



**SKRINING BAKTERI PEKTINOLITIK PADA SISTEM
PENCERNAAN *Crocidolomia pavonana* F. DAN PURIFIKASI
ENZIM YANG DIHASILKAN**

TESIS

Oleh:

**Maulfi Dwi Lestari
NIM 171820401002**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**SKRINING BAKTERI PEKTINOLITIK PADA SISTEM
PENCERNAAN *Crocidolomia pavonana* F. DAN PURIFIKASI
ENZIM YANG DIHASILKAN**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Biologi (S2)
dan mencapai gelar Magister Sains

Oleh:

**Maulfi Dwi Lestari
171820401002**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, tesis ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Sunarsi dan Ayahanda Subandiyo tercinta, terimakasih atas segala limpahan doa, pengorbanan, motivasi, serta dukungan yang tiada henti;
2. Kakak kandung tercinta Linggar Jefiyadi, dan kakak ipar Nunik Irma Reztiyana yang telah memberi doa, motivasi, dan dukungan;
3. Bapak Ibu guru SDN 2 Lemahbangkulon, SMPN 2 Rogojampi, SMA Darul Ulum 1 BPP-Teknologi Jombang yang telah mendidik dan memberikan ilmunya dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Dan hanya kepada Allah SWT hendaknya kamu berharap”

(QS. Al Insyirah : 8)*



*) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara
Penerjemah/Penafsiran Al-Qur'an. 2009. Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya.
Bogor: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Maulfi Dwi Lestari

NIM : 171820401002

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul ” Skrining Bakteri Pektinolitik Pada Sistem Pencernaan *Crocidolomia pavonana* F. Dan Purifikasi Enzim yang dihasilkan” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh kelompok riset BIRG tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 20 Juli 2019

Yang menyatakan,

Maulfi Dwi Lestari

NIM 171820401002

TESIS

**SKRINING BAKTERI PEKTINOLITIK PADA SISTEM
PENCERNAAN *Crocidolomia pavonana* F. DAN PURIFIKAIS
ENZIM YANG DIHASILKAN.**

Oleh

Maulfi Dwi Lestari
NIM 171820401002

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Purwatiningsih, S.Si, M.Si, Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si

PENGESAHAN

Tesis berjudul “Skринing Bakteri Pektinolitik Pada Sistem Pencernaan *Crocidolomia pavonana* F. Dan Purifikasi Enzim Yang Dihasilkan”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Purwatiningsih., S.Si, M.Si, Ph.D
NIP 197505052000032001

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
NIP 196805031994011001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si
NIP 197403311999032001

Mukhamad Su’udi, Ph.D
NIP 760016788

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Skrining Bakteri Pektinolitik Pada Sistem Pencernaan *Crocidolomia pavonana* F. Dan Purifikasi Enzim Yang Dihasilkan; Maulfi Dwi Lestari; 171820401002; 2019; 40 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kubis (*Brassica oleracea*) merupakan tanaman famili Brassicaceae yang banyak di budidayakan di Indonesia untuk memenuhi kebutuhan pangan, ataupun komoditas perdagangan. Salah satu Kendala dalam budidaya tanaman kubis adalah adanya hama yaitu *Crocidolomia pavonana*. Kemampuan *C. pavonana* dalam mencerna tanaman kubis dikarenakan adanya simbiosis antara bakteri endosimbion dengan sistem pencernaan *C. pavonana* yang mampu menyediakan enzim-enzim pencernaan dan dapat mendegradasi senyawa polisakarida menjadi komponen yang lebih sederhana. Salah satu jenis senyawa polisakarida yang mampu di degradasi oleh bakteri endosimbion adalah pektin. Pektin merupakan kelompok senyawa polisakarida yang banyak dijumpai pada tanaman khususnya dibagian lamela tengah dinding sel primer tanaman. Bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa pektin adalah bakteri pektinolitik. Bakteri tersebut memiliki aktivitas pektinolitik yaitu menghasilkan enzim pektinase yang mampu merombak senyawa pektin dengan memecah asam poligalakturonat menjadi asam monogalakturonat melalui reaksi depolimerisasi dan deesterifikasi.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi menggunakan usus larva *C. pavonana* instar akhir pada media pektin agar 0,5 % secara aerob. Hasil isolasi tersebut di murnikan dan masing-masing isolat bakteri diuji secara semikuantitatif untuk mengetahui potensi bakteri pektinolitik. Selanjutnya dilakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan biokimia sesuai dengan buku panduan Bergey Manual of Determinative Bacteriology 9th, Microbiology: A Laboratory Manual. Isolat bakteri yang telah diidentifikasi di uji aktivitas enzim pektinase dan juga

dilakukan purifikasi enzim pektinase dengan melalui kolom dialisis 10 kDa dan *anions exchanger chromatography*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat 5 isolat bakteri pektinolitik yang di isolasi dari sistem pencernaan *C. pavonana* yaitu I1, I2, I3, I4 dan I5. Berdasarkan pengamatan makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia menunjukkan bahwa isolat I2 mendekati genus *Acetobacter* dan isolat I3, I4 mendekati genus *Neisseria*. Hasil purifikasi enzim melalui kolom dialisis 10 kDa menunjukkan bahwa fraksi < 10kDa memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan fraksi >10kDa yaitu sebesar 0,05 U/ml. Hasil purifikasi enzim pektinase melalui *anions exchanger chromatography* menunjukkan bahwa terdapat 1 peak yang memiliki aktivitas enzim tertinggi dengan *purification fold* sebesar 13,582 dan *yield* 10,79%.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul “ Skrining Bakteri Pektinolitik Pada Sistem Pencernaan *Crocitolomia pavonana* F. Dan Purifikasi Enzim Yang Dihasilkan”.Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan magister (S2) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

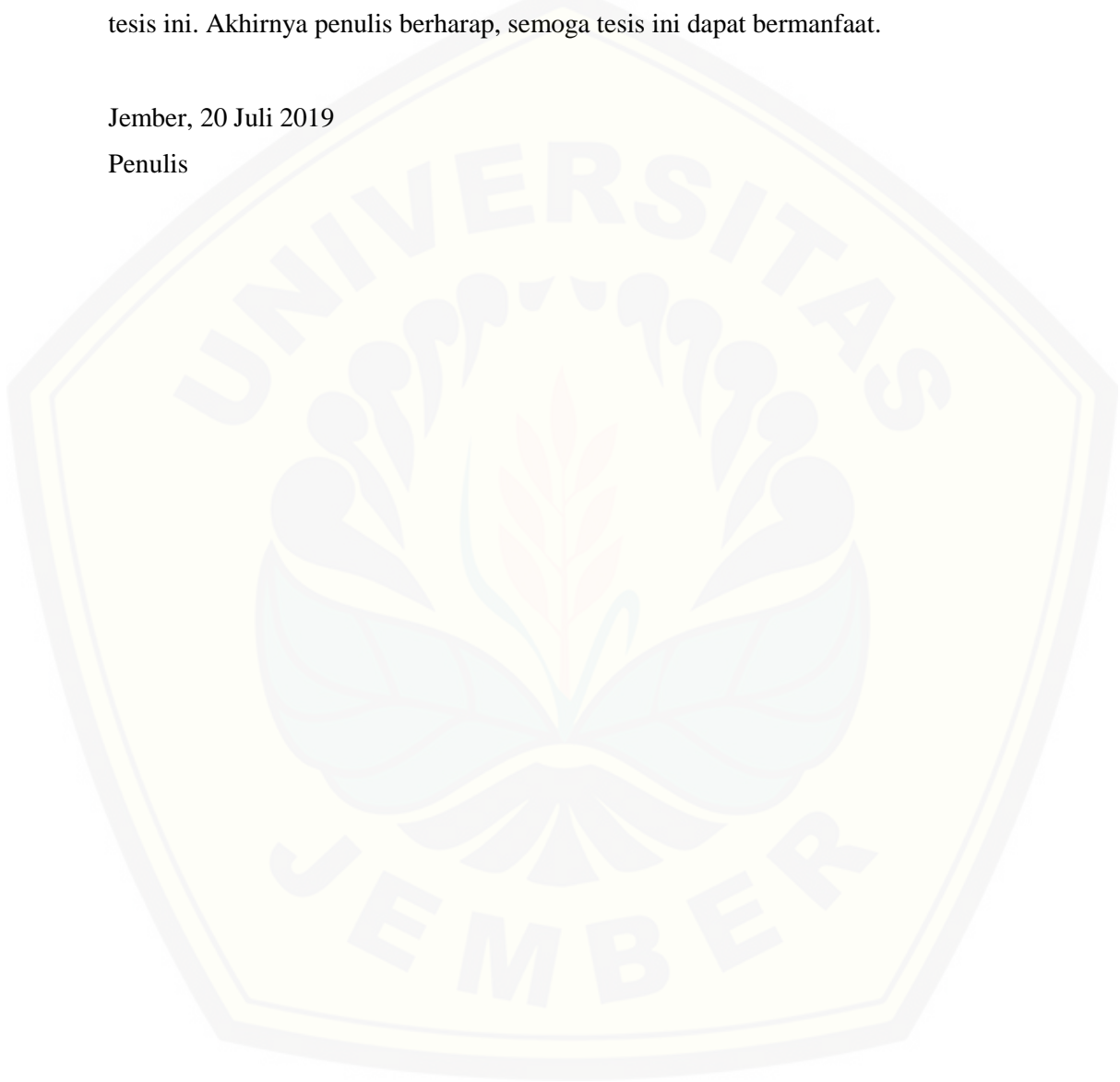
1. Purwatiningsih, S.Si., M.Si, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Kahar Muzakhar, S.Si, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan tesis ini;
2. Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si selaku Dosen Penguji I dan Mukhamad Su’udi, Ph.D, selaku Dosen Penguji II, yang telah membantu memberikan saran serta kritik dalam penulisan tesis ini;
3. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing serta memberikan masukan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Soesetianingsih, selaku Teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
5. keluarga besarku terima kasih atas limpahan do’a, pengorbanan, motivasi, dukungan dan kasih sayangnya demi terselesaikannya tesis ini;
6. Teman-teman *Entomology Research Team* Rini, Fisel, Alpina, Lia, Firna, Maya, Rohilda, terimakasih atas kerjasama, motivasi dan bantuannya;
7. Teman-teman laboratorium Enzimologi Syafiq Ubaidillah, Azizah, Umi wasilah, terima kasih atas kerjasama, motivasi, dukungan dan bantuannya;
8. sahabat-sahabatku Lidia, Yeni, Nobitak, Almas, terima kasih atas segala bantuan, doa, serta semangat yang kalian berikan kepada penulis;
9. teman-teman Magister Biologi (angkatan 2017) Jurusan Biologi Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu;

10. teman-teman Jurusan Biologi (angkatan 2013) yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu;
11. semua pihak yang telah memberikan sumbangan tenaga, semangat, dan pikiran yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis dalam kelancaran penulisan tesis ini.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tesis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tesis ini dapat bermanfaat.

Jember, 20 Juli 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Crocidolomia pavonana L.....	4
2.1.1 Klasifikasi <i>C. pavonana</i>	4
2.1.2 Siklus Hidup <i>C. pavonana</i>	5
2.1.3 Sistem pencernaan <i>C. pavonana</i>	6
2.1.4 Bakteri Simbion Pada Saluran Pencernaan <i>C. pavonana</i>	7
2.2 Pektin dan Pektinase	9
2.3 Purifikasi Enzim	10

BAB 3. METODE PENELITIAN	12
3.1 Tempat dan Waktu	12
3.2 Alat dan Bahan	12
3.3 Prosedur Penelitian	13
3.3.1 Koleksi <i>C. pavonana</i>	14
3.3.2 Isolasi bakteri Pektinolitik.....	14
3.3.3 Pengujian zona bening	14
3.3.4 Identifikasi Bakteri Pektinolitik	15
3.3.5 Produksi enzim dan uji aktivitas enzim pektinase dari bakteri pektinolitik	17
3.3.6 Purifikasi Parsial Pektinase isolat I4.	18
3.4 Analisis Data	19
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Isolasi Bakteri Pektinolitik Pada Sistem Pencernaan <i>Crocidolomia</i> <i>pavonana</i>	20
4.2 Pengamatan Secara Makroskopis dan Mikroskopis	21
4.3 Uji Biokimia	23
4.4 Optimasi Produksi Crude Pektinase Isolat I2, I3 dan I4.	26
4.5 Purifikasi Parsial Pektinase Isolat I4.	27
4.5.1 Dialisis Ekstrak Kasar Pektinase Isolat I4 dengan kolom dialisis 10kDa.....	27
4.5.2 Kromatografi Penukar Anion (Anion Exchange Chromatography)	28
BAB 5. PENUTUP	30
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Indeks aktivitas enzim pektinolitik pada isolat I1, I2, I3, I4 dan I5.....	21
4.2 Pengamatan makroskopis bakteri pektinolitik pada sistem pencernaan <i>C. pavonana</i>	22
4.3 Hasil uji biokimia pada isolat I2, I3 dan I4.....	24
4.4 Ringkasan tahap pemurnian pektinase dari isolat I4.....	31

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus Hidup <i>C. pavonana</i>	6
2.2 Struktur umum sistem pencernaan serangga.....	7
2.3 Struktur Molekul Pektin.....	9
3.1 Alur Penelitian.....	14
4.1 Hasil Pewarnaan Gram.....	23
4.2 Kurva optimasi produksi ekstrak pektinase isolat I2, I3 dan I4.....	27
4.3 Aktivitas pektinase pada isolat I4 hasil dialisis 10 kDa.....	29
4.4 Kurva hasil pemurnian dengan menggunakan Sartobind MA Q-75.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi reagen somogyi.....	38
B. Komposisi reagen nealson.....	38
C. Rangkuman hasil purifikasi.....	39
D. . Kurva standar glukosa.....	40
E. Tabel hasil identifikasi isolat terpilih I2, I3 dan I4.....	
D.1. Perbandingan karakter morfologi mikroskopis dan biokimia isolat I2.....	41
D.2. Perbandingan karakter morfologi mikroskopis dan biokimia isolat I3 dan I4.....	

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kubis (*Brassica oleracea*) merupakan tanaman famili Brassicaceae yang banyak di budidayakan di Indonesia untuk memenuhi kebutuhan pangan, ataupun komoditas perdagangan (Hasyim *et al.*, 2009). Salah satu Kendala dalam budidaya tanaman kubis adalah serangan hama terhadap tanaman tersebut, seperti *Plutella xylostella*, *Hellula undalis*, *Spodoptera litura* dan *Crociodolomia pavonana* (Ebenebe *et al.*, 2006). Kerusakan terbesar pada kubis disebabkan oleh *C. pavonana*. Hal ini dikarenakan, *C. pavonana* menyerang bagian titik tumbuh tanaman seperti pada tanaman kubis. Kerusakan tanaman kubis yang disebabkan oleh *C. pavonana* sebesar 65%-100% dan dapat menurunkan produksi panen sebesar 79,81% (Syahroni dan Prijono, 2013).

Kemampuan *C. pavonana* dalam mencerna tanaman kubis tidak terlepas dari adanya simbiosis antara bakteri endosimbion dengan *C. pavonana* pada sistem pencernaannya. Bakteri tersebut mampu menyediakan enzim-enzim pencernaan yang dapat mendegradasi senyawa polisakarida menjadi komponen yang lebih sederhana sehingga dapat dicerna langsung oleh *C. pavonana* (Park *et al.*, 2007). Salah satu jenis senyawa polisakarida yang mampu di degradasi oleh bakteri endosimbion adalah pektin.

Pektin merupakan salah satu komponen utama dinding sel tanaman yang banyak dijumpai pada bagian lamella tengah dinding sel primer yang berkontribusi dalam proses fisiologis tanaman (Marcia *et al.*, 1999). Secara umum pektin pada tanaman berperan dalam pembentukan dinding sel tanaman, pertumbuhan sel, diferensiasi sel, mempengaruhi sifat dinding sel tanaman seperti porositas, pH, keseimbangan ion yang berperan penting dalam transportasi ion dinding sel tanaman. Selain itu pektin pada tanaman juga berperan dalam mengaktifkan respon pertahanan tanaman (Voragen *et al.*, 2009). Pada dinding sel tanaman dikotil secara umum tersusun atas 35% pektin, 30% selulosa, 30% hemiselulosa dan 5% protein (Voragen *et al.*, 2009). Menurut Maatsch *et al.*

(2016) pada tanaman kubis segar memiliki kandungan senyawa pektin sebesar 93 mg/g.

Pada bakteri secara umum pektin berperan sebagai salah satu sumber karbon utama oleh mikroorganisme. Selain itu pada bakteri tertentu pektin berperan dalam menginduksi kekebalan dan meningkatkan integritas sel epitel usus inang (Lersen *et al.*, 2019). Salah satu jenis bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa pektin adalah bakteri pektinolitik. Bakteri tersebut memiliki aktivitas pektinolitik yaitu menghasilkan enzim pektinase yang mampu merombak senyawa pektin dengan memecah asam poligalakturonat menjadi asam monogalakturonat melalui reaksi depolimerisasi dan deesterifikasi (Aaisha dan Barata, 2016; Geetha *et al.*, 2012).

Beberapa jenis serangga Lepidoptera yang diketahui memiliki bakteri pektinolitik pada sistem pencernaannya salah satunya adalah serangga *Bombyx mori*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Anand *et al.* (2010) terdapat 3 spesies bakteri yang di isolasi dari sistem pencernaan larva instar akhir *Bombyx mori* yaitu *Bacillus circulans*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Erwina* sp. Hal ini didukung oleh pernyataan Dillon dan Dillon (2004) bahwa, kelompok serangga Lepidoptera memiliki bakteri endosimbion pada sistem pencernaan yang dapat mencerna senyawa polisakarida yaitu selulosa, pektin, dan xylan.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi penelitian dasar untuk nantinya mampu menjadikan inovasi baru yang ramah lingkungan dalam pengendalian serangga hama *C. pavonana* pada tanaman kubis dengan mengganggu metabolisme bakteri endosimbion pada sistem pencernaan serangga. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai skrining bakteri pektinolitik pada sistem pencernaan *C. pavonana* dan purifikasi enzim yang dihasilkan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat bakteri pektinolitik yang bersimbiosis pada sistem pencernaan *C. pavonana* sebagai hama tanaman kubis?

2. Bagaimanakah aktivitas pektinolitik pada bakteri yang ditemukan berdasarkan enzim pektinasenya?
3. Bagaimanakah hasil purifikasi enzim pektinase yang dihasilkan oleh bakteri pektinolitik dengan aktivitas enzim tertinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengidentifikasi bakteri pektinolitik yang terdapat pada sistem pencernaan *C. pavonana*.
2. Mengetahui aktivitas pektinolitik pada bakteri yang ditemukan berdasarkan enzim pektinasenya.
3. Mengetahui hasil purifikasi enzim pektinase yang dihasilkan oleh bakteri pektinolitik dengan aktivitas enzim tertinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil akhir dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi penelitian dasar untuk nantinya mampu menjadikan inovasi baru yang ramah lingkungan dalam pengendalian serangga hama *C. pavonana* pada tanaman kubis dengan mengganggu metabolisme bakteri endosimbion pada sistem pencernaan serangga.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Crocidolomia pavonana* L.

2.1.1 Klasifikasi *C. pavonana*

Menurut Kalshoven (1981). *C. pavonana* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Insecta
Ordo	: Lepidoptera
Famili	: Pyralidae
Genus	: <i>Crocidolomia</i>
Spesies	: <i>Crocidolomia pavonana</i> F.

C. pavonana atau disebut dengan ulat krop kubis merupakan salah satu jenis serangga yang masuk kedalam ordo Lepidoptera famili Pyralidae yang tersebar di benua Asia dan Afrika. Secara umum *C. pavonana* dewasa akan meletakkan telurnya dipermukaan bawah daun kubis, sehingga larva dapat menetas dan merusak bagian tunas muda. Serangga ini umumnya aktif menyerang dan menyebar pada fase larva instar tiga. Selain itu *C. pavonana* pada tanaman kubis akan menyerang bagian krop. Sehingga hal tersebut dapat mengakibatkan kegagalan panen atau menurunnya produksi tanaman kubis. (Sulifoa *et al.*, 2016).

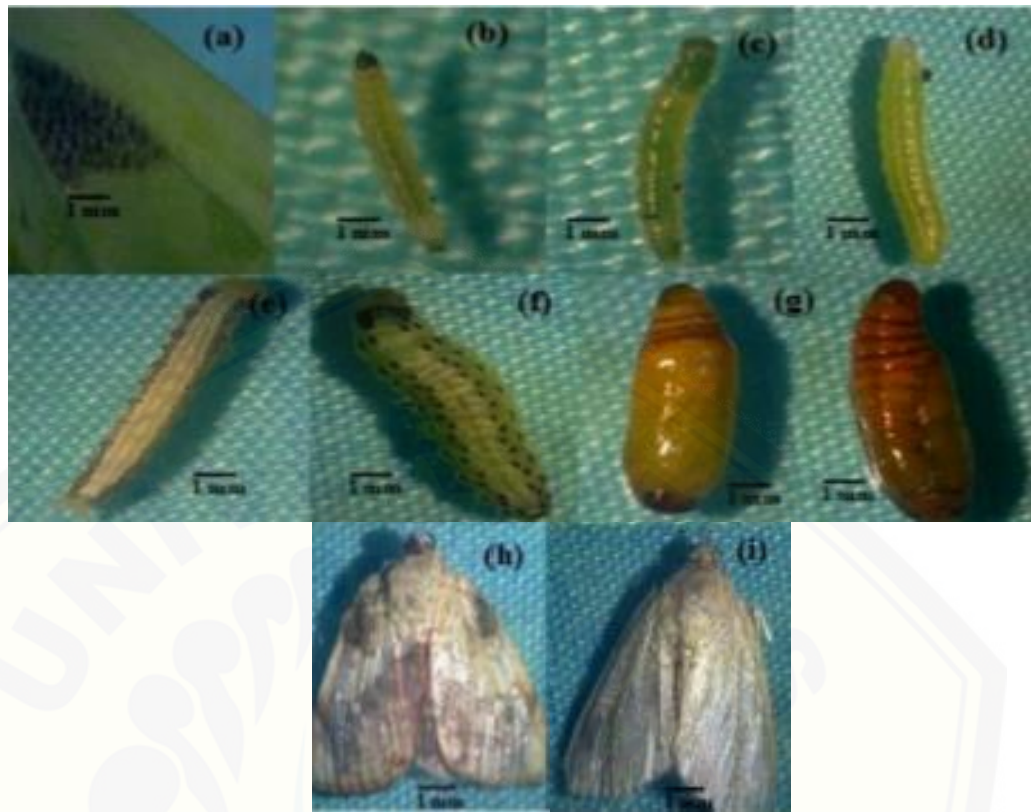
Kehadiran larva *C. pavonana* pada tanaman kubis diketahui dapat menurunkan produksi kubis sebesar 79,81 %. Selain itu adanya larva *C. pavonana* juga dapat menyebabkan kerusakan sebesar 65,0%, dan pada musim kemarau kerusakan dapat mencapai 100% (Kristanto *et al.*, 2013; Surahmat dan Prijono, 2002).

2.1.2 Siklus Hidup *C. pavonana*

C. pavonana merupakan kelompok serangga holometabola yang memiliki beberapa tahapan siklus hidup yaitu fase telur, larva, pupa dan imago. Pada fase telur, *C. pavonana* dewasa akan meletakkan telurnya pada permukaan bawah daun ataupun tepi daun dengan jumlah yang bervariasi. Secara umum jumlah telur yang dihasilkan berkisar 50- 300 telur. Waktu yang dibutuhkan saat fase telur menuju fase larva adalah kurang lebih 5 hari. Sedangkan waktu yang dibutuhkan pada fase telur sampai imago adalah 22-30 hari. (Smyth *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2009).

Pada fase larva, *C. pavonana* melalui beberapa tahap perkembangan yaitu larva instar ke 1, instar ke 2, instar ke 3 dan instar ke 4 atau instar akhir. Pada tahap instar awal, larva memakan sebagian dari pucuk tanaman kubis. Sedangkan saat memasuki instar ke 3 larva mulai melakukan pergerakan menuju titik tumbuh tanaman kubis dan menyebabkan kerusakan yang dapat menghambat pertumbuhan tanaman tersebut. Periode perkembangan larva instar awal sampai instar akhir memerlukan waktu 7-8 hari dengan suhu 25-28°C. Pada saat menjelang pergantian fase larva menjadi pupa, serangga *C. pavonana* akan bergerak dari daun menuju ke tanah (Priyono dan Hasan, 1992).

Awal mula fase pupa ditandai dengan mulai terbentuknya kokon. Secara umum ciri morfologi pupa *C. pavonana* yaitu berwarna coklat kekuningan sampai menjadi coklat tua. Sedangkan tahap akhir dari perkembangan serangga *C. pavonana* adalah tahap imago. Waktu yang dibutuhkan untuk perkembangan fase pupa ke fase imago adalah 10 hari dengan suhu 26-32°C. Karakteristik dari fase ini yaitu terbentuknya sayap dan dapat dibedakan antara jantan dan betina. Salah satu karakteristik yang membedakan antara imago betina dan jantan adalah pada jantan terdapat bercak putih pada bagian sayap depan dan adanya rambut coklat tua pada tepi anterior sayap bagian depan. Selain itu umumnya pada imago jantan memiliki tubuh yang lebih panjang dibandingkan dengan imago betina. Berikut merupakan siklus hidup *C. pavonana* dari fase telur sampai fase imago dapat dilihat pada Gambar 2.1



(a) fase telur; (b) larva instar 1; (c) larva instar 2; (d) larva instar 3; (e) larva instar 4; (f) pra pupa; (g) pupa; (h) imago jantan; (i) imago betina.

Gambar 2.1 Siklus hidup *C. pavonana* (Sumber : Jannah, 2017)

2.1.3 Sistem pencernaan *C. pavonana*

Serangga memiliki struktur sistem pencernaan yang beragam karena adanya perbedaan sumber makanan. Pada umumnya sistem pencernaan serangga terbagi atas 3 bagian utama yaitu foregut, midgut dan hindgut. Foregut (stomodeum) atau usus depan merupakan bagian sistem pencernaan serangga yang berperan dalam penyimpanan dan proses penghancuran makanan. Midgut (mesenteron) atau usus tengah merupakan bagian sistem pencernaan serangga yang berperan dalam mengabsorpsi dan juga mensekresikan enzim-enzim pencernaan. Sedangkan bagian akhir dari sistem pencernaan serangga yaitu hindgut (proctodeum) atau disebut dengan usus belakang yang berperan untuk reabsorpsi atau penyerapan kembali molekul-molekul penting yang masih dibutuhkan seperti air, garam ataupun molekul yang masih diperlukan (Chapman *et al.*, 2013). Berikut merupakan sistem pencernaan serangga dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Umum Sistem Pencernaan Serangga (Lepidoptera:Pyralidae)
(Sumber : Mahdavi *et al.*, 2013).

C. pavonana memiliki sistem pencernaan yang hampir sama pada serangga umumnya. Pada serangga daerah foregut atau usus depan terdiri dari mulut sampai ke faring, *esofagus*, crop dan proventrikulus. Hasil pencernaan pada daerah foregut akan ditransportasikan dan kemudian di simpan kedalam suatu area yang disebut dengan *crop* yang berfungsi untuk menyimpan makanan sementara. Sedangkan bagian midgut ditandai dengan adanya *gastric caeca* dan *ventrikulus*. Bagian akhir pencernaan serangga yaitu hindgut terdiri dari katup piloriuc, tubulus malphigi, ileum dan kolon (Engel dan Moran, 2013; Chapman *et al.*, 2013)

2.1.4 Bakteri Simbion Pada Saluran Pencernaan *C. pavonana*

Simbiosis merupakan suatu interaksi antara makhluk hidup satu dengan lain yang dapat bersifat saling menguntungkan (mutualistik) atau saling merugikan. Simbiosis mutualistik antara bakteri dengan serangga telah diketahui memberikan dampak biologis pada inangnya. Bakteri tersebut memberikan dampak positif salah satunya dengan memproduksi enzim pencernaan yang dapat

meningkatkan kemampuan dalam mencerna makanan (Doughlas, 2015; Dillon dan Dillon, 2004).

Beberapa jenis bakteri diketahui banyak dijumpai didalam usus serangga Lepidoptera yaitu *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* dan *Erwina*. Selain bakteri juga terdapat mikroorganisme lain seperti protozoa, fungi yang banyak ditemukan dalam sistem pencernaan serangga seperti rayap atau serangga pemakan kayu lainnya (Anand *et al.*, 2010; Pal dan Karmakar, 2018). Mikroorganisme tersebut berperan sangat penting dalam membantu proses pencernaan, meningkatkan respon imun dan juga melindungi dari patogen pada beberapa spesies.

Pada serangga, umumnya bakteri endosimbion banyak dijumpai pada kelompok serangga pemakan kayu, omnivora ataupun serangga herbivor. Mikroorganisme yang ada pada saluran pencernaan serangga herbivor bertujuan untuk mendegradasi beberapa senyawa atau nutrisi pada tanaman seperti selulosa, pektin, xilan dan juga beberapa jenis vitamin yang tidak dapat dicerna langsung oleh serangga. Sehingga dengan adanya bakteri endosimbion, dapat meningkatkan proses pencernaan dengan menyediakan enzim-enzim pencernaan yang dapat mendegradasi senyawa tersebut (Dillon dan Dillon, 2004).

Salah satu jenis bakteri yang diketahui membantu dalam proses pencernaan serangga adalah kelompok bakteri pektinolitik. Bakteri tersebut merupakan bakteri yang mampu mendegradasi senyawa pektin sebagai salah satu senyawa polisakarida penyusun dinding sel tumbuhan. Adanya simbiosis antara bakteri dengan serangga, maka bakteri endosimbion tersebut dapat merombak senyawa pektin menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana dengan memecah asam poligalakturonat menjadi asam monogalakturonat melalui pelepasan ikatan glikosidik melalui reaksi depolimerisasi dan deesterifikasi (Anand *et al.*, 2010 ; Geetha *et al.*, 2012).

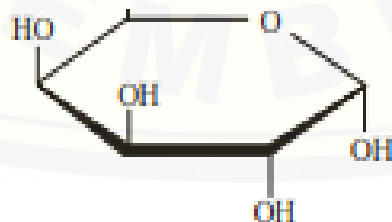
Salah satu jenis serangga diketahui memiliki bakteri pektinolitik pada sistem pencernaannya adalah *Bombyx mori*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Anand *et al.* (2010) terdapat 3 spesies bakteri pektinolitik yang terdapat pada sistem pencernaan larva instar akhir *Bombyx mori* yaitu *B. circulans*, *P.*

fluorescens dan *Erwinia sp.* Selain itu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kavuthodi *et al.* (2015) bahwa, terdapat beberapa spesies bakteri pektinolitik yang di isolasi dari tanah di daerah Malabar . Bakteri tersebut yaitu *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus panthotheticus* dan *Corynebacterium kutscheri*.

Hal ini didukung oleh pernyataan Dillon dan Dilon (2004) bahwa, kelompok serangga Lepidoptera memiliki bakteri endosimbion pada sistem pencernaan yang dapat mencerna senyawa polisakarida yaitu selulosa, pektin, dan xylan.

2.2 Pektin dan Pektinase

Pektin merupakan kelompok senyawa makromolekul yang banyak dijumpai pada tanaman khususnya dibagian lamela tengah dinding sel primer tanaman. Selain itu pada tanaman secara umum pektin berperan untuk menjaga integritas struktur dan jaringan sel. Secara umum struktur kimia, pektin tersusun atas asam D-galakturonat yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik (Aaisha dan Barata , 2016; Marcia *et al.*, 1999). Kubis merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa polisakarida salah satunya pektin. Menurut Maatsch *et al.* (2016) pada tanaman kubis segar memiliki kandungan senyawa pektin sebesar 93 mg/g. Berikut merupakan struktur kimia molekul pektin yang dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.3 Struktur Molekul Pektin
(Sumber: Khan *et al.*, 2015)

Pektin merupakan suatu senyawa yang dapat terhidrolisis oleh enzim pektinase. Pektinase adalah kelompok enzim heterogenus yang memiliki kemampuan mendegradasi pektin melalui reaksi depolimerisasi dan deesterifikasi (Geetha *et al.*, 2012). Secara umum enzim pektinase tersebar pada tanaman dan juga diproduksi oleh mikroorganisme prokariotik atau eukariotik. Beberapa mikroba diketahui mampu menggunakan senyawa pektin sebagai sumber karbon dan energi dengan cara memproduksi enzim pektinase (Pedrolli, 2009). Pada tanaman secara umum enzim pektinase memiliki peran yang sangat penting diantaranya yaitu berperan dalam pertumbuhan tanaman, pelunakan pada beberapa jaringan tanaman selama proses pematangan dan juga proses dekomposisi tanaman (Giacobbe *et al.*, 2014; Smirnov *et al.*, 2017).

Menurut Debbing *et al.* (2006) berdasarkan cara kerjanya secara umum enzim pektinase dikelompokkan menjadi beberapa yaitu pektinesterase atau pektin metilesterase (PME, EC 3.1.1.11), poligalakturonase (PG, EC 3.2.1.15), pektat liase (PAL, EC 4.2.2.2), dan pektin liase (PL, EC 4.2.2.10). Pektin metilesterase adalah enzim yang dapat memutus ikatan antara gugus karboksil dengan gugus metil pada asam poligalakturonat, sehingga dapat teresterifikasi. Poligalakturonase (PG) merupakan golongan enzim hidrolase yang mampu menghidrolisis molekul pektin dengan derajat esterifikasi yang sangat tinggi dengan membuka ikatan α -1,4-glikosidik pada rantai asam poligalakturonat. Pektat liase (PAL) dan pektin liase (PL) merupakan enzim depolimerase yang memutus ikatan α -1,4-glikosidik pada asam poligalakturonat melalui mekanisme reaksi f3-eliminasi menghasilkan oligogalakturonat dengan ikatan C4-O5 tak jenuh. Pektat liase bekerja pada pektin dengan derajat esterifikasi yang rendah atau tidak teresterifikasi dan memerlukan Ca^{2+} untuk meningkatkan aktivitasnya. Sedangkan pektin liase bekerja pada pektin dengan derajat esterifikasi yang cukup tinggi dan aktivitasnya tidak dipengaruhi oleh Ca^{2+} (Mayans *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1995).

2.3 Purifikasi Enzim

Enzim merupakan suatu jenis biomolekul berupa protein yang dihasilkan oleh organisme yang berperan sebagai katalis untuk menghasilkan reaksi biokimia

(Sathyanarayana *et al.*, 2002). Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk memisahkan enzim dengan komponen lain didalam sel yaitu melalui proses purifikasi. Purifikasi enzim adalah suatu metode pemurnian enzim untuk memperoleh enzim murni yang ditargetkan. Secara umum proses purifikasi enzim terbagi menjadi 3 yaitu *Capture*, *Intermediate*, dan *Polishing* (Biosciences, 2001).

Tahap *Capture* merupakan tahap awal purifikasi enzim. Pada tahap ini bertujuan untuk mengisolasi, pemekatan dan menghasilkan produk target. Tahap selanjutnya adalah tahap *Intermediate* yaitu untuk menghilangkan kontaminan berupa protein lain atau asam nukleat. Pada tahap ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari kontaminan yang masih belum bisa di pisahkan pada tahap *Capture*. Sedangkan tahap akhir dari proses purifikasi enzim adalah tahap *Polishing* yaitu untuk menghilangkan sebagian besar sisa kontaminan dengan tujuan mendapatkan tingkat kemurnian yang tinggi dari enzim target (Biosciences, 2001).

Secara umum beberapa metode yang umum digunakan pada proses purifikasi yaitu Presipitasi amonium sulfat, Dialisis, *Ion Exchange Chromatography*. Presipitasi amonium sulfat merupakan proses pengendapan protein dengan penambahan garam amonium sulfat. Pada metode ini penambahan garam dengan konsentrasi yang lebih tinggi ($>0,15$ M) akan menurunkan tingkat kelarutan protein (salting-out). Penambahan garam secara terus menerus akan mengakibatkan kenaikan konsentrasi garam. Semakin tinggi konsentrasi garam maka kelarutan protein semakin rendah dan terjadi pengendapan (Culture, 2004; Wingfield, 2001).

Metode lain yang juga sering digunakan adalah *Ion Exchange Chromatography* atau kromatografi pertukaran ion. Pada metode ini bertujuan untuk memisahkan protein target dengan prinsip melalui pembentukan ikatan ion antara gugus ionik biomolekul dan ion yang berada pada kolom yang memiliki muatan ion yang berbeda. Protein yang memiliki muatan positif akan berinteraksi dengan ion yang memiliki muatan yang berbeda yaitu muatan negatif atau disebut dengan *anion exchanger*. Sedangkan protein yang bermuatan negatif akan berinteraksi dengan ion yang memiliki muatan berbeda yaitu muatan positif atau *cation exchanger* (Murray *et al.*, 2003; Grodzki dan Berenstein, 2010).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari 2019 sampai Juli 2019.

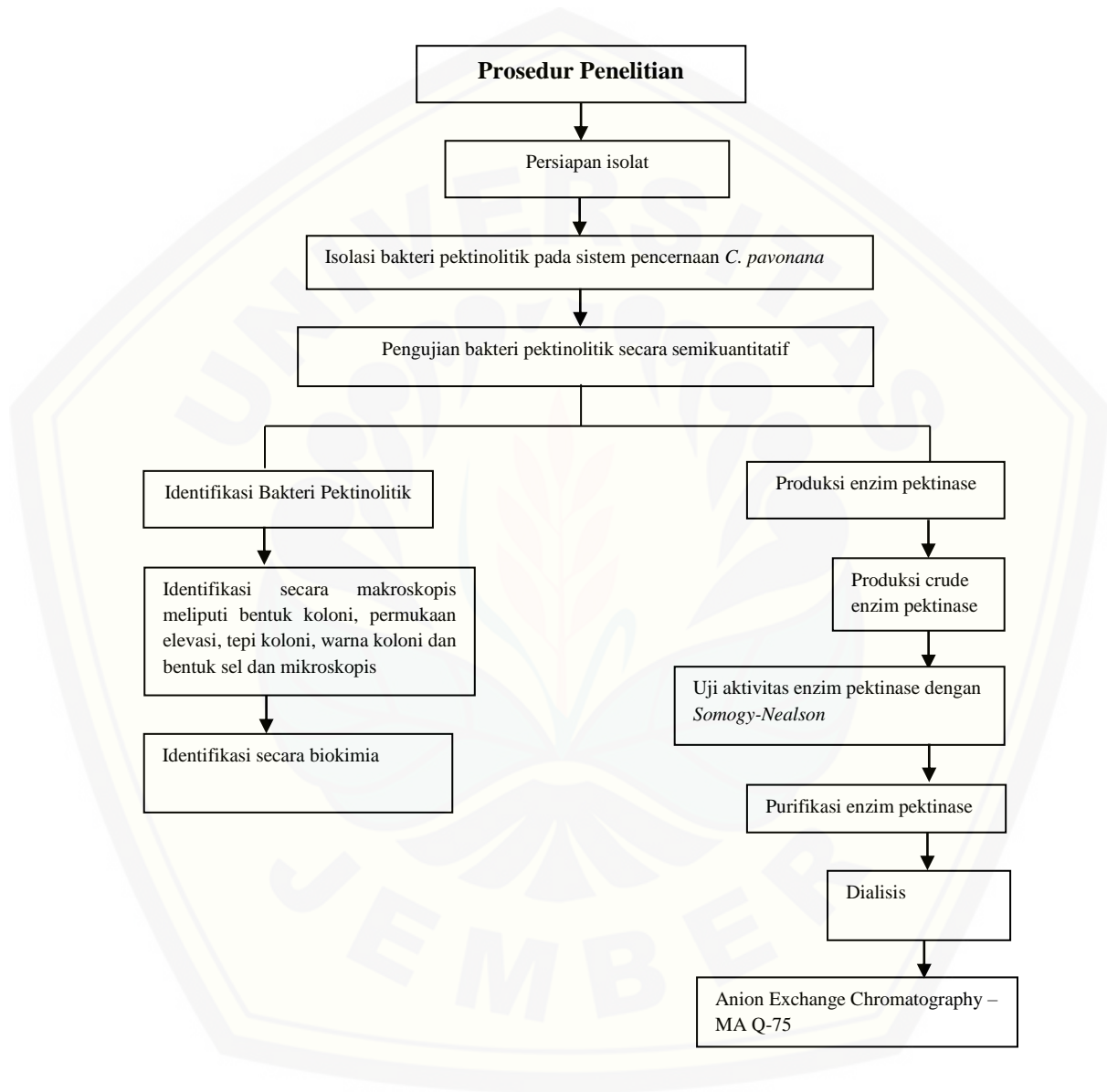
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat bedah, cawan petri, tabung reaksi, spatula, labu *erlenmeyer*, gelas beker, gelas pengaduk, gelas ukur, pipet volume, inkubator, autoklaf, jarum ose, neraca analitik, mikro pipet 100-1000 μL , mikro pipet 10-100 μL , tabung falcon dan tip, *microtube*, pH meter, kertas saring, *hot plate stirrer*, *shaker*, *laminar air flow* (LAF), *colony counter*, mikroskop Olympus CX 21, mikroskop stereo, vortex, *sentrifuge*, spektrofotometer, kolom *chromatography*, tabung eppendorf, mikroskop, vortex, gelas benda, UV transilluminator, tabung durham, dan kamera Huawei.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi larva *C. pavonana instar akhir*, pektin 0.5 %, Na_2HPO_4 6 gr/L. KH_2PO_4 3 gr/l, NaCl 0,5 gr/L, MgSO_4 0,2 gr/L, NH_4Cl 1 mg/L, agar 17 gr/L, pepton 2 gr/L. media *pepton* 1%, cat Gram (*iodine*, kristal violet, safranin), alkohol, akuades, garam fisiologis (NaCl 0,5gr/L), NaOH, CH_3COOH , etanol, buffer fosfat 1 M, glukosa, dan reagen *Somogvi-Nelson*, larutan 3% H_2O_2 , larutan glukosa, larutan sukrosa, larutan laktosa, larutan arabinose, larutan maltose, larutan mannitol, BTB (*BromTimol Blue*), pepton, 2 gr/L % gula simonsitrat, dan larutan iodin, Aquades, ammonium sulfat, aluminium foil, kertas dorslang, lampu bunsen, dan tissue.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terbagi dalam dua tahapan utama yaitu isolasi bakteri pektinolitik pada sistem pencernaan *C. pavonana* dan produksi enzim pektinase yang dihasilkan. Berikut diagram alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian

3.3.1 Koleksi *C. pavonana*

Larva *C. pavonana* yang digunakan diperoleh dari lahan pertanian sawi di Desa Kertosari, Kecamatan Pakusari, Jember. Pengambilan larva dilakukan secara acak dengan mengumpulkan stadia larva yang ditemukan pada tanaman kubis di lahan pertanian yang kemudian dikembangbiakkan di *Animal Care Unit (ACU)*, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

3.3.2 Isolasi bakteri Pektinolitik

Diambil sepuluh Larva *C. pavonana* instar akhir. Dimasukkan kedalam alkohol 70 % selama 60 detik dan dibilas menggunakan aquades sebanyak 3 kali dengan tujuan untuk mensterilkan bagian eksternal tubuh serangga larva *C. pavonana* dari kontaminan luar. Diambil sepuluh usus Larva *C. pavonana* instar akhir dengan cara membedah bagian abdomen dari ujung anterior sampai posterior. Kemudian usus diangkat, di meserasi NaCl 0,85%, di hancurkan menggunakan mortar dan di masukkan ke dalam NaCl 0,85% untuk selanjutnya dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian sampel tersebut diencerkan dengan seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} dengan larutan pengencer garam fisiologis (NaCl 0,85%). 10 μ L suspensi usus larva *C. pavonana* ditumbuhkan pada media pektin agar dengan metode *spread*, kemudian di inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C (Cakici *et al.*, 2014; Anand *et al.*, 2010).

Selanjutnya Koloni bakteri yang tumbuh kemudian di murnikan dengan menumbuhkan kembali pada media nutrisi agar dalam cawan petri dengan cara streak dan di inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C sampai di dapatkan seluruh bakteri biakan murni. Koloni bakteri yang murni ini digunakan untuk identifikasi secara fisiologis, morfologi, biokimia serta pengujian aktivitas pektinolitiknya.

3.3.3 Pengujian bakteri pektinolitik secara semikuantitatif.

Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan larutan I_2KI 0,03% (Lugol's Iodine). 5 Isolat murni yang didapatkan di inokulasikan

sebanyak 1 ose kedalam media NB (Nutrien Broth) cair dan di inkubasi menggunakan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Kemudian isolat tersebut di tumbuhkan pada lubang sumuran yang terdapat pada media pektin agar 0,5 % dengan cara memasukan 30 μ L suspensi bakteri pada lubang sumuran dan selanjutnya di inkubasi selama 2 hari. Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan I₂KI 0,03% (Lugol's Iodine) 1 ml dan diamkan selama 15 menit. Dibuang larutan Lugol's Iodin. Diamati dan diukur zona bening yang terbentuk. Indeks aktivitas pektinolitik dapat diukur dengan menggunakan persamaan berikut (Kasana *et al.*, 2008).

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{diameter koloni dengan zona bening (cm)}}{\text{diameter koloni (cm)}}$$

3.3.4 Identifikasi Bakteri Pektinolitik

a. Secara morfologi

Pengamatan morfologi bakteri meliputi bentuk koloni, permukaan elevasi, tepi koloni, warna koloni dan bentuk sel. Pengamatan ini didasarkan pada buku panduan Bergey Manual of Determinative Bacteriology 9th, Microbiology: A Laboratory Manual.

b. Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan untuk identifikasi bakteri meliputi pewarnaan gram, uji katalase, uji motilitas, uji karbohidrat, uji oxidase, uji urease, uji nitrat, uji indol dan uji sitrat.

1. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram bakteri dilakukan dengan menggunakan sel bakteri yang berumur 24-48 jam. Isolat bakteri dioleskan setipis mungkin pada kaca preparat, kemudian difiksasi di atas api bunsen sampai kering. Selanjutnya teteskan larutan kristal violet (zat pewarna I atau zat pewarna utama) dan tunggu selama 1 menit, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Kemudian preparat dibilas dengan alkohol sampai warna ungu menghilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin, didiamkan selama 30 detik, selanjutnya dibilas dengan akuades. Kaca objek diletakkan dalam posisi tegak pada rak kaca agar mengering. Amati bakteri

dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet, sedangkan gram negatif berwarna merah jambu (Becerra *et al.*, 2016; Thairu *et al.*, 2014)

2. Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% pada koloni murni. Teteskan 1 tetes larutan H₂O₂ di atas permukaan koloni. Bakteri yang bersifat katalase positif terlihat adanya pembentukan gelembung gas di sekitar koloni dan jika gas tidak terbentuk berarti bakteri bersifat katalase negatif (Facklam dan Elliot, 1995; Hemraj *et al.*, 2013).

3. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan metode *Hanging Drop* yaitu ditetaskan sampel bakteri pada preparat cekung kemudian ditutup dengan gelas penutup. Motilitas bakteri dilihat dengan menggunakan mikroskop. Pergerakan bakteri akan terlihat arah dan kecepatan yang berbeda (Aygan dan Arikan, 2007).

4. Uji Indol

Uji indol dilakukan dengan menginokulasikan bakteri pada media, kemudian di inkubasi pada suhu 37°C. pengamatan dilakukan dengan menambahkan reagen Kovac's. Uji indol menunjukkan hasil positif jika terbentuk lapisan atau cincin merah pada permukaan medium (Hemraj *et al.*, 2013).

5. Uji Karbohidrat

Uji karbohidrat dilakukan dengan menginokulasikan sampel bakteri ke dalam larutan berbeda yang berisi glukosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, maltose, dan manitol. Masing-masing larutan mengandung brom timol biru (BTB) sebagai indikator pH dan ditambahkan pepton sebagai sumber nitrogen, mineral dan vitamin. Masing-masing campuran dengan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji karbohidrat menunjukkan hasil positif jika terbentuk asam dengan ciri warna kuning dan terbentuk gas pada tabung durham.

6. Uji Sitrat

Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasikan sitrat. Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan sampel bakteri pada media agar (pepton 1.25 g, 1% simon sitrat, dan 50mL aquades

steril). Media campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Uji sitrat positif jika koloni bakteri berwarna biru, sedangkan uji negatif ketika koloni berwarna hijau.

3.3.5 Produksi enzim dan uji aktivitas enzim pektinase dari bakteri pektinolitik

a. Optimasi Produksi ekstrak kasar pektinase.

Produksi pektinase dari bakteri yang telah dipilih dan teridentifikasi secara morfologi, makroskopis, mikroskopis dan biokimia dibagi menjadi 3 tahapan utama yaitu optimasi produksi ekstrak kasar pektinase, produksi skala besar ekstrak pektinase dan purifikasi enzim. Optimasi merupakan salah satu cara untuk mengetahui waktu inkubasi optimum pada masing-masing isolat dalam menghasilkan pektinase. Di inokulasikan 100 µl bakteri kedalam media pektin 1 % untuk kemudian di inkubasi selama 3 hari. Pemanenan ekstrak kasar pektinase dilakukan mulai jam ke 0, jam ke 24, jam ke 48, jam ke 60. Pemanenan dilakukan dengan cara mensentrifuge kecepatan 8000rpm selama 10 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak kasar crude enzim diambil dan di uji aktivitas enzim menggunakan metode analisis gula reduksi *Somogyi-Nelson* (Nelson, 1994)

Sebanyak 500 µl substrat pektin dalam 20 mM buffer asetat pH 5 di inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dalam waterbath. Selanjutnya kelompok uji dimasukan 100 µl ekstrak kasar pektinase hasil panen dan di inkubasi waterbath suhu 37°C selama 2 jam. Selanjutnya ditambahkan 500 µl larutan somogy pada kelompok uji dan kontrol. Reagen *Somogyi* berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik. Setelah di inkubasi 2 jam, pada kelompok kontrol ditambahkan 100 µl ekstrak kasar kemudian dididihkan 15 menit. Selanjutnya yaitu ditambahkan 500 µl larutan *Nelson* dan ditambahkan 2,5 ml aquades. Masing-masing perlakuan diambil 1,3 ml dimasukan kedalam eppendorf dan disentrifuge 8000rpm 10 menit. Seluruh perlakuan diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 500 nm. Nilai absorbansi yang didapat dikonversi kedalam persamaan linear kurva standart glukosa untuk mengetahui kadar gula reduksinya.

$$Y = 0,0053 - 0,0049$$

Keterangan y: absorbansi panjang gelombang 500 nm

X: konsentrasi gula reduksi

Konsentrasi gula reduksi yang didapat kemudian di konversi kedalam Unit/ml yaitu 1 unit aktiivitas pektinase didefinisikan sebagai jumlah enzim untuk mengkatalis perubahan 1 μ ml gula reduksi permenit dalam kondisi pengujian.

$$\text{Aktivitas pektinase } \left(\frac{U}{ml}\right) = \frac{\text{Kadar gula reduksi} \times \text{faktor pengenceran}}{V \times t \times BM}$$

Keterangan : V : volume enzim (0,05 ml)

t : waktu inkubasi (120 menit)

BM : Berat molekul glukosa (180 g/ml)

b. Produksi enzim skala besar.

Ekstrak kasar (*crude*) enzim pektinase diperoleh dengan mensterifugasi kultur bakteri pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan, digunakan untuk pengujian aktivitas spesifik enzim pektinase.

b. Uji aktivitas spesifik enzim pektinase dari bakteri pektinolitik

Uji aktivitas pektinase dilakukan dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan *Somogyi-Nelson*. Reagen yang digunakan yaitu reagen *Somogyi* dan reagen *Nelson*. Reagen *Somogyi* berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik, sedangkan reagen *Nelson* berfungsi untuk mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat, sehingga dapat terwarnai dan terbaca nilai absorbansinya.

3.3.6 Purifikasi Parsial Pektinase Isolat Terpilih

Purifikasi dari isolat I4 yang telah dipilih dilakukan dengan 2 tahapan utama yaitu dialisis 10 kDa dan kromatografi penukar anion (*Anions Exchanger Chromatography*) dengan Sartobind MA Q-75.

a. Dialisis ekstrak kasar pektinase dengan kolom dialisis 10 kDa

Ekstrak kasar enzim yang telah diproduksi dalam skala besar dipisahkan berdasarkan ukurannya menggunakan kolom 10 kDa. Sebanyak 170 ml ekstrak kasar dilewatkan kedalam kolom dialisis 10 kDa kemudian di uji aktivitas enzimnya baik yang berada >10 kDa ataupun < 10 kDa.

b. Kromatografi penukar anion (*Anions exchanger chromatography*)

Enzim yang didapatkan melalui proses dialisis kemudian dimurnikan kembali dengan menggunakan *anion exchanger chromatography*. Optimasi dilakukan dengan mengalirkan 20 ml enzim dalam 20 ml 20 mM buffer asetat pH 5 kedalam kolom matriks. Elusi dilakukan dengan menggunakan NaCl dalam 20 mM buffer asetat pH 5 dengan variasi konsentrasi NaCl 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M dan 0,5 M dengan kecepatan aliran elusi diatur sebesar 0,5 ml/mrnit. Eluat dari masing-masing konsentrasi di tampung dengan per fraksinya sebanyak 10 ml. Kuantitas protein diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 280 nm dan aktivitas enzimnya diukur berdasarkan gula reduksi yang dihasilkan dan di uji dengan metode Somogy Nelson selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan panjang gelombang 500nm (Nelson, 1944).

3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data jenis kualitatif hasil identifikasi bakteri secara makroskopis, mikroskopis, biokimia dan data kuantitatif hasil purifikasi.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat bakteri pektinolitik pada sistem pencernaan *C. pavonana* yaitu isolat I2 mendekati genus *Acetobacter* dan isolat I3, I4 mendekati genus *Neisseria*
2. Terdapat aktivitas enzim pektinase pada keseluruhan isolat, dengan aktivitas enzim tertinggi terdapat pada isolat I4 dengan nilai 0,107 U/ml.
3. Hasil purifikasi enzim dengan Anion Exchanger Chromatography menunjukkan bahwa terdapat 1 peak yang memiliki aktivitas enzim tertinggi dengan *purification fold* sebesar 13,582 dan *yield* 10,79%.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan pada penelitian kali ini yaitu perlu dilakukan penelitian lanjut dengan mengidentifikasi secara molekuler pada isolat bakteri hasil isolasi dari sistem pencernaan *C. pavonana* dan perlu dilakukan karakterisasi enzim pektinase hasil purifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaisha, G.A., dan Barate, D.L. 2016. Isolation and Identification of Pectinolytic Bacteria from Soil Samples of Akola Region, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 5(1): 514-521.
- Alcantara, S.R., N.J. Leite dan F.L.H. D. Silva. 2013. Scale up of polygalacturonase production by soil state fermentation process. *Intech open science*
- Anand, A.A.P., S.J. Vennison, S.G. Sankar, D.I.G. Prabhu, P.T. Vasan, C.J. Geoffery, dan S.E. Vendan. 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of insect science*.10.
- Atmojo, M.A, Z, Hao, dan D. Monhen. 2013. Evolving views of Pectin Biosynthesis. *Annual. Rev. Plant Biol.* 64:747-79
- Augimeri, R.V., A.J. Verley dan J.L. Strap. 2015. Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions : Lessons Learned from Diverse Biofilm-Producing Proteobacteria. *Review.Fronties Microbiology*.6.
- Aygan, A., dan B. Arikan. 2007. An Overview on Bacterial Motility Detection. *International Journal Of Agriculture and Biology.* 9(1):193-196.
- Becerra, S.C., D.C. Roy, C.J. Sanchez, R.J. Christy dan D.M. Burmeister. 2016. An optimized staining technique for the detection of gram positive and gram negative bacteria within tissue. *Biomed Central*.9:216
- Biosciences, A. 2001. *Protein Purification – Handbook*. Swedwn: Snits & design AB.
- Cakici, F.O., A. Sevim, Z. Demirag dan I. Demir. 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(Lepidoptera:Noctuidae) larvae and some Bacillus strain as biocontrol agents. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*.38:99-110.

- Corby, H. V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E., and Promislow, D. E. L. (2007). Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3470–3479.
- Cutler, P. 2004. *Protein Purification Protocol 2nd Edition*. Humana Press.
- Delalibera, I., J. Handelsman, dan K.F. Raffa. 2005. Contrast in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* dan *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculinidae). *Journal of Environment Entomology*. 34 (3): 541-547.
- Dillon R.J., dan V.M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* .49: 71–92.
- Douglas, A. E. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* 60:17–34.
- Ebenebe, A. A., Sulifoa, J. B. and Boe, G. P. 2006. Species complex and importance of leaf-eating caterpillars of head cabbage in Samoa. *Journal of South Pacific Agriculture*. 13. 6-10.
- Engel, P. dan N.A. Moran. 2013. The gut microbiota of insect – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology*. 37:699-736.
- Facklam, R dan J.A. Elliot. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci ,excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4):479.
- Fikrinida, I.A., Purwadira, T, dan Santosa, D.A. 2000. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Selulase Ekstremofil dari Ekosistem Air Hitam. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 5 (2): 75-80.
- Geetha, M., P. Saranraj, S. Mahalaksmi, dan D. Reetha. 2012. Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes. *International journal of biochemistry & biotech science*. 1:30-42.

Giacobbe, S., O. Pepe, V. Ventorino, L. Birolo, R. Vinciguerra, dan V. Faraco. 2014. Identification and characterisation of a pectinolytic enzyme from *paenibacillus xylanolyticus*. *J. Bioresource*.9(3): 4873-4887.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2017. Taxonomy Browser. www.gbif.org [28 Oktober 2018]

Grodzki, A.C. dan E. Berenstein. (2010). Antibody Purification: Ion-Exchange Chromatography. *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 588: 27-32.

Hasyim, A, Nuraida dan Trizelia 2009, 'Patogenisitas jamur entomopatogen terhadap stadia telur dan larva hama kubis, *Crociodolomia pavonana Fabricus*', *J. Hort*. 19 (3): 334-43.

Hemraj, V., S. Diksha dan G. Avneet. 2013. A Review commonly used biochemical test test for bacteria. *Innovare journal of life science*. 1.

Hold, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley dan S.T. Williams. 1994. *Bergeys manual of Determinative Bacteriology* ninth edition. William and Wilkins. USA

Kalshoven, L. G. E. 1981. *The Pest of Crop in Indonesia*. Jakarta: PT Ichtiar Baru

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., dan Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol*.57:503-507.

Khan, M., N. Bibi dan A. Zeb. 2015. Optimization of Process Conditions for Pectin Extraction from Citrus Peel. *Science, Technology and Development*. 34 (1):9-15.

Kismiyati., S. Subekti, R.W.N. Yusuf dan R. Kusdarwati. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri gram negatif pada luka ikan maskoki (*Carassius aratus*) akibat infeksi ektoparasit *Argulus* sp. *J. Ilmiah Perikanan dan Kelautan*.1(2).

Koolman, J dan K.H Roehm. 2005. *Atlas Of Biochemistry*. Ed Ke-2. New York : Thieme.

- Lersen, N., C.B.D. Souza, L. Krych, T.B. Cahu, M. Wiese, W. Kot, K.M. Hensen, A. Blennow, K. Venema, dan L. Jespersen. 2019. *Frontiers in Microbiology*.10.
- Liu, G., M. C. Tang dan R.M Exley. 2015 Non-pathogeniz Neisseria : members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *J. Microbiology*.161,1297-1312
- Maatsch, J.M., M. Bencivenni, A. Caligiani, T. Tedeschi, G. Bruggeman, M. Bosch, J. Petrusan, B.V. Droogenbroeck, K. Elst, S. Sforza. 2016. Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*.37-45.
- Mahdavi, A., M. Ghadamyari, R.H. Sajedi, M. Sharifi, B.R. Kouchaki. 2013. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. *Journal of insect science*.13(8).
- Manal., S.Selim, Sahar, S. Mohamed, G. Manal, M. Mohsen, M. Asker dan O.H.E. Sayed. 2016. Purification and kinetics of pectinase producing from *Paenibacillus lactis* NRCI locally isolated from Egyptian mangrove habitat. *Der Pharma Chemicia*. 8(9):150-159.
- Marcia, M.C.N., Soares, R.D. Silva dan E. Gomes. 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* *J. Revista de Microbiologia*. 30:299-303.
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R., dan Jenkins, J. 1997. Two Crystal Structures of Pectin Lyase a From *Aspergillus* Reveal a pH Driven Conformational Change and Striking Divergence in the Substrate Binding Clefs of Pectin and PectateLyases. *Structure*.5(5):677-689.
- Murray, Granner, Mayes, dan Rodwell. 2003. *Harper's Illustraterd Biochemistry 26th Edition*. USA: Mc-Graw Hill Companies Inc.
- Nelson, N., 1994. A Photometric Adaptation of the Somogy Method for the Determination of glucose. *Biol. Chem*.153:375-380.

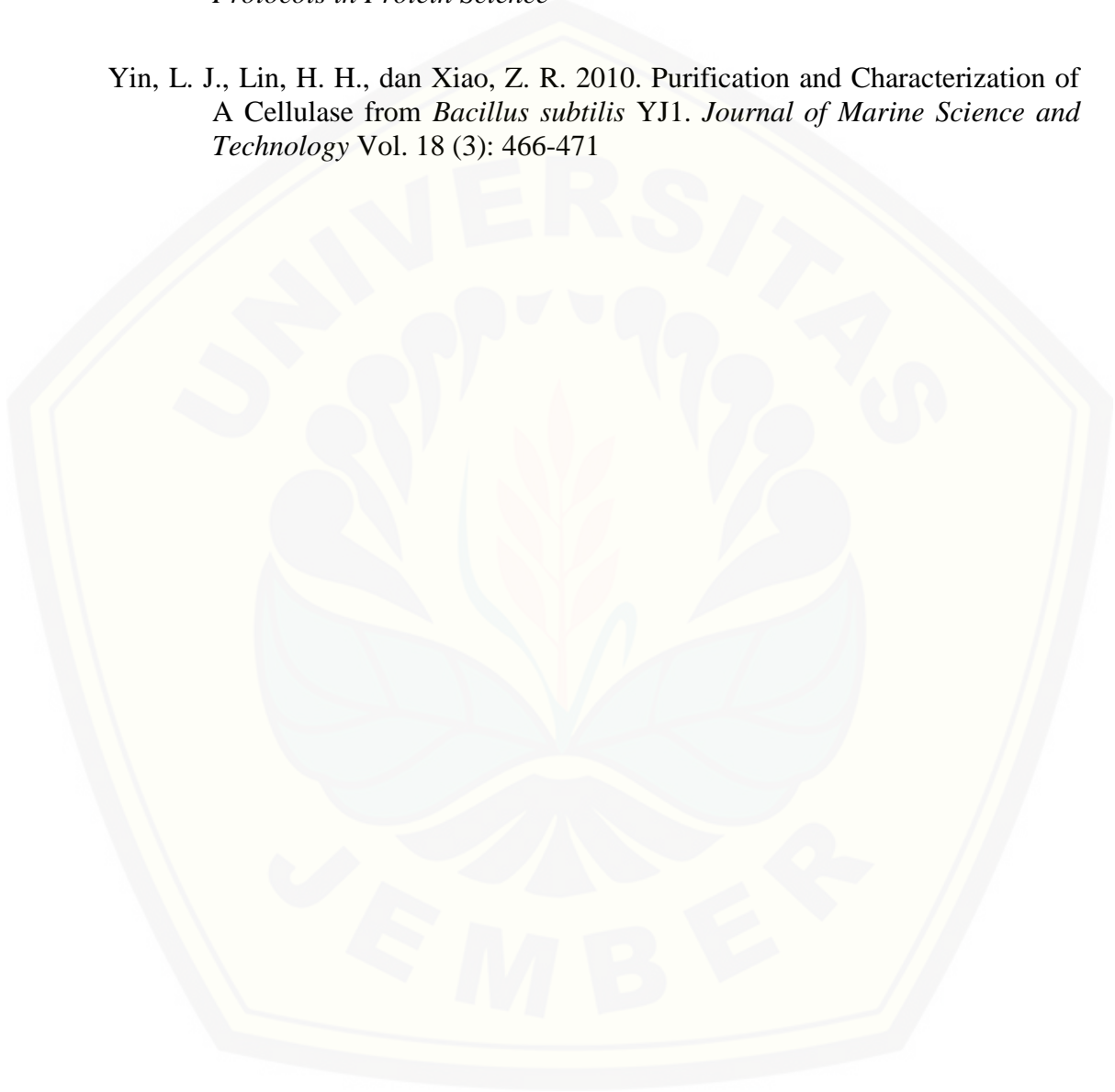
- Nussinovitch. 1997. *Hydrocolloid Applications Gum Technology in the Food and Other Industries*. London: Blackie Academic and Professional
- Pal,S., dan P. Karmakar.2018. Symbionts associated with insect digestive system and their role in insect nutrition. *J. Entomology and Zoology Studies*.6(5):421-425.
- Park D.S., H.W. Oh, W.J. Jeong, H. Kim , H.Y Park, dan K.S. Bae. 2007. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine Longicorn beetle species and their exoenzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *The Journal of Microbiology* .45(5): 394-401.
- Pedrolli, D.B., A.C. Monteiro, E.Gomes, dan E.C.Carmona. 2009. Pectin and pectinase: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 9-18.
- Prijono. D., dan E. Hasan. 1992. Life cycle and demography of *Crocidolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) on broccoli in the laboratory. *Indonesian Journal Tropical Agriculture*. 4(1): 18-24.
- Sathyanarayana,N., Gummadi, dan T. Panda. 2002. Purification and biochemical properties of microbial pectinases review. *Process biochemistry*. 987-986.
- Sharma, M., M. Rathore, N. Sharma, S. Dayama, B. Jogpal, K. Dashora, dan A. Sharma. 2011. *Journal of medical & dental research*. 11(3).
- Shen, J. C., Zingg, J. M., Yang, A. S., Schmutte, C., dan Jones, P. A. 1995. A Mutant HpallMethyltransferase Functions as a Mutator Enzyme. *Nucleic Acids Resources*.23(21):4275-4282.
- Smirnov, V.V., V.V. Golovchenko, F.V. Vityazey, O.A. Patova, N.Y. Selianov, O.G. Selianova, dan S.V. Popov. 2017. The Antioxidant Properties of Pectin Fractions Isolated from Vegetables Using a Simulated Gastric Fluid. *Journal of chemistry*.
- Smyth, R.R., M.P. Hoffmann, dan A.M. Shelton. 2003. Larval Performance in Relation to Labile Oviposition Preference of *Crocidolomia pavonana* [F.]

- (Lepidoptera: Pyralidae) Among Phenological Stages of Cabbage. *Environmental entomology*. 32(4).
- Sulifoa, J. B., Furlong, M. J. and Kant, R. 2016. Oviposition strategies of large cabbage moth (*Crocidolomia pavonana*) on Chinese cabbage. *New Zealand Plant Protection* .69-326.
- Syahroni, Y.Y., dan D. Priyono. 2013. Aktivitas insektisida ekstrak buah *Piper aduncum* L. (Piperaceae) dan *Sapindus rarak* DC. (Sapindaceae) serta campurannya terhadap larva *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). *Indonesian Journal of Entomology*. 1(10): 39-50.
- Takeuchi, H., M.P. Zalucki, dan M.J. Furlong. 2009. *Crocidolomia pavonana* larval foraging: behavior and feeding site preferences on cabbage, *Brassica oleracea*. *Entomologia Experimentalis et applicata*.133:154-164.
- Tang, X., D. Freitalk, H. Vogel, Y. Shao, E.A. Cordero, G. Andersen, M. Westermann, D.G. Heckel, W. Boland. 2012. Complexity and Variability of Gut commensal microbiota in polyphagous lepidoptera larvae. *Commensal Mikrobiota*. 7(7).
- Thairu, Y., I.A. Nasir dan Y. Usman. 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious disease. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. 1(4)
- Voragen, A.G.J., G.J. Coenen, R.P. Verhoef dan H.A. Schols. 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in cell walls. *Struct Chem*.20:263-275.
- Wang,H., N. Wu, J.K. Kundu, W. Liu, dan X. Wang. Higher bacterial diversity of gut microbiota in different natural populations of Leafhopper Vector does not influence WDV transmission. *J. Frontiers in Microbiology*. 10:1:144
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., & Woolverton, C.J., (2009), Prescott's Principles Of Microbiology. Boston: McGraw-Hill Higher Education
- Williams, A.G.1983. Staining reactions for the detection of hemicellulose-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 20(2), 253-258.

Wilson, K. dan J.M Walker .2000. Protein and enzyme techniques“ in Wilson K. & Walker J.M. (ed.) *Practical Biochemistry*, Cambridge University Press, p. 161-226.

Wingfield, P. T. 2001. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*

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



LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Reagen Somogyi

Komposisi	Jumlah
Na ₂ CO ₃	24 gr
C ₄ H ₄ KNaO ₆ H ₂ O (Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate)	12 gr
NaHCO ₃	16 gr
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 %	40 ml
Na ₂ SO ₄	180 gr
Akuades	1000ml

Lampiran B. Komposisi Reagen Nelson

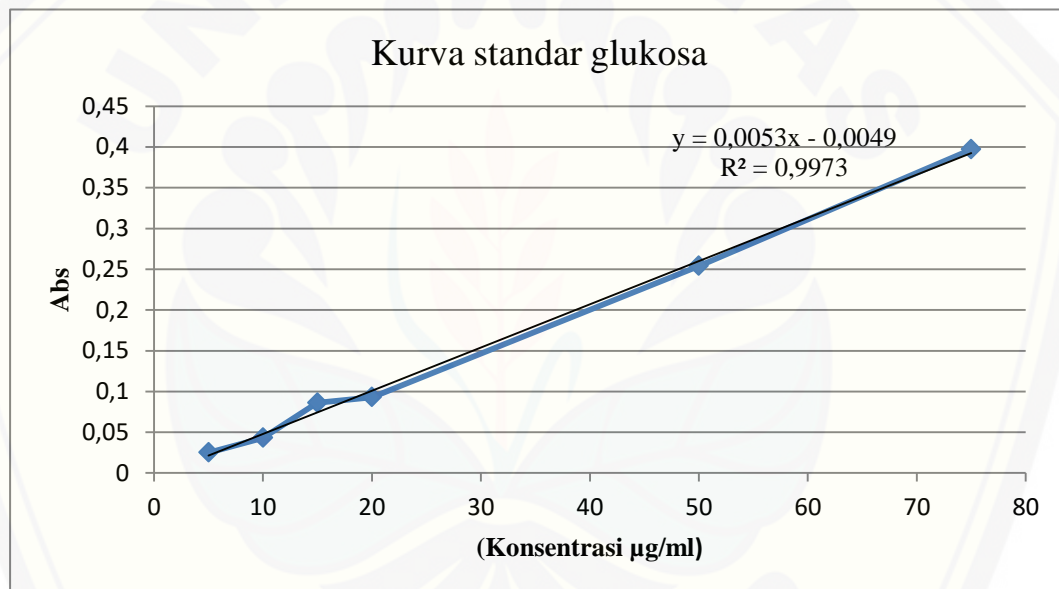
Komposisi	Jumlah
(NH ₄) ₂ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	50 gr
Sulfuric acid	46 ml
NaHSO ₄ .7H ₂ O	6 gr
Akuades	1000 ml

Lampiran C. Rangkuman Hasil Purifikasi

Tahap purifikasi	Volume (ml)	Aktivitas (U/ml)	Total Aktivitas (U/ml)	Abs 280 nm	Tot Abs	Aktivitas /Abs 280 nm	Yield (%)	Purification fold
Crude Enzim	170	0,104	17,68	26,9	4573	0,003	100	1
dialisis 10 kDa	166	0,049	8,134	20,03	3324,98	0,002	46,00	0,632
Anion Exchanger MA Q-75	10	0,190	1,909	3,6354	36,35	0,052	10,79	13,582

Lampiran D. Kurva Standar Glukosa

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi (500 nm)
5	0,025
10	0,043
15	0,086
20	0,093
50	0,254
75	0,397



Lampiran E. Tabel Hasil Identifikasi Isolat Terpilih (I2, I3 dan I4)

Tabel E.1. Perbandingan Karakter Morfologi Mikroskopis dan Biokimia Isolat I2

Karakter	I2	Acetobacter	Azotobacter
Gram	Gram negatif	Gram Negatif	Gram Negatif
Bentuk Sel	Coccus (Bulat)	Coccus (Bulat)/Rods (Batang)	Ovoid
Motilitas	Motil	Non motil/motil	Motil/Non motil
Oxidase	Negatif	Negatif	Positif/Negatif
Indol	Negatif	Negatif	
Pembentukan Asam	Positif	Positif	

Tabel E.2. Perbandingan Karakter Morfologi Mikroskopis dan Biokimia Isolat I3 dan I4

Karakter	I3	I4	Neisseria	Morococcus
Gram	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif
Bentuk Sel	Coccus (Bulat)	Coccus (Bulat)	Coccus (Bulat)/Rods (Batang)	Coccus (Bulat)
Motilitas	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil
Oxidase	Positif	Positif	positif	Positif
Indol	Positif	Negatif		negatif
Pembentukan Asam	Positif	Positif	positif	positif

Lampiran F. Hasil Analisis Uji One Way Anova

Descriptives

zonabening

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Isolat 1	5	1,22890	,111338	,049792	1,09066	1,36714	1,065	1,350
Isolat 2	5	1,26000	,085147	,038079	1,15428	1,36572	1,150	1,360
Isolat 3	5	1,29200	,052631	,023537	1,22665	1,35735	1,220	1,350
Isolat 4	5	1,30000	,121244	,054222	1,14946	1,45054	1,100	1,430
Isolat 5	5	1,05660	,052133	,023314	,99187	1,12133	1,000	1,100
Total	25	1,22750	,122090	,024418	1,17710	1,27790	1,000	1,430

Test of Homogeneity of Variances

zonabening

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,807	4	20	,535

ANOVA

zonabening

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,198	4	,050	6,226	,002
Within Groups	,159	20	,008		
Total	,358	24			

zonabening

Duncan^a

Jenisisolat	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Isolat 5	5	1,05660	
Isolat 1	5		1,22890
Isolat 2	5		1,26000
Isolat 3	5		1,29200
Isolat 4	5		1,30000
Sig.		1,000	,262

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.