ADLN - Perpustakaan Unair

PEMURNIAN PARSIAL ENZIM XILANASE ASAL ISOLAT SUMBER AIR PANAS PACET, JAWA TIMUR

SKRIPSI

NI NYOMAN PURWANI

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

PEMURNIAN PARSIAL ENZIM XILANASE ASAL ISOLAT SUMBER AIR PANAS PACET, JAWA TIMUR

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia
Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga

Oleh :

NI NYOMAN PURWANI
NIM. 080212480

Tanggal Lulus : 19 Juli 2006

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,

Dr. Ni Nyoman Tri P., M.Si
NIP. 131 653 446

Pembimbing II,

Dr. Afaf Baktir, M.S.
NIP. 132 286 710

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul	:	**PEMURNIAN PARSIAL ENZIM XILANASE ASAL ISOLAT SUMBER AIR PANAS PACET, JAWA TIMUR**
Penyusun	:	**Ni Nyoman Purwani**
NIM	:	**080212480**
Pembimbing I	:	**Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si**
Pembimbing II	:	**Dr. Afaf Baktir, M.S.**
Tanggal Ujian	:	**19 Juli 2006**

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,

Dr. Ni Nyoman Tri P., M.Si
NIP. 131 653 446

Pembimbing II,

Dr. Afaf Baktir, M.S.
NIP. 132 286 710

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Airlangga

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL UNIVERSITAS AIRLANGGA JURUSAN KIMIA

Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D
NIP. 131 801 627

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

ADLN - Perpustakaan Unair

Failure does not mean I'm a failure;
It does mean I have not yet succeeded.

Failure does not mean I have accomplished nothing;
It does mean I have learned something.

Failure does not mean I have been a fool;
It does mean I had enough faith to experiment.

Failure does not mean I have disgraced;
It does mean I have dared to try.

Failure does not mean I don't have it;
It does mean I have something to do in a different way.

Failure does not mean I am inferior;
It does mean I am not perfect.

Failure does not mean I have wasted my life;
It does mean that I have an excuse to start over.

Failure does not mean that I should give up;
It does mean that I should try harder.

Failure does not mean that I will never make it;
It does mean that I need more practice.

Failure does not mean that you have abandoned me;
It does mean that you must have a better idea

ADLN - Perpustakaan Unair

Puji syukur pada Ida Sang Hyang Widhi Wasa karena atas karuniaNya yang tiada henti penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Terselesainya penyusunan skripsi dan masa studi selama 4 tahun ini tentunya tak lepas juga dari bantuan, semangat, dukungan dan do'a dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penyusun ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. *Ibu Dr Ni Nyoman, M.Si. selaku pembimbing I (penginspirasiku) atas segala bimbingan, bantuan, masukan-masukan dan semangatnya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.*
2. *Ibu Dr. Afaf Baktir, M.S selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikirannya untuk melakukan bimbingan.*
3. *Dr. Y.Sri Wulan. M dan Drs Hamami, M.Si, sebagai dosen penguji atas saran-saran yang diberikan untuk perbaikan penyusunan skripsi ini*
4. *Ibu Dra Tjitjik Srie T., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga.*
5. *Bapak Drs.Bambang Kurniadi, Apt. selaku dosen wali atas perwalian yang telah diberikan selama ini.*
6. *Bapak dan Ibu dosen FMIPA Kimia Unair yang telah memberikan ilmunya.*
7. *Bapak dan ibuku yang telah merawat, mendidik dan selalu memberi dukungan dan do'a dengan limpahan kasih dan sayang.*
8. *Kakak-kakakku tersayang (suan dan made) atas nasehat-nasehatnya, doa serta kesabarannya dalam mendengarkan keluh kesahku. Maafkan bila sering menyusahkan.*
9. *Adik-adikku (Surya dan Novi) sorry ya sering bikin computernya jadi error. Belajar yang rajin ya.*
10. *Sahabat-sahabatku yang aku sayangi, si kalem l-ly(tapi itu hanya penampakan luarnya aja kok, klo aslinya cari tahu sendiri he.he.he.) mami(dian, yang semangat ye) Luphy(kapan-kapan kita YM lagi yuuuk, oh ya lain kali klo kirim email janagn salah kirim yo), Wiwik (jangan suka melamun wik), Popo(sang pendongeng), Shanti (kapan2 nitip jelly fruit ya, gratis tapi he.he.he.) iden , thank's atas persahabatan yang telah terjalin diantara kita, suka duka telah kita lewati bersama. Puji syukur pada Yang Widhi karena menghadiahkan teman-teman sebaik kalian . Semoga persahabatan kita tidak hanya sampai disini.*
11. *Spesial my best friend and sister Dewik (Niu) Thank's karena kamu sahabat terindah yang pernah kumiliki, maaf bila keegoisankuq membuat jalinan persahabatan kita tak lagi seindah dulu.*
12. *Buat fren2 ku (enix, ayuk, luh ade , diah suseni, winasih, widnya, ariani), kapan ya kita ngumpul2 lagi.*
13. *My favourite teacher terima kasih atas nasehatnya sebelum berangkat ke SBY*

ADLN - Perpustakaan Unair

14. Penghuni lab Biokim Nuri(semangaaaaaaaaaat, kamu pasti bisa), hantul (jangan hianati a'a bowo ya) ratnil (btw info u up to date tuch) rohma, ana, diah , uul, uus, amel kapan rujakkan lagi rek?
15. Mbak One dan mbak Anita (the third and fourth sister) sing akur ya atas bantuan dan nasehatnya , Kiki (tin-tin) jangan gampng patah semangat y masih banyak kesempatan kok
16. Bu Mirni terima kasih atas pinjaman buku2nya dan nasehatnya, sekaligus masukkannya buat penyusunan naskah skripsinya. Makasih juga buat bu Elly dan bu Melati atas saran-sarannya. Mbak Helen dan mas Erik TDC atas bantuannya mengerjakan zimogram dan SDS-PAGE. Bu Dewi dan mahasiswanya (Djoko dan Toriq) atas bantuan dan semangatnya.
17. Teman-teman dilab organic, ndonk, widi, mbak nia, ririn , rani, saenah(semangat y) atas kerjasamanya selama menjadi penghuni lab lantai 2.
18. Teman-temanku yang baik joe, ida, alfa, , haning, nila, silvi, juhana n semua teman-teman angkatan '02 senang bisa mengenal dan berteman dengan kalian semua. Don't Forget Me.OK, juga buat adik-adik angkatan'03 Ira(thank's 4 the lucky shoe), Nuke , '04 n '05 makasih atas bantuan dan semangatnya.
19. Seluruh penghuni kosim kost terutama Nana (sorry sering bikin kamu kesel, coz aq sering BT, Thank's atas waktunya dengerin curhatku n pinjeman computernya), ria, musriati, okti, zumi.
20. Konco2 ku KKN(Indah, singo, lina, wisnu, mirza) n semuanya yang tidak bisa disebutkan satu-persatu
21. Pak Damam, Mas Fendi dan semua karyawan jurusan Kimia FMIPA Unair atas bantuannya selama ini sehingga semuanya dapat terselesaikan dengan lancar. Buat Pak Damam maap ya pak kalo sering nyusahin makasih banyak telah nemenin lembur.
22. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, semoga amal baik yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Ida Sang Hyang Widhi Wasa.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur atas segala limpahan rahmat yang Tuhan berikan kepada penyusun sehingga dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pemurnian Parsial Enzim Xilanase Asal Isolat Sumber Air Panas Pacet, Jawa Timur" sebagai syarat untuk penyusunan skripsi.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Untuk itu penyusun mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca untuk penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan siapa saja yang membacanya

Surabaya, juli 2006

Penyusun,

Ni Nyoman Purwani

Ni Nyoman Purwani, 2006. Pemurnian Parsial Enzim Xilanase Yang DiisolasiDari Sumber Air Panas Pacet, Jawa Timur. Skripsi dibawah bimbingan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan Dr, Afaf Baktir. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga.

ABSTRAK

Pada penelitian ini telah dilakukan pemurnian parsial enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur dengan menggunakan metode kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion. Tahap pemurnian enzim xilanase dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat dan diikuti dengan proses dialisis, kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar anion. Hasil yang diperoleh menunjukkan terjadi peningkatan kemurnian enzim dari ekstrak kasar sebesar 62,18 kali setelah dilakukan kromatografi interaksi hidrofobik dan didukung oleh munculnya dua aktivitas enzim xilanase setelah dilakukan kromatografi interaksi hidrofobik. Sedangkan untuk kromatografi penukar anion perlu dilakukan optimasi lebih lanjut untuk mendapatkan fraksi enzim xilanase yang lebih murni.

Kata kunci: *xilanase, pemurnian parsial, kromatografi*

Ni Nyoman Purwani, 2006. Partial Purification of Xilanase Enzyme From Pacet ot Spring, East Java. This script under graduence by Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih and Dr. Afaf. Baktir. Chemistry Department of Mathematic and Natural Science of Airlangga University.

ABSTRACT

Partial purification of xylanase enzyme from Pacet Hot Spring, East Java have been done in this research. The purpose of this research is knowing purification level of xylanase enzyme which isolated from Pacet hot spring, East Java by hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography method. The steps of partial purification was carried out by addition of ammonium sulfhate and followed by dialysis, interaction hydrophobic chromatography and anion exchange chromatography. The result shown that there was an increasing purity level of xylanase enzyme from crude extract as much as 62,18 after hidrorobic interaction hidrofobic chromatography has been done. The result of chromatography hidrofobic shown there was two activity of xylanase enzyme in 2^{nd} and 6^{th} fraction. Eventhough anion exchange chromatography need optimation to get xylanase enzyme fraction.

Key word: *xylanase, partial purification, chromatography.*

DAFTAR ISI

Judul		Halaman
HALAMAN JUDUL		
LEMBAR PENGESAHAN		
KATA PENGANTAR		i
ABSTRAK		ii
ABSTRACT		iii
DAFTAR ISI		iv
DAFTAR TABEL		vi
DAFTAR GAMBAR		vii
DAFTAR LAMPIRAN		ix
BAB I	PENDAHULUAN	1
	1.1 Latar belakang masalah	1
	1.2 Manfaat penelitian	3
	1.3 Tujuan penelitian	3
	1.4 Manfaat penelitian	3
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	4
	2.1 Mikroorganisme termofilik	4
	2.2 Enzim	5
	2.2.1 Spesifitas enzim	6
	2.2.2 Kompleks enzim substrat	7
	2.2.3 Enzim termofil	8
	2.3 Enzim xilanase	8
	2.4 Pemurnian enzim	13
	2.4.1 Pemekatan enzim	14
	2.4.2 Kromatografi kolom	17
BAB III	METODE PENELITIAN	22
	3.1 Tempat dan waktu penelitian	22
	3.2 Sampel, bahan, dan alat penelitian	22
	3.2.1 Sampel penelitian	22
	3.2.2 Bahan penelitian	22
	3.2.3 Alat penelitian	22
	3.3 Prosedur kerja	24
	3.3.1 Diagram alir	24
	3.3.2 Pembuatan media	25
	3.3.2.1 Pembuatan media cair	25
	3.3.2.2 Pembuatan media padat	25
	3.3.3 Isolasi mikroba	26
	3.3.4 Seleksi isolat	27
	3.3.5 Uji aktivitas enzim	27

3.3.5.1 Uji dengan metode asam 3.5-dinitrosalisilat (DNS) 27
3.3.5.2 Pembuatan kurva standar xilosa 27
3.3.5.3 Uji kualitatif enzim xilanolitik dengan menggunakan substrat turunan p-nitrofenol 28
3.3.6 Pembuatan kurva standar protein 28
3.3.7 Fraksinasi enzim xilanse dengan amonium sulfat 28
3.3.8 Pemurnian parsial enzim xilanase 30
3.3.8.1 Kromatografi Interaksi hidrofobik 30
3.3.8.2 Kromatografi penukar ion 31
3.3.9 Elektroforesis SDS-PAGE 31

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 33
4.1 Isolasi mikroba penghasil enzim xilanase dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur 33
4.2 Pemurnian enzim xilanase 35
4.2.1 Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat 35
4.2.1 Kromatografi interaksi hidrofobik 37
4.2.3 Kromatografi penukar anion 38
4.3 Analisis Zimogram dan SDS-PAGE 41

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 45
5.1 Kesimpulan 45
5.2 Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 46

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Aplikasi xilanase dalam berbagai industri	12
4.1	Data aktivitas isolat penghasil xilanase dari sumber air panas Pacet	35
4.2	Pemurnian enzim xilanase	40

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Struktur xilan dan enzim yang terlibat dalam hidrolisisnya	9
2.2	Distribusi muatan dan bagian hidrofobik pada permukaan protein	15
2.3	Penataan molekul air disekitar residu hidrofobik pada permukaan protein	15
2.4	Agregasi protein melalui campuran pelarut organik	16
2.5	Pemisahan dengan dialisis	17
2.6	Kromatografi filtrasi gel	18
2.7	Matriks penukar kation dan anion	20
2.8	Kromatografi penukar ion	20
2.9	Kromatografi afinitas	21
2.10	Efek shielding off sebagai tenaga penggerak bagi interaksi ligan dan bagian hidrofobik	22
3.1	Bagan fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan ammonium sulfat	29
4.1	Isolat penghasil enzim xilanase	34
4.2	Pengendapan ekstrak kasar enzim xilanase dengan ammonium Sulfat	36
4.3	Profil elusi kromatografi interaksi hidrofobik dengan Buty-Toyopearl 650 M	38
4.4	Profil elusi kromatografi interaksi hidrofobik dengan DEAE-Toyopearl 650 M	40
4.5	Pita protein hasil analisis zimogram dari enzim	43

xilanolitik rekombinan M : penanda standar protein, X: enzim hasil fraksinasi dengan amonium sulfat

4.6 Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dari enzim xilanolitik isolat PC-01 M : penanda standar protein, H: enzim hasil pemurnian dengan kolom interaksi hidrofobik, I: enzim hasil pemurnian dengan krom penukar anion. 44

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul
1	Tabel pengendapan dengan amonium sulfat
2	Pembuatan reagen
3	Penyiapan tabung dialisis
4	Kurva standar xilosa
5	Penentuan aktivitas enzim xilanase dengan metode DNS
6	Kurva standar protein
7	Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat
8	Kromatografi interaksi hidrofobik
9	Data aktivitas enzim dari tiap tahapan pemurnian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Xilan merupakan komponen terbesar hemiselulosa yang terikat pada selulosa, pektin, lignin, dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel tanaman. Xilan merupakan heteropolisakarida kompleks dengan rantai tulang punggung homopolimer unit-unit D-xilopiranosa yang terikat β-1,4 (Kulkarni *et al.*,1999; Subramaniyan & Prema, 2002) yang biasanya mengandung rantai samping berupa gugus asetil, arabinosil dan glukuronosil. Kelimpahan xilan di biosfer menjadikan peranan enzim xilanolitik sangat penting untuk biokonversi xilan (Dung *et al.*, 1993). Biodegradasi xilan dilakukan oleh enzim xilanase yang diproduksi oleh berbagai organisme seperti bakteri, alga, fungi, protozoa, crustacea, serangga, dan benih tanaman.

Xilanase telah ditemukan pada berbagai bakteri dan fungi, beberapa di antaranya telah pula diklonkan (Blanco *et al.,* 1993). Kebanyakan xilanase dari sumber mikoorganisme tersebut bekerja pada kondisi pH optimum asam atau netral. Namun demikian manfaat xilanase yang luas dalam proses pemutihan bubur kertas dibatasi oleh kondisi proses yang berlangsung pada temperatur tinggi dan pH alkalis. Oleh karena itu, penemuan mikroorganisme yang mampu menghasilkan xilanase yang memiliki pH alkalis akan sangat menguntungkan dalam proses industri, terutama industri *pulp* dan kertas. Selain diperlukan

UNIVERSITAS AIRLANGGA

xilanase yang mampu bekerja pada suasana alkali maka termostabilitas enzim juga memegang peranan penting (Schafer *et al.*, 2000).

Xilanase yang tahan terhadap suhu tinggi dapat dihasilkan oleh mikroorganisme yang bersifat termofilik. Mikroorganisme termofil dapat diperoleh di antaranya dari sumber air panas, kawah gunung berapi, palung laut dalam serta gunung api bawah laut (BPPT, 2004). Xilanase yang berasal dari mikroorganisme termofil mendapat perhatian besar pada dekade terakhir ini karena sangat potensial sebagai alat bioteknologi dalam proses industri (Bajpai, 1999; Niehaus *et al,* 1993; Wong and Saddler, 1992) seperti industri makanan, makanan ternak serta industri *pulp* dan kertas. Xilanase menunjukkan potensi yang sangat besar dalam meningkatkan produksi beberapa produk yang berguna dalam bidang ekonomi. Aplikasi xilanase yang paling menarik adalah dalam pemrosesan hemiselulosa menjadi kertas. Selama proses pemutihan bubur kertas, xilanase telah digunakan untuk menggantikan klorin untuk menghasilkan kertas berkualitas tinggi. Penggunaan xilanase dalam proses ini dapat memberikan dampak yang baik terhadap kelestarian lingkungan (Irawan, 2001).

Enzim digunakan dalam bentuk ekstrak kasarnya maupun dalam bentuk murni. Enzim dalam keadaan murni diperlukan untuk analisis struktur primer, sekunder, tersier dan untuk penentuan urutan asam aminonya. Sekuen yang diperoleh ini bisa digunakan untuk sintesis primer degenerate (Erlich, 1992). Protein murni dapat juga digunakan sebagai marker atau petunjuk dalam penentuan berat molekul(BM) suatu sampel tertentu. Penggunaan enzim dengan kemurnian yang baik dapat meningkatkan spesifisitas dan efisiensi produksi di

industri. Pada penelitian ini akan dilakukan pemurnian parsial enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur. Tahap awal pemurnian dilakukan dengan metode fraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat dan dialisis. Tahap selanjutnya menggunakan kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion. Metode ini dipilih karena banyak penelitian terdahulu yang membuktikan bahwa pemurnian enzim dengan metode tersebut menghasilkan tingkat kemurnian yang cukup baik

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas maka dapat dirumuskan suatu masalah penelitian sebagai berikut: Bagamanakah tingkat kemurnian protein enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur dengan menggunakan metode kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur dengan menggunakan metode kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion.

1.4 Manfaat Penelitian

Memperoleh protein enzim xilanase yang murni, sehingga dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya, khususnya dalam aplikasinya ke industri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroorganisme Termofilik

Lingkungan yang ekstrem bagi manusia seperti kondisi pH, suhu dan kadar garam yang tinggi ternyata merupakan suatu habitat yang unik bagi mikroorganisme tertentu. Salah satu mikroorganisme yang unik ini adalah mikroorganisme yang dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang bersuhu tinggi. Kisaran suhu pertumbuhan dapat digunakan untuk menggolongkan mikroorganisme : psikrofil(-5-20^{0}C), mesofil (20-45^{0}C), termofil(45-65^{0}C), ekstrem termofil (65-85^{0}C) dan hipertermofil (85-110^{0}C). Sebagian besar mikroorganisme terakhir ini yang dapat hidup dengan subur pada kondisi air mendidih seperti mata air panas, kawah, solfatara dan sumber air panas dasar laut. Sebagian besar hipertermofil bersifat anaerob obligat dan beberapa diantaranya bersifat heterotrof obligat, yaitu hanya dapat menggunakan senyawa karbohidrat atau protein kompleks sebagai sumber karbon. Ada juga hipertermofil yang bergantung pada senyawa belerang untuk pertumbuhannya, dan menghasilkan hidrogensulfida yang bersifat korosif (Adams & Kelly 1995). Mikroorganisme termofil yang dapat tumbuh pada suhu 50-60^{0}C telah dikenal selama beberapa dekade lalu. Tetapi pada tahun 1968, Thomas D. Brock dari University of Winconsin, Madison, berhasil mengisolasi mikroorganisme yang tumbuh pada suhu 70^{0}C dan > 70^{0}C yang berasal dari Yellowstone National Park. Salah satu di antaranya dikenal dengan nama *Thermus aquaticus*, menghasilkan DNA

polimerase yang saat ini digunakan dalam proses PCR. (Adams and Kelly, 1995). Thomas D. Brock (1972) mengisolasi mikroorganisme yang dideskripsikan sebagai acidocaldirus dari tempat yang sama, yang mampu tumbuh pada suhu 85^0C. Mikroorganisme termofilik lain antara lain berasal dari kelompok aktinomisetes , bakteri asam laktat, bakteri gram negatif dan sianobakter (Stell & Walker, 1991).

2.2 Enzim

Kata *enzyme* atau enzim berasal dari kata yunani, en ("in") dan zyme yang berarti sesuatu didalam sel. Istilah enzyme dikemukakan untuk pertama kalinya oleh Kuhne yang banyak mengadakan penyelidikan tentang fermentasi pada tahun 1878. Selanjutnya Buchner menemukan bahan cairan sel ragi yang masih mampu melakukan fermentasi seperti yang dilakukan oleh sel hidupnya. (Lehninger, 1997). Enzim adalah protein tak hidup yang dihasilkan oleh sel hidup (eukariota dan prokariota) dan berfungsi sebagai katalis biologis yang spesifik. Dapat dikatakan semua reaksi kehidupan hanya bisa dimungkinkan dengan adanya enzim. Didalam sel, protein enzim melangsungkan ribuan reaksi kimia yang membuat sel dapat hidup mengekstrak energi dari lingkungan, mengubah sumber energi menjadi molekul bermanfaat, memperbaiki dan membangun diri-sendiri, melakukan pembuangan hasil samping, dan melakukan replikasi diri. Hampir seluruh reaksi fisologis dikatalisis enzim dengan meningkatkan kecepatan reaksi 10^6-10^{12} kali lebih cepat daripada reaksi tanpa katalis enzim. Reaksi katalitik oleh enzim pada umumnya bersifat cepat membentuk kesetimbangan, bekerja dalam

larutan encer, berlangsung pada suhu rendah, kondisi netral (Ottaway &Apps, 1984). Reaksi-reaksi biokimia didalam sel tidak mungkin terjadi secara tepat dan cepat seperti yang dikehendaki pada keadaan alamiahnya (suhu kamar) tanpa adanya biokatalisator enzim, yang bekerja dengan efisiensi dan selektifitas tinggi. Katalisator reaksi kimia tidak hanya terbatas pada enzim. Telah dikenal katalisator umum seperti logam-logam platina, tembaga, besi atau beberapa zat organik lainnya; akan tetapi hanya biokatalisator enzimlah yang diperlukan oleh suatu kehidupan (Lehninger, 1997).

2.2.1 Spesifitas enzim

Sifat spesifik dari enzim adalah daya kapasitas dan sifatnya yang spesifik terhadap reaksi. Disini berarti suatu enzim hanya bekerja terhadap satu substrat atau sejumlah kecil senyawa yang sejenis. Kekhususan enzim terhadap reaksi dapat bersifat:

1. absolut, bila suatu enzim yang dimaksud hanya dapat bereaksi dengan satu substrat saja,
2. relatif, suatu enzim dapat bereaksi dengan beberapa atau kelompok senyawa tertentu.

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

2.2.2 Kompleks enzim substrat

Sebelum enzim dapat melaksanakan fungsi katalitiknya (pemutusan atau pembentukan ikatan kimia), maka terlebih dahulu membentuk ikatan dengan substrat:

$$E+S \longrightarrow ES \longrightarrow E+P$$

Keterangan

E = Enzim

S = Substrat

ES = kompleks enzim substrat

Setelah substrat terikat pada enzim, baru kemudian terjadi proses katalisis yaitu pembentukan ikatan kimia. 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 misalnya ikatan elektrostatik, ikatan hidrogen, gaya-gaya van der walls ataupun interaksi hidrofobik. Interaksi yang terjadi antara molekul enzim dan substrat melibatkan gugusan reaktif baik dari enzim maupun dari substrat dan enzim 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 (Poedjiadi, 1986).

2.2.3 Enzim termofil

Enzim termofil merupakan enzim yang tumbuh secara optimal pada rentang suhu 50-80^{0}C. Diluar suhu tersebut aktivitas enzim menjadi tidak optimal. Enzim termofil dapat disebut sebagai enzim ekstremofil, karena memiliki stabilitas dan aktivitas pada temperatur yang tinggi, keberadan enzim ini sangat berguna dalam bidang bioteknologi (Claire V., Zeikus G., 2001).

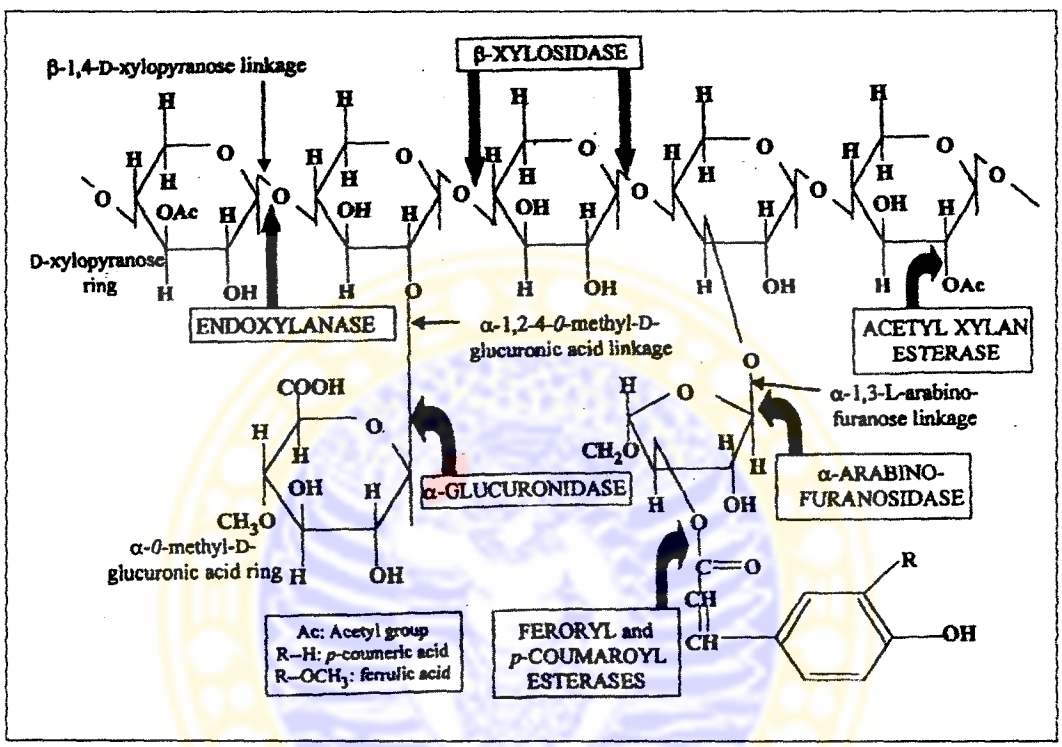
Enzim termofil memiliki beberapa kelebihan yaitu :

1. Mudah dimurnikan dengan perlakuan dalam kondisi yang panas,
2. Stabil dan resisten terhadap denaturasi dari bahan-bahan kimia,
3. Reaksi enzimatik dengan temperatur tinggi dengan konsentrasi substrat yang lebih tinggi, menghasilkan resiko kontaminasi terhadap mikroorgansme lain lebih kecil dan laju reaksi menjadi lebih kecil.

2.3. Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa atau xilo-oligosakarida. Xilan sebagai komponen utama dari hemiselulosa merupakan suatu heteropolimer dengan rantai utama berupa gugus xylosil yang diikat oleh ikatan β-1,4 yang biasanya mengandung rantai samping berupa gugus asetil, arabinosil dan glukoronosil. Oleh karena itu sistem enzim yang terlibat didalam

dedgradasi xilan biasanya terdiri dari enzim: endo-1.4-β-xilanase, β-xilosidase, α-glukoronidase, α-L-arabinofuranosidase dan asetilesterase (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Struktur xilan dan enzim yang terlibat dalam hidrolisisnya (Beg *et al.*, 2001)

.Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis yaitu β-xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase. β-xilosidase yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai oligosakarida. (Reilly,1991 ; Dekker,1983). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim β-xilosidase. Sebagian enzim β-xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim kurang dapat digunakan dalam industri penghasil xilosa.

Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa.

Endoxilanase mampu memutus ikatan β 1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut.

Pada umumnya xilanase merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Da, aktif pada suhu 55°C dengan pH 9 (Yang *et al*, 1988 ; Yu *et al*, 1991). Pada suhu 60°C dan pH normal , xilanase lebih stabil (Tsujibo *et al.*, 1992; Cho-Goo *et al.*, 1996).

Penggunaan enzim yang stabil pada kondisi ekstrem, yang terjadi pada kebanyakan proses industri, akhir-akhir ini meningkat pesat, karena proses pada kondisi ekstrem dapat mengurangi resiko kontaminan dan pada proses yang berlangsung pada suhu tinggi laju reaksinya akan lebih cepat. Oleh karena itu untuk mendapatkan xilanase yang sesuai dengan kebutuhan industri adalah dengan menggunakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme ekstremofil. Xilanase alkalis menjadi penting karena kegunaannya untuk pengembangan teknologi yang ramah lingkungan dalam industri kertas dan *pulp*. Xilanase dapat menghidrolisis xilan dengan lebih mudah karena polimer ini larut dalam kondisi alkalis.

Selama dekade terakhir, potensi bioteknologi dan apilkasi xilan serta xilanase telah menjadi perhatian utama dari para peneliti. Penggunaan xilanase dalam industri kertas dan *pulp* saat ini mendapat perhatian besar karena adanya peraturan lingkungan hidup yang ketat terutama pada penggunaan klorin dalam proses pemutihan kertas dan *pulp*. Perlakuan xilanase sebelum proses pemutihan kertas dan *pulp* dilaporkan dapat mengurangi penggunaan bahan kimia pemutih dan memberikan hasil akhir yang lebih baik.

Dalam proses pemutihan *pulp*, sangat diperlukan enzim dengan pH dan suhu optimum yang tinggi. Xilanase termostabil dari bakteri anaerobik termofilik Dictyoglomus sp. telah diuji kemampuannya dalam proses pemutihan *pulp*(Irawan, 2001)

Tabel 2.1. Aplikasi xilanase dalam berbagai industri (Beg. *et al.*, 2001)

No	Industri	Aplikasi	Fungsi
1	Buah dan sayuran	Jus buah dan jus sayur, pembuatan anggur, minyak zaitun dan minyak jagung.	Meningkatkan maserasi dan klarifikasi jus, mengurangi viskositas, meningkatkan hasil ekstraksi dan filtrasi, serta meningkatkan kualitas produk.
2	Kue	Pembuatan adonan kue dan pembuatan roti	Meningkatkan elastisitas dan kekuatan adonan sehingga mudah diolah meskipun dalam ukuran yang besar dan meningkatkan tekstur roti.
3	Makanan ternak	Untuk hewan *monogastric* (babi, unggas), dan hewan memamahbiak	Mengurangi kandungan polisakarida non pati, sehingga meningkatkan penggunaan protein dan pati. Meningkatkan daya cerna dan nilai nutrisi dari makanan yang susah didegradasi seperti gandum.
4	Pulp dan kertas	*Biobleaching* dari *kraft pulp*, *bio-mechanical pulping*, bio-modifikasi serat, *bio-de-inking*	Mengurangi penggunaan klorin dan bahan-bahan kimia lainnya. Mengurangi metode mekanik dalam proses *pulping*, mengurangi penggunaan energi yang lebih besar, meningkatkan efisiensi proses dan kekuatan kertas, menunjang proses *de-inking* dan penggunaan senyawa kimia yang bersifat basa.
5	Pati	Pemisahan zat perekat dari pati	Mengurangi viskositas adonan, meningkatkan penggumpalan dan proses efisiensi, mengurangi penggunaan klorin dan senyawa berbahaya.
6	Biokonversi	Pengolahan hasil pertanian, dan sampah industri makanan.	Daur ulang sampah, produksi hasil fermentasi, daur ulang bahan bakar, dan senyawa kimia berbahaya.

2.4 Pemurnian Enzim

Pemurnian bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa yang tidak dikehendaki. Tahap-tahap pemurnian tergantung dari tujuan akhir, apakah untuk tujuan komersial atau tujuan riset. Enzim yang kasar atau yang dimurnikan sebagian masih dapat dipakai untuk komersial, sedangkan enzim yang murni atau hampir murni dikehendaki dalam riset atau dipakai dalam produk analitik. Untuk tujuan riset, biasanya digunakan untuk mempelajari aktivitas enzim, struktur dan fungsinya. Jumlah dari protein yang telah dimurnikan tidak hanya bergantung pada material awal tetapi juga proses. Ada protein yang hilang pada setiap tahap pemurnian, karena itu untuk memaksimalkan proses diusahakan sesedikit mungkin tahap pemurnian yang digunakan (Harris and Angal, 1989).

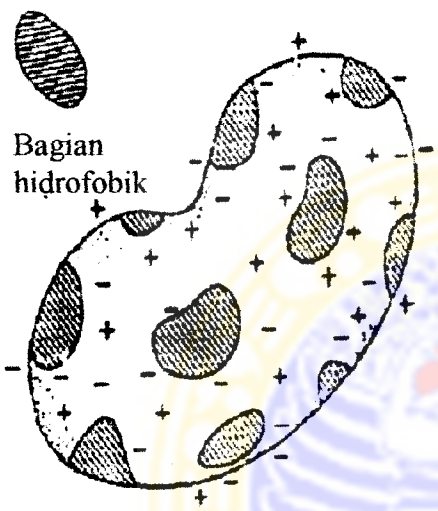
Harris (1989) menyebutkan ada tiga strategi dalam pemurnian enzim yang harus diperhatikan :1) Kualitas: perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas protein dengan cara mengurangi proteolisis dan denaturasi, 2) Kuantitas : pemakaian akhir dari protein murni akan menentukan kualitas enzim yang diperlukan, 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 seri pemisahan.

2.4.1 Pemekatan enzim

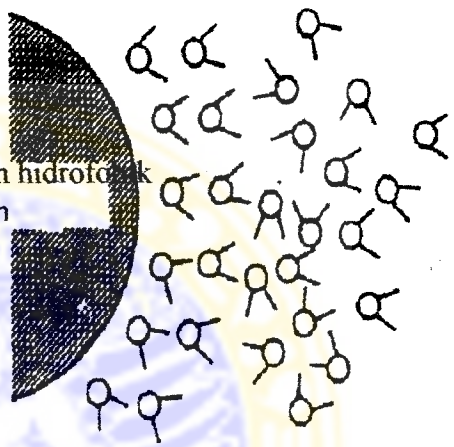
Pemekatan protein enzim merupakan tahap awal dari prosedur pemurnian enzim sebelum tahap pemurnian berikutnya atau dapat pula digunakan untuk keperluan analisis enzim (Haris, 1989). Pemekatan protein dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu analitik dan preparatif (penyiapan). Metode analitik menggunakan fraksinasi asam (asam trikloroasetat), fraksinasi organik (aseton atau etanol), dan imunopresipitasi dapat menyebabkan denaturasi protein. Berbeda dengan metode analitik, metode preparatif tetap mempertahankan aktivitas protein. Pemekatan protein dengan metode preparatif misalnya dengan menggunakan fraksinasi dengan garam, fraksinasi dengan pelarut organik, fraksinasi dengan polimer organik, ultrafiltrasi, liofilisasi dan dialisis (Bollag &Edelstein, 1991). Metode fraksinasi protein yang biasa dilakukan adalah dengan menggunakan garam amonium sulfat dan pelarut organik aseton.

Prinsip fraksinasi dengan garam berdasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam, dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan garam-garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi kemudian mengendap (Harris 1989; Scopes 1987). Amonium sulfat merupakan garam yang

paling sering digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki daya larut tinggi didalam air, relatif tidak mahal, dan kestabilan protein didalam larutan amonium sulfat (2M-3M) tahan bertahun-tahun (Scopes, 1987)



Gambar 2.2 Distribusi muatan dan bagian hidrofobik pada permukaan protein (Scopes, 1987)



Gambar 2.3 Penataan molekul air disekitar residu hidrofobik pada permukaan protein (Scopes, 1987)

Fraksinasi protein dengan menggunakan pelarut organik aseton berdasarkan pada pengurangan kelarutan protein dan konstanta dielektrika pelarut. Semakin banyak pelarut organik yang ditambahkan, semakin berkurang daya solvasi air dan muatan pada permukaan molekul protein yang hidrofilik. Hal ini akan mengakibatkan molekul-molekul protein cenderung berinteraksi dengan sesamanya, hingga akhirnya protein mengendap. Prosedur fraksinasi pelarut organik aseton dilakukan pada suhu di bawah 0^0C. Pada suhu diatas 10^0C, konformasi protein akan segera berubah yang memungkinkan molekul-molekul pelarut organik mendapatkan jalan masuk ke bagian dalam struktur potein,

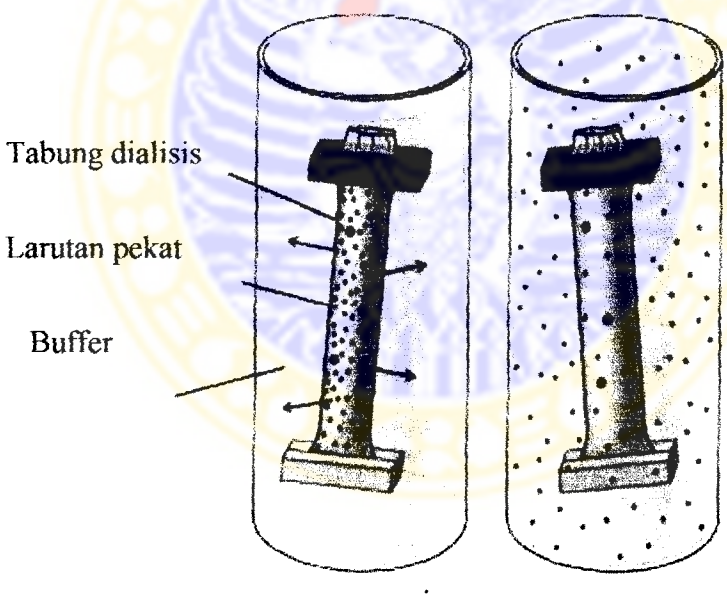
kemudian merusak interaksi hidrofobik dan akhirnya akan terjadi denaturasi (Harris 1989; Scopes 1987).

Gambar 2.4 Agregasi protein melalui interaksi campuran pelarut organik air (Scopes, 1987)

Fraksinasi protein dengan polimer organik, misalnya yang paling banyak menggunakan polietilen glikon (PEG), memiliki mekanisme yang hampir sama dengan fraksinasi pelarut organik, tetapi pada PEG hanya perlu konsentrasi yang lebih rendah dari 20 %. Berat molekul PEG yang digunakan berkisar 6000-2000. PEG adalah polimer noionik yang tak larut pengendapan enzim dengan PEG tidak mempengaruhi tahap pemurnian berikutnya, misalnya dengan kromatografi penukar ion atau kromatografi kertas. Garam berlebih yang terdapat didalam larutan enzim setelah tahap pemurnian dapat dihilangkan dengan cara dialisis. Pada tahap dialisis, protein ditempatkan didalam kantung (membran) semipermeabel yang direndam didalam larutan buffer tertentu. Molekul yang berukuran kecil akan keluar melalui membran, dan molekul yang berukuran besar

akan tertahan didalam membran dialisis. Ukuran pori kantung dialisis yang terbuat dari bahan selulosa asetat ini berdiameter 1-20 nm. Ukuran ini menunjukkan berat molekul minimum yang dapat tertahan didalam membran.

Selain dengan dialisis, penghilangan garam dapat dilakukan dengan filtrasi gel. Metode ini biasanya diterapkan untuk jumlah sampel yang sedikit, yaitu tidak melampaui 25-30% volum kolom untuk mendapatkan resolusi yang memadai antara protein dan garam. Matriks filtrasi gel memiliki pori berukuran kecil, misalnya (Sephadex G-25) (Pharmacia). Kekurangan metode ini adalah terjadi pengenceran sampel protein.



Pada saat dialisisis Pada saat kesetimbangan

Gambar 2.5 Pemisahan dengan dialisis(Stryer, 2002)

2.4.2 Kromatografi kolom

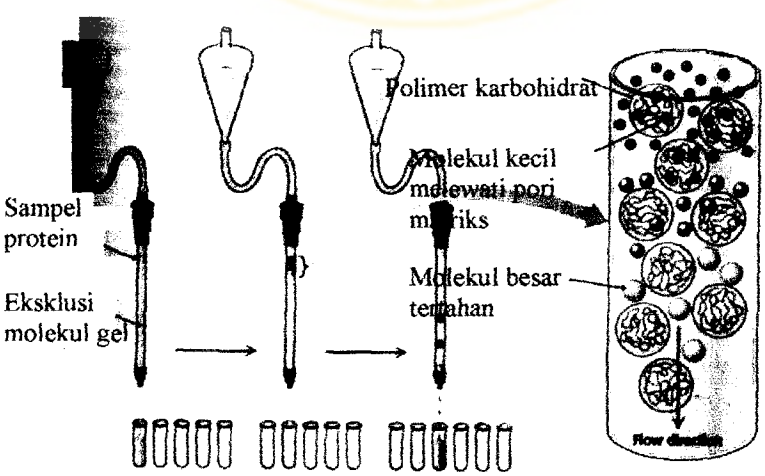
Kromatografi merupakan metode utama dalam pemisahan senyawa organik yang mana senyawa tersebut terdistribusi diantara 2 fase: yaitu fase diam

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

Ada beberapa cara kromatografi kolom, antara lain kromatografi filtrasi gel, kromatografi penukar ion, kromatografi afinitas, kromatografi interaksi hidrofobik.

1.Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi Filtrasi Gel merupakan teknik pemisahan protein dan makromolekul biologi lain berdasarkan ukuran molekul. Matriks filtrasi gel berupa gel yang berpori seperti dekstran atau agarosa atau poliakrilamida. Contoh matriks komersial tersebut adalah Sepharose, Sephadex, dan Biogel, kemudian dikemas didalam kolom dan dielusi dengan fase cair mobil. Pori-pori matriks dapat menampung molekul berukuran lebih kecil. Molekul berukuran kecil akan memasuki pori-pori matriks, namun molekul yang besar tidak terperangkap ke dalam pori kolom. Hasil yang dicapai adalah molekul besar akan keluar dari kolom lebih dulu dibanding molekul yang lebih kecil. (Scopes 1987)

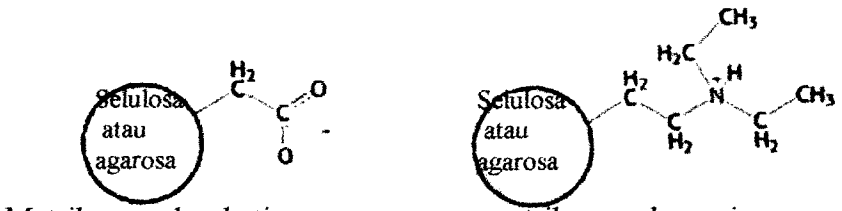


Gambar 2.6 Kromatografi filtrasi gel (Stryer, 2002)

2.Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion memanfaatkan perbedaan afinitas antara molekul bermuatan didalam larutan dengan senyawa yang tidak reaktif yang bermuatan berlawanan sebagai pengisis kolom. Permukaan protein terdiri dari muatan positif dan negatif tergantung dari rantai samping asam amino asam atau basa. pH protein dengan jumlah muatan positif dan negatif sama sama disebut titik isoelektrik (pI). pI sebagian besar protein diantara pH 5 dan 9. Protein yang memiliki pH diatas pI akan bermuatan negatif, sedangkan pH di bawah pI akan bermuatan positif.

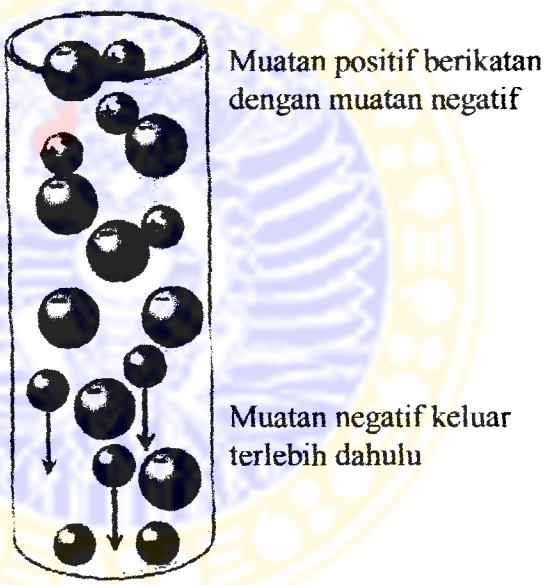
Pengerjaan kromatografi penukar ion didahului dengan mengelusi protein enzim dengan pH buffer awal yang telah diatur. Protein diharapkan terikat kuat pada kolom, dan protein lain dibiarkan terelusi terlebih dahulu. Protein yang terikat pada kolom dilepaskan dengan cara mengubah pH buffer atau kekuatan ion pelarut. Matriks penukar ion mengikat secara kovalen gugus fungsional yang bermuatan negatif pada penukar kation, atau gugus fungsional yang bermuatan positif pada penukar anion. Matriks berupa polimer elastis dan mengandung senyawa resin sintetik terbuat dari bahan dekstran, selulosa, atau sephadex. Contoh matriks penukar kation dan anion masing-masing adalah karboksimetil selulosa (CMC) dan dietilaminoetil (DEAE) selulosa (Scopes 1987).



Matriks penukar kation — matriks penukar anion

Kelompok karboksimetil — Kelompok dietilaminoetil

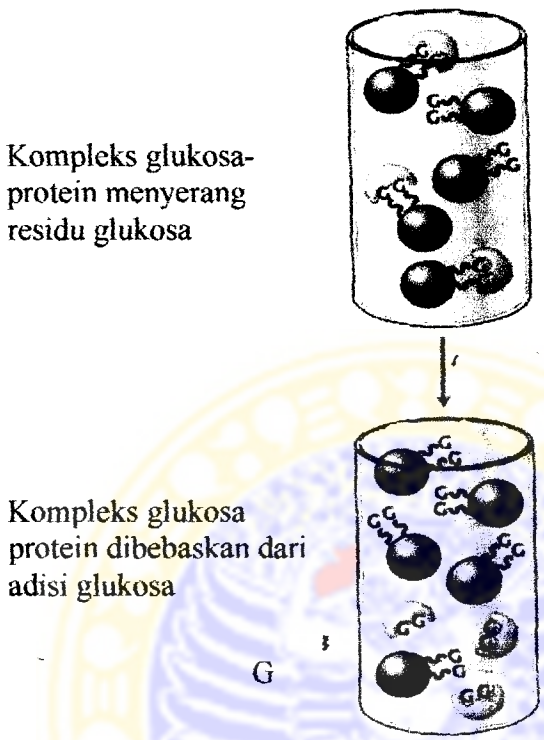
Gambar 2.7 Matriks penukar kation dan anion



Gambar2.8 Kromatografi penukar ion (Stryer, 2002)

3.Kromatografi Afinitas

Pemisahan protein dengan kromatografi afinitas berdasarkan interaksi sfesifik diantara makromolekul biologi dengan pasangannya, sebagai contoh enzim dengan substrat atau inhibitor, dan antibodi dengan antigen. Ligan akan terikat secara kovalen pada matriks. Komponen protein yang memiliki afinitas sfesifik terhadap ligan akan diserap, dan komponen lainnya (protein kontaminan) yang tidak memilki afinitas akan terelusi terlebih dahulu



Gambar 2.9 Kromatografi afinitas (Stryer, 2002)

4.Kromatografi Interaksi Hidrofobik

kromatografi interaksi hidrofobik banyak digunakan untuk pemisahan protein dan peptida. Pada kekuatan ion yang tinggi protein terikat kuat pada matriks melalui interaksi hidrofobik. Matriks bersifat nonpolar. Campuran protein dimasukkan ke dalam kolom dengan buffer konsentrasi garam tinggi. Setelah protein yang tidak terikat keluar lebih dulu, protein yang terikat dielusi dengan menggunakan eluen yang polaritasnya diturunkan (konsentrasi garam lebih rendah) (O'Farrel, 1998).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Agustus 2006 di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Sampel, Bahan, dan Alat Penelitian

3.2.1 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah air dan tanah yang diambil dari sumber air panas Pacet, Jawa Timur.

3.2.2 Bahan penelitian

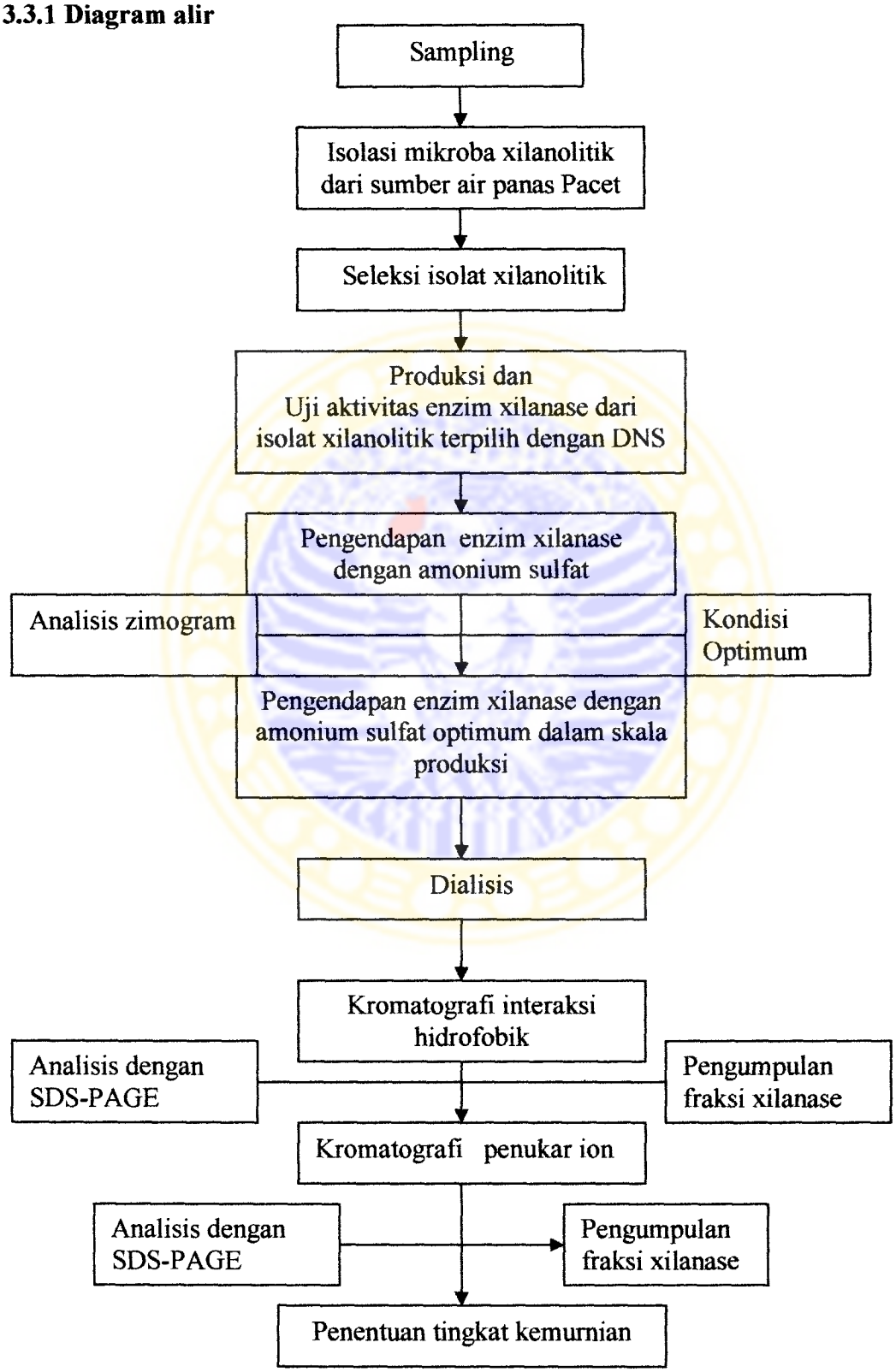
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai derajat kemurnian pro analisis(pa). Bahan-bahan yang digunakan meliputi: akuades, yeast ekstrak, *oat spelt xylan*, $MgSO_4$, Na_2HPO_4, NaCl, $MgCl_2$, Na_2CO_3, agar, asam sitrat, HCl, Tris(hidroximetil)aminomethan, asam 3,5-dinitrosalisilat(DNS), buffer phospat sitrat, butil-toyopearl 650 M, DEAE-toyopearl 650 M, $(NH_4)_2SO_4$, amonium persulfat, TEMED (N,N,N'N'-tetrametilendiamin), sodium dedosil sulfat (SDS), bisakrilamid, bufer sampel, bromofenol biru, coomasive blue, congo red, asam asetat glasial , metanol.

3.2.3 Alat penelitian

Labu Erlenmeyer 100 dan 250 mL, cawan petri, pipet mikro, autoclave (Ogawa Seiki, CO, LTD. Osk 6508), sentrifuge dingin (Beckman model TJ-6), shaker inkubator (Heidolph Unimax 1010, Inkubator 1000), water bath (Sanyo Rikogaku-kikai), oven (Isotemp* oven model 655F), Timbangan analitik (OHAUS), Penangas air, pH meter, laminar air flow cabinet (Kottermann), spektrofotometer shimadzu (UV 1700), *shaker*/alat penggoyang (Jeio Tech sk-7608), freezer, lemari pendingin (Sharp Matric), tabung Eppendorf, mikropipet (Eppendorf) dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Diagram alir



3.3.2 Pembuatan media

3.3.2.1 Pembuatan media cair

Media cair terdiri dari 0,04 gram yeast ekstrak; 0,005 gram $MgSO_4.3H_2O$; 0,1 gram Na_2HPO_4 dan 0.046 gram NaCl. Semua bahan dilarutkan dalam 20 mL akuades dalam wadah labu Erlenmeyer 100 mL. Kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium *foil.* Larutan ini disterilkan dengan autoclave selama 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.3.2.2 Pembuatan media padat

Media padat terdiri dari 0,04 gram yeast ekstrak; 0,005 gram $MgSO_4.3H_2O$; 0,1 gram Na_2HPO_4; 0.046 gram NaCl dan 0,5 gram agar. Semua bahan dilarutkan dalam 20 mL akuades dalam wadah labu Erlenmeyer 100 mL. Kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium *foil.* Larutan ini disterilkan dengan autoclave selama 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya setelah di keluarkan dari sterilisator campuran atau medium ditunggu sampai suam-suam kuku kemudian dituang kedasar cawan petri dan dibiarkan sampai menjadi dingin dan padat.

3.3.3 Isolasi mikroba

Masing-masing sampel hasil *sampling* dari 5 lokasi di sumber air panas Pacet diinokulasikan dalam media cair dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 50°C dengan penggoyangan 150 rpm. Selanjutnya hasil inokulasi tersebut dipipet dengan mikropipet sebanyak 1 µL kemudian disebar kedalam media padat yang telah dibuat sebelumnya dan diratakan dengan *spreader* biakan diinkubasi dalam

oven pada suhu 50°C selama 16 jam. Koloni-koloni yang tumbuh kemudian diamati.

3.3.4 Seleksi isolat

Koloni-koloni yang tumbuh di media cair di tanam dalam media padat yang mengandung substrat *oat spelt xylan* dengan menggoreskan ujung ose ke koloni tersebut kemudian di goreskan pada permukaan media padat, diinkubasi pada suhu 50°C selama 16 jam. Dilakukan pengamatan adanya halo (daerah tidak berwarna pada media padat yang mengandung *oat spelt xylan*) disekitar koloni.

Kemudian halo yang diperoleh diperjelas dengan menggunakan Congo red 0,1% kedalam biakan tersebut. Uji positif ditandai dengan warna daerah halo yang tetap bening dan warna media menjadi merah dan selanjutnya menjadi biru bila ditambah HCl 1 N.(Hadioetomo, 1985)

3.3.5 Uji aktivitas enzim

Masing-masing isolat yang diperoleh diuji aktivitasnya dengan memasukkan masing-masing isolat ke dalam 20 mL media cair di Erlenmeyer 100 mL, diinkubasi pada suhu 50° C selama 18 jam dengan penggoyangan 170 rpm. Setelah diinkubasi 1% diinokulasi kedalam media cair yang mengandung *oat spelt xylan* dan diinkubasi lagi pada suhu 50° C selama 18 jam dengan penggoyangan 170 rpm. Hasil inkubasi kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan diambil supernatannya untuk diuji aktivitas enzim xilanasenya.

3.3.5.1 Uji dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Aktivitas enzim xilanase diukur berdasarkan banyaknya gula pereduksi yang terbentuk dengan metode DNS secara spektrofotometri. Satu unit aktivitas xilanase menunjukkan µmol xilosa yang dihasilkan permenit untuk setiap mL enzim. Sebanyak 100 µL enzim dan 100 µL substrat (1% *oat spelt xylan* dalam buffer fosfat sitrat 50 mM pada pH 7) dimasukkan dalam tabung Ependorf, diinkubasi dalam water bath pada suhu 50° C selama 1 jam. Selanjutnya ditambah dengan 600 µL DNS lalu tabung diletakkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit bersama-sama dengan kontrol (mengandung 100 µL enzim ditambah 600 µL DNS dan 100 µL substrat) kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca secara spektrofometri pada λ 550 nm. Isolat yang memiliki aktivitas tertinggi selanjutnya dipilih untuk tahap pemurnian enzim.

3.3.5.2 Pembuatan kurva standar xilosa

Standar xilosa dibuat pada variasi konsentrasi 150-500µg dari stok xilosa 10 mg/mL sebanyak 100 µL masing-masing larutan standar ditambah dengan 100 mL akuades dan 600 mL perekasi DNS kemudian dikocok kuat. Tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit. Kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Blanko digunakan dengan mengganti xilosa dengan akuades (Miller, 1959)

3.3.5.3 Uji kualitatatif enzim xilanolitik menggunakan substrat turunan *p*-nitrofenol

Uji aktivitas enzim pendegradasi xilan yaitu α-L arabinofuranosidase, asetil xilan esterase dlakukan dengan substrat turunan *p*-nitrofenol(pNP) berturu-turut pNP- α-L arabinofuranosida, pNP-asetat. Masing-masing 1mM substrat (180 µL) diinkubasi bersama-sama enzim (20 µL) pada suhu 50^0C selama 30 menit. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan ditandai dengan perubahan warna larutan yang berubah warna menjadi kuning sedangkan kontrol dengan menggunakan akuades tidak mengalami perubahan warna.

3.3.6 penentuan kadar protein

Kadar protein secara akurat, untuk penentuan aktivitas spesifik ditentukan dengan metode Lowry, menggunakan standar bovine serum albumine(BSA). Disiapkan pereaksi-pereaksi A($CuSO_4.5H_2O$ dan $Na_3C_6H_5O_72H_2O$), B(Na_2CO_3 dan NaOH), C(larutan A +B), dan D(reagent Folint-Ciocalteau phenol) dipipet 0,5 mL sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 mL perekasi C, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian pada campuran reaksi ditambah 0,25 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Dibaca serapan dari larutan yang diperoleh pada panjang gelombang 500 nm. Kurva standar BSA dibuat dengan cara sebagai berikut. Disiapkan beberapa larutan BSA dengan kadar 400; 500; 600; 700; 800 dan 900 µg/ mL. Setiap larutan tersebut diperlakukan sama dengan seperti sampel .

serapan setiap larutan yang terukur dicatat dan kemudian dibuat kurva standar antara absorbansi vs kadar BSA.

3.3.7 Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim xilanase dari isolat terpilih dengan berbagai prosentase kejenuhan amonium sulfat diendapkan untuk memperoleh kondisi optimum pengendapan xilanase dengan amonium sulfat. Tabel kejenuhan amonium sulfat yang digunakan adalah berdasarkan Scopes (1987). Penghitungan jumlah amonium sulfat untuk mencapai prosentase kejenuhan tertentu terdapat pada lampiran 1. Penentuan kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum terlebih dahulu dilakukan dalam skala kecil yaitu sebanyak 1mL ekstrak kasar enzim xilanase diendapkan dengan amonium sulfat kemudian dibiarkan semalam selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, selama 20 menit. Selanjutnya diuji aktivitasnya. Setelah didapatkan kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum pengendapan enzim xilanase dilakukan dalam skala besar, yaitu sebanyak 500 mL ekstrak kasar enzim xilanase dijenuhkan dengan amonium sulfat

Kedalam larutan ekstrak kasar enzim yang telah direndam dalam penangas es dimasukkan sejumLah amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai kadar amonium sulfat mencapai prosentase kejenuhan yang dikehendaki. Tabel kejenuhan amonium sulfat yang digunakan berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat (Scopes,1987). Prosentase kejenuhan amonium sulfat yang digunakan beragam dari 15-90%. Enzim yang mengendap selanjutnya

disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, selama 20 menit . Endapan enzim dilarutkan dalam bufer fosfst sitrat pH 7, kemudian didialisis. Dialisis dilakukan dengan cara memasukkan fraksi yang memiliki aktivitas optimum ke dalam tabung selofan yang salah satunya telah disimpul setelah setengah dari volume tabung terisi, maka ujung yang lain diikat. Tabung selofan berisi larutan enzim xilanase direndam dalam larutan 0,05 M bufer Tris HCl pH 7,5 sambil diaduk perlahan dengan pengaduk magnetik dan diletakkan dalam ruang bersuhu tertentu. Dialisis dilakukan sampai fraksi enzim bebas amonium sulfat dan setiap 2 jam dilakukan penggantian bufer. Proses dialisis selesai apabila fraksi enzim telah bebas dari amonium sulfat yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih ketika larutan bufer ditetesi larutan $BaCl_2$. setelah proses dialisis selesai larutan enzim dikeluarkan dari tabung selofan, diukur volumenya kemudian ditentukan aktivitas xilanase total

3.3.8 Pemurnian parsial enzim xilanase

Ekstrak kasar xilanase hasil pengendapan dengan amonium sulfat dimurnikan dengan kromatografi interaksi hidrofobik menggunakan Butyl-Toyopearl 650 dan kromatografi penukar ion menggunakan DEAE-Toyopearl 650 M (Tosoh, Jepang). Hasil pemurnian dari kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion dianalisis dengan SDS-PAGE.

3.3.8.1 Kromatografi interaksi hidrofobik

Tahap awal yang dilakukan dalam pemurnian ekstrak kasar enzim xilanase adalah kromatografi interaksi hidrofobik menggunakan matriks butil-Toyopearl

650 M. Kapas dimasukkan secukupnya kedalam kolom . Sebanyak 1-2 mL bubur butil toyopearl dalam etanol dituangkan kedalam kolom. Selanjutnya 10 mL larutan jenuh bufer Tris HCl pH 6 dalam kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum ditambahkan kedalam matriks. Sebanyak 3 mL enzim xilanase hasil dialisis dimasukkan ke dalam kolom dan dialiri dengan bufer Tris HCl pH 6 dalam kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum. Fraksi enzim sebanyak 2 mL ditampung dalam tabung reaksi diukur aktivitasnya dan absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap fraksi enzim yang dialiri bufer Tris HCl pH 6. Fraksi enzim yang menunjukkan aktivitas xilanase selanjutnya dikumpulkan, didialisis dan dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi penukar anion. (Puspaningsih, 2004)

3.3.8.2 Kromatografi penukar ion

Kromatografi penukar ion dilakukan dengan menggunakan matriks DEAE-Toyopearl dalam kolom yang berukuran sama dengan kolom pada kromatografi interaksi hidrofobik. Kapas dimasukkan secukupnya ke dalam kolom. Sebanyak 1-2 mL bubur DEAE- toyopearl dalam etanol dituangkan kedalam kolom. Selanjutnya ke dalam matriks ditambahkan 10 mL larutan jenuh bufer Tris HCl pH 6. Sebanyak 2 mL enzim xilanase hasil kromatografi interaksi hidrofobik dimasukkan ke dalam kolom. Fraksi enzim dipisahkan dengan mengalirkan gradien NaCl 0 M-0,5 M ke dalam kolom. Selanjutnya masing-masing fraksi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm dan diuji aktivitasnya.(Puspaningsih, 2004)

3.3.9 Analisis zimogram dan SDS-PAGE

Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE menggunakan gel pemisah 12,5 % poliakrilamida dan gel penahan 12,5 % poliakrilamida (Laemmli, 1970). Ke dalam tabung eppendorf dimasukkan 20 µL sampel protein dan 5X buffer sampel. Campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Sampel dimasukkan ke dalam sumur gel penahan menggunakan pipet-mikro. Selanjutnya piranti elektroforesis Mini-Protean II (Biorad, USA) dipasang, dan 300 ml 1X bufer elektroforesis dituangkan ke dalam bejana elektroforesis. Proses elektroforesis berlangsung lebih kurang selama 1 jam pada tegangan 100 volt. Gel hasil elektroforesis dilepas dari cetakan dan jarak migrasi bromofenol biru diukur dari batas atas gel pemisah. Pencucian gel dilakukan dengan menggunakan larutan pencuci yang terdiri dari metanol, asam asetat dan akuades sebanyak 2 kali pencucian. Dilanjutkan pencucian dengan glutaraldehid 10% dan akuades. Penampakan pita protein dilakukan dengan merendam gel SDS-PAGE dalam larutan pewarna gel perak nitrat selama 15 menit sambil digoyang konstan pada mesin penggoyang dan diperjelas dengan menggunakan larutan pengembang warna. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan peluntur warna sampai diperoleh pita-pita protein berwarna coklat dengan latar belakang jernih.(Bollag and Edelstein)

Analisis zimogram enzim xilanase dilakukan dengan cara menambahkan substrat *oat spelt xilan* ke dalam campuran bahan-bahan pembentuk poliakrilamida. Setelah proses elektroforesis selesai, protein direnaturasi dengan merendam gel dalam 2,5% Triton-X 100 selama 1 jam sambil digoyang konstan

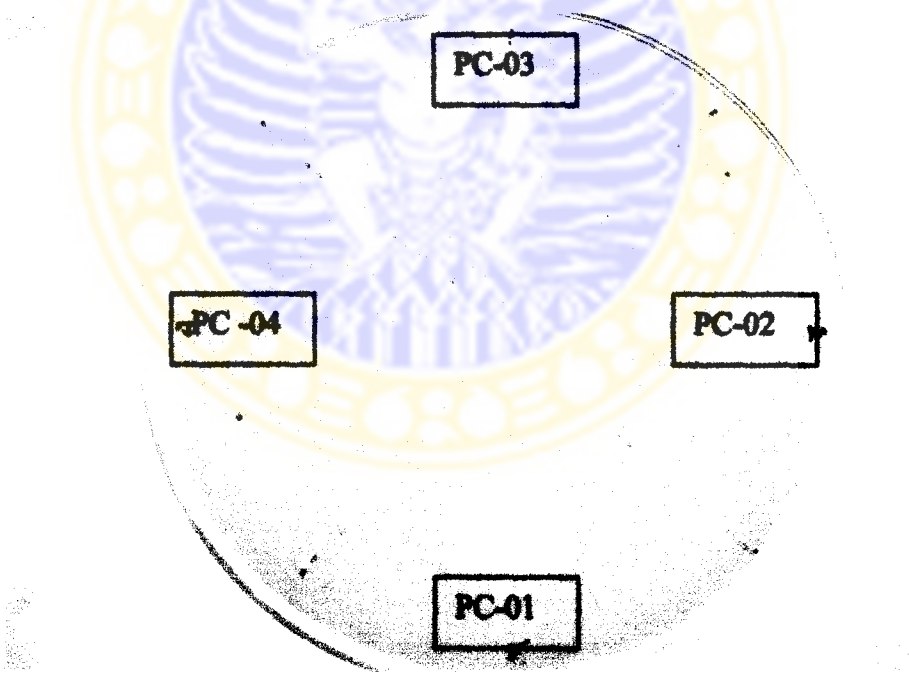
dengan mesin penggoyang. Esei enzim xilanase dalam gel dilakukan dengan merendam gel dalam 50 Mm bufer Tris HCl pH 7 dan diinkubasi pada suhu 60^0C selama 2 jam. Adanya pita protein aktif xilanase dapat dilihat dengan cara merendam gel dalam larutan 0,1% Congo Red (Bollag and Edelstein,1982) selama 30 menit pada suhu kamar yang dilanjutkan dengan pencucian gel beberapa kali dengan larutan NaCl 1 M. Pita-pita protein aktif akan tampak sebagai pita bening dengan latar belakang warna merah bata

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Mikroba Penghasil Enzim Xilanase dari Sumber Air Panas Pacet

Isolasi mikroba dari sumber air panas Pacet pada kondisi suhu inkubasi 50° C menunjukkan hasil positif pada uji aktivitas enzim xilanase yang ditunjukkan oleh adanya halo (daerah bening) pada media padat. Pada penelitian ini dihasilkan 4 isolat yang menunjukkan adanya halo pada media padat yang mengandung *oat spelt xilan.* Hasil isolasi mikroba penghasil enzim xilanase terdapat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Isolat penghasil enzim xilanase

Diantara 4 isolat yang diperoleh, terdapat sebuah isolat yang memberikan aktivitas paling besar yaitu isolat nomor 1 (5.76 x 10^{-3} U/ml) yang ditunjukkan dalam table 4.1

Tabel 4.1 Data aktivitas isolat penghasil xilanase dari sumber air panas Pacet :

Isolat	Aktivitas (U/ml)
PC-01	$5,76 \times 10^{-2}$
PC-02	$4,92 \times 10^{-2}$
PC-03	$1,12 \times 10^{-2}$
PC-04	$4,21 \times 10^{-2}$

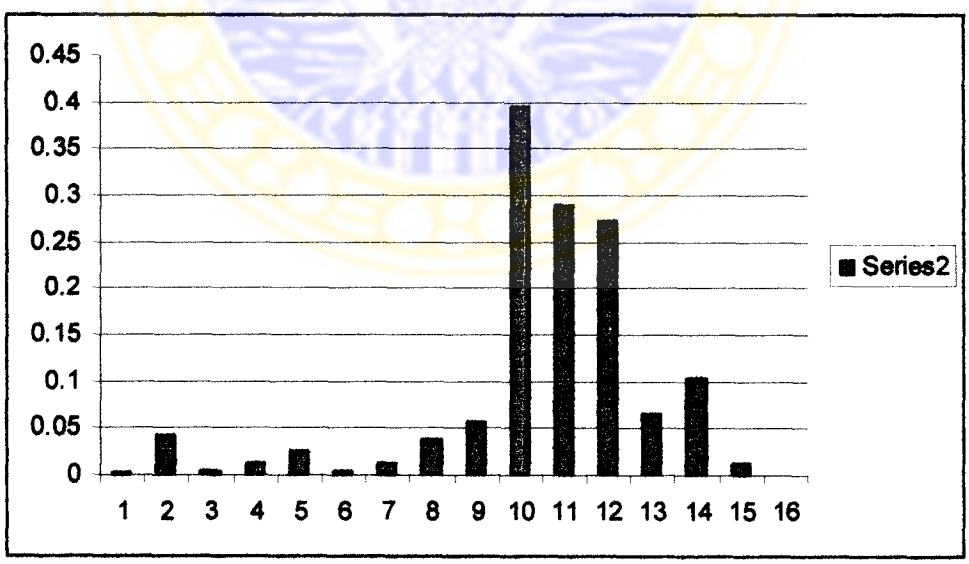
. Isolat nomor 1 dipilih untuk digunakan pada penelitian selanjutnya dan diberi nama PC 01.

4.2 Pemurnian Enzim Xilanase

4.2.1 Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim xilanase merupakan campuran dari enzim dan protein lain yang tidak terendapkan dengan sentrifugasi, sehingga perlu dilakukan pemurnian parsial terhadap ekstrak kasar ini. Pemurnian enzim xilanase dilakukan dengan kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar anion. Pengendapan ekstrak kasar dilakukan terlebih dahulu sebagai tahap awal dalam pemurnian enzim xilanase untuk memisahkan protein-protein lain yang terdapat dalam ekstrak kasar enzim, akibatnya aktivitas enzim-enzim xilanolitik yang terdeteksi akan memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibanding ekstrak kasarnya. Pemekatan dapat dilakukan dengan garam amonium sulfat (Scopes, 1987). Penambahan amonium sulfat ke dalam larutan protein akan menarik molekul air yang pada awalnya melindungi permukaan molekul protein, akibatnya setiap protein akan mengendap pada kejenuhan amonium sulfat yang berbeda dan akan terjadi fraksinasi protein. Pengendapan dengan amonium sulfat dilakukan dengan

cara menambahkan sedikit demi sedikit amonium sulfat kedalam larutan enzim dengan pengadukan. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnet kecepatan lambat agar tidak terjadi pembusaan. Pengadukan dimaksudkan untuk meningkatkan kontak antara garam dengan air, sehingga terjadi pengendapan enzim. Adanya garam amonium sulfat berfungsi untuk menarik air yang terjebak pada daerah hidrofob, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi intermolekuler pada daerah-daerah tersebut. Ini menyebabkan terjadinya agregasi pada molekul-molekul enzim sehingga enzim tersebut akan mengendap. Pengendapan ekstrak kasar enzim xilanase dapat dilakukan dengan pengendapan dengan amonium sulfat. Hasil pengendapan ekstrak kasar enzim xilanase dengan amonium sulfat terlihat pada gambar 4.2 yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim xilanase mencapai aktivitas optimum pada pengendapan 60% kejenuhan amonium sulfat.



Gambar 4.2. Pengendapan ekstrak kasar enzim xilanase dengan amonium sulfat

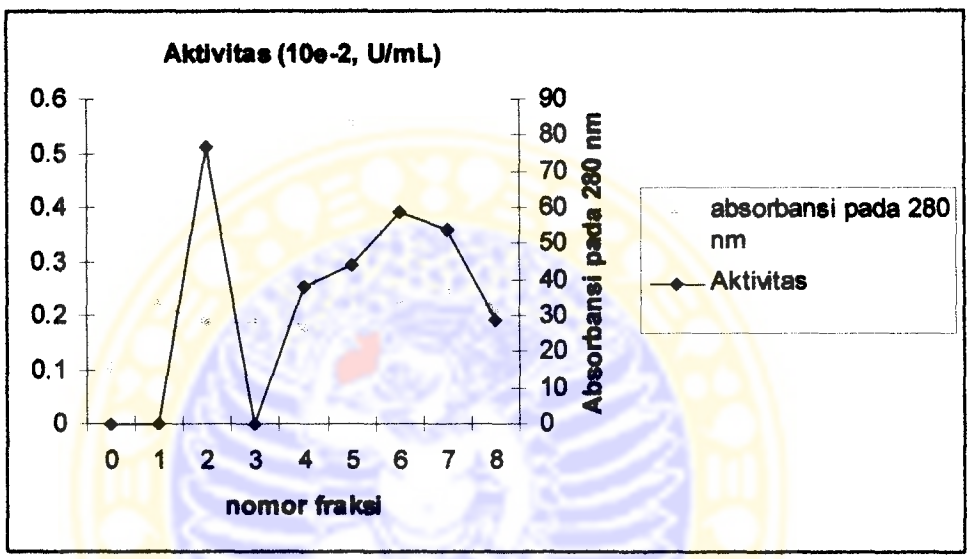
Aktivitas enzim tersebut selanjutnya turun secara perlahan, hal ini karena enzim telah jenuh dengan amonium sulfat. Hasil pengendapan enzim dengan amonium sulfat ini kemudian didialisis dalam buffer tris HCl 0,05 M pH 7,5 dengan menggunakan selofan. Dialisis ini dimaksudkan untuk mengeluarkan garam amonium sulfat atau partikel kecil lainnya yang terdapat dalam larutan enzim yang dapat menggangu aktivitas enzim xilanase.

4.2.2 Kromatografi interaksi hidrofobik

Hasil pengendapan enzim xilanase yang telah didialisis selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi interaksi hidrofobik dalam kolom butil-Toyopearl 650 M. Prinsip dasar kromatografi interaksi hidrofobik adalah terjadinya interaksi antara residu hidrofobik pada permukaan protein dengan rantai alifatik atau aromatis dari adsorben. Interaksi hidrofobik ini juga disebut adsorpsi yang ditingkatkan dengan adanya garam. Pernyataan tersebut berhubungan dengan sifat kelarutan yang tinggi antara molekul air dengan garam, akibatnya penambahan garam kedalam larutan protein akan segera menarik molekul air dan menyebabkan terjadi interaksi hidrofobik antara residu hidrofobik pada protein dengan adsorben. Kekuatan interaksi hidrofobik tersebut sangat bergantung pada persentase kejenuhan garam yang ditambahkan. Garam yang sering digunakan adalah amonium sulfat (Scopes 1987, Janson dan Ryden 1998).

Ekstrak kasar enzim xilanase dijenuhkan terlebih dahulu dengan 60% kejenuhan amonium sulfat sebelum dialirkan kedalam kolom butil-Toyopearl 650 M. Dasar pemilihan 60% kejenuhan amonium sulfat adalah dari hasil pengendapan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat yang menunjukkan

bahwa pengendapan dengan 60% amonium sulfat memberikan aktivitas enzim xilanase optimum. Untuk mengetahui kadar protein masing-masing fraksi diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm, karena absorbansi pada 280 nm sama dengan kadar protein (mg/ml)(Deutscher, 1990). Hasil kromatografi interaksi hidrofobik dapat dilihat pada gambar 4.2.



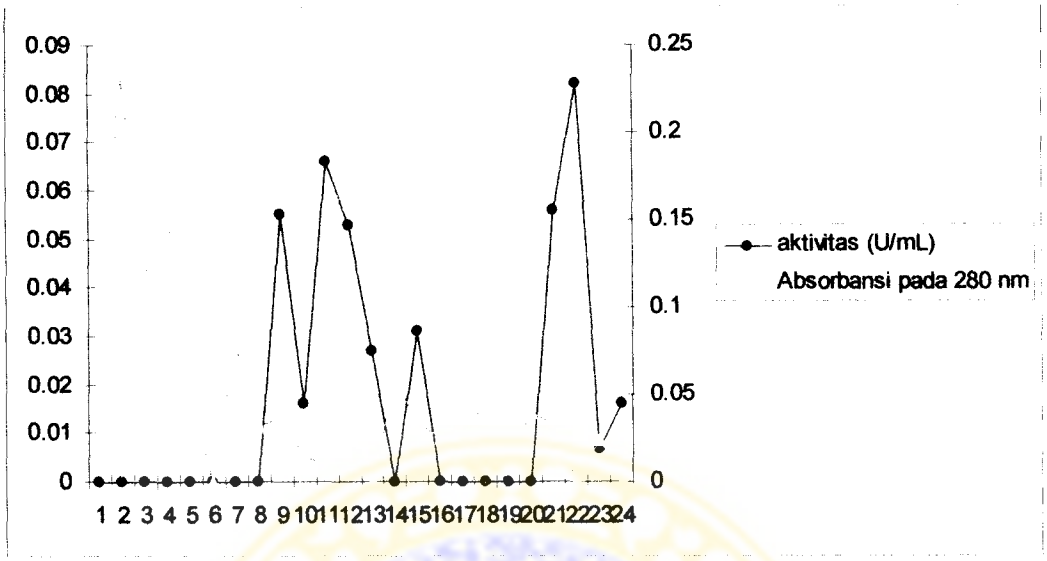
Gambar 4.3. Profil elusi kromatografi interaksi hidrofobik dengan Butyl-Toyopearl 650 M

Hasil kromatografi interaksi hidrofobik menunjukkan adanya dua aktivitas enzim xilanase. Hal ini ditunjukkan dengan adanya dua puncak aktivitas enzim xilanase pada fraksi ke-2 dan fraksi ke-6. Fraksi nomor 2 selain menunjukkan aktivitas enzim endo β-xilanase juga positif adanya aktivitas enzim arabinofuranosidase sementara itu fraksi nomor 6 hanya menunjukkan adanya aktivitas enzim endo β-xilanase sehingga fraksi nomor 6 digunakan sebagai sample untuk penelitian lanjutan dengan kromatografi penukar anion serta dianalisis dengan SDS-PAGE.

4.2.3 Kromatografi penukar ion

Metode penukar anion digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan muatannya(Stryer, 2002). Matriks yang digunakan sebagai penukar anion adalah DEAE-Toyopearl 650 M. Protein enzim yang bermuatan negatif akan diselimuti oleh buffer Tris yang bermuatan positif, sedangkan matriks DEAE yang bermuatan positif akan diselimuti oleh ion Cl^- (komponen dari buffer), yang bermuatan negatif. Interaksi antara enzim dan matriks DEAE akan terjadi, dimana ion Cl^-akan segera digantikan posisinya oleh enzim. Ion Cl^- selanjutnya akan bergabung kembali dengan Htris+ menjadi Tris Cl yang tidak bermuatan. Peningkatan konsentrasi Tris Cl akhirnya dapat mengusir kedudukan enzim, sehingga enzim akan terelusi keluar kolom dengan fraksi yang berbeda-beda(Scopes, 1987). Peningkatan konsentrasi ion dalam penelitian ini dilakukan dengan gradien NaCl 0 M-0,5 M.

Hasil kromatografi penukar anion dari fraksi hasil kromatografi interaksi hidrofobik belum mendapatkan hasil yang optimal hal ini didukung oleh data SDS-PAGE yang tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim xilanase yang disebabkan karena kadar protein sangat rendah sehingga perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap fraksi hasil kromatografi interaksi hidrofobik dengan metode kromatografi yang lain.



Gambar 4.3. Profil elusi kromatografi penukar anion dengan DEAE-Toyopearl 650 M

Tabel 4.2 Pemurnian enzim xilanase

Tahap pemurnian	Volume (mL)	Aktivitas total (Unit)	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Kemurnian
Ekstrak kasar	500 mL	23,42	2480,5	$1,04 \times 10^{-2}$	100	1
Fraksinasi dengan $(NH_4)_2SO_4$	50 mL	9,24	22,175	$46,22 \times 10^{-2}$	36,44	44,44
Butil-Toyopearl	3 mL	$15,9 \times 10^{-2}$	0,2505	$64,67 \times 10^{-2}$	0,117	62,18

Dari table 4.2 terlihat bahwa terjadi peningkatan kemurnian dari enzim xilanase setelah dilakukan pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik yaitu sebesar 62,18 kali dibanding ekstrak kasarnya. Metode kromatografi yang sama (interaksi hidrofobik) digunakan untuk memurnikan enzim xilanase pTP 510 dan menghasilkan tingkat kemurnian sebesar 36 kali dibanding ekstrak kasar(Puspaningsih, 2004)

4.3. Analisis Zimogram dan SDS-PAGE

Elektroforesis adalah proses pemisahan molekul-molekul berdasarkan ukuran dan muatan listrik. Teknik ini digunakan pada analisis DNA maupun protein. Elektroforesis merupakan metode standar di samping untuk memisahkan dan memurnikan, juga digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan DNA dan protein.

Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) adalah suatu prosedur yang sangat penting dalam karakterisasi protein. Banyak informasi bisa diperoleh menggunakan PAGE, seperti menentukan berat molekul, kemurnian protein, modifikasi post translasi, jumlah sub unit, aktivitas enzim, dan pemrosesan protein. Akrilamida merupakan bahan/media yang tepat sebagai gel pada elektroforesis, karena dapat memisahkan protein berdasarkan ukurannya.

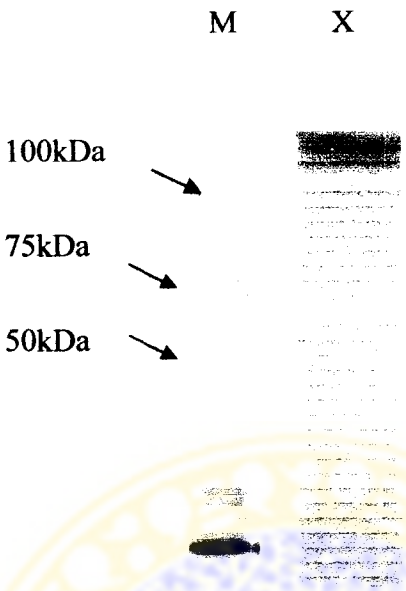
Sistem elektroforesis yang paling banyak digunakan dinamakan diskontinyu atau disc elektroforesis. Dalam sistem ini, pori-pori dalam ukuran besar (*stacking gel*) dilapiskan di atas *separating gel.* Masing-masing dibuat dengan bufer yang berlainan. Pada stacking gel inilah, protein akan terpisah. Adanya perbedaan pH sehingga protein-protein dalam sampel terkonsentrasi di bagian dasar / bawah stacking gel sebagai lapisan-lapisan pita, sebelum memasuki separating gel.

Elektroforesis protein dilakukan dengan zimogram dan SDS-PAGE. Kedua teknik ini metodenya sama dalam persiapan gel poliakrilamida dan pemisahannya. Perbedaannya yaitu, pada zimogram ditambahkan substrat dalam

campuran polimerisasi gel, dan sampel protein tidak dipanaskan sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel.

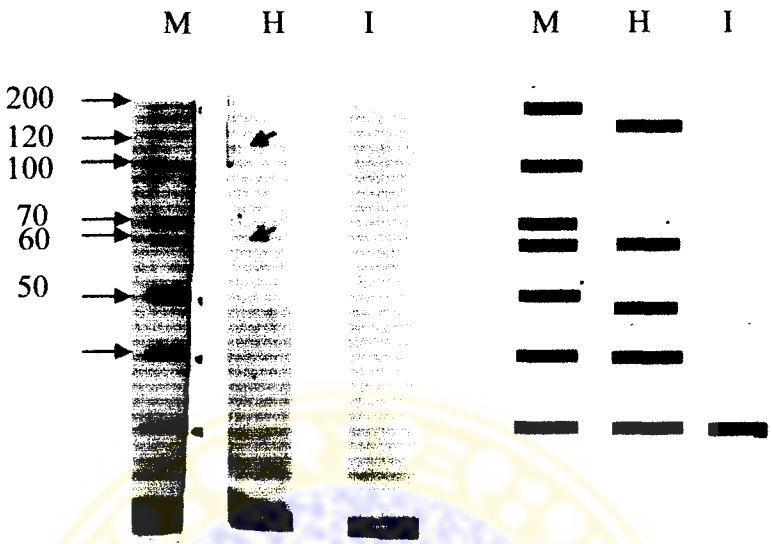
Zimogram merupakan analisis untuk mengetahui aktivitas protein di dalam gel. Dengan demikian melalui teknik zimogram dapat pula diketahui berat molekul suatu protein aktif.

Analisis zimogram enzim xilanolitik dilakukan dengan cara menambahkan substrat xilan ke dalam campuran bahan-bahan pembentuk poliakrilamid. Pita bening dengan latar belakang warna merah bata menunjukkan adanya pita-pita protein aktif. Pada gambar 4.4 hasil analisis zimogran menunjukkan bahwa xilanase yang dihasilkan oleh isolat PC-01 terdiri dari dua isozim yang mempunyai kisaran berat molekul 60 kDa dan 120 kDa. Adanya dua isozim ini memberikan indikasi bahwa isolat PC-01 setidaknya dua gen penyandi xilanase. Hasil isolat ini didukung oleh hasil penelitian identifikasi enzim xilanolitik isolat PC-01 menggunakan substrat turunan p-nitrofenol yang dilakukan oleh Purwadi (2006) menunjukkan adanya dua aktivitas endo-xilanase dan arabinofuranosidase.



Gambar 4.4 Pita protein hasil analisis zimogram dan SDS-PAGE dari enzim xilanolitik rekombinan M : penanda standar protein, X: enzim hasil fraksinasi dengan amonium sulfat.

Xilanase hasil dari pemurnian dengan SDS—PAGE dianalisis jumlah pita proteinnya dengan SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE menunjukkan sedikitnya lima pita protein xilanase isolat PC-01 pada fraksi ke-7 kolom interaksi hidrofobik. Molekul-molekul protein dari hasil pemurnian dengan kolom penukar anion hanya muncul satu pita dengan berat molekul 15 kDa.dan diduga bukan pita protein enzim xilanase. Hal ini didukung oleh data zimogram yang menunjukkan pita protein enzim xilanase yang mempunyai kisaran berat molekul 60 kDa dan 120 kDa.



Gambar 4.5 Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dari enzim xilanolitik isolat PC-01 M : penanda standar protein, H: enzim hasil pemurnian dengan kolom interaksi hidrofobik, I: enzim hasil pemurnian dengan kromatografi penukar anion.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Terjadi peningkatan kemurnian enzim dari ekstrak kasar sebesar 62,18 kali setelah dilakukan kromatografi interaksi hidrofobik dan didukung oleh munculnya dua aktivitas enzim xilanase setelah dilakukan kromatografi interaksi hidrofobik dan adanya aktivitas enzim arabinofuranosidase dengan menggunakan substrat turunan *p*-nitrofenol

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap fraksi-fraksi hasil kromatografi interaksi hidrofobik dengan metode kromatografi yang lain, selain dengan metode kromatografi penukar anion untuk memperoleh fraksi enzim xilanase yang lebih murni.

DAFTAR PUSTAKA

Adams MWW, Kelly R.M., 1995. **Enzymes from Micoorganism in Extreme environment Chemical and Engineering News. (Re-prints).**

BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan)Teknologi. 2004. *Penelitian microbiologi.*

Bajpai P, Bajpai ,P.K.1992 **Biobleaching of Kraft pulp**. *Process Bichem* 27: 319-325.

Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S., 2001. **Microbial xylanase from the newly isolated bacillus sp strain BP-23,** *Can J Microbiol* 39:1162-1166.

Bollag, D.M. and Edelstein, S.J., 1991. **Protein Methods** New YorkWilley-liss.

Blanco, A. and Pastor, F.U., 1993. **Characterization of cellulose-free xylanases from the newly isolated *Bacillus sp* strain** BP-23, *Can J Microbial*, 39:1162-1166.

Claire V, and Zeikus J.G., 2001. **Hyperthermophilic Enzimes: Sources, uses and Molecular Mechanism for Thermostability. Microbiol And Molekular Biolog.** Review. 65:1-43.

Cho-Goo, S., Sub, and Y.I. Choi. 1996. **Over Production, Purification and Characterization of *Bacillus stearothmophilus* Endo-xylanase A (Xyn A)**. J.Microbiology and Biotechnology 6: 79-85.

David, S. 1997. *Prinsi-prinsip Biokimia.* Edisi Kedua. Penerjemah R. Soendoro. Erlangga Jakarta. Hal 122-125.

Dekker, R.F.H. 1983. **Bioconversion of Hemicellulose: Aspect of Hemicellulose Production by *Tricoderma resei* QM 9414 and Enzymic Saccharification of Hemicellulose**. *Brotechnol. Bioeng.* 25: 1127-1146.

Dung NV., et al., 1993. **Purification and Propeties of β-1,4-xylanse 2 and 3 from Aeromonas Caive W-61.J. Biosci.** *Biotech. Biochem* 57:1708-1712.

Deutscher, P.M., 1990, *Guide to Protein Purification* Academic Press, London

erlich, H.A.,1992, PCR Teechnology, Principles and Application for DNA Amplification, W.H.Freeman and Company, New York, P.99-10.

Harris ELV. 1989. **Concentration of the extract. Didalam harris ELV, Angal S, Editor protein purification Methods.** *Apractical Approach.* Oxford : IRL PC Hlm 125-161.

Irawan, 2001. Eksplorasi Enzim Xilanolitik Termofilik, http://www.hayati-ipb.com/user/rydyct/PPs 702 /IRAWAN.HTM, 24 Desember 2005.

Janson, J.C., and Rayden, J.A., 1998, *Protein Purification Principles, High-Resolution Methods, and Applications*. Sedond Edition New York: John Willey and Sons

Kulkarni, N.A., Shendye, and M.Rao. 1999. **Molecular and Biotechnological a spects of xylanases.** *FEMs Microbiol*. Rev 23:411-456.

Kuhad RC, Singh A. 1993. **Lignocellulosic Biotechnology: current and future prospect**. *Crit Rev Biotechnol* 13:151-172.

Lehninger, A.L., 1997. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Penerjemah Maggy Thenawijaya. Penerbit Erlangga. Jakarta, hal 235-236.

Laemmli UK. 1970. **Cleavage of Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4**. Nature 227: 6 80-685.

Miller, G.L., 1959, **Use of Dinitrosalicyclic acid Reagent for Determination of Reducing Sugars**, *Anal.Chem* 131: 426-428

Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G. 1999. **Extremophiles as asource of novel enzymes for industrial applications**. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:771-729.

O'Farrel PA. 1998. *Hidrophobic Interaction Chromatography*. Didalam Repley R Walker JM. Molekular Biomethods Handbook. Totowa : Humana Pr. Hal 461-167

Ottaway JH, Apps DK.1984. *Biochemistry*. Edisi ke-4. Cambridge: ELBS.

Poedjiadi, Anna, 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-PRESS. Jakarta hal 145-146.

Reilly, P.J. 1991. **Xylanase: Structure and Function**. In Hollander, A. (Ed). Proceeding of A Symposium on Trend in Biotechnology of Fermentation for Fuels and Chemicals. Plenum Press. New York.

Scopes RK. 1987. *Protein purification principles and Practice*. Edisi ke-2. New York : Springer Verlag.

Schafer, T., Dufnfner, ., and Borchert TV. 2001. **Extremophilic enzyme in industry; screening, protein engineering and applications**. Extremophilic proceeding.

Stryer L, Tymoczko JL, and Berg JM. 2002. *Biochemistry*, Edisi ke-5, New York WH Freeman.

Subramaniyan, S. Prema, P. 2002. **Biotechnology of microbiol xylanase Enzymology, molecular biology, ang application**. *Critical rev. In Biotech*. 22:33-64.

Steel DM, Walker JM. 1991. **Thermostable Protein**. Life Chem Report 8. Page 49-96. Stryer L, Tymoczko JL and Berg JM. 2002. *Biochemistry*. Edisi Kelima. New York: WH Freeman.

Brock, Thomas D, "*Thermophilic Microorganism and Life at High Temperature* ", New York:Springer –Verlag, 1978.

Tsujibo, H., K. Miyomoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa, and Y. Lanamori. 1992. **Purification, Properties, and Partial Amino Acid Sequences of Thermostable Xylanase from *Streptomyces termoviolaceus* OPC-520.** *Apll. Environ. Mikrobiol.* 58: 371-375.

Puspaningsih, N.N.T., 2004. **Pencirian Enzim-Enzim Xilanolitik dan Kloning Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovoran* IT08.** Disertasi. IPB. Bogor.

Wong, K.K.Y., Saddler, J.N., 1992 **Trichoderma xylanses, their properties and purification,** *Crit Rev Biotechnol 12: 413-435*

Yang, R. C. A., C.r. Mc Kenzi, D. Bilous, V.l. Seligy, and S. S. Narang. 1988 . **Moleculer Cloning and Expression of Xylanase Gene from *Bacillus polymyxa* in *Eschericia coli.*** *Environ. Microbiol* 54: 1023-1029.

Yu, J., Y. Park, D. Yum, J Kim., I. Kong, and D. bai. 1991. **Nukleotide Sequence and Analysis of a xylanase ge (Xyn S) from Alkali-Tolerant *Bacillus sp.* YA-14 and Comparison with other Xylanase**. *Apll. Environ, Microbiol.* 3: 139-145.

ADLN - Perpustakaan Unair

Table I. Ammonium Sulfate, Grams to be Added to 1 Liter

From S_1% ↘ To S_2% →	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0	27	55	84	113	144	176	208	242	277
5		27	56	85	115	146	179	212	246
10			28	57	86	117	149	182	216
15				28	58	88	119	151	185
20					29	59	89	121	154
25						29	60	91	123
30							30	61	92
35								30	62
40									31
45									
50									

From S_1 %	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55			33	66	101	138	175	215	256	298	343
60				33	67	103	140	179	219	261	305
65					34	69	105	143	183	224	266
70						34	70	107	146	186	228
75							35	72	110	149	190
80								36	73	112	152
85									37	75	114
90										37	76
95											38

LAMPIRAN 2

Pembuatan Reagen

Larutan buffer –fosfat sitrat:

Dibuat larutan A asam sitrat 0.1M dan larutan B natrium difosfat 0.2M. Campuran x mL larutan A ditambah y mL larutan B, kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL.

x	y	pH
30.7	19.3	4.0
24.3	25.7	5.0
17.9	32.1	6.0

Larutan buffer Tris-HCl

Dibuat larutan A Tris(hidroksimetil)aminomethan 0.2M dan larutan B HCL 0.2M. Campuran 50 mL larutan A ditambah x mL larutan B, kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 200 mL.

x	pH
60.2	6
39.1	7.5
28.3	8
5.0	9

Larutan NaCl 1M

Ditimbang dengan teliti 5.85 gram NaCl, dilarutkan dengan akuades didalam gelas beker. Lalu dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan Triton X-100 2.5%

Sebanyak 2.5 ml Triton X-100 dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan Congo-Red 0.1%

Ditimbang dengan teliti 0.1 gram congo-red kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades.

Larutan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Ditimbang dengan teliti 1 gram NaOH dilarutkan dengan 60 mL akuades, ditambahkan 18.2 gram garam rocelle, 1 gram asam dinitrisalisilat (ditambahkan pelan-pelan sambil diaduk dengan stirrer magnetic), 0.2 gram fenol dan 0.05 gram natrium sulfit. Lalu dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Subtrat *oat spelt xilan* 1%

Ditimbang dengan teliti 0.1 gram *oat spelt xilan* dilarutkan dalam 10 mL buffer fosfat-sitrat pH 7, kemudian diautoklaf.

Larutan Tris pH 6.8

Ditimbang dengan teliti 12.1 gram tris dilarutkan dalam 50 ml akuades lalu ditambah dengan HCl sampai pH-nya 6.8. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan Tris pH 8.8

Ditimbang dengan teliti 24.4 gram tris dilarutkan dalam 50 mL akuades lalu ditambah dengan HCl sampai pH-nya 8.8. Larutan dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan SDS 10%

Ditimbang dengan teliti 1 gram SDS dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker. Lalu dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan APS

Ditimbang dengan teliti 0.5 gram ammonium persulfat kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuades.

Larutan A

Ditimbang dengan teliti 0.5gram $CuSO_4.5H_2O$ dan 1g $Na_3C_6H_5O_7(2H_2O)$ dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker

Larutan dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan B

Ditimbang dengan teliti 20 gram Na_2CO_3 dan 4 gram NaOH dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker

Larutan dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1 L. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan C

1 mL larutan A ditambah dengan 50 mL larutan B

Larutan D

10 mL reagent Folint-Ciocalteau phenol ditambah 10 ml akuades

Bufer elektroforesis pH 8.3

Ditimbang dengan teliti 3 gram tris, 14.4 gram glisin, 1 gram SDS dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker. Lalu dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1000 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen. Kemudian di cek pH-nya dengan menggunakan pH meter.

Komposisi gel zimogram 12.5%

Reagen	Separating gel (mL)	Stacking gel (mL)
1. H_2O	1.04	2.04
2. Tris pH 8.8	1.5	-
3. Tris pH 6.8	-	1.5
4. SDS	0.06	0.06
5. Substrat *oat spelt xilan*	1	-
6. Akrilamide	2.4	2.4
7. TEMED	0.003	0.006
8. APS	0.03	0.03

Komposisi gel SDS page 12.5%

Reagen	Separating gel (mL)	Stacking gel (mL)
1. H_2O	1.04	2.04
2. Tris pH 8.8	1.5	-
3. Tris pH 6.8	-	1.5
4. SDS	0.06	0.06
5. Akrilamide	2.4	2.4
6. TEMED	0.003	0.006
7. APS	0.03	0.03

Larutan pencuci I

Sebanyak 25 µL methanol dan 3.75 µL asam asetat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan pencuci II

Sebanyak 2.5 µL methanol dan 3.75 µL asam asetat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan pewarna perak nitrat ($AgNO_3$)

Ditimbang dengan teliti $AgNO_3$ 0.8 gram dilarutkan dalam 4 mL akuades dalam gelas beker ditambah NaOH 36% 21 mL, NH_3 1.4 mL, dan akuades sebanyak 73.5 mL.

Larutan pengembang warna

Sebanyak 50 µL formaldehid , 100 mL akuades dan 100 µL dimasukkan kedalam gelas beker diaduk sampai homogen.

Substrat pNP-α-L-arabinofuranosida 10 mM

Ditimbang dengan teliti 2.71 gram pNP-α-L-arabinofuranosida. dilarutkan dengan buffer fosfat sitrat pH dalam gelas beker

Larutan dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Substrat pNP-aseat 10 mM

Ditimbang dengan teliti 1.81 gram pNP-α-L-arabinofuranosida. dilarutkan dengan buffer fosfat sitrat pH dalam gelas beker

Larutan dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen

larutan jenuh bufer Tris HCl pH 6 dalam 60 % amonium sulfat

Sebanyak 7,2 gram amonium sulfat yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam larutan bufer Tris HCl

LAMPIRAN 3

Penyiapan tabung dialisis

Tabung dialisis dipotong sepanjang 10-20 cm kemudian didihkan selama 30 menit dalam sejumlah volume larutan yang mengandung bikarbonat 10 mM sodium bikarbonat (NaHCO3/1mM EDTA). Selanjutnya bilas dengan akuades dan. tabung dibiarkan dingin kemudian disimpan dalam larutan EDTA suhu 40, sebelum digunakan tabung dialisis dikeluarkan dari larutan EDTA dan dibilas dalamnya dengan akuades.

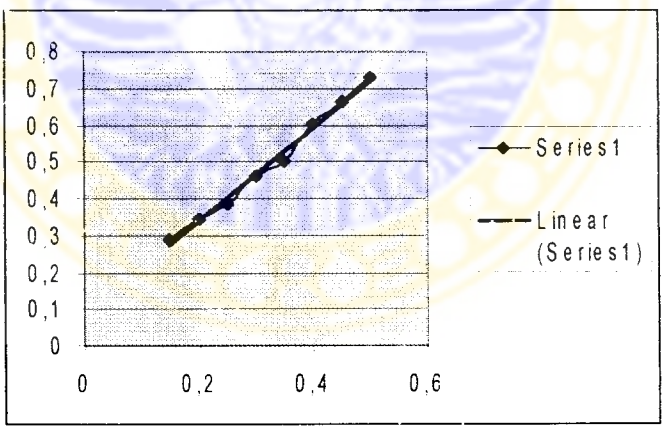
LAMPIRAN 4

Kurva standar xilosa

Data absorbansi larutan standar xilosa pada berbagai konsentrasi :

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi (A)
0,15	0,238
0,20	0,324
0,25	0,363
0,30	0,436
0,35	0,532
0,40	0,603
0,45	0,662
0,50	0,728

Dari data absorbansi larutan standar xilosa pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi kurva standar xilosa yang dinyatakan sebagai y = ax + b. Dengan ketentuan y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi larutan xilosa (mg/ml). Diperoleh persamaan regresi linier y =0.0264+1,4113x, R= 0.9953



Kurva standar xilosa

LAMPIRAN 5

Penentuan aktivitas enzim xilanase dengan metode DNS

Contoh cara perhitungan aktivitas enzim xilanase :

Persamaan regresi linier : y =0,0264+0,4133x

Absorbansi produk (xilosa) : 0.221

Waktu inkubasi : 60 menit

Berat molekul xilosa : 150

Konsentrasi produk (xilosa):

$y = 0.0264+0.4133x$

y = absorbansi

x = kosentrasi produk (xilosa)

$0.221 = 0.0264+0.4133x$

$x = 0,138$ mg

$$\text{Aktivitas xilanase} = \frac{\text{Konsentrasi produk (mg) x Faktor pengenceran x 1000 x10}}{\text{Waktu inkubasi x Berat molekul xilosa}}$$

$$= \frac{0.153 \times 1 \times 1000 \times 10}{60 \times 150}$$

$$= 15,3 \times 10^{-2} \text{ U/mL}$$

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1µmol produk/menit/mL

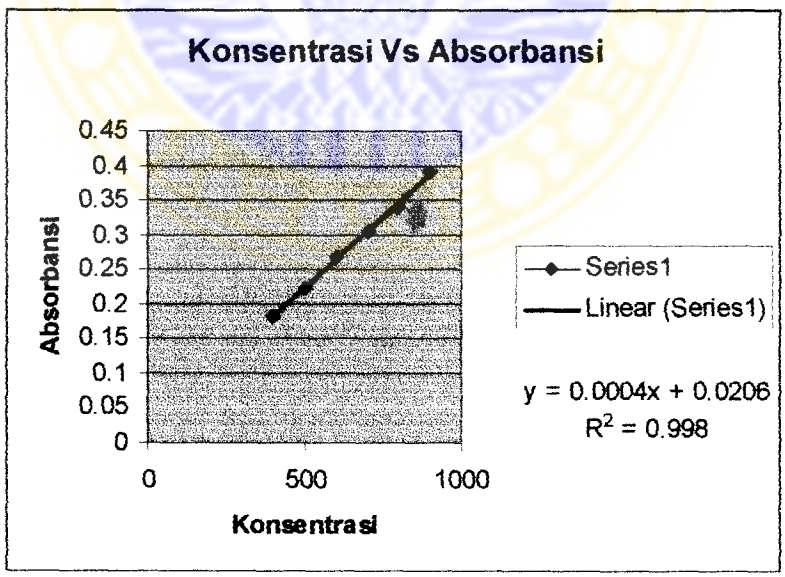
LAMPIRAN 6

Kurva standar protein

Data absorbansi larutan standar protein (BSA) pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (A)
400	0.183
500	0.223
600	0.268
700	0.305
800	0.34
900	0.39

Dari data absorbansi larutan standar protein pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi kurva standar protein yang dinyatakan sebagai y = ax + b. Dengan ketentuan y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi larutan standar protein (µg/mL). Diperoleh persamaan regresi linier y =0.0004+0.0206, R^2=0.998



LAMPIRAN 7

Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat

Data aktivitas enzim xilanase setelah pengendapan dengan amonium sulfat

Fraksi ke	Aktivitas (U/ml)
15%	0.00313
20%	0.043
25%	0.004
30%	0.0127
35%	0.025
40%	0.004
45%	0.0127
50%	0.039
55%	0.056
60%	0.396
65%	0.29
70%	0.273
75%	0.066
80%	0.103
85%	0.013
90%	0

LAMPIRAN 8

Kromatografi interaksi hidrofobik

Data aktivitas enzim setelah dimurnikan dengan kromatografi interaksi hidrofobik

Fraksi ke	absorbansi pada 280 nm	Aktivitas (U/mL)
0	0,106	0
1	0,221	0
2	0,188	0.077
3	0,190	0
4	0,180	0.038
5	0,565	0.044
6	0,222	0.059
7	0,244	0.054
8	0,216	0.029

Lampiran 9

Kromatografi penukar anion

Data aktivitas enzim setelah dimurnikan dengan kromatografi penukar anion

Fraksi ke	Absorbansi pada 280 nm	Aktivitas (U/Ml)
1	0.098	0
2	0.234	0
3	0.118	0
4	0.156	0
5	0.046	0
6	0	0
7	0.079	0
8	0.032	0
9	0.036	0
10	0.015	0
11	0.01	0
12	0.029	0
13	0	0.027
14	0.058	0
15	0.034	0.031
16	0.025	0
17	0.034	0
18	0.042	0
19	0.013	0
20	0.04	0
21	0.033	0.056
22	0	0.082
23	0.024	0.0066
24	0	0.016

LAMPIRAN 10

Data aktivitas enzim dari tiap tahapan pemurnian

Tahapan pemurnian	Aktivitas (U/ml)
Ekstrak kasar	23,42
Fraksinasi dengan $(NH_4)_2SO_4$	9,24
Kromatografi interaksi hidrofobik	$15,9 \times 10^{-2}$