dehidrogenase).



Penamaan yang terlalu panjang dan rumit menyebabkan nama trivial masih tetap dipakai (Lehninger, 1997).

### 2.3.2 Spesifitas Enzim

Sifat spesifik dari enzim adalah daya kapasitas dan sifatnya yang spesifik terhadap reaksi, sehingga suatu enzim hanya bekerja terhadap satu substrat atau sejumlah kecil senyawa yang sejenis. Spesifitas enzim terhadap reaksi dapat bersifat absolut maupun relatif. Absolut dimaksudkan bila suatu enzim hanya dapat beraktivitas dengan satu substrat saja dan tidak akan bekerja bahkan terhadap molekul yang amat serupa, sedangkan relatif bila suatu enzim dapat beraktivitas dengan beberapa atau kelompok senyawa tertentu, atau senyawa yang memiliki ciri struktural yang sama (Lehninger, 1997).

Enzim memiliki massa molekuler  $1,2 \times 10^4$  hingga lebih dari 1 juta Dalton, sehingga enzim tampak berukuran amat besar dibanding substrat atau gugus fungsional targetnya. Beberapa enzim dikenal sebagai protein sederhana karena hanya terdiri dari polipeptida, tidak mengandung gugus kimiawi selain residu asam amino, dan aktivitas katalitiknya hanya bergantung pada struktur proteinnya. Enzim kompleks memerlukan tambahan komponen kimia bagi aktivitasnya atau yang disebut kofaktor. Kofaktor dapat berupa suatu molekul anorganik seperti Mo, Se, ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , atau  $\text{Ni}^{2+}$ , maupun suatu molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Beberapa enzim membutuhkan baik koenzim maupun satu atau lebih ion logam bagi aktivitasnya. Pada beberapa enzim, koenzim atau ion logam hanya terikat secara lemah atau dalam waktu sementara pada protein, namun pada enzim lain senyawa ini terikat kuat, atau terikat secara permanen yang dalam hal ini disebut gugus prostetik. Enzim yang strukturnya sempurna dan aktif mengkatalisis, bersama dengan koenzim atau gugus logamnya disebut holoenzim. Koenzim dan ion logam bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein yang disebut apoenzim, terdenaturasi oleh pemanasan. Spesifitas enzim dipengaruhi



oleh sifat ikatan enzim, substrat dan sifat gugusan katalitiknya yang juga dipengaruhi oleh kofaktor-kofaktor organik maupun ion hidrogen yang ada (Lehninger, 1997).

### 2.3.3 Mekanisme Kerja Enzim

Enzim dapat melaksanakan fungsi katalitiknya (pemutusan atau pembentukan ikatan kimia) didahului dengan pembentukan ikatan dengan substrat, mekanisme katalitiknya dapat dilihat berikut ini.



dimana,  $E$  adalah enzim,  $S$  merupakan substrat,  $ES$  berupa kompleks enzim-substrat, dan  $P$  adalah produk yang terbentuk.

Proses katalisis berupa pembentukan ikatan kimia baru akan terjadi setelah substrat terikat pada enzim. Mengingat bahwa molekul enzim besar, sedang molekul substrat umumnya kecil, maka tidak seluruh permukaan enzim terletak pada pengikatan substrat. Pengikatan substrat terjadi pada daerah khusus dari permukaan enzim. Daerah tersebut sebagai tempat kegiatan (*active site*) atau tempat katalisis berlangsung.

Ikatan yang terjadi antara enzim dan substrat merupakan ikatan yang lemah seperti ikatan elektrostatik, ikatan hidrogen, gaya-gaya van der Waals ataupun interaksi hidrofobik. Interaksi yang terjadi antara molekul enzim dan substrat melibatkan gugusan reaktif baik dari enzim maupun dari substrat, dan enzim tersebut hanya dapat mengikat substrat yang memiliki gugusan-gugusan reaktif yang sama. Gugusan-gugusan reaktif enzim yang terlibat dalam pengikatan substrat disebut gugusan-gugusan pengikat (*binding group*). Proses katalisis melibatkan sejumlah gugusan-gugusan reaktif lain yang disebut gugusan katalitik (*catalytic group*). Gugusan tersebut terletak pada gugusan samping (Lehninger, 1997).

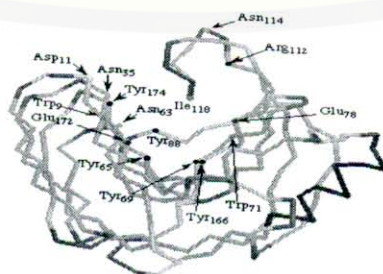
Enzim memiliki dua ciri yang utama yaitu efisiensi katalitik dan derajat spesifitasnya yang tinggi terhadap substrat. Cara kerja enzim-substrat dapat dipandang dari dua hipotesis yaitu *lock-key* dan *induced fit*. Hipotesis pertama menjelaskan bahwa reaksi antara enzim dan substrat terjadi karena adanya kesesuaian

konformasi antara substrat dengan sisi aktif enzim. Hipotesis kedua menjelaskan bahwa reaksi antara enzim dan substrat terjadi karena adanya induksi substrat terhadap enzim sedemikian rupa sehingga bentuk ruang substrat menjadi sesuai dengan enzim (Pandey and Sinha, 1997).

Enzim dapat diisolasi berdasarkan informasi tentang lokasi enzim tersebut di dalam sel. Enzim ekstraseluler (eksoenzim) lebih mudah diisolasi karena dapat diperoleh tanpa pemecahan sel, sedangkan enzim intraseluler (endoenzim) diisolasi dengan memecahkan dinding sel dan organel di dalam sel secara kimia maupun fisika. Sebagai biomakromolekul yang memiliki ukuran, bentuk, dan muatan tertentu, maka enzim dapat dipisahkan atau dimurnikan terhadap campuran enzim yang ada. Berbagai cara dapat dilakukan diantaranya adalah melalui presipitasi, dialisis, adsorpsi, pertukaran ion, filtrasi dalam gel, ultrasentrifugasi, pengikatan berdasarkan afinitas dan hidrofobisitas (Whitaker, 1994).

#### 2.4 Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase mempunyai nama lain xilanase,  $\beta$ -xilanase 1,4- $\beta$ -D-xilan-xilanohidrolase (EC 3.2.1.8), endoxilanase,  $\beta$ -1,4-xilanase (Collins et al., 2005). Enzim ini mampu mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 pada bagian dalam rantai xilan secara acak untuk menghasilkan mono-, di-, tri-, dan xiloölogosakarida. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut.



Gambar 2.4 struktur xylanase famili 11



Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang berasal dari mikroba seperti pada gambar 2.4 diklasifikasikan ke dalam dua famili utama berdasarkan sifat fisiko-kimianya yaitu masa molekul relatif dan titik isoelektrik. Famili GH 10 (disebut famili F) yang merupakan kelompok endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan masa molekul relatif tinggi dengan harga pI yang rendah. Sebaliknya famili GH 11 (disebut famili G) mempunyai masa molekul relatif rendah dengan harga pI yang tinggi. Perbedaan sifat katalitik dari kedua famili tersebut, famili GH 10 mampu menyerang ikatan glikosida disebelah titik cabang dan mengarah keujung non-pereduksi dengan menggunakan dua residu xilopiranosil non-substitusi antara cabang-cabang, sedangkan famili GH 11 menggunakan tiga residu xilopiranosil non-substitusi (Subramaniyan *et al.*, 2002). Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase telah diproduksi melalui beberapa tipe pemisahan dan purifikasi seperti yang ditunjukkan pada lampiran 1.

#### 2.4.1 Lokasi In Vivo Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dapat ditemukan dalam xilanosom, yaitu suatu tepat ditemukannya kompleks multienzim yang multifungsional pada permukaan tubuh mikroba (Sunna and Antranikian, 1997). Kompleks ini memainkan peranan penting dalam degradasi hemiselulosa. Kompleks B (CB) xilanosom ekstraseluler dari *Butyvirio fibrisolvens* H17c terdapat sebagai agregat protein multisubunit (Lin and Thomson, 1991). Kompleks tersebut memiliki massa molekuler > 669 kiloDalton (kDa) dan tersusun dari 11 pita protein dengan aktivitas xilanase dan 3 pita yang menunjukkan aktivitas endoglukanase.

#### 2.4.2 Produksi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase adalah enzim yang umumnya disekresi dalam media yang mengandung xilan murni atau residu yang kaya xilan (Balakrishnan *et al.*, 1997). Induksi sebagian besar endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase disebabkan oleh xilan dalam *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg *et al.*, 2000a).



Beberapa laporan telah menunjukkan induksi oleh lignoselulosa seperti tepung gandum, jerami padi, bonggol jagung, dan ampas tebu (Beg *et al.*, 2000a). Pada beberapa kasus, gula yang dapat langsung dimetabolisme seperti glukosa dan atau xilosa, keduanya merupakan *suppressor* atau penghalang sintesis endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase (Beg *et al.*, 2000a). Peningkatan produksi xilanase dengan adanya Zeolit sintetis yang mengandung kalsium (CaA) pada konsentrasi 0,5% dapat meningkatkan hingga 2 kali lipat dalam *Bacillus* sp. NCL-87-6-10 (Balakrishnan *et al.*, 2000).

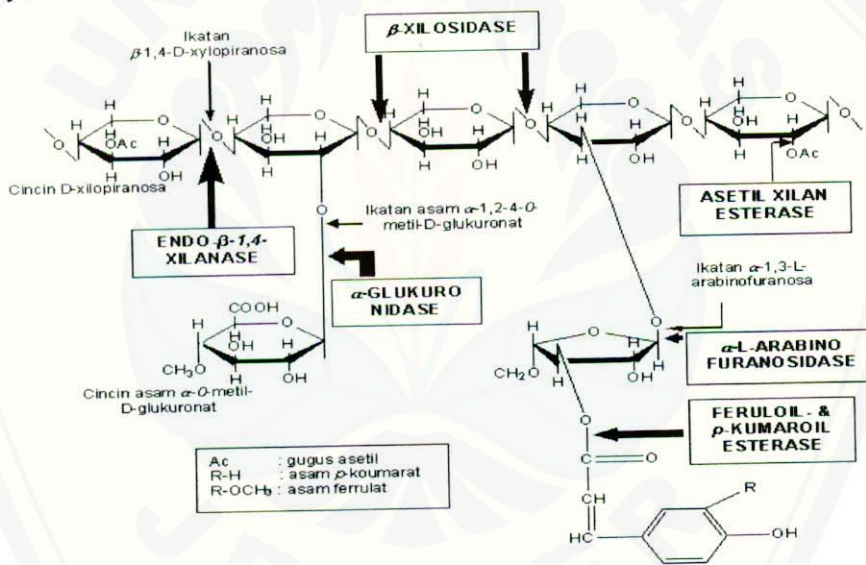
#### 2.4.3 Karakteristik Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Suatu enzim dalam aktivitasnya membutuhkan kondisi tertentu yang spesifik. Kondisi tersebut telah banyak dieksplorasi melalui berbagai penelitian yang merupakan karakteristik *in vitro* suatu enzim. Mikroba (bakteri dan jamur) akan memproduksi xilanase dengan pH dan temperatur optimum berkisar 2,0-11,0 dan 5-105°C, serta stabil pada pH 3,0-10,0 (Collins *et al.*, 2005).

Disamping karakteristik kondisi, aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase juga dipengaruhi oleh eksistensi senyawa atau kation logam yang mampu bertindak sebagai inhibitor maupun aktivatornya. Beberapa inhibitor (diasumsikan menurunkan aktivitas hingga kurang dari 100%) seperti  $\text{Ag}^+$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Ba}^{2+}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ ;  $\text{Hg}^{2+}$ ;  $\text{Cu}^{2+}$ ; Triton<sup>®</sup> X-100 1,0% (v/v); Tween 80 1,0% (v/v); Lubrol WX 1,0% (b/v); SDS 1,0% (b/v); pCMB (*para*-kloromerkuribenzoat) 0,5% (b/v),  $1 \times 10^{-4}$  M,  $2 \times 10^{-4}$  M; pelarut organik (metanol, etanol, butanol, asetonitril, aseton, dioksan), *D*-glukono- $\delta$ -laktone, NBS (*N*-bromosuksinimida) telah dilaporkan (Faulet *et al.*, 2006a). Sedangkan aktivator yang telah dilaporkan antara lain  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Nonidet P40 1,0% (b/v), Urea 1,0% (b/v), merkaptoetanol 1,0% (b/v), DL-DTT 1,0% (b/v), DTNB (dithionitrobenzoat) 0,5% (b/v) (Faulet *et al.*, 2006b).

### 2.4.4 Aktivitas Katalitik Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Xilan dengan heterogeneitas dan sifat kimianya yang kompleks menyebabkan penguraian sempurna membutuhkan aksi kompleks beberapa enzim hidrolitik dengan spesifitas dan aktivitas (mode aksi) yang berbeda-beda. Sistem enzim xilanolitik yang menghidrolisis xilan umumnya tersusun atas sekumpulan enzim-enzim hidrolitik seperti endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase, ekso- $\beta$ -1,4-D-xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glukuronidase, asetil xilan esterase, dan asam fenolat (asam ferrulat dan *p*-koumarat) esterase seperti yang tampak pada gambar 2.5. Enzim-enzim tersebut beraksi secara bersama-sama untuk mengubah xilan menjadi gula-gula penyusunnya.

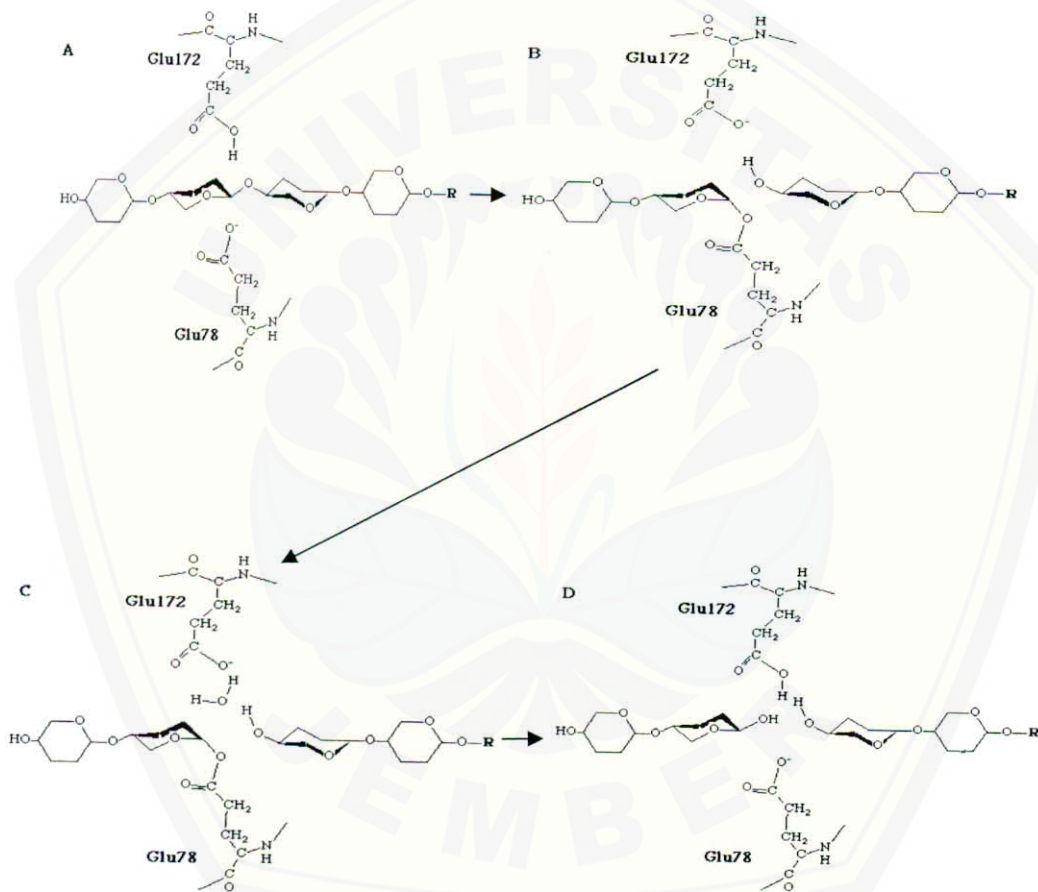


Gambar 2.5 Lokasi hidrolisis xilan oleh enzim xilanolitik. Gambar dibuat dengan program Chemsoftware Chemdraw (R) Ultra versi 5.0 (CambridgeSoft Corp., 1998)

Produksi sistem multienzim xilanolitik memiliki fungsi tertentu, dan ini merupakan salah satu strategi dari suatu mikroba untuk menghidrolisis xilan secara efektif. Sinergisme dapat ditemui antara enzim yang beraksi pada kerangka utama 1,4- $\beta$ -D-xilan ( $\beta$ -1,4-D-endoxilanase), dan enzim-enzim yang memutuskan rantai samping ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, asetil xilan esterase, dan  $\alpha$ -D-glukuronidase).



Aksi sinergistik antara asetil xilan esterase dan endoxilanase menyebabkan degradasi xilan terasetilasi yang efisien (Biely *et al.*, 1986). Pelepasan asam asetat oleh asetil xilan esterase akan meningkatkan aksesibilitas kerangka utama xilan terhadap serangan endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menghasilkan polimer terasetilasi yang lebih pendek dan merupakan substrat yang lebih disukai untuk aktivitas esterase (Biely *et al.*, 1986).

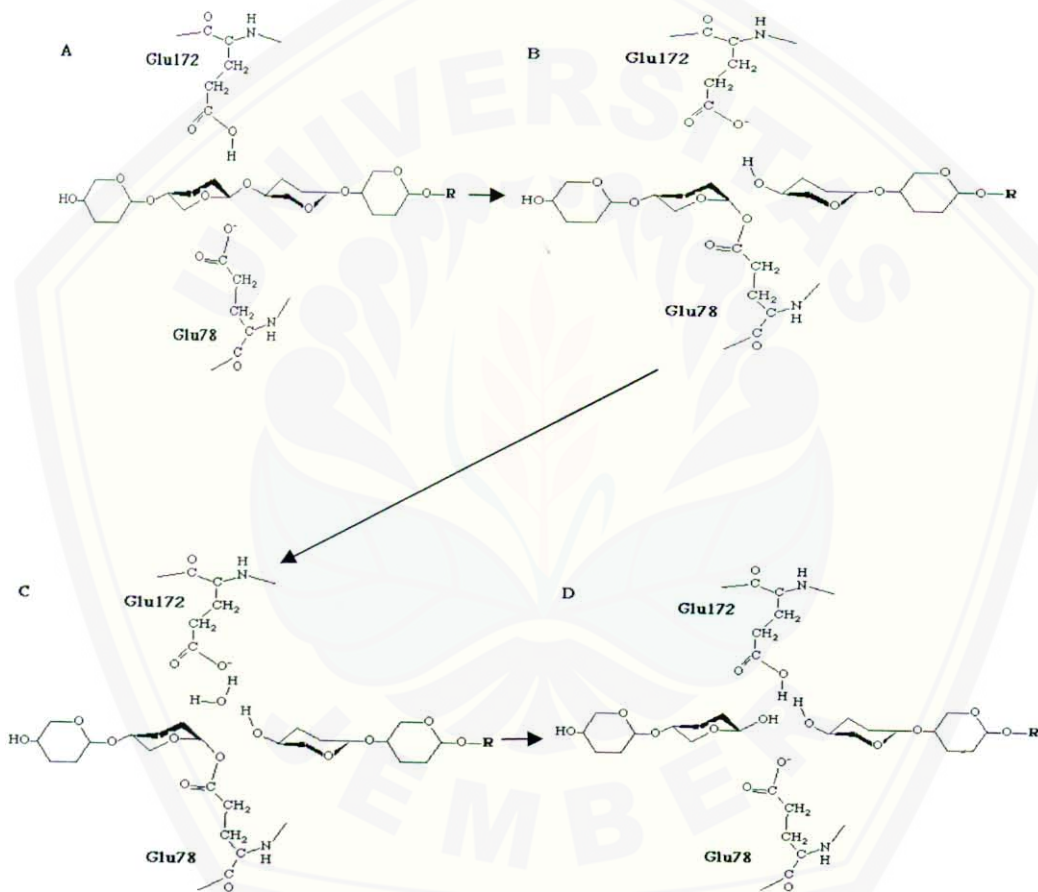


Gambar 2.6 Mekanisme reaksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari *Bacillus circulans* (Subramanian *et al.*, 2002)

Enzim  $\beta$ -1,4-D-xilosidase akan meningkatkan hidrolisis xilan oleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan membantu inhibisi produk akhir endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Dengan



Aksi sinergistik antara asetil xilan esterase dan endoxilanase menyebabkan degradasi xilan terasetilasi yang efisien (Biely *et al.*, 1986). Pelepasan asam asetat oleh asetil xilan esterase akan meningkatkan aksesibilitas kerangka utama xilan terhadap serangan endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menghasilkan polimer terasetilasi yang lebih pendek dan merupakan substrat yang lebih disukai untuk aktivitas esterase (Biely *et al.*, 1986).



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari *Bacillus circulans* (Subramanian *et al.*, 2002)

Enzim  $\beta$ -1,4-D-xilosidase akan meningkatkan hidrolisis xilan oleh endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan membantu inhibisi produk akhir endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Dengan

penambahan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase terhadap endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang akan meningkatkan sakarifikasi arabinoxilan (Beg *et al.*, 2001).

Mekanisme reaksi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase secara umum terlihat pada gambar 2.6 yang merupakan reaksi retensi yang berlangsung melalui dua tahap. Pertama terjadi protonisasi substrat oleh katalis asam ( $A \rightarrow B$ ) yang selanjutnya mengakibatkan terjadinya disosiasi dan difusi pada glikon (xilobiosa) ( $B \rightarrow C$ ) yang memindahkan enzim ke posisi yang baru terhadap substrat ( $C \rightarrow D$ ) (Subramaniyan *et al.*, 2002).

#### 2.4.5 Metode Penentuan Aktivitas Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Produktivitas yang tinggi sangat esensial untuk kepentingan manufaktur sehingga secara langsung membutuhkan pengukuran aktivitas yang akurat. Terdapat beberapa metode untuk menentukan aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase, diantaranya adalah :

1. Metode asam dinitrosalisilat atau DNS berdasarkan pada reaksi antara DNS dengan gula reduksi yang mengakibatkan DNS tereduksi menjadi ANS yang mempunyai serapan pada 550 nm dengan menggunakan spektrofotometri (Miller, 1959a). Rasio sensitivitas metode ini meningkat seiring dengan bertambahnya derajat polimerisasi (DP) produknya. Satu unit endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase didefinisikan sebagai aktivitasnya yang mampu menghasilkan 1  $\mu$ mol gula pereduksi ekivalen xilosa selama satu menit pada kondisi pengujiannya. xilosa digunakan sebagai standar dalam metode ini.
2. Metode arsenomolibdat, ARS, atau Nelson-Somogyi berdasarkan deteksi gugus gula pereduksi yang terbentuk secara spektrofotometri pada 500; 520; atau 540 nm. Satu unit endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase didefinisikan sebagai aktivitasnya yang menghasilkan 1  $\mu$ mol gula pereduksi ekivalen xilosa selama satu menit pada kondisi pengujiannya. Rasio sensitivitas metode ini menurun seiring dengan berkurangnya derajat depolimerisasi (DP) produk gula (Jeffries *et al.*, 1998).



#### 2.4.6 Metode Penentuan Kadar Protein Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Terdapat beberapa metode yang sering digunakan untuk menentukan protein dalam enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil isolasi. Metode yang dipilih relatif lebih cepat dan membutuhkan sampel yang sedikit dalam pengujiannya. Metode-metode tersebut adalah :

1. Metode bicinchoninic acid (BCA) yang berdasarkan pada reduksi Cu(II) menjadi Cu(I) dalam larutan alkali oleh protein. Cu(I) akan bereaksi dengan BCA untuk menghasilkan warna ungu dengan intensitas tinggi yang memiliki panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) 562 nm warna yang dihasilkan stabil dalam waktu yang lama dan juga hanya memerlukan sampel dalam jumlah yang sedikit. Standar yang digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA). Metode ini sangat berguna untuk larutan protein yang mengandung deterjen (Whitaker, 1994).
2. Metode Lowry berdasarkan reaksi fosfomolibdat dalam larutan basa dengan residu tirosil protein, sehingga metode ini sangat tergantung pada sifat protein karena kandungan tirosin yang bervariasi. Reagen utama yang digunakan adalah fenol Folin-Chiocalteau. Metode ini lebih sensitif daripada metode biuret. Ion tembaga(II) yang terdapat didalamnya akan meningkatkan sensitivitas reaksi, sehingga warna biru yang dihasilkan sangat stabil dan memiliki absorbansi maksimum pada 750 nm. BSA, *human serum albumin*, gelatin, dan lisozim (Miller, 1959b) digunakan sebagai standar. Detergent, fenol, tanin dan senyawa fenolat, DTT dan reagent disulfida atau sulfhidril, ion potassium, senyawa amfolit, Triton<sup>®</sup> X-100, dan larutan gradien Percoll (sol silika koloid) dapat menginterferensi reaksi (Whitaker, 1994).
3. Metode Bradford (Bradford, 1976) berdasarkan pengikatan muatan negatif zat pewarna *coomassie brilliant blue* G-250 pada muatan positif protein, yang mengakibatkan pergeseran panjang gelombang maksimum dari 465 nm untuk zat pewarna bebas ke 595 nm untuk zat pewarna yang berikatan. Pada proses ini dapat terjadi interaksi hidrofobik antara zat pewarna dan protein (Whitaker, 1994). BSA digunakan sebagai standar dalam uji ini. Metode Bradford lebih aman



daripada metode Lowry dan Smith terhadap berbagai interferensi hanya tanin dan sesium klorida yang menjadi inhibitor metode ini (Gegenheimer, 1990).

#### 2.4.7 Aplikasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari mikroba telah menarik perhatian pada dekade terakhir ini, terutama karena potensi bioteknologisnya dalam beberapa proses industri (Wong and Saddler, 1992) antara lain industri makanan, pakan ternak, pulp dan kertas. Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase memberikan potensi untuk meningkatkan produksi beberapa produk bermanfaat dengan cara yang paling ekonomis, dengan kemungkinan utama seperti produksi protein sel tunggal (SCP), bahan bakar cair dan gas, pelarut dan sirup gula yang dapat digunakan sebagai fungsi tersebut atau sebagai stok pakan untuk proses mikrobiologis lainnya (Kuhad and Singh, 1993).

Akhir-akhir ini aplikasi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang paling menjanjikan adalah dalam *prebleaching* pulp *kraft*. Aplikasi enzimatisnya adalah meningkatkan fibrilasi pulp dan retensinya terhadap air, mengurangi waktu pengadukan (*beating time*) *virgin pulp*, merestorasi ikatan dan meningkatkan *freeness* pada serat daur ulang, serta memisahkan xilan secara selektif dari pulp terlarut. Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase juga berguna dalam produksi selulosa dari pulp terlarut untuk produksi rayon serta *biobleaching* pulp kayu (Viikari *et al.*, 1994).

Penurunan berat tubuh dan efisiensi konversi pakan pada ayam broiler dengan pakan sejenis gandum dihubungkan dengan viskositas intestinalnya. Pencampuran endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ke dalam diet gandum ayam broiler akan menurunkan viskositas intestinal tersebut sehingga mampu menambah berat tubuh dan efisiensi konversi pakannya (Bedford and Classen, 1992).

Efisiensi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dalam meningkatkan kualitas roti tampak pada bertambahnya volume spesifik roti tersebut. Hal tersebut akan lebih baik apabila amilase digunakan dalam kombinasinya dengan endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase.

Xilan terdapat dalam jumlah besar pada limbah pertanian dan industri makanan, sehingga endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dapat digunakan untuk mengkonversi

xilan menjadi xilosa dalam limbah cair. Perkembangan proses hidrolisis enzimatis yang efisien menawarkan prospek baru dalam penanganan limbah hemiselulosik (Biely, 1985).

Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase digunakan bersama dengan selulase dan pektinase untuk menjernihkan sari buah dan jus, untuk *liquefying* buah dan sayur-sayuran (Biely, 1985).

Sinergi endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan beberapa enzim lain seperti mannanase, ligninase, xilosidase, glukosidase dan lainnya dapat digunakan untuk menghasilkan bahan bakar biologis seperti etanol dan xilitol dari biomassa lignoselulosa (Kuhad and Singh, 1993). Selama lebih dari satu dekade terakhir sejumlah enzim mikroba telah diterapkan untuk aplikasi potensialnya pada beberapa industri. Beberapa produk komersial telah diperkenalkan dengan sukses diseluruh dunia pada beberapa tahun yang lalu.

## 2.5 Xilan

Xilan adalah heteropolimer dengan unit monomer berupa *D*-xilosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida dan *L*-arabinosa dengan kadar renik. Xilan/hemiselulosa terletak diantara lignin dan kumpulan serat selulosa dibawahnya dalam menyusun tanaman. Berdasarkan kepadatan struktur kimia dan substitusi gugus sampingnya, xilan tampak berselang-seling, berjalin, dan berikatan secara kovalen pada beberapa titik dengan cara melapisi lapisan lignin, seraya membentuk lapisan disekitar dasar untaian selulosa melalui ikatan hidrogen (Biely, 1985).

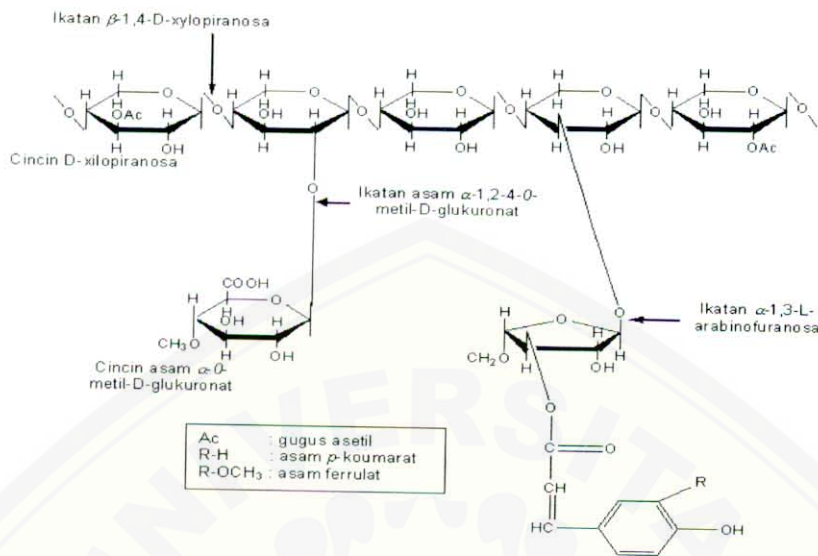
Koposisi xilan dalam menyusun sel tanaman mencapai hingga 30-35% dari berat kering total tumbuhan tersebut. Xilan juga merupakan hemiselulosa terbesar pada kayu keras (hardwood) *Angiospermae* dengan jumlah sekitar 15-30% namun kurang berlimpah pada kayu lunak (softwood) dari *Gymnospermae* dengan jumlahnya sekitar 7-12% dari berat kering totalnya (Wong *et al.*, 1988).



Xilan dari kayu keras adalah *o*-asetil-4-*O*-metilglukuronoxilan, yaitu suatu polisakarida yang terdiri dari sekurang-kurangnya 70 residu  $\beta$ -xilopiranososa (derajat polimerisasi DP rata-rata antara 150-200) yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida. Setiap 10 residu xilosa membawa asam 4-*O*-metilglukuronat yang terikat pada posisi kedua xilosa. Xilan dari kayu keras terasetilasi dengan jumlah yang besar (misalnya xilan dari *birchwood* mengandung lebih dari 1 mol asam asetat tiap 2 mol xilosa). Asetilasi tersebut lebih sering terjadi pada posisi C-3 daripada C-2. Gugus asetil tersebut bertanggung jawab terhadap kelarutan parsial xilan dalam air dan pelepasannya yang langsung bila diekstraksi dengan basa (Sunna and Antranikian, 1997).

Xilan dari kayu lunak tersusun dari arabino-4-*O*-metilglukuronoxilan dan memiliki kandungan asam 4-*O*-metilglukuronat yang lebih besar daripada xilan kayu keras. Residu asam 4-*O*-metilglukuronat tersebut terikat pada posisi C-2. Xilan kayu lunak tidak terasetilasi dan diganti dengan gugus asetil yang memiliki satuan  $\alpha$ -*L*-arabinofuranosa yang dihubungkan dengan ikatan  $\alpha$ -1,3-glikosida pada posisi C-3 xilosa. Substituen arabinosil terdapat pada hampir 12% residu xilosil (Wong *et al.*, 1988). Xilan kayu lunak lebih pendek daripada xilan kayu keras, dengan DP antara 70-130 serta kurang bercabang. Rasio  $\beta$ -*D*-xylopiranososa, asam 4-*O*-metil- $\alpha$ -*D*-glukuronat, dan *L*-arabinofuranosanya adalah 100 : 20 : 13. Struktur xilan (Beg *et al.*, 2001) ditunjukkan pada gambar 2.7 berikut.





Gambar 2.7 Struktur xilan tumbuhan. Gambar dibuat dengan program *Chemsoftware Chemdraw (R) Ultra* versi 5.0 (CambridgeSoft Corp., 1998)

Substituen yang umum ditemukan pada kerangka utama xilan adalah residu asetil, arabinosil, dan glukuronisil (Whistler and Richards, 1970). Dilain pihak, homoxilan mengandung residu xilosil yang terpisah. Tipe xilan ini tidak tersebar luas di alam dan telah diisolasi dari rumput *esparto grass* (Chanda *et al.*, 1950). Xilan dengan kerangka utama ikatan  $\beta$ -1,3 telah dilaporkan pada alga laut (Dekker and Richards, 1976), sedangkan xilan dengan ikatan campuran  $\beta$ -1,3- dan  $\beta$ -1,4- telah ditemukan pada rumput laut seperti *Palmeria palmata* (Barry and Dillon, 1940).

## 2.6 Pemurnian Enzim

Harris (1989) menyebutkan ada tiga strategi dalam pemurnian enzim yang harus diperhatikan :1) Kualitas: perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas protein dengan cara mengurangi proteolisis dan denaturasi, 2) Kuantitas : pemakaian akhir dari protein murni akan menentukan kualitas enzim yang diperlukan, 3) Ekonomis merupakan kunci penting bila akan dipakai dalam industri atau diterapkan dalam skala laboratorium. Pemurnian protein dilakukan berdasarkan sifat kelarutan,

ukuran, muatan afinitas pengikatan spesifik dari protein itu sendiri. Oleh karena itu campuran protein selanjutnya dipisahkan dengan berbagai tahap pemisahan.

Pemekatan protein merupakan tahap awal dari prosedur pemurnian atau dapat pula digunakan untuk keperluan analisis enzim (Harris, 1989). Pemekatan protein dapat dilakukan dengan presipitasi menggunakan garam dan pelarut organik.

Prinsip presipitasi dengan garam berdasarkan pada kekuatan interaksi antara protein dengan air dan garam dengan air, Semakin tinggi kepolaran garam yang dipakai akan membuat molekul air yang terikat pada protein akan tertarik kegaram yang akibatnya protein akan mengalami agregasi sesama protein dan akibatnya protein mengalami pengendapan (Scopes, 1987).  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  merupakan garam yang umum digunakan untuk mengendapkan protein, karena memiliki daya larut tinggi didalam air, relatif murah, dan kestabilan protein didalam larutan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2M-3M) tahan bertahun-tahun (Scopes, 1987)

Kromatografi merupakan metode utama dalam pemisahan senyawa organik yang terdistribusi diantara 2 fase: yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak berupa pelarut dan molekul yang akan dipisahkan, sedangkan fase diam berupa padatan atau larutan yang mendukung padatan atau gel. Fase gerak bergerak kontinyu terhadap fase diam.

Beberapa jenis kromatografi kromatografi kolom dapat diungkap disini, diantaranya yaitu; kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi interaksi hidrofobik, kromatografi penukar ion, kromatografi filtrasi gel. Dalam kromatografi adsorpsi, komponen yang dipisahkan secara selektif teradsorpsi pada permukaan adsorben yang dipakai sebagai matrik. Dalam kromatografi partisi komponen yang dipisahkan secara selektif mengalami partisi antara lapisan cair tipis pada penyangga padat yang bertindak sebagai fase stasioner dan eluen yang bertindak sebagai fase gerak. Kromatografi hidrofobik, prinsip dari kromatografi ini berdasarkan pada interaksi antara residu hidrofobik pada permukaan protein dengan rantai alifatik atau aromatis dari adsorben (Scopes, 1987). Protein yang akan dimurnikan terlebih dahulu dijenuhkan dengan menggunakan garam. Enzim yang terikat pada matrik dielusi



dengan menggunakan eluen yang polaritasnya diturunkan (konsentrasi garam lebih rendah).

Kromatografi penukar ion memisahkan komponen yang berbentuk ion. Komponen ion-ion tersebut yang terikat pada penukar ion sebagai fase stasioner secara selektif akan terlepas atau terelusi oleh fase gerak. Dalam kromatografi filtrasi gel, kolom diisi dengan gel yang permeabel sebagai fase stasioner. Pemisahan berlangsung seperti proses pengayakan, yang didasarkan pada ukuran molekul dari komponen yang dipisahkan. kromatografi interaksi hidrofobik sudah umum digunakan untuk pemisahan protein.

## 2.7 Elektroforesis

Suatu protein yang bermuatan akan bergerak didalam medan listrik, peristiwa ini dikenal dengan elektroforesis, dapat digunakan untuk memisahkan protein. Kecepatan migrasi protein sangat tergantung pada kekuatan medan listrik, muatan protein dan koefisien gesek.

Pemisahan secara elektroforesis hampir selalu dilakukan didalam gel (atau penunjang padat seperti kertas), tidak dalam larutan. Hal ini dilakukan dengan dua alasan, yang pertama gel mengurangi muatan listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil, yang diperlukan agar pemisahan protein menjadi efektif. Yang kedua, gel bertindak sebagai saringan sehingga dapat meningkatkan daya pisah molekul protein. Molekul yang berukuran lebih kecil dari pori dapat bergerak dengan mudah didalam gel, sedangkan molekul yang besar hampir tidak dapat bergerak didalam gel. Molekul yang berukuran sedang dapat bergerak didalam gel sesuai dengan ukuran molekul protein. Media pilihan pada elektroforesis adalah gel poliakrilamida, sebab secara kimiawi bersifat inert dan dapat dibuat dengan mudah menggunakan akrilamid dan bis akrilamida(reagen pengikat) pada saat polimerisasi.

Setelah didenaturasi protein dapat dipisahkan berdasarkan masanya dengan elektroforesis gel poliakrilamida. Campuran protein mula-mula dicampur dengan larutan sodium dodesil sulfonat (SDS), suatu detergen anionik yang akan memutus



hampir semua interaksi kovalen dalam protein alami. Juga ditambahkan merkaptotanol atau ditioneitol untuk mereduksi ikatan disulfida. Anion SDS akan berikatan pada rantai utama dengan perbandingan satu SDS untuk setiap dua residu asam amino, sehingga terbentuk kompleks SDS dengan protein terdenaturasi yang bermuatan negatif tinggi yang secara kasar sebanding dengan masa molekul protein. Muatan negatif akibat pengikatan SDS ini umumnya lebih besar dari pada muatan protein alami, sehingga muatan negatif alami protein tidak penting lagi. Pada kompleks SDS-protein terdenaturasi kemudian dielektroforesis pada gel elektroforesis dari atas kebawah. Setelah terjadi pemisahan, protein didalam gel dapat diperlihatkan setelah diberi pewarnaan dengan perak atau dengan zat warna seperti biru coomassie, yang akan terlihat sebagai pita-pita (stryer, 2000).



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Selain itu penelitian juga dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2007 hingga bulan Juli 2007.

### 3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian diklasifikasikan menjadi peralatan gelas, instrumen, dan peralatan bukan gelas.

Peralatan gelas meliputi gelas kimia (beaker glass), pipet volume, pipet ukur Mohr, labu ukur, gelas ukur, seperangkat buret (statif dan *clamp*), dan labu erlenmeyer berbagai volume, pipet tetes Pasteur, tabung reaksi mikro dan makro beserta rak, tabung sentrifugasi, cawan petri (petridish), pengaduk gelas, pembakar Bunsen, corong Buchner, serta wadah gelas.

Instrumen meliputi *stirrer magnet* dan *spinbar*, *autoclave* dan *pressure gauge*, *airstream vertical laminar flow cabin* dengan lampu *ultra violet*, neraca analitik, *oven incubator*, *shaker incubator*, refrigerator, sentrifuse dingin, sentrifuse tabung reaksi, rotavator/*shaker*, pHmeter, *tube shaker*, *hot plate*, oven listrik, sentrifuse Eppendorf, spektrofotometer *ultra violet-visible* dengan kuvet, *rocking*, seperangkat alat elektroforesis (SDS-PAGE) dengan *power supply*, kamera digital, sistem komputerisasi dengan *printer* dan *scanner*, serta regulator voltase.

Peralatan bukan gelas yaitu termometer, *timer*, jarum ose, neraca lengan tunggal, gunting, tabung sentrifugasi berskala, spatula logam, pinset logam,



*microsyringe*, mikropipet, tip pipet (putih, kuning, biru), *ball* pipet, lemari asam, botol cuci, wadah aquades, bak alat, bak *staining* dan *destaining* gel, seperangkat minikolom kromatografi (kolom, penjepit selang, statif dan *clamp*), Eppendorf, wadah *autoclave*, *sprayer*, kompor LPG dan selang regulator.

### 3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini digolongkan menjadi kemikalia dan bahan pendukung.

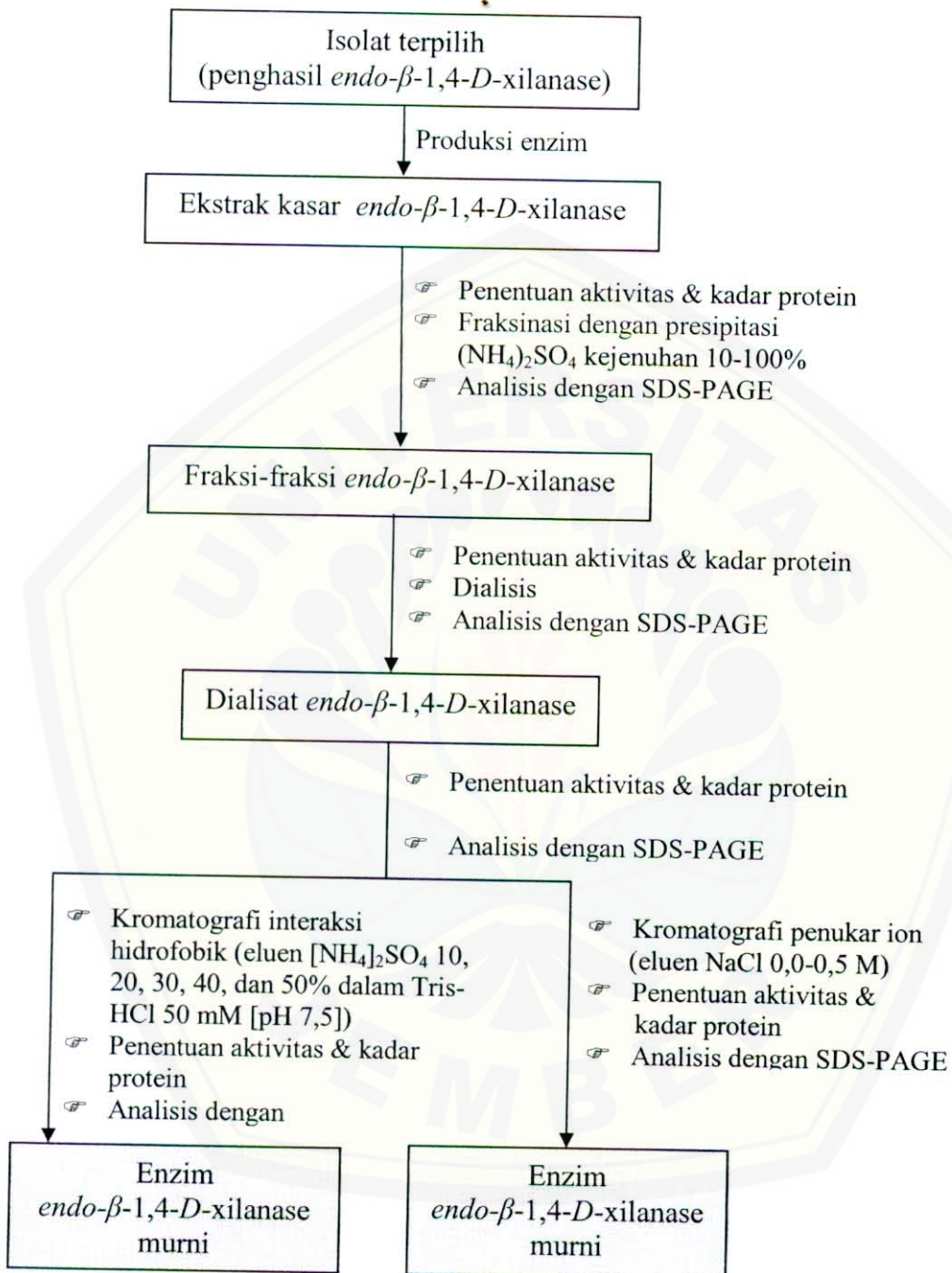
Kemikalia meliputi sodium klorida (NaCl), *oat-spelt xylan*, Tris-hidroksimetilaminometana ( $C_4H_{11}NO_3$ ), asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), sodium kalium tartrat, sodium sulfit ( $Na_2SO_3$ ), sodium hidroksida (NaOH), fenol ( $C_6H_5OH$ ), gliserol ( $C_3H_8O_3$ ), *D*-xilosa ( $C_5H_{10}O_5$ ), resin penukar ion, resin interaksi hidrofobik, *coomassie*<sup>®</sup> *brilliant blue* (CBB G-250 dan R-250), *bovine serum albumin* (BSA),  $(NH_4)_2SO_4$ , asam *o*-fosfat ( $H_3PO_4$ ), etanol absolut ( $C_2H_5OH$  95%), glisin ( $C_2H_5NO_2$ ), asam klorida (HCl), sodium dodesil sulfat (SDS), akrilamida ( $CH_2CHCONH_2$ ), *bis*-metilen akrilamida ( $[H_2C=CHCONH_2]CH_2$ ), tetrametil etilendiamina (TEMED;  $[CH_3]_2NCH_2-CH_2N[CH_3]_2$ ), ammonium persulfat (APS;  $[NH_4]_2S_2O_8$ ),  $\beta$ -merkptoetanol ( $HS[CH_2]_2OH$ ), asam asetat glasial ( $CH_3COOH$ ), *bromophenol blue* (BPB;  $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ ), metanol ( $CH_3OH$ ), dan marker protein.

Bahan pendukung meliputi kertas penyerap, kertas kayu, aquades, aquades demineralisasi, spiritus, alkohol teknis, kapas, benang pengikat, spidol *waterproof*, *aluminium foil*, label kertas, karet pengikat, kantung dialisis selofan, sarung tangan, kertas filter, teepol dan cairan anti lemak.

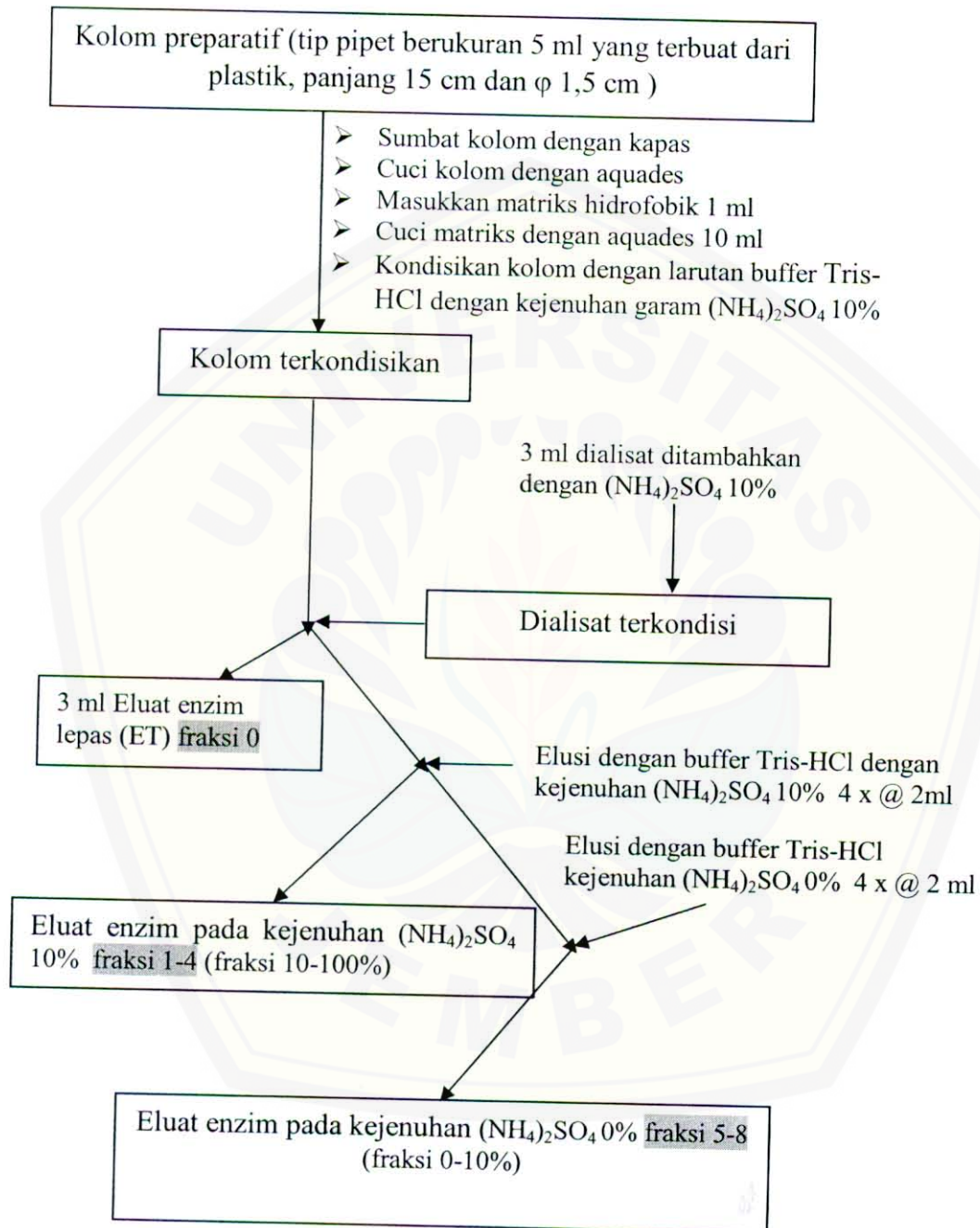
### 3.4 Desain dan Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini bersifat eksploratif laboratoris (*in vitro*) dengan pengulangan penentuan parameter sebanyak tiga kali. Ringkasan penelitian berupa diagram alir diberikan pada gambar 3.1 berikut.





Gambar 3.1. Diagram alir penelitian



Gambar 3.2. Skema Kerja Kromatografi Hidrofobik Kejenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10-0 %

### 3.5 Isolasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Sebanyak 1 *loop* isolat terpilih penghasil enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase (hasil penelitian yang lain) dicelupkan ke 5 ml media produksi (medium MELB yang disuplementasi xilan), diinkubasi goyang selama 6 jam (inokulum pertama) dan ditentukan aktivitasnya (metode sub bab 3.8). Sebanyak 0,25 ml inokulum pertama ditambahkan ke dalam 25 ml media produksi kemudian diinkubasi goyang selama 6 jam (inokulum kedua). Isolasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase selanjutnya dilakukan dengan mengambil sebanyak 25 ml inokulum kedua tersebut. Inokulum kedua kemudian selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 16913 g selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian digunakan sebagai ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Ekstrak kasar enzim selanjutnya ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya sesuai dengan metode pada sub bab 3.8 dan 3.9.

### 3.6 Optimasi Purifikasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

#### 3.6.1 Fraksinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan Dialisis

Fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dilakukan berdasarkan metode Roy *et al.* (2000) dan Puspaningsih *et al.* (2004) pada temperatur 4°C. Fraksinasi berupa presipitasi protein ekstrak kasar endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ini dilakukan secara diskontinyu melalui penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jenuh 10-100% (massa  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang ditambahkan dapat dilihat pada lampiran 2) dengan rentang 10% ke dalam ekstrak kasar endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Ekstrak kasar dengan berbagai prosentase kejenuhan dipresipitasikan dalam keadaan dingin seraya diaduk perlahan. Protein yang mengendap selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 16913 g selama 15 menit dengan temperatur 4°C sehingga akan diperoleh supernatan dan pellet protein. Pellet protein kemudian diresuspensi ke dalam buffer Tris-HCl. Suspensi pellet protein selanjutnya ditentukan aktivitas dan kadar protein menurut metode pada sub bab 3.8 dan 3.9. Suspensi pellet protein enzim dengan aktivitas spesifik tertinggi digunakan pada tahap dialisis. Fraksinasi dengan cara seperti ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui secara langsung fraksi optimum, dimana endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang



terpresipitasi pada konsentrasi kejenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  akan memiliki aktivitas spesifik tertinggi.

Dialisis terhadap supernatan dilakukan selama  $\pm 24$  jam dalam buffer Tris-HCl. Penggantian buffer dilakukan pada 2, 4, dan 6 jam setelah dialisis berlangsung. Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil dialisis (dialisat) ditentukan aktivitas dan kadar protein menurut metode pada sub bab 3.8 dan 3.9, serta dianalisis tingkat kemurniannya dengan elektroforesis pada sub bab 3.7.

### 3.6.2 Kromatografi Interaksi Hidrofobik

Tahap purifikasi berikutnya adalah kromatografi interaksi hidrofobik berdasarkan metode Puspaningsih (2004). Sebelum digunakan matrik dicuci dengan aquades dan dikondisikan dengan menggunakan larutan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dalam buffer Tris-HCl. Sebanyak 3 ml dialisat enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase jenuh dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dituangkan ke dalam kolom. Fraksi enzim yang tidak terikat pada resin ditampung hingga seluruh enzim teralirkan. Fraksi yang dapat terikat pada resin dipisahkan dengan mengalirkan larutan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dalam buffer Tris-HCl secara bergradien (10, 20, 30, 40, dan 50%) ke dalam kolom. Eluat berupa fraksi-fraksi ditampung sebanyak  $\pm 2$  ml. Seluruh fraksi baik yang terikat maupun tidak terikat pada resin ditentukan kadar proteinnya melalui pembacaan absorbansinya pada 280 nm dan ditentukan aktivitas enzimnya (metode sub bab 3.8). sebelum dilakukan purifikasi berikutnya, gabungan fraksi-fraksi yang menghasilkan aktivitas tinggi ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya, serta dianalisis tingkat kemurniannya dengan elektroforesis masing-masing menurut pada sub bab 3.8, 3.9, dan 3.7.

### 3.6.3 Kromatografi Penukar Ion

Tahap purifikasi selanjutnya adalah kromatografi penukar ion berdasarkan metode Puspaningsih (2004). Kromatografi ini menggunakan kolom yang berukuran sama pada kolom kromatografi interaksi hidrofobik. Sebelum digunakan matrik dicuci dengan aquades dan dikondisikan dengan menggunakan larutan buffer Tris-

HCl. Sebanyak 3 ml enzim dialisat endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dituangkan ke dalam kolom. Fraksi enzim yang tidak terikat pada resin ditampung hingga seluruh enzim teralirkan. Fraksi yang dapat terikat pada resin dipisahkan dengan mengalirkan gradien NaCl 0.0-1.0 M ke dalam kolom. Eluat berupa fraksi-fraksi ditampung sebanyak  $\pm$  2 ml. Seluruh fraksi baik yang terikat maupun tidak terikat pada resin ditentukan kadar proteinnya melalui pembacaan absorbansi pada 280 nm dan ditentukan aktivitas enzimnya (metode sub bab 3.8). Fraksi-fraksi yang menghasilkan aktivitas tinggi kemudian digabungkan untuk ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya, serta dianalisis tingkat kemurniannya dengan elektroforesis masing-masing menurut pada sub bab 3.8, 3.9, dan 3.7.

### 3.7 Penentuan Massa Molekul Relatif Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Massa molekul relatif ( $M_r$ ) endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase diketahui berdasarkan estimasi dengan elektroforesis protein SDS-PAGE (Puspaningsih *et al.*, 2003 dan 2004). Estimasi massa molekul relatif hasil elektroforesis diketahui dengan membandingkan pita migrasi protein dengan pita migrasi *marker*. Adapun tahapan elektroforesis tersebut adalah sebagai berikut.

#### 3.7.1 Preparasi Gel

Seluruh perangkat elektroforesis dicuci sampai bersih dengan detergen dan dibilas dengan aquades untuk menghilangkan kontaminasi dari protein lain. Lempengan kaca *sandwich* untuk mencetak gel dicuci dengan etanol, dikeringkan sampai bersih dan dicegah dari sentuhan tangan terbuka. Setelah kering, perangkat elektroforesis dirangkai sesuai dengan petunjuk (Bio-Rad, 2007). Setelah alat terangkai semua pada celah lempeng kaca diisi dengan aquades untuk memastikan cetakan tidak bocor.

Formulasi gel bawah (*separating gel* 12%; 2000  $\mu$ l akrilamid/bis, 1250  $\mu$ l buffer Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8], 50  $\mu$ l SDS 10%, 50  $\mu$ l APS 10%, 5  $\mu$ l TEMED, dan 1670  $\mu$ l aquades) segera dimasukkan ke dalam cetakan setelah aquades dalam



cetakan dibuang. Pembuatan gel bawah tidak boleh memenuhi cetakan karena harus disisakan untuk membuat gel atas (*stacking gel* 8%; 1650  $\mu\text{l}$  akrilamid/bis, 1250  $\mu\text{l}$  buffer Tris-HCl 0,5 M [pH 6,8], 50  $\mu\text{l}$  SDS 10%, 50  $\mu\text{l}$  APS 10%, 5  $\mu\text{l}$  TEMED, dan 2100  $\mu\text{l}$  aquades). Aquades ditambahkan ketika selesai menginjeksi gel bawah dengan tujuan untuk mempercepat polimerisasi akrilamida. Setelah gel bawah memadat (20-30 menit), aquades dihisap dan formulasi gel atas segera dituangkan dalam cetakan yang selanjutnya dipasang *comb* (sisir cetakan). *Comb* dilepas ketika gel atas telah mengalami polimerisasi atau mengalami pematangan. Celah (sumur) yang terbentuk akibat adanya *comb* dibersihkan dengan aquades dari sisa-sisa akrilamid yang tidak mengalami polimerisasi.

### 3.7.2 Preparasi Sampel Protein

sebanyak 40  $\mu\text{l}$  sampel ditambahkan dengan buffer sampel (2 ml SDS 10%, 5 ml  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  50%, 0,5 ml  $\text{HS}(\text{CH}_2)\text{OH}$ , 1 ml BPB 1%, dan 0,9 ml aquades dicampurkan ke dalam 0,6 ml Tris-HCl 1,0 M [pH 6,8]). Campuran ini dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit untuk mendenaturasi sampel.

### 3.7.3 Running SDS-PAGE

Seluruh komponen elektroforesis dirangkai sesuai dengan petunjuk (Bio-Rad, 2007) dan dilakukan pemeriksaan terhadap kebocoran pada kompartemen larutan buffer atas (*upper gel buffer*; 50 ml Tris-HCl 1,0 M [pH 6,8], 4 ml SDS 10%, aquades hingga 100 ml). Kompartemen diisi dengan larutan buffer elektrode atau *running buffer* (3 g  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , 14,4 g  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ , 1 g SDS, aquades hingga 1000 ml) hingga memenuhi kompartemen *upper* dan *lower* (75 ml Tris-HCl 2,0 M [pH 8,8], 4 ml SDS 10%, aquades hingga 100 ml). Sampel protein kemudian diinjeksikan ke dalam masing-masing sumur yang terbentuk (10 sumur) pada gel atas. Setelah semua selesai dilakukan kompartemen ditutup dan elektrode yang terdapat pada buffer atas dan buffer bawah masing-masing dihubungkan dengan kutub positif (anoda) dan kutub negatif (katoda) *power supply*. Voltase yang digunakan 100 V (konstan).



Elektroforesis selesai apabila warna biru *tracking dye* (BPB) telah mencapai sekitar 0,5 cm dari bagian gel bawah ( $\pm 45$  menit).

#### 3.7.4 Staining Gel

Setelah elektroforesis selesai, gel diambil dan perlahan-lahan dilepaskan dari kaca cetakan. Selanjutnya gel dimasukkan dalam wadah yang berisi larutan pewarna (*staining solution*; 1 g CBB R250, 450 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 100 ml  $\text{CH}_3\text{OOH}$ , aquades hingga 100 ml). Wadah digojok perlahan pada temperatur ruang hingga pewarna larutan dapat diikat oleh protein yang berada di dalam gel.

#### 3.7.5 Destaining Gel

Pewarna yang tidak terikat pada protein dilepaskan menggunakan larutan *destaining* (100 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 100 ml  $\text{CH}_3\text{OOH}$ , aquades hingga 100 ml) hingga pita-pita protein nampak jelas atau *back ground* menjadi berkurang selama beberapa kali penggantian larutan *destaining*. Penggojokan dilakukan untuk mempercepat proses pelepasan larutan pewarna yang tidak terikat pada protein.

### 3.8 Penentuan Aktivitas Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ditentukan berdasarkan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan (Puspaningsih *et al.*, 2003). Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  sampel enzim ditambahkan pada 100  $\mu\text{l}$  suspensi substrat *oat-spelt xylan* 0,5 % (b/v) dalam buffer pH yang menunjukkan aktivitas optimum enzim (hasil penelitian yang lain) dan diinkubasi bersama kontrol selama 60 menit pada 40°C. Sebanyak 600  $\mu\text{l}$  reagen DNS (Na-K tartrat, NaOH, DNS,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) kemudian ditambahkan pada campuran enzim-substrat yang telah diinkubasi. Campuran dan kontrol dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan secara langsung dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Satu unit endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang mampu menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  gula reduksi (ekivalen xilosa) dari xilan

dalam 1 menit untuk setiap 1 ml enzim. Kontrol merupakan campuran 100  $\mu$ l enzim, 600  $\mu$ l reagen DNS, dan 100  $\mu$ l suspensi substrat *oat-spelt xylan*. Larutan xilosa digunakan sebagai standar dan diperlakukan sama dengan sampel atau kontrol. Aquades digunakan sebagai blanko untuk mengganti xilosa.

### 3.9 Penentuan Kadar Protein Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase

Kadar Protein ditentukan berdasarkan metode Bradford (Bradford, 1976; Bollag *et al.*, 1996). Sebanyak 1000  $\mu$ l reagen kerja Bradford (100 mg CBB G250, 100 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, 50 ml C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 95%, aquades hingga 1000 ml) ditambahkan pada campuran 20  $\mu$ l sampel enzim dengan buffer hingga volume 100  $\mu$ l. Campuran kemudian diinkubasi selama 2-5 menit. Absorbansi dibaca pada 595 nm dengan standar larutan BSA. Blanko menggunakan aquades sebagai pengganti BSA.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Aktivitas ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-*D*-xilanase 0,048 U.ml<sup>-1</sup> dan mempunyai kadar protein 0,074 mg.ml<sup>-1</sup>
2. Fraksi kejenuhan garam (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% menghasilkan aktivitas dan kadar protein enzim endo- $\beta$ -1,4-*D*-xilanase tertinggi
3. Aktivitas dialisat yang diperoleh sebesar 0,070 U.ml<sup>-1</sup> dan mempunyai kadar protein 0,074 U.ml<sup>-1</sup>
4. Fraksi kejenuhan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% menghasilkan pola pelepasan enzim yang sesuai dengan harapan yaitu enzim mulai dilepaskan pada eluat ke 5 sampai ke 8.
5. Fraksi kejenuhan garam NaCl 0.5 M mampu menghasilkan pelepasan enzim dengan aktivitas tertinggi yaitu 0,582 U.ml<sup>-1</sup>
6. Kondisi optimum untuk pemurnian hidrofobik ditentukan dengan pola pelepasan enzim yang dimulai pada eluat ke 5 sampai ke 8, sedangkan untuk kromatografi penukar ion kondisi optimum ditentukan dengan aktivitas spesifik dari enzim yang tertinggi
7. Berat molekul enzim endo- $\beta$ -1,4-*D*-xilanase yang disekresikan oleh bakteri yang hidup dalam abdomen rayap mempunyai kisaran 45.000 – 66.200 Dalton





## 5.2 Saran

1. Bakteri terpilih pada tahap skrining ditentukan terlebih dahulu dengan menentukan indeks aktivitas terluas
2. Presipitasi dengan garam  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang dilakukan secara diskontinyu perlu dilengkapi atau didukung dengan presipitasi secara berseri pada fraksi yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi
3. Karakter enzim terutama muatan perlu dipelajari terlebih dahulu sebelum dilakukan pemurnian dengan kromatografi penukar ion skala besar
4. Pada penelitian berikutnya perlu dilakukan optimasi pemurnian dengan rentang yang lebih sempit sehingga diperoleh data yang lebih baik

DAFTAR PUSTAKA

- Balakrishnan, H., Srinivasan, M. C., and Rele, M.V. 1997. Extracellular Protease Activities in Relation to Xylanase Secretion in an Alkalophilic *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters** **19** (7, July) : 599–601.
- Balakrishnan, H., Srinivasan, M. C., Rele, M. V., Chaudari, K., and Chandwadkar, A. J. 2000. Effect of Synthetic Zeolites on Xylanase Production from an Alkalophilic *Bacillus* sp. **Current Science** **79** (1, July) : 95-97.
- Barry, V. C., and Dillon, T. 1940. Occurrence of Xylans in Marine Algae. **Nature** **146** : 620.
- Bedford, M. R., and Classen, H. L. 1992. The Influence of Dietary Xylanase on Intestinal Viscosity and Molecular Weight Distribution of Carbohydrates in Rye-Fed Broiler Chick. In Visser, J., van Someren, M. A. K., Beldman, G., and Voragen, A.G. J. (Eds.), **Xylan and Xylanases**. Amsterdam : Elsevier. pp. 361-370.
- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G. S. 2000a. Production and Characterization of Thermostable Xylanase and Pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology** **24** (6, June) : 396–402.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S. 2001. Microbial Xylanases and their Industrial Applications : a Review. **Applied Microbiology and Biotechnology** **56** (3-4, August) : 326-338.
- Biely, P. 1985. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology** **3** (11, November) : 286–290.
- Biely, P., Mackenzie, C. R., Puls, J., and Schneider, H. 1986. Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. **Biotechnology** **4** : 731–733.
- Bio-Rad. 2007. **Mini-Protean® 3 Cell Assembly Guide/ Mini-Protean® II Cell Assembly Guide**. Hercules : Bio-Rad (accessed online from url [http : //www.bio-rad.com/cmcc\\_upload/literature/37363/4006158B.pdf](http://www.bio-rad.com/cmcc_upload/literature/37363/4006158B.pdf); [//sosnick.uchicago.edu/biorad\\_gelcaster.pdf](http://sosnick.uchicago.edu/biorad_gelcaster.pdf)).
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. **Protein Methods (2<sup>nd</sup> edition)**. New York : Wiley-Liss a John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** **72** (1-2, May) : 248-254.



- CambridgeSoft Corp. 1998. **ChemSoftware ChemDraw (R) Version 5.5**. Cambridge : CambridgeSoft. Corp.
- Chanda, S. K., Hirst, E. L., Jones, J. K. N., and Percival, E. G. V. 1950. The Constitution of Xylan from Esparto Grass (*Stipa tenacissima*). **Journal of Chemical Society (resumed) 50 : 1287–1289**.
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophile Xylanases. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 29 (1, January) : 3-23**.
- Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. 1976. Hemicellulases, Their Occurrence, Purification, Properties and Mode of Action. In Tipson, R. S., and Horton, D. (Eds.), **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Volume 32**. New York : Academic Press. hal. 277–352.
- Dwidjoseputro D., 2003, **Dasar-Dasar Mikrobiologi**, edisi ke-4, Percetakan Karya Unipress, Jakarta, hal: 22-34
- Faulet, B. M., Niamké, S., Gonnety, J. T., and Kouame, L. P. 2006a. Purification and Biochemical Characteristics of a New Strictly Specific Endoxylanase from Termite *Macrotermes subhyalinus* Workers. **Bulletin of Insectology LIX (1, June) : 17-26**.
- Faulet, B. M., Niamké, S., Gonnety, J. T., and Kouamé, L. P. 2006b. Purification and Biochemical Properties of a New Thermostable Xylanase from Symbiotic Fungus, *Termitomyces* sp. **African Journal of Biotechnology 5 (3, February) : 273-282**.
- Harris ELV. 1989. **Concentration of the extract. Didalam harris ELV, Angal S, Editor protein purification Methods. Apractical Approach**. Oxford : IRL PC Hlm 125-161.
- Jeffries, T. W., Yang, V. W., and Danis, M. W. 1998. Comparative Study of Xylanase Kinetics using Dinitrosalicylic, Arsenomolybdate, and Ion Chromatographic Assays. **Applied Biochemistry and Biotechnology 70 : 257-265**.
- Kuhad, R. C., and Singh, A. 1993. Lignocellulosic Biotechnology : Current and Future Prospects. **Critical Reviews of Biotechnology 13 (2) : 151–172**.
- Kulkarni, N., Shendye, A., and Rao, M. 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 23 : 411–456**.
- Lehninger, A. L. 1997. **Dasar-Dasar Biokimia I (cet. kelima)**. Terjemahan Thenawidjaja, M. dari *Principles of Biochemistry* (1982). Jakarta : Erlangga.



- Lin, L. L., and Thomson, J. A. 1991. An Analysis of the Extracellular Xylanases and Cellulases of *Butyrivibrio fibriosolvens* H17c. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 84 : 197–204.
- Miller, G. L. 1959a. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** 31 (3, March) : 426-428.
- Miller, G. L. 1959b. Protein determination for Large Numbers of Samples. **Analytical Chemistry** 31 (5, May) : 964.
- Miller, J. C., and Miller, J. N. 1991. **Statistics for Analytical Chemistry**. Chichester : Ellis Horwood.
- Myles, T. G. 2007. Proposed Taxonomy of the Order Isoptera. Toronto : Urban Entomology Program Centre for Urban and Community Studies University of Toronto (**accessed online from url [http : //www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm/](http://www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm/)**).
- Nandika, D., Adijuwana, H., dan Rizal, E. S. 1995. Karakteristik Saluran Pencernaan Rayap Kayu Kering *Cryptotermes cynocephalus* Light. (Isoptera : Kalotermitidae). **Jurnal Biosains** 1 (2, Juli) : 7-10.
- Pandey, S. N., and Sinha, B. K. 1997. **Plant Physiology**. New Delhi : Vikas Publishing House PVT LTD.
- Purwadaria, T., Ardiningsih, P., Ketaren, P. P., dan Sinurat, A. P. 2004. Isolasi dan Penapisan Bakteri Xilanolitik Mesofil dari Rayap. **Jurnal Mikrobiologi Indonesia** 9 (2, September).
- Puspaningsih, N. N. T., Achmadi, S. S., Suhartono, M. T., and Suwanto, A. 2003. Identification of Xylan-Digesting Enzymes from *Bacillus thermoleovorans* IT-08 to Produce Xylose for Use in Food Industry. **Proceeding of International Conference on Functional and Health Food : Market, Technology and Health Benefit, Yogyakarta, 26<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> August, 2003, 11 p.**
- Puspaningsih, N. N. T. 2004. Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08. **Disertasi Program Studi Biologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor**. Bogor : Institut Pertanian Bogor. 119 hal.
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. **Buletin AgroBio** 5 (1) : 29-36.
- Rismayadi, Y. 2000. Dunia Kehidupan Rayap. **Makalah Pribadi Pengantar ke Falsafah Sains (PPS702)**. Bogor : Sekolah Pasca Sarjana/S3 Institut Pertanian Bogor.
- Roy, N., Okai, N., Tomita, T., Muramoto, K., and Kamio, Y. 2000. Purification and some Properties of High-Molecular-Weight Xylanases, the Xylanases 4 and 5 of

- Aeromonas caviae* W-61. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 64 (2, February) : 408-413.
- Scopes RK. 1987. *Protein purification principles and Practice*. Edisi ke-2. New York : Springer Verlag.
- Somogyi, M. 1952. Notes on Sugar Determination. **Journal of Biological Chemistry** 195 (1, March) : 19-23.
- Sri R., Hadioetomo, Teja I., Sutarmi S., Lestari S. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. UI Press. Jakarta.
- Styer, L. 2000. *Biochemistry*. New York. New York and Basingstoke
- Subramaniyan, S., and Prema, P. 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnology** 22 (1, May) : 33-64.
- Sunna, A., and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology** 17 : 39-67.
- Takahashi, H., Nakai, R., and Nakamura, S. 2000. Purification and Partial Characterization of a Basic Xylanase Produced by Thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 64 (4, April) : 887-890.
- Tarumingkeng, R. C. 2001. **Biologi dan Perilaku Rayap**. Bogor : Program Studi Ilmu Hayati Institut Pertanian Bogor.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sandquist, J., and Linko, M. 1994. Xylanases in Bleaching: from an Idea to the Industry. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters** 13 (2-3) : 338-350.
- Whistler, R. L., and Richards, E. L. 1970. Hemicelluloses. In Pigman, W., and Horton, D. (Eds.), **The Carbohydrates, 2a**. New York : Academic Press. pp. 447-469.
- Whitaker, J. R. 1994. **Principles of Enzymology for the Food Sciences (2<sup>nd</sup> ed.)**. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms : Functions and Applications. **Microbiological Reviews** 52 (3, September) : 305-317.
- Wong, K. K. Y., and Saddler, J. N. 1992. *Trichoderma* Xylanases, their Properties and Purification. **Critical Reviews in Biotechnology** 12 (5-6) : 413-435.

Xu, F. 2005. Review. Applications of Oxidoreductases : Recent Progress. **Industrial Biotechnology 1 (1, March) : 38-50.**





## Lampiran 1

Teknik-Teknik Pemisahan dan Purifikasi Enzim *Endo-β-1,4-D-Xilanase*

No	Sumber Enzim	Teknik Purifikasi	Pustaka
1	<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	Media cair (xilosa)-homogenisasi-presipitasi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -dialisis-kromatografi kolom (karboksimetil-Toyopearl 650M)-SDS-PAGE-IEF-zimogram	Takahashi <i>et al.</i> (2000)
2	<i>Bacillus</i> sp. NCL 87-6-10	Filtrat kultur-homogenisasi-kromatografi kolom (karboksimetil-Sephadex)-kromatografi kolom (fenil-Sepharose)-elektroforesis preparatif	Balakrishnan <i>et al.</i> (2000)
3	<i>Bacillus thermoleovorans</i> IT-08	Medium cair ( <i>oat-spelt xylan</i> )-homogenisasi-presipitasi aseton (0-70% kejenuhan)-SDS-PAGE-zimogram	Puspaningsih <i>et al.</i> (2003)
4	<i>Bacillus thermoleovorans</i> IT-08	Media cair ( <i>oat-spelt xylan</i> )-presipitasi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0-30% kejenuhan)-kromatografi interaksi hidrofobik (Butyl-Toyopearl 650M)-kromatografi penukar ion (DEAE-Toyopearl 650M)-SDS-PAGE-zimogram	Puspaningsih <i>et al.</i> (2004)
5	<i>Termitomyces</i> sp. (fungi simbiotik rayap)	Homogenisasi-sonikasi-kromatografi penukar anion (DEAE-Sepharose CL-6B)-kromatografi penukar ion (karboksimetil-Sepharose CL-6B)-presipitasi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0-80% kejenuhan)-kromatografi kolom (Sephacryl S-200 HR)-kromatografi kolom (fenil-Sepharose CL-4B)-dialisis-SDS-PAGE-nativ PAGE-filtrasi gel sistem HPLC (TSK, QC-PAK GFC 200)	Faulet <i>et al.</i> (2006a)
6	Rayap pekerja <i>Macrotermes subhyalinus</i> Rambur.	Homogenisasi-kromatografi penukar anion (DEAE-Sepharose CL-6B)-kromatografi filtrasi gel (Sephacryl S-200 HR)-kromatografi penukar ion (karboksimetil-Sepharose CL-6B)-kromatografi kolom (fenil-Sepharose CL-4B)	Faulet <i>et al.</i> (2006b)



**Lampiran 3.****Pembuatan buffer dan substrat**

## 1. Pembuatan buffer fosfat sitrat

A. 0,1 M larutan asam sitrat dibuat dengan melarutkan 19,21 g menjadi 1000 ml

B. 0,2 M larutan natrium fosfat dengan melarutkan 53,65  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  menjadi 1000 ml atau 71,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dalam 1000 ml

Pencampuran larutan A dan larutan B untuk membuat 100 ml

A (ml)	B (ml)	pH
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3,0
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4,0
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	13,3	4,6
25,2	24,8	4,8
24,3	25,7	5,0
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21,0	29,0	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6,0
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4
13,6	36,4	6,6
9,1	40,9	6,8
6,5	43,6	7,0

## 2. Larutan buffer Tris-HCl

A : Larutan  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  0,1 M (12,1 gram dalam 1000 ml)

B : HCl 0,1 M



50 mL A + x mL B, diencerkan hingga 100 ml.

x	pH
46,6	7,0
44,7	7,2
42,0	7,4
38,5	7,6
34,5	7,8
29,2	8,0
22,9	8,2
17,2	8,4
12,2	8,6
8,5	8,8
5,7	9,0

3. Larutan buffer glisin-NaOH

A : Larutan  $C_2H_5NO_2$  0,2 M (15,01 gram dalam 1000 ml)

B : NaOH 0,2 M

50 ml A + x ml B, diencerkan hingga 200 ml.

x	pH
8,8	9,0
12,0	9,2
16,8	9,4
22,4	9,6
27,2	9,8
32,0	10,0

4. Reagen DNS

10 g NaOH ditambah dengan 182 g Na/K tartrat, ditambahkan phenol 2 g dan 0,5 g Na sulfit, dilarutkan dengan aquades 60 0ml dan diaduk dengan

magnetik setirer sampai semua larut dan secara perlahan ditambahkan 10 g DNS, setelah DNS larut tambahkan aquades samapi volum larutan 1000 ml.

5. Substrat xilan  
10 ml buffer tris-HCl ditambahkan dengan xylan 0,1 g dan aduk sampai semua xilan larut.
6. Larutan kerja akrilamid (30% T, 2,67% C, 100 ml)  
Sebanyak 29,2 g akrilamid dan 0,8 g bis-akrilamid dilarutkan dalam aquades hingga 100 ml. Larutan diaduk hingga larut sempurna. Larutan diletakkan dalam botol berwarna gelap dan disimpan dalam refrigerator untuk maksimum 30 hari.
7. Larutan kerja ammonium persulfat 10% (b/v, 5 ml)  
Sebanyak 0,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  dilarutkan dalam 5 ml aquades. Larutan kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan disimpan dalam refrigerator untuk 30 hari.
8. Larutan kerja SDS 10% (b/v, 100 ml)  
Sebanyak 10 g SDS dilarutkan dalam 90 ml aquades dengan pengadukan lambat. Larutan SDS dibuat hingga 100 ml melalui penambahan air deionisasi. Larutan disimpan pada temperatur kamar.
9. Larutan kerja buffer sampel (5 x pakai, 10 ml)  
Sebanyak 2 ml SDS 10%, 5 ml gliserol 50%, 0,5 ml 2-merkaptotanol, 1 ml *bromophenol blue* 1%, dan 0,9 ml aquades dicampurkan kedalam 0,6 ml Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8). Buffer disimpan dalam refrigerator untuk 7 hari atau pada  $-20^\circ\text{C}$  untuk 30 hari.
10. Larutan kerja buffer *stacking gel/upper* (4 x pakai, 100 ml)  
Sebanyak 50 ml Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8) dan 4 ml SDS 10% dicampurkan kedalam 46 ml aquades. Larutan disimpan dalam refrigerator untuk 30 hari.
11. Larutan kerja buffer *separating gel/lower* (4 x pakai, 100 ml)

Sebanyak 75 ml Tris-HCl 2,0 M (pH 8,8) dan 4 ml SDS 10% dicampurkan kedalam 21 ml aquades. Larutan disimpan dalam refrigerator untuk 30 hari.

12. Larutan kerja buffer elektrode/elektroforesis/*running* (10 x *running*, 1000 ml, pH 8,3)

Sebanyak 3 g Tris, 14,4 g glisin, dan 1 g SDS dilarutkan dalam aquades hingga 1000 ml. Buffer disimpan pada temperatur kamar.

13. Larutan stok gliserol 50% (v/v, 100 ml)

Sebanyak 50 ml gliserol 100% diencerkan dalam 50 ml aquades.

14. Larutan stok *bromophenol blue* 1% (b/v, 10 ml)

Sebanyak 100 mg *bromophenol blue* dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml seraya diaduk. Filtrasi dilakukan untuk menyingkirkan agregat.

15. Larutan kerja *staining*

Sebanyak 1 g CBB R 250 dilarutkan dalam 450 ml etanol. Larutan kemudian ditambahkan 450 ml aquades dan 100 ml asam asetat glasial.

16. Larutan kerja *destaining*

Sebanyak 100 ml metanol dicampurkan kedalam 100 ml. Asam asetat glasial dan 800 ml aquades.

17. Larutan stok Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8, 100 ml)

Sebanyak 12,1 g Tris dilarutkan dalam 50 ml aquades dan ditambahkan HCl pekat hingga pH 6,8 (sekitar 8,0 ml). Larutan didiamkan hingga dingin pada temperatur kamar, sehingga pH akan meningkat. Larutan dibuat menjadi 100 ml melalui penambahan aquades.

18. Larutan stok Tris-HCl 2,0 M (pH 8,8, 100 ml)

Sebanyak 24,2 g Tris dilarutkan dalam 50 ml aquades dan ditambahkan HCl pekat secara perlahan hingga pH 8,8 (sekitar 4,0 ml). Larutan didiamkan hingga dingin pada temperatur kamar, sehingga pH akan meningkat. Larutan dibuat menjadi 100 ml melalui penambahan aquades.

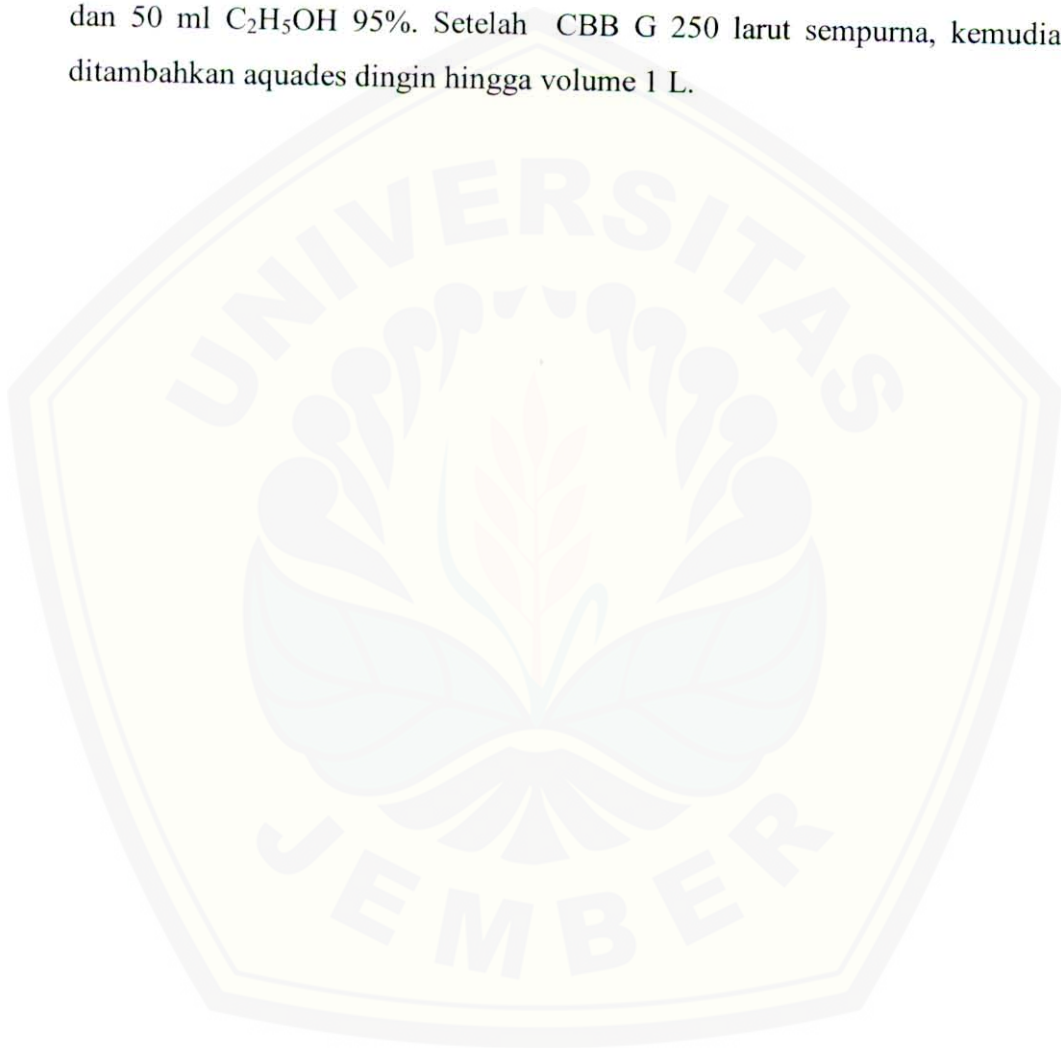
19. Larutan stok disodium EDTA 5 mM (500 ml)



Sebanyak 0,9304 gram disodium EDTA dilarutkan dalam aquades hingga 500 ml.

20. Reagen warna Bradford (buffer kerja Bradford) metode Stoschek (1990)

Sebanyak 100 mg CBB G 250 dilarutkan dalam campuran 100 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% dan 50 ml  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  95%. Setelah CBB G 250 larut sempurna, kemudian ditambahkan aquades dingin hingga volume 1 L.



**Lampiran 4.****Preparasi Kantung Dialisis**

Kantung dialisis dapat mengandung beberapa kontaminan kimiawi dan biologis selama proses pembuatannya. Untuk menyingkapkan kontaminan tersebut, maka kantung dialisis perlu dicuci. Kantung dialisis dipotong sepanjang 10 – 20 cm dan dipanaskan hingga mendidih ( $\pm$  10 – 30 menit) dalam sejumlah volume larutan cuci. Kantung dialisis kemudian dibilas dengan aquades dan dipanaskan kembali hingga mendidih dalam larutan 1 mM EDTA (pH 8,0). Kantung dialisis kemudian dibiarkan dingin dan disimpan dalam larutan EDTA 1 mM tersebut pada temperatur 4 °C untuk mencegah kontaminasi mikroba.

Sebelum digunakan, kantung dialisis dikeluarkan dari larutan EDTA 1 mM dan dibilas bagian luar dan dalamnya dengan aquades. Seluruh perlakuan terhadap kantung dialisis dilakukan secara hati-hati dan pengguna diwajibkan mengenakan pelapis tangan.

Larutan cuci kantung dialisis mengandung  $\text{NaHCO}_3$  2 % (b/v) atau 10 mM dan EDTA 1 mM (pH 8,0). 1 mM NaOH digunakan untuk menjaga pH hingga konstan.

## Lampiran 5.

## Formulasi Gel SDS-PAGE

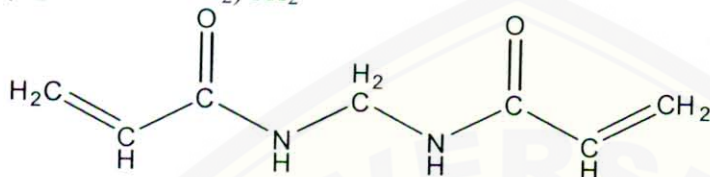
Bahan	Bollag dan Edelstein (1996)
Polimer gel (30 % T; 2,67 % C)	Akrilamid 29,2 g + bis 0,8 g + aquades hingga 100 ml
SDS 10 % (b/v)	10 g/100 ml aquades
Ammonium persulfat 10 % (b/v)	0,5 g/5 ml aquades
Buffer separating gel/lower	
2,0 M	24,2 g Tris + x ml HCl + aquades hingga 100 ml
1,5 M	75 ml Tris-HCl 2 M (pH 8,8) + 4 ml SDS 10 % (0,4 %) + aquades 21 ml (4 x pakai)
Buffer <i>stacking gel/upper</i>	
1,0 M	12,1 g Tris + x ml HCl + aquades hingga 100 ml
0,5 M	50 ml Tris-HCl 1 M (pH 6,8) + 4 ml SDS 10 % (0,4 %) + 46 ml aquades (4 x pakai)
Gliserol 50 % (v/v)	50 ml (100 %)/50 ml aquades
Bromophenol blue 1 % (v/v)	100 mg/10 ml aquades
Buffer elektrode/elektroforesis/ <i>running</i> (pH 8,3)	
Tris	3,0 g (25 mM)
Glisin	14,4 g (192 mM)
SDS	1,0 g (0,1 %)
H <sub>2</sub> O	hingga 1000 ml (10 x running)
Buffer sampel ( <i>SDS Reducing Buffer</i> )	
Tris-HCl	0,6 ml 1,0 M (60 mM; pH 6,8)
SDS 10 %	2,0 ml (2 %)
Gliserol	5,0 ml 50 % (25 %)
2-merkaptotanol	0,5 ml (14,4 mM)
Bromophenol blue 1 %	1,0 ml (0,1 %)
H <sub>2</sub> O	0,9 ml
DTT 1,0 M	
Larutan <i>staining</i> stok	
CBB R 250	1 g
Metanol	450 ml
Asam asetat glasial	100 ml
Aquades	450 ml
Larutan <i>destaining</i> stok	
Metanol	100 ml
Asam asetat glasial	100 ml
Aquades	800 ml



## Lampiran 6.

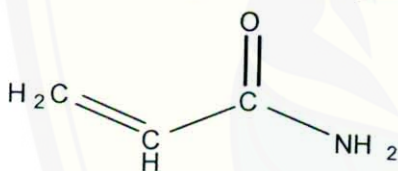
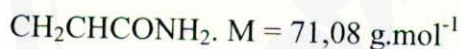
## Spesifikasi Reagen-Reagen Penelitian

1. *N,N'*- Metilenbisakrilamid, *N,N'*- Metylen – bis - (acrylsäureamid),  
*N,N'*- Methylenebisacrylamide (electrophoresis grade, 99+%, Aldrich)  
 $(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH}_2)_2\text{CH}_2$



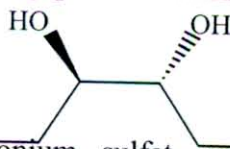
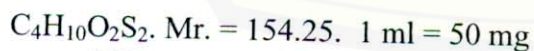
metilen-bis(akrilamid)

2. Akrilamid, acrylamid, acrylamide, acrylic acid amide, propenamide  
 (electrophoresis grade,  $\geq 99.9\%$ , Merck)



akrilamid

3. DTT, 1,4-Dithiothreitol, DL-threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol, threo-2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutane, 1,4-dithio-DL-threit, 1,4-dithio-DL-threitol, Cleland's reagent racemic, ( $\pm$ )-threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol, 4,5-dihydroxy-1,2-dithiane ( $> 99.9\%$ , Fluka-Biochemika)



4. Ammonium sulfat, ammoniumsulfat, ammonium sulfate, ammonio solfato, amonio sulfato, ammoniumsulfaat (pro analysi, min. 99%, Riedel-de Haën)  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .  $M = 132, 14 \text{ g/mol}$ .

5. Asam klorida 32%, muriatic acid, salzsäure, hydrochloric acid, acide chlorhydrique, acido cloridrico, zoutzuur, saltsyre, acido clorhídrico (GR for analysis, min 32%, Merck)

HCl.  $M = 36,46 \text{ g/mol}$ . 1 L = 1.15 kg

6. Metanol, methanol, methanol, méthanol, alcole metilico, metanol, metanolo, méthanol, methanol (IMO, ICAO), methyl alcohol, carbinol, wood spirit, wood alcohol (GR for analysis, min 99.8%, Merck).

$\text{CH}_3\text{OH}$ .  $M = 32.04 \text{ g/mol}$ . 1 L = 0.79 kg.

7. Asam sulfat 95–97%, vitriol oil, schwefelsäure, sulfuric acid, acide sulfurique, oleum, acido solforico, Ácido sulfúrico, zwavelzuur, svovlsyre, sulphuric acid (IMO), sulphuric acid (ICAO), fuming (GR for analysis, 95–97%, Merck).

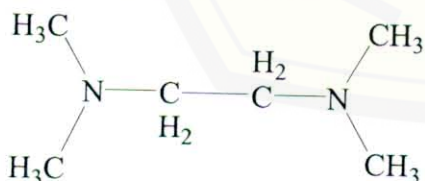
$\text{H}_2\text{SO}_4$ .  $M = 98.08 \text{ g/mol}$ . 1 L = 1.84 kg.

8. Natrium hidroksida, soda caustik, sodium hydrate, natriumhydroxid, sodium hydroxide, sodium hydroxyde, sodio idrato, natriumhydroxide, sodio hidróxido, caustic soda, soda lye (purified, min 98%, Riedel-de Haën).

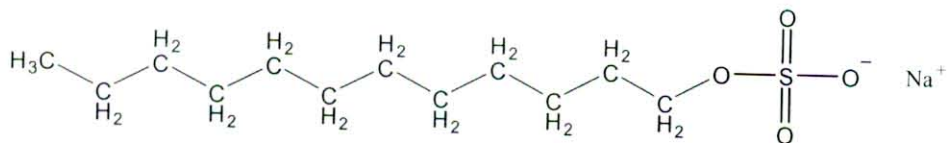
$\text{NaOH}$ .  $M = 40,00 \text{ g/mol}$ .

9. TEMED, *N, N, N', N'* - Tetramethylethylendiamin, *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,2-diaminoethane, *N, N, N', N'* -Tetramethylethylenediamine, *N,N,N',N'*-Tetrametiletilendiamina, 1,2-bis(dimethylamino)ethane, TMEDA (for synthesis, > 98%, Merck)

$(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_2\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_2$ .  $M = 116,21 \text{ g/mol}$ .



10. SDS, dodecylsulfat natriumsalz, dodecyl sulfate sodium salt, sodium lauryl sulfate, dodecyl sodium sulfate, irium (LAB, > 99.9%, Merck).



sodium dodesilsulfat

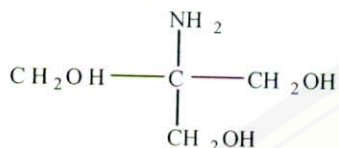
$[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-]\text{Na}^+$ .  $M = 288,38 \text{ g/mol}$

11. Asam asetat glasial, essigsäure (eisessig) 100%, acetic acid, acide acétique (crystallisable) 100%, acido acetico (glaciale) 100%, acido acético (glacial) 100%, acetic acid glacial (IMO, ICAO) (glacial, GR for analysis, min 99,8%, Merck).  
 $\text{CH}_3\text{COOH}$ .  $M = 60,05 \text{ g/mol}$ . 1 L = 1,05 kg.
12. 2-merkapttoetanol, 2-mercaptoethanol,  $\beta$  - mercaptoethanol, 2-hydroxy-1-ethanethiol, 2-hydroxyethylmercaptan, monothioethyleneglycol, thioglycol (pro analysi, Merck)  
 $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .  $M = 78,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . 1 L = 1,12 kg
13. BSA, albumin from bovine serum, bovine albumin, serum albumin, albumin, from bovine, albuminate (obsolete), albuminar, albumisol, albuspan, buminat, pro-bumin, proserum ( $\geq 97.0\%$  protein content, Fluka-Biochemika)  
 $M_r = \sim 67000$  (lit.)
14. Gliserol 99%, glyceryn, glycerin, glycerol, glycérine, glycérol, glycerine, glicerina, 1,2,3-propanetriol, trihydroxypropane (extra pure, min. 98–101%, BDH)  
 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ .  $M = 92,09 \text{ g/mol}$ . 1 L = 1,26 kg
15. APS, Ammonium persulfat, PER, ammoniumperoxodisulfat, ammonium peroxodisulfate, ammonium peroxodisulfaat, ammonium peroxodisulfat, ammonio perossodisolfato, amonio peroxodisulfato, amónio peroxodisulfato (pro analysi, min. 98%, Merck).  
 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .  $M = 228,20 \text{ g/mol}$
16. Tris, Tris(hidroksimetil)aminometan, Trizma<sup>®</sup> baze, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (trometamol), trisamine, trimethylolaminomethane, tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (trométamol), Tris-Steril, Tham-E, tris



amino, THAM, Tromethane, talatrol, tromethamine, TRIS, tris buffer, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, tris(hydroxymethyl)-aminomethane, tris(hydroxymetil)-aminometano (buffer substance, pro analysi, min. 99,8%, Merck).

$C_4H_{11}NO_3$ .  $M = 121,14$  g/mol.  $pH_{0,1M} = 10,4$ .  $pH$  7,0 – 9,0.  $pK_a$  (25 °C) 8,1.

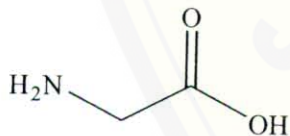


17. Natrium bikarbonat, sodium hydrogen carbonate, sodium bicarbonate, sodium hydrogen, sodium carbonic acid, backing soda, natrium hidrogen karbonat, natrium bicarbonat, hidrogéno carbonate de sodium, natrium bicarbonaat, natrium hidrogen karbonat, natriumhydro karbonat, bicarbonato disodio, hydrogenocarbonato de sodio, hídrogenocarbonato de sódio (pro analysi, min. 99,5%, Merck)

$\text{NaHCO}_3$ .  $M = 84,1$  g/mol.  $1 \text{ L} = 1,71$  kg

18. Glisin, glycin, glycine, glicina, Gly, aminoethanoic acid, aminoacetic acid, glycocoll, glycosthene (buffer substance, pro analysi, min. 99,7%, Riedel-de Haën)

$C_2H_5NO_2$ .  $M = 75,07$  g/mol



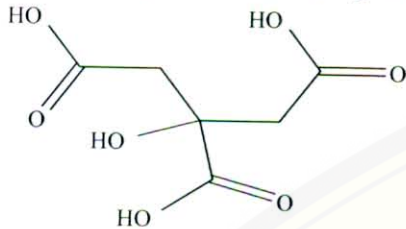
19. Asam fosfat 85%, *ortho*-phosphorsäure, *ortho*-phosphoric acid, acide *ortho*-phosphorique, acido-*orto*-fosforico, *ortho*-Fosforzuur, *ortho*-Phosphorsyre, acido *orto*-fosfórico, phosphoric acid (chem. pure, Riedel-de Haën)

$\text{H}_3\text{PO}_4$ .  $M = 98,00$  g/mol.  $1 \text{ L} = 1,71$  kg

20. Asam sitrat, citronensäure-1-hydrat, citric acid-1-hydrate, acide citrique-1-hydrate, acido citrico-1-idrato, acido cítrico-1-hidrato, 2-hydroxy-1,2,3-

propanetricarboxylic acid,  $\beta$ -hydroxytricarballic acid (buffer substance, reagent grade, min. 99,5%, Riedel-de Haën)

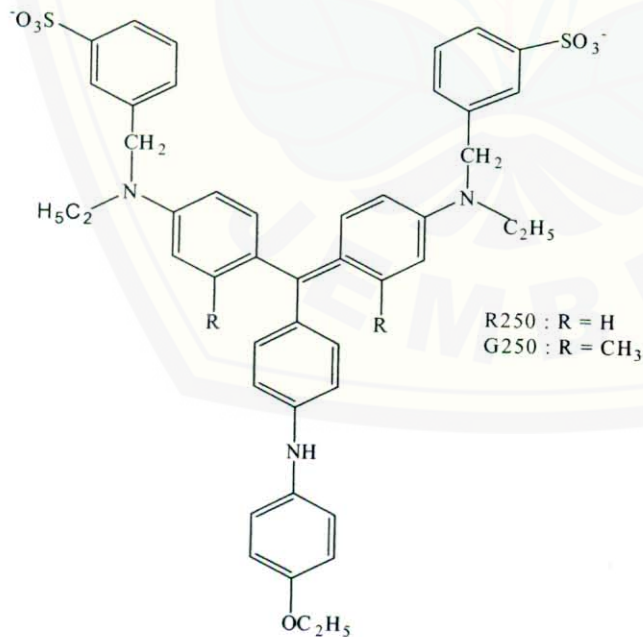
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ .  $M = 210,14 \text{ g/mol}$ .



21. CBB G 250, coomassie<sup>®</sup> brilliant blue G 250, coomassie<sup>®</sup> brilliantblau G 250, bleu brillant coomassie<sup>®</sup> 250, coomassie<sup>®</sup> briljantblauw G 250, blu brillanto G coomassie<sup>®</sup> 250, azul brilanto G coomassie<sup>®</sup> 250, acid blue 90 (Fluka-Biochemika)

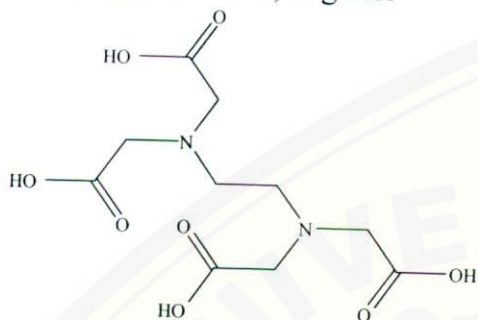
CBB R 250, brilliant blue R, brilliant blue R 250 (Sigma-Aldrich), coomassie<sup>®</sup> brilliant blue R 250, acid blue 83, brilliant indocyanin 6B

$C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$ .  $M = 826,0 \text{ g.mol}^{-1}$



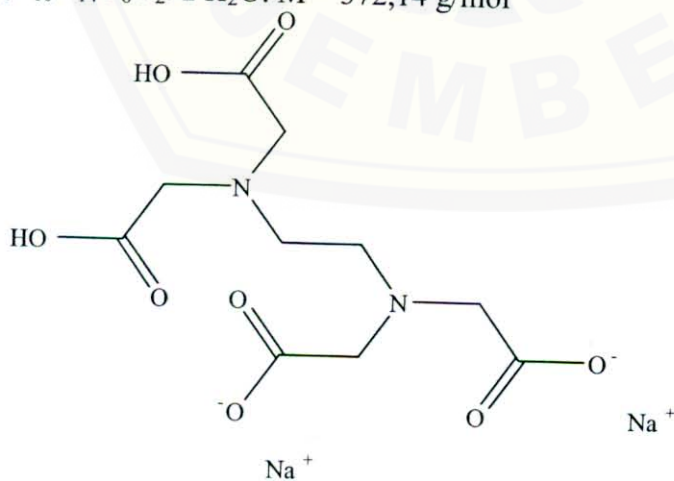
22. EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, versene, Idranal<sup>®</sup> II EDTA, edathamil, complexone II<sup>®</sup>, (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid, havidote, edetic acid, *N-N'*-1,2-ethanediybis[*N*-(carboxymethyl)glycine] (Riedel-de Haën)

$C_{10}H_{16}N_2O_8$ .  $M = 292,25$  g/mol



23. Disodium EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA disodium, disodium ethylenediaminetetraacetate, endrate disodium, cheladrate, EDTA disodium salt dihydrate, edathamil, edathamil disodium, disodium edathamil, tetracemate disodium, (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid disodium salt, EDTA, Chelaplex III, Titriplex III, Versene disodium salt dihydrate, complexone III<sup>®</sup>, sequestrene Na<sub>2</sub>, disodium EDTA dihydrate, dihydrate disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate, edetic acid disodium salt, edetate disodium salt, disodium edetate, ethylenebis(iminodiacetic acid) disodium salt, Idranal<sup>®</sup> III (Riedel-de Haën)

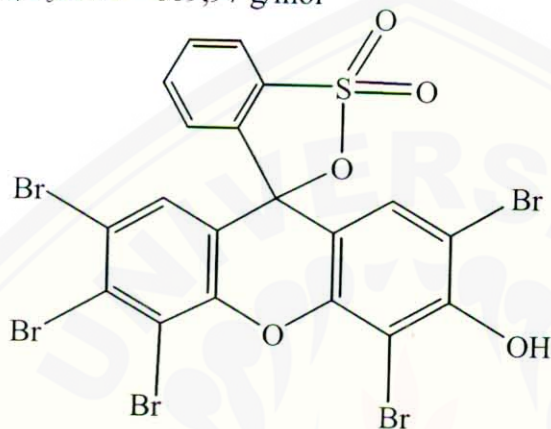
$Na_2C_{10}H_{14}O_8N_2 \cdot 2 H_2O$ .  $M = 372,14$  g/mol





24. BPB, bromophenol blue, 3',3'',5',5''(tetrabromphenolsulfonephthalein), bromphenol blau, bromphenol blue indicator, bleu de bromophénol indicateur, blu bromofenolo, broomfenolblauw, bromphenol blá, azul de bromofenol (Riedel-de Haën).

$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ .  $M = 669,97 \text{ g/mol}$



25. Etanol, ethanol absolut, ethanol absolute, ethanol absolu, ethanollo assoluto, ethanol absoluut, etanol absoluto, ethyl alcohol, alcool ethyl, alcohol anhydrous (pro analysi, min. 99,8%, Merck).

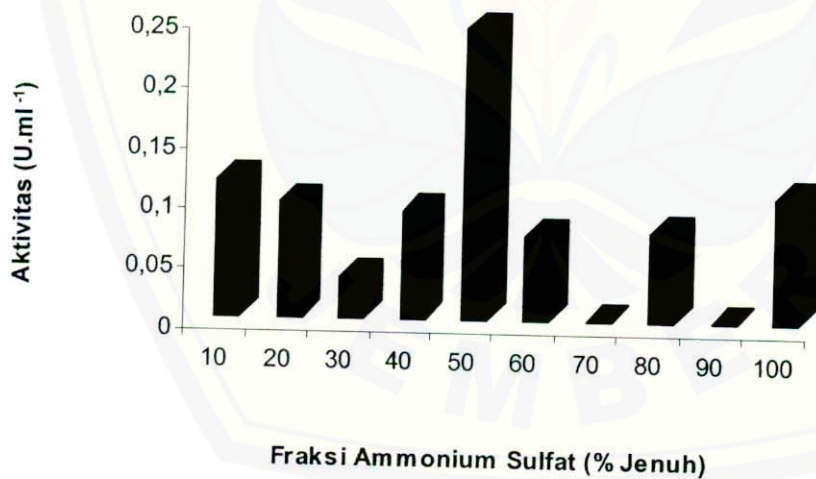
$C_2H_6O$ .  $M = 46,07 \text{ g. mol}^{-1}$ .  $1 \text{ L} = 0,788 \text{ kg}$ .

## Lampiran 7.

## Data-data penelitian

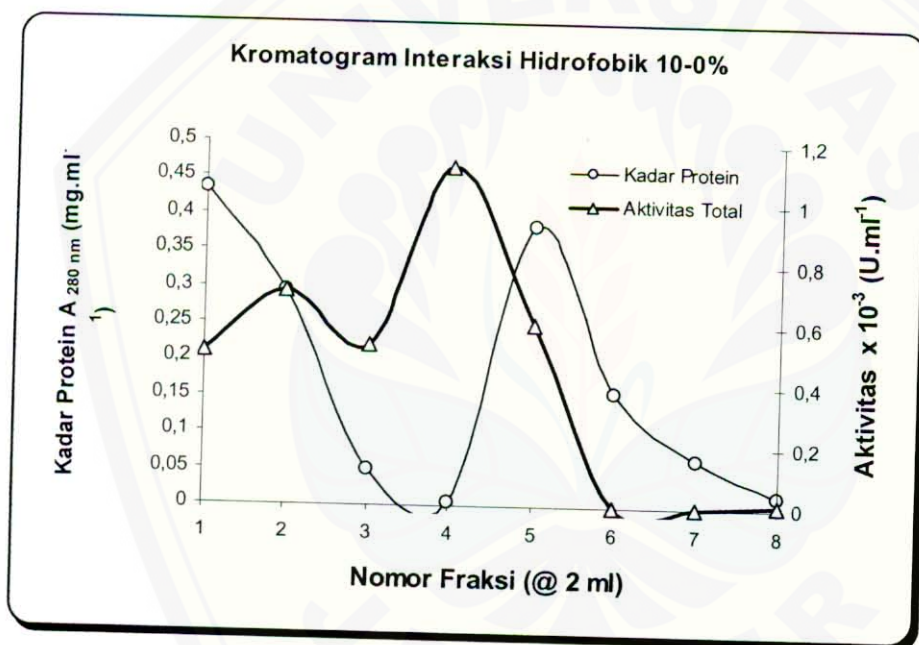
1 Fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

Fraksi	A	Akt. Total (U/ml)
10	0,066	0,011
20	0,052	0,010
30	0,006	0,003
40	0,047	0,009
50	0,162	0,024
60	0,033	0,007
70	-0,065	0,000
80	0,036	0,007
90	-0,043	0,000
100	0,058	0,010

Presipitasi Ekstrak Kasar Enzim *B*-Endoxilase

**2. Kromatografi hidrofobik 10%**

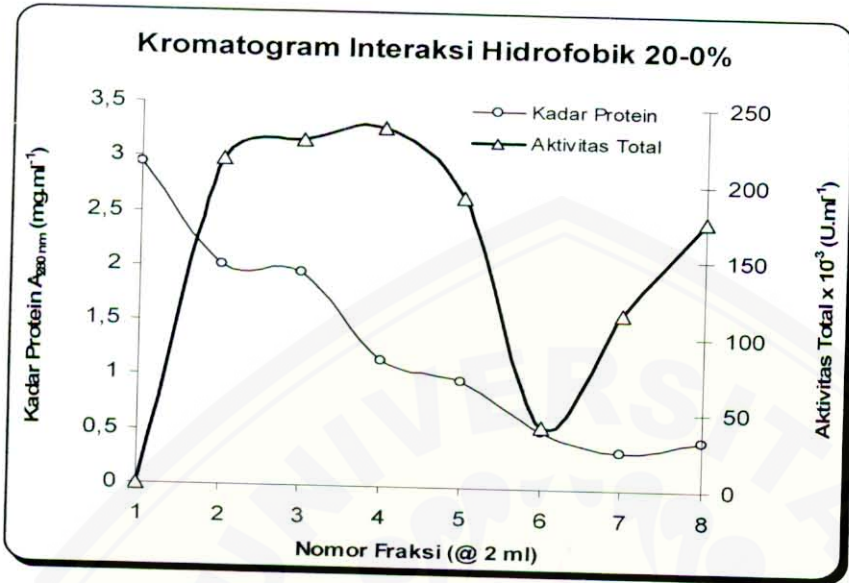
sampel	S	K	S-K	AK (U.ml <sup>-1</sup> ) X10 <sup>-3</sup>	KP (A <sub>280</sub> )
1	0,318	0,300	0,011	0,505	0,434
2	0,286	0,253	0,033	0,704	0,294
3	0,369	0,349	0,020	0,531	0,049
4	0,352	0,288	0,064	1,120	0,005
0-1	0,277	0,252	0,025	0,598	0,386
0-2	0,226	0,247	-0,021	0,000	0,158
0-3	0,210	0,245	-0,035	0,000	0,067
0-4	0,206	0,225	-0,019	0,013	0,016



**3 Kromatografi hidrofobik 20%**

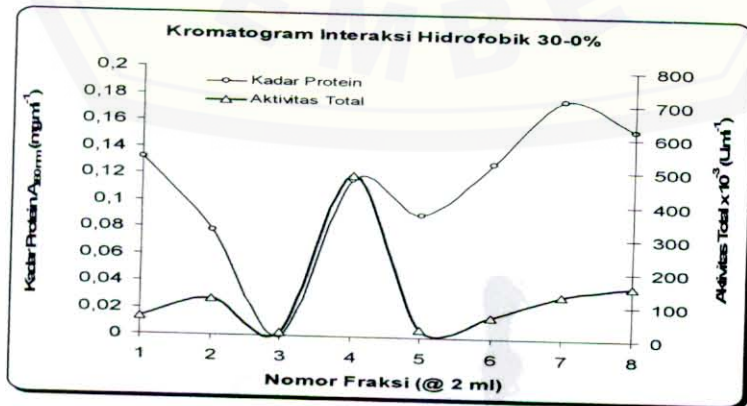
sampel	S	K	S-K	AK . 10 <sup>-3</sup> (U.ml <sup>-1</sup> )	KP A280
ET 20%	0,707	0,307	0,399	278,442	3,530
20-1(20%)	0,471	0,523	-0,053	0,000	2,940
20-2(20%)	0,523	0,222	0,301	213,147	2,010
20-3(20%)	0,648	0,327	0,322	226,870	1,948
20-4(20%)	0,689	0,353	0,335	235,502	1,161
0-1(20%)	0,605	0,341	0,267	190,350	0,981
0-2(20%)	0,346	0,306	0,041	40,504	0,522
0-3(20%)	0,573	0,421	0,153	114,874	0,352
0-4(20%)	0,680	0,429	0,245	175,963	0,444





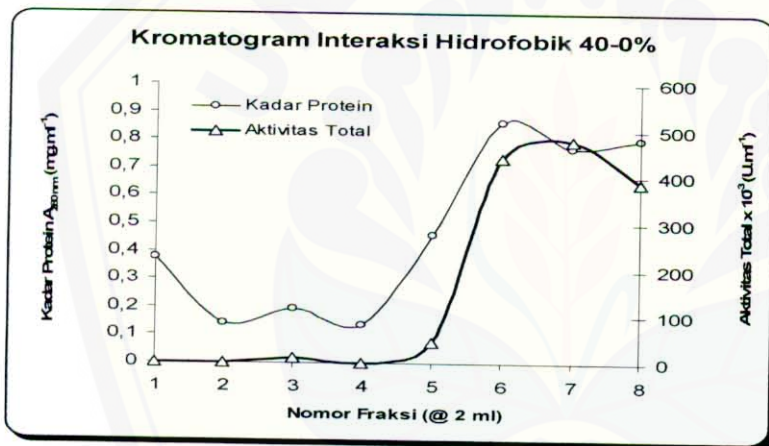
4 Kromatografi hidrofobik 30%

Sampel	S	K	S-K	AK ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) $\times 10^{-3}$	KP $A_{280\text{nm}}$
ET 30%	2,178	1,019	1,156	780,655	0,206
30-1(30%)	1,099	1,045	0,057	51,350	0,132
30-2(30%)	1,120	0,977	0,141	106,684	0,078
40-3(40%)	1,115	1,121	-0,003	11,288	0,000
40-4(40%)	1,101	0,996	0,702	479,416	0,117
0-1(40%)	1,078	1,061	0,017	24,347	0,091
0-2(40%)	1,246	1,170	0,076	63,524	0,130
0-3(40%)	1,224	1,048	0,175	129,703	0,178
0-4(40%)	1,267	1,049	0,218	158,256	0,156



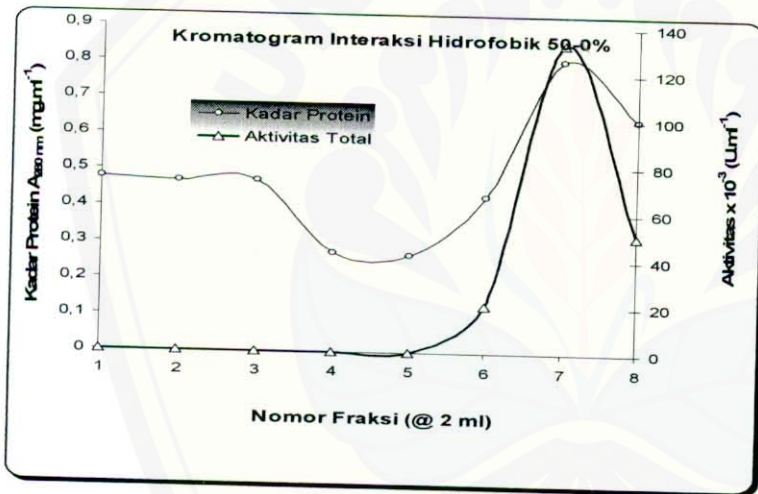
5 Kromatografi hidrofobik 40%

Sampel	S	K	S-K	AK (U.ml <sup>-1</sup> ) x10 <sup>-3</sup>	K.P (A <sub>280</sub> )
ET	0,164	0,347	-0,177	0,000	0,446
40-1(40%)	0,245	0,421	-0,171	0,000	0,374
40-2(40%)	0,186	0,270	-0,083	0,000	0,141
40-3(40%)	0,172	0,177	-0,006	9,517	0,196
40-4(40%)	0,192	0,301	-0,108	0,000	0,138
0-1(40%)	0,237	0,195	0,048	44,931	0,461
0-2(40%)	0,793	0,149	0,644	440,682	0,864
0-3(40%)	0,852	0,149	0,702	479,194	0,772
0-4(40%)	0,924	0,361	0,566	388,889	0,802



6 Kromatografi hidrofobik 50%

Sampel	S	K	S-K	AK(U.ml <sup>-1</sup> ) x10 <sup>-3</sup>	K.P (A <sub>280</sub> )
ET	0,174	0,502	0,000	0,000	0,477
50-1(50%)	0,383	0,426	0,000	0,000	0,478
50-2(50%)	0,218	0,531	0,000	0,000	0,470
50-3(50%)	0,188	0,398	0,000	0,000	0,471
50-4(50%)	0,188	0,400	0,000	0,000	0,275
0-1(50%)	0,186	0,254	0,000	0,000	0,270
0-2(50%)	0,203	0,192	0,011	20,584	0,431
0-3(50%)	0,487	0,305	0,180	133,023	0,810
0-4(50%)	0,402	0,353	0,056	50,465	0,645

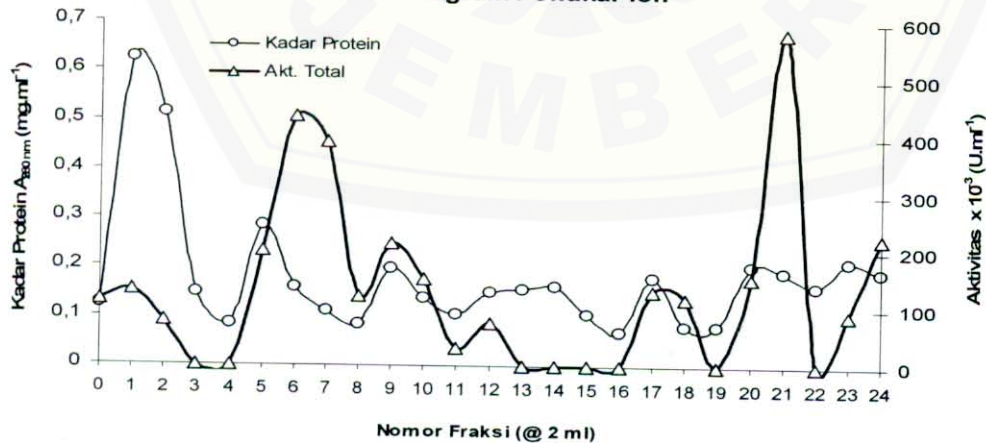




7 Kromatografi Penukar Ion

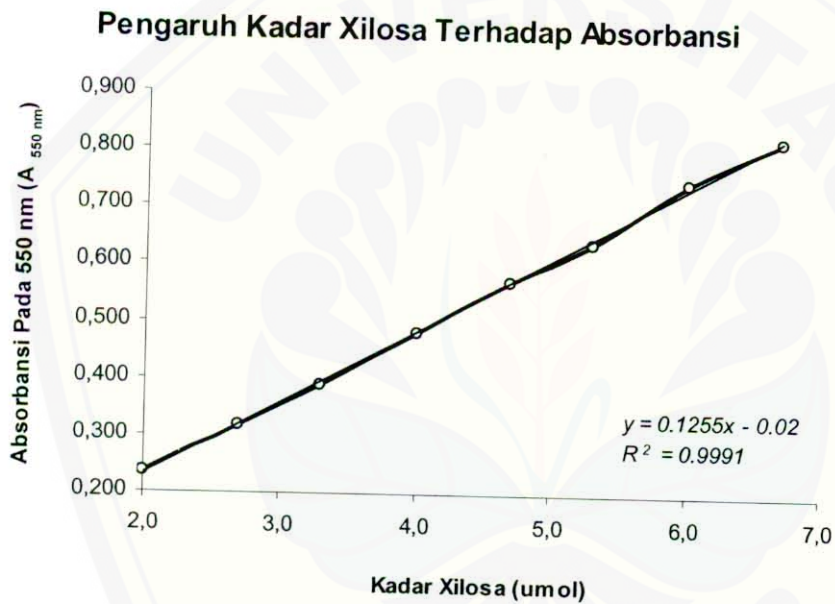
Sampel	S	K	S-K	AK	KP
0	0,308	0,242	0,066	114,210	0,122
1	0,353	0,274	0,079	131,474	0,624
2	0,237	0,199	0,038	77,025	0,514
3	0,136	0,245	0,000	0,000	0,146
4	0,235	0,406	0,000	0,000	0,083
5	0,281	0,150	0,131	200,531	0,285
6	0,455	0,147	0,308	435,591	0,158
7	0,387	0,113	0,274	390,438	0,111
8	0,294	0,223	0,071	120,85	0,085
9	0,265	0,125	0,140	212,483	0,199
10	0,302	0,207	0,095	152,722	0,139
11	0,325	0,322	0,003	30,544	0,106
12	0,479	0,443	0,036	74,369	0,151
13	0,323	0,636	0,000	0,000	0,155
14	0,308	0,636	0,000	0,000	0,163
15	0,298	0,953	0,000	0,000	0,106
16	0,38	0,483	0,000	0,000	0,070
17	0,366	0,288	0,078	130,146	0,180
18	0,397	0,327	0,070	119,522	0,082
19	0,433	0,609	0,000	0,000	0,082
20	0,540	0,443	0,097	155,378	0,205
21	0,809	0,391	0,418	581,673	0,193
22	0,144	0,702	0,000	0,000	0,163
23	0,459	0,411	0,048	90,305	0,213
24	0,520	0,372	0,148	223,108	0,191

Kromatogram Penukar Ion



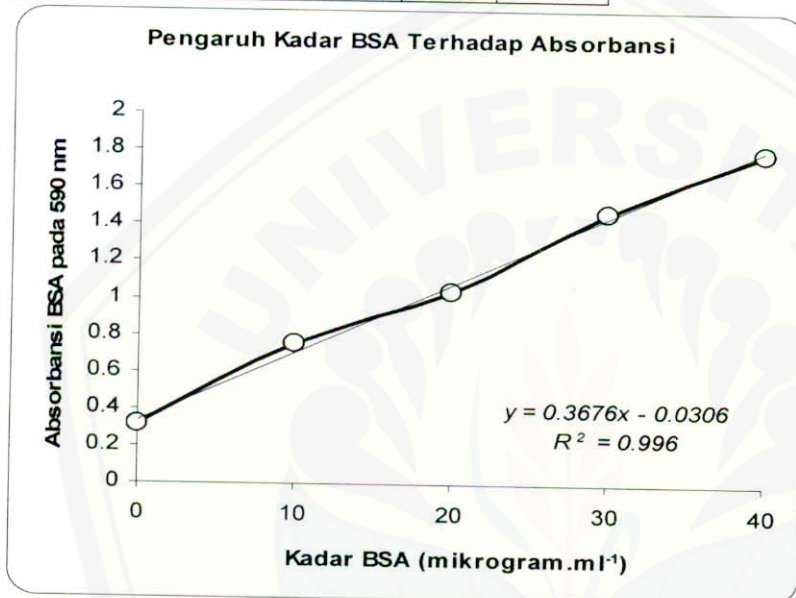
### 8. Kurva standart xilosa

[xilosa]umol	A1	A2	A3	A/3
2,0	0,237	0,237	0,370	0,237
2,7	0,319	0,318	0,319	0,319
3,3	0,387	0,388	0,387	0,387
4,0	0,481	0,481	0,481	0,481
4,7	0,571	0,571	0,571	0,571
5,3	0,636	0,636	0,636	0,636
6,0	0,743	0,743	0,743	0,743
6,7	0,820	0,820	0,820	0,820



### 9. Kurva standar BSA

[BSA] ug/ml	A1	A2	A3	A/3
0	0.309	0.309	0.309	0.309
10	0.754	0.754	0.754	0.754
20	1.040	1.040	1.040	1.040
30	1.468	1.468	1.468	1.468
40	1.790	1.790	1.790	1.790



Perhitungan konversi aktivitas dialisat enzim dari 45 ml menjadi 75 ml.

$$V_1AT_1 = V_2AT_2$$

$$\frac{45\text{ml}}{75\text{ml}} = \frac{3,15U}{A_2}$$

$$AT_2 = \frac{75\text{ml} \times 3,15U}{45\text{ml}}$$

$$AT_2 = 5,25 U$$

Dimana ;

$V_1$  = volume enzim yang didialisis

$V_2$  = volume enzim yang dihasilkan dari fraksinasi

$AT_1$  = aktivitas spesifik enzim yang didialisis

$AT_2$  = aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan dari fraksinasi

