

**Bioteknologi**

**LAPORAN HASIL PENELITIAN  
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA-HPTP  
(HIBAH PASCA)**

kk  
k/c  
4p.76/110  
pus  
L



MILIK  
PERTUNJANGAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**OVER-EKSPRESI GEN-GEN PENYANDI ENZIM XILANOLITIK  
(pTP510) KE DALAM SEL INANG KOMERSIAL  
SERTA PEMANFAATAN PRODUK HIDROLISISNYA SEBAGAI  
ANTI-MIKROBA DAN PREBIOTIK**

Oleh :

**Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih,MSi  
Dr. Eddy Bagus W.,MS,SpMK  
Dr. Bambang Prayogo EW,MS**

**Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Surat Perjanjian Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2008**


## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Over-ekspresi Gen-gen Penyandi Enzim Xilanolitik (pTP510) ke dalam Sel Inang Komersial Serta Pemanfaatan Produk Hidrolisisnya sebagai Anti-Mikroba dan Prebiotik
2. Peneliti Utama
- a. Nama Lengkap : Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Msi
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 131 653 446
  - d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
  - e. Jabatan Struktural : Direktur Pendidikan, Universitas Airlangga
  - f. Bidang Keahlian : Enzimologi dan Biologi Molekuler
  - g. Program Studi/Jurusan : Kimia
3. Daftar Anggota Peneliti dan Mahasiswa

NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi	Enzimologi dan Biologi Molekuler	FMIPA/Kimia	Universitas Airlangga
2.	Dr. dr. Eddy Bagus W., MS.SpMK	Mikrobiologi	Fakultas Kedokteran/Mikrobiologi	Universitas Airlangga
3.	Dr. Bambang Prajogo E.W., MS	Kimia Analitik	Fakultas Farmasi/Kimia Farmasi	Universitas Airlangga
4.	Dra Sri Sumarsih, MSi NIM. 090515718D	Enzimologi	F. Saintek/Kimia	Universitas Airlangga
5.	I Nengah Wirajana, S.Si., Msi NIM. 090610071/D	Biokimia	FMIPA/Kimia	Universitas Udayana
6.	One Asmarani, S.Si NIM. 090710034/M	Biokimia	-	-

4. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
  - b. Jangka waktu penelitian yang sudah dijalani : 1 tahun
  - c. Biaya total yang diusulkan : Rp. 267.000.000,-
  - d. Biaya yang disetujui tahun 2007 : Rp. 50.000.000,-
  - e. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp. 50.000.000,-

Surabaya, 24 Desember 2008  
Peneliti Utama,

Mengetahui,  
Direktur Program Pascasarjana,  
  
Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS  
NIP. 130517146

  
Dr. Ni Nyoman Tri P., MSi  
NIP. 131 653 446

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

  
Dr. Bambang Sektian L., DEA, Drh.  
NIP. 131837004

- i -

**RINGKASAN****Over-ekspresi Gen-gen Penyandi Enzim Xilanolitik (pTP510) ke dalam Sel Inang Komersial Serta Pemanfaatan Produk Hidrolisisnya sebagai Anti-Mikroba dan Prebiotik****Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Eddy Bagus Wasito, dan Bambang Prajogo E.W.****Universitas Airlangga, Surabaya**

---

Enzim xilanolitik berperan penting dalam menghidrolisis substrat Xilan. Substrat xilan banyak terkandung dalam limbah pertanian, seperti limbah tongkol jagung, jerami padi, ampas tebu, limbah padat kelapa sawit dan lain-lain. Kompleks enzim xilanolitik terdiri dari lima jenis enzim, yaitu endo-xilanase, arabinofuranosidase, xilosidase, glukuronidase, dan esterase. Hidrolisis total limbah pertanian kaya xilan oleh kelima enzim kelompok xilanolitik tersebut akan mampu menghasilkan monomer xilosa, arabinosa, glukuronat dan xilo-oligosakarida. Produk xilo-oligosakarida dapat dimanfaatkan sebagai bahan prebiotik dan anti-bakteri, namun penelitian ini tergolong masih dalam taraf penelitian di laboratorium dan belum dilakukan secara aplikatif. Enzim xilanolitik *exo-xilanase*, *xilosidase* dan *arabinofuranosidase* telah berhasil diisolasi, dimurnikan bahkan gen-gen penyandinya telah pula berhasil diklonkan ke dalam sel inang *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  dan BL21 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2004). Selanjutnya dalam penelitian Hibah Tim Pascasarjana ini dilakukan penelitian mengenai kloning gen-gen penyandi enzim xilanolitik ke dalam sel inang komersial serta kemampuan produk hidrolisisnya terutama xilo-oligosakarida sebagai bahan prebiotik dan anti-bakteri.

Tahapan penelitian pada tahun pertama dan kedua telah berhasil dihasilkan sub-kloning gen penyandi *xilosidase* ke dalam sel inang komersial *Bacillus megaterium*, analisis efek prebiotik xilo-oligosakarida terhadap pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota*, dan pengujian efek anti-bakteri xilo-oligosakarida terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu, telah berhasil pula dilakukan pemurnian enzim *xilosidase*, sub-kloning gen penyandi *arabinofuranosidase* ke dalam *shuttle vector* pYES2 yang akan diekspresikan dalam sel inang *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen penyandi *xilosidase* telah berhasil diisolasi dari pTP510 dan diklonkan ke dalam plasmid pHIS1525 menghasilkan pSMX serta telah pula berhasil diekspresikan dalam sel inang *Bacillus megaterium*. Analisis efek prebiotik telah pula menunjukkan hasil yang memuaskan dengan mempunyai xilo-oligosakarida meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota*. Selanjutnya hasil penelitian tahun kedua ini menyarankan untuk mengkarakterisasi ekspresi gen penyandi *arabinofuranosidase* dalam *S. Cerevisiae*, serta uji sinergisme hidrolisis xilan dengan enzim *xilosidase*, *arabinofuranosidase* dan *exo-xilanase* rekombinan.

**SUMMARY****Over-expression of xylanolytic genes (pTP510) into commercial hosts and analysis of its prebiotic and anti-bacterial effect****Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Eddy Bagus Wasito, and Bambang Prajogo E.W.****Airlangga University, Surabaya**

---

Xylanolytic enzymes catalyse the hydrolysis of xylan substrate. Agriculture waste such as rice straw, corn cob, baggase, palm oil solid waste contains xylan, the second abundant polysaccharide after cellulose. Xylanolytic enzymes compose by five enzymes, those are arabinofuranosidase, endo-xylanase, xilosidase, glucuronidase, and esterase. Total hydrolysis of agriculture waste rich in xylan using the above enzymes will produce monomer of xylose, arabinose, glucuronate, and xylo-oligosaccharides. Xylo-oligosaccharides can be used as prebiotic and anti-bacterial agents, although it is still done at laboratory work than its application. Xylanolytic enzymes group, exo-xylanase, arabinofuranosidase, and xylosidase has successfully been isolated, and characterized. They also has been cloned in *Eschericia coli* DH5 $\alpha$  and BL21 (Ni Nyoman Tri puspaningsih, 2004). Therefore in this research, we will continue to clone the xylanolytic gene from pTP510 into commercial hosts and analysis the xylo-oligosaccharide products as prebiotic and anti-bacterial agents.

Cloning the xylosidase gene from pTP510 into *Bacillus megaterium* and analysis the xylo-oligosaccharides as prebiotic on *Lactobacillus casei* strain *Shirota* and antibacterial agents on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* has done in this first year of the research. The result showed that xylosidase gene has successfully cloned into pHIS1525 and namely pSMX then it also can be expressed in *Bacillus megaterium*. Analysis of xylo-oligosaccharides effect as prebiotic indicated that it could increasing the *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. Additionally, it also could decrease the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The second year of this research showed that the arabinofuranosidase gene was successfully cloned into shuttle vector pYES2 and expressed in *E.coli-S.cerevisiae* system. The recombinant xylosidase has also been purified by Ni-NTA affinity chromatography. The research will be continued on the third year (2009) to characterize the properties of recombinant arabinofuranosidase in *S. cerevisiae*. The research also will analyzed the synergism among recombinant arabinofuranosidase, xilosidase and exo-xylanase to degrade xylan.

## CAPAIAN INDIKATOR KINERJA

No.	Indikator kinerja	Pelaksanaan penelitian tahun pertama (2007)	Setelah pelaksanaan 2 tahun penelitian (2008)
1.	Kloning gen xilosidase di <i>Bacillus megaterium</i>	Ada	Ada dan terkarakterisasi
2.	Analisis xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa asal limbah pertanian (tongkol jagung) sebagai prebiotik	Belum ada	Ada
3.	Hidrolisis limbah tongkol jagung dengan enzim xilanase	Ada namun belum diaplikasikan	Ada dan telah berhasil diaplikasikan sebagai anti-bakteri
4.	Pemurnian enzim xilanolitik rekombinan dengan kromatografi afinitas	Belum ada	Ada dan enzim xilosidase rekombinan telah berhasil dimurnikan
5.	Sub-kloning gen penyandi arabinofuranosidase dari <i>E.coli</i> (pTP510) ke dalam sistem ragi <i>S. cerevisiae</i>	Belum ada	Ada dan telah berhasil di sub-klonkan ke dalam vektor pYES2

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan hidayahNya penelitian Hibah Tim Pascasarjana yang berjudul ***Over-ekspresi Gen-gen Penyandi Enzim Xilanolitik (pTP510) ke dalam Sel Inang Komersial serta Pemanfaatan Produk Hidrolisisnya sebagai Anti-Mikroba dan Prebiotik*** telah berhasil diselesaikan pada tahun kedua pelaksanaan penelitian.

Pada kesempatan ini, ijin kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. DP2M-Dikti Jakarta atas kepercayaannya telah mendanai penelitian HTP kami pada tahun kedua ini
2. Rektor Universitas Airlangga atas kepercayaan yang diberikan kepada kami dalam menyelesaikan penelitian HTP tahun kedua ini
3. LPPM Universitas Airlangga yang telah mengkoordinir dan melakukan monev terhadap pelaksanaan penelitian tahun kedua ini
4. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi dan Ketua LPT Universitas Airlangga dalam memberikan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini
5. Semua pihak yang telah terlibat dalam penelitian ini

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan khususnya bagi pengembangan ilmu.

Surabaya, Desember 2008

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
CAPAIAN INDIKATOR KINERJA	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang masalah	1
1.2. Tujuan dan manfaat penelitian tahun kedua	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Xilooligosakarida	6
2.2. Oligosakarida	7
2.3. Prebiotik	12
BAB III. METODE PENELITIAN	15
3.1. Efek in-vitro Xilooligosakarida asal Tongkol Jagung terhadap Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> (Penelitian mahasiswa S1 atas nama Shindy Purnamasari)	15
3.2. Mekanisme sinergi enzim xilanolitik rekombinan dalam hidrolisis xilan (Penelitian mahasiswa S2 atas nama One Asmarani)	19
3.3. Karakterisasi enzim xilosidase rekombinan yang diekspresikan oleh sistem <i>Bacillus megaterium</i> (pSMX) (Penelitian mahasiswa S3 atas nama Sri Sumarsih)	21
3.4. Sub-kloning gen penyandi enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari sistem <i>E.coli</i> ke dalam sistem sel ragi <i>S. cerevisiae</i> (Penelitian mahasiswa S3 atas nama I Nengah Wirajana)	23

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	55
BAB VI. RENCANA /PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA	56
BAB VII.DAFTAR PUSTAKA	58
DRAF ARTIKEL ILMIAH	62



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur kimia xilooligosakarida	6
Gambar 2. Skema struktur xilan	7
Gambar 3. Hasil analisis KLT senyawa xilooligosakarida Dari HemiA dan B	26
Gambar 4. Grafik pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	27
Gambar 5. Embden-Meyerhof Pathway pada pembentukan asam laktat	30
Gambar 6. Phosphoketolase pathway pada pembentukan <i>Asam laktat</i>	31
Gambar 7. Hasil analisis KLT terhadap xilooligosakarida Sebelum dan sesudah dimurnikan dengan <i>Candida guilliermondii</i>	34
Gambar 8. Hasil pemurnian enzim xilosidase dengan SDS-PAGE	39
Gambar 9. Foto hasil uji xilosidase dengan MUX	42
Gambar 10. Analisis SDS-PAGE protein <i>B. megaterium</i> MS941 rekombinan	42
Gambar 11. Kurva pertumbuhan <i>B. Megaterium</i> MS941 rekombinan	43
Gambar 12. Analisis SDS-PAGE protein dalam medium kultur	43
Gambar 13. Profil aktivitas $\beta$ -xilosidase selama kultivasi <i>B. megaterium</i> MS941 rekombinan	45
Gambar 14. Grafik Pengaruh Suhu dan pH terhadap aktivitas $\beta$ -xilosidase	48
Gambar 15. Grafik Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas $\beta$ -xilosidase	48

Gambar 16. Elektroforegram pTP510 dan pYES2 serta pemotongan dengan <i>Sacl</i> dan <i>XhoI</i>	50
Gambar 17. Elektroforegram gel agarosa hasil PCR gen <i>abfa</i>	52
Gambar 18. Elektroforegram hasil pemotongan ampikon dan vektor dengan <i>Sacl</i> dan <i>XhoI</i>	53
Gambar 19. Elektroforegram DNA plasmid hasil isolasi dan analisis restriksi <i>E. coli</i> TOP10 (pYES2- <i>abfa</i> )	54

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Jumlah sel <i>Lactobacillus casei</i> dalam beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh	27
Tabel 2. Hasil analisis larutan hasil fermentasi <i>Lactobacillus casei</i> pada beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh	32
Tabel 3. Rata-rata pH larutan hasil fermentasi <i>Lactobacillus casei</i> Pada beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh	32
Tabel 4. Hasil analisis HPLC hasil hidrolisis Hemi A dan B Tongkol jagung dan setelah pemurnian dengan <i>Candida guilliermodii</i>	37

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar belakang masalah

Pemanfaatan dan pengolahan kembali limbah pertanian yang bersifat dapat diperbaharui (*renewable*) terutama sebagai bahan baku energi sangat penting untuk dilakukan. Keterbatasan jumlah minyak bumi dewasa ini menjadi perhatian pemerintah untuk mencari alternatif bahan baku energi dari limbah hayati. Selain itu, pemanfaatan limbah pertanian kaya akan sumber polisakarida seperti selulosa dan hemiselulosa menjadi produk monomer dan oligomernya akan sangat bermanfaat sebagai bahan prebiotik pangan yang saat ini sangat dikenal perkembangannya dalam kelompok *Glycoscience*.

Limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku energi dan prebiotik adalah limbah pertanian kaya akan kandungan selulosa dan hemiselulosa. Kandungan polisakarida yang cukup tinggi pada limbah pertanian tersebut dapat didegradasi secara kimia maupun enzimatik menjadi gula sederhana, selanjutnya digunakan sebagai bahan baku pembuatan bio-etanol. Sedangkan produk hidrolisis dalam bentuk oligosakarida sangat bermanfaat sebagai bahan prebiotik. Degradasi secara kimia dapat menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan, oleh karena itu degradasi enzimatik yang lebih spesifik dan ramah lingkungan sangat diperlukan dalam proses degradasi limbah pertanian tersebut. Teknologi seperti ini dikenal dengan nama *White Biotechnology*, yaitu menggunakan enzim sebagai bio-katalis dalam proses industri.

Salah satu kelompok enzim yang dapat mendegradasi limbah pertanian tersebut adalah kelompok enzim hemiselulase, diantaranya adalah kelompok enzim xilanase. Berbagai limbah pertanian, seperti ampas tebu, tongkol jagung, limbah padat pengolahan kelapa sawit, dedak padi dan gandum mengandung hemiselulosa yang kaya akan kandungan xilan. Hemiselulosa merupakan suatu heteropolimer yang mengandung monosakarida pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (glukosa, galaktosa, manosa) dan juga gula asam (asam glukuronat) (Saha, 2003). Degradasi hemiselulosa kaya xilan secara enzimatik akan menghasilkan monosakarida dan oligosakarida yang selanjutnya dapat

dimanfaatkan pada proses pembuatan alkohol maupun industri kimia lain, seperti pembuatan xilitol dan 2,3-butanadiol. Penggunaan enzim xilanolitik termofilik hasil rekombinasi galur lokal yang telah berhasil dilakukan oleh peneliti pengusul (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2000–2005) akan sangat bermanfaat dalam degradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa seperti limbah padat kelapa sawit, ampas tebu, ampas pengolahan bio-diesel biji jarak dan limbah tongkol jagung menjadi gula sederhana. Keberadaan limbah-limbah pertanian tersebut di atas sangatlah berlimpah di Indonesia yang merupakan negara agraris, berbasis pada pertanian.

Hemiselulosa tersusun atas heteropolimer xilan, manan, arabinogalaktan dan arabinan. Hemiselulosa ini bersama-sama dengan selulosa dan lignin menyusun dinding sel tanaman dengan komposisi kandungan hemiselulosa 30-35 %, selulosa 50-55% dan lignin 10-20% (Beg *et al.*, 2001). 1,4- $\beta$ -xilan merupakan komponen utama hemiselulosa, memiliki kerangka dasar residu ikatan 1,4- $\beta$ -D-xilopiranosil yang rantai sampingnya disubstitusi dengan asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan  $\alpha$ -arabinofuranosil (Subramaniyan *et al.*, 2002). Hemiselulosa mempunyai struktur yang amorf, random dan kekuatannya lebih lemah dibanding selulosa. Oleh karena itu, hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis oleh enzim, asam atau basa. Hidrolisis enzimatik mempunyai nilai ekonomis dan komersial yang lebih tinggi dan penting.

Hidrolisis total hemiselulosa xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu endo-1,4- $\beta$ -xilanase (1,4- $\beta$ -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida; 1,4- $\beta$ -D-xilosidase (1,4- $\beta$ -D-xylanxylohydrolase, EC.3.2.1.37) memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Subramaniyan *et al.*, 2002).

Enzim xilanolitik dapat digunakan untuk beberapa keperluan, diantaranya adalah untuk (1) proses pemutihan industri pulp dan kertas, (2) meningkatkan mutu pakan ternak, (3) pengolahan bahan makanan, (4) meningkatkan kemampuan dalam degradasi material tumbuhan, khususnya limbah pertanian, (5) produksi alkohol dan xilitol serta (6) meningkatkan proses ekstraksi minyak tumbuhan. Keberadaan limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan akan sangat

bermanfaat sebagai bahan baku industri kimia bila didegradasi secara enzimatik menjadi oligosakarida maupun monosakarida.

Penelitian Penelitian yang telah dilakukan dan dikembangkan oleh Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim selama 5 tahun terakhir telah berhasil mengisolasi, mengkarakterisasi enzim-enzim xilanolitik termofilik dari isolat lokal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan telah pula berhasil mengklon gen-gen penyandi enzim xilanolitik termofilik tersebut ke dalam *Escherichia coli*. Kemampuan enzim-enzim xilanolitik rekombinan tersebut dalam mendegradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan telah pula dilakukan. Hasil menunjukkan tingginya produk xilo-oligosakarida selain dihasilkan pula monosakarida xilosa dan arabinosa.

Pada penelitian tahun I telah berhasil dilakukan uji anti-bakteri dan prebiotik dari produk xilo-oligosakarida. Penambahan 5 % xilooligosakarida standar pada media MRSB (deMan Rogosa Sharp Broth) dengan lama inkubasi 24 jam memperlihatkan hasil yang terbaik terhadap peningkatan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*. Selain itu, penambahan xilooligosakarida berpengaruh terhadap pertambahan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* dan produksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirrat (*Short chain fatty acid* = SCFA) oleh bakteri ini sehingga menyebabkan penurunan nilai pH pada media (Asnia, Tesis S2, 2007). Analisis peran xilooligosakarida sebagai anti-bakteri terhadap *Stapylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* telah pula menunjukkan hasil yang positif (Eko, Tesis S2, 2007). Pada penelitian lanjutan di tahun II akan dilakukan analisis prebiotik menggunakan xilooligosakarida hasil hidrolisis tongkol jagung secara enzimatik dan akan dibandingkan dengan hasil tahun I yang menggunakan xilooligosakarida standar (Cindy, Skripsi S1, 2008).

Hal penting lainnya yang juga dikembangkan dalam penelitian tahun I adalah bahwa semua klon yang mengandung gen penyandi enzim xilanolitik tersebut telah dilakukan dan diuji ekspresinya dalam sel inang *E.coli*. Kelemahan dari ekspresi di sel inang *E. coli* adalah enzim tidak mampu disekresikan secara ekstraseluler dan *E. coli* bukanlah mikroba unggulan untuk produksi skala komersial. Gen xilosidase memberikan ekspresi yang rendah di *E.coli*. Oleh karena itu, dalam penelitian tahun I dilakukan sub-kloning dan ekspresi gen penyandi xilosidase termofilik dari *E.coli* ke dalam sel inang komersial *Bacillus*

*megaterium*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen penyandi xilosidase yang terinsersi dalam pET-xyl telah berhasil di sub-kloning ke dalam pSMX dan telah berhasil pula diekspresikan secara ekstraseluler di sel inang *Bacillus megaterium* (Sri Sumarsih, Mahasiswa S3, 2007). Pada penelitian lanjutan tahun II ini dilakukan karakterisasi enzim xilosidase rekombinan dalam sistem *Bacillus megaterium* (Sri Sumarsih, Mahasiswa S3, 2008)

Pada tahun II juga dilakukan sub-kloning gen penyandi arabinofuranosidase dari *E.coli* ke dalam sel inang ragi *S. cerevisiae* (Nengah Wirajana, Mahasiswa S3, 2008). Mengingat hingga saat ini, Indonesia masih mengimport enzim dari luar negeri. Peningkatan produksi enzim-enzim rekombinan secara mandiri akan meningkatkan ekonomi bangsa.

Pada tahun kedua pelaksanaan penelitian tim hibah pascasarjana (HPTP) ini melibatkan 2 mahasiswa S1, 1 mahasiswa S2 dan 2 mahasiswa S3. Penelitian dilakukan di (1) Laboratorium Kimia Organik-Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA-Universitas Airlangga; (2) Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga; dan (3) Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada. Hasil yang diharapkan pada pelaksanaan tahun kedua penelitian HPTP meliputi (1) perolehan data karakterisasi enzim xilosidase termofilik yang diekspresikan oleh *Bacillus megaterium* MS941 rekombinan (pSMX), (2) perolehan data analisis yang menunjukkan bahwa xilo-oligosakarida mampu berperan sebagai prebiotik, (3) perolehan gen penyandi arabinofuranosidase di sistem *shuttle vector Saccharomyces cerevisiae-E.coli*.

## 1.2. Tujuan dan manfaat penelitian tahun kedua

### Tujuan Umum :

- a. Kloning dan peningkatan ekspresi enzim-enzim xilanolitik rekombinan dalam sel-sel inang komersial *S. cerevisiae* dan *Bacillus* sp.
- b. Mengkarakterisasi enzim-enzim xilanolitik rekombinan yang terekspresi di sel inang *S. cerevisiae* dan *Bacillus* sp.
- c. Produksi enzim-enzim xilanolitik rekombinan secara ekstraseluler di sel inang *S. cerevisiae* dan *Bacillus* sp.
- d. Mengisolasi produk hidrolisis xilo-oligosakarida.

- e. Menguji kemampuan enzim xilanolitik rekombinan dan produk xilo-oligosakarida sebagai anti-bakteri dan prebiotik.

**Tujuan Khusus Penelitian Tahun II :**

- a. Karakterisasi enzim xilosidase rekombinan yang diekspresikan oleh sel inang *Bacillus megaterium* MS941(pSMX).
- b. Menguji kemampuan xilo-oligosakarida hasil hidrolisis enzimatis tongkol jagung sebagai prebiotik.
- c. Mempersiapkan enzim xilanolitik rekombinan murni dalam pengujian sinergisme aktivitas enzim terhadap xilan.
- d. Sub-kloning gen penyandi arabinofuranosidase dari sistem E.coli (pET-abfa/pTP510) ke dalam sistem ragi *S. cerevisiae*.

**Manfaat Penelitian Tahun II :**

- a. Efek sinergisme peran xilo-oligosakarida alam sebagai prebiotik dan anti-bakteri akan sangat menguntungkan dalam meningkatkan peran enzim xilanolitik pada campuran pakan ternak.
- b. Enzim xilanolitik dapat digunakan sebagai kajian bahan tambahan dalam pakan ternak.
- c. Kemampuan ekspresi gen penyandi xilosidase di sel inang komersial *Bacillus megaterium* MS941 dan *S. cerevisiae* akan menguntungkan dalam aplikasi secara komersial.

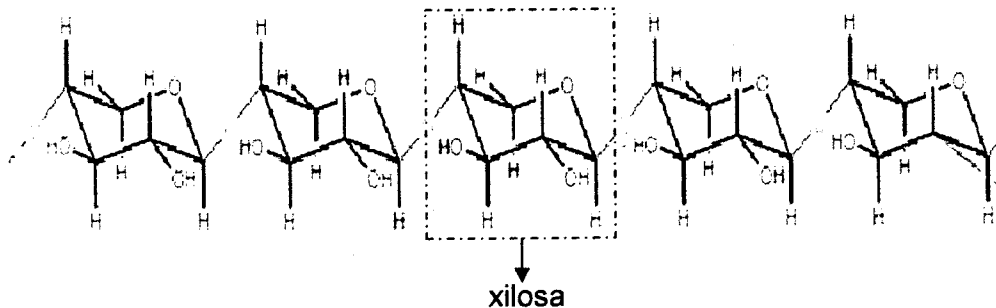


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Xilooligosakarida (XOs)

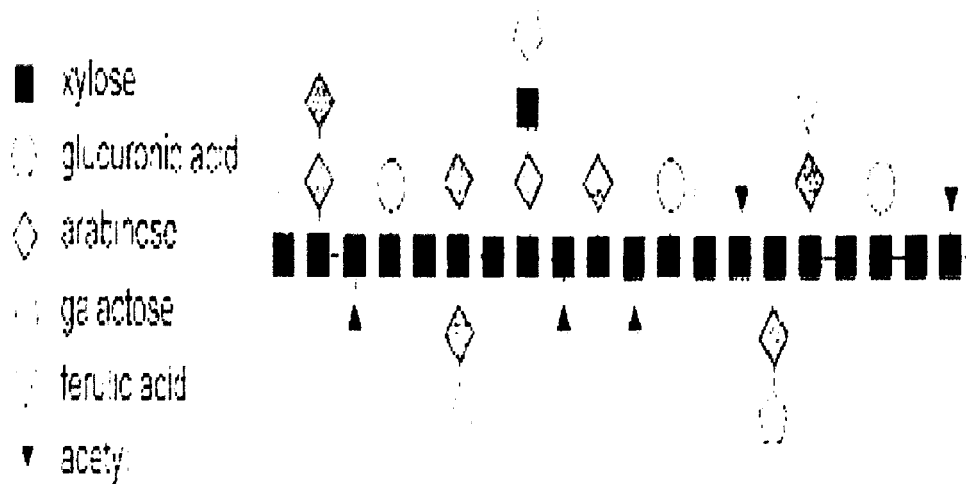
Xilooligosakarida (XOs) adalah *sugar oligomers* (oligosakarida) yang terdiri dari unit-unit xilosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ 1,4-Xilopiranososa dengan struktur  $\text{Xyl}\beta$ 1-4[Xyl] $_n$  ( $n = 2-10$ ).



Gambar 1. Struktur kimia xilooligosakarida (Nath, 2006)

Sifat fisika-kimia xilooligosakarida antara lain: tidak dapat dicerna (*undigestible*) oleh enzim-enzim saluran cerna atas, rasa manis sedang, stabil pada pH dan temperatur lebih tinggi dan mempunyai karakteristik organoleptik sesuai untuk dicampurkan ke dalam suatu bahan makanan. Dengan sifat fisika-kimia yang dimiliki xilooligosakarida mempunyai nilai penting untuk digunakan sebagai bahan prebiotik (Dominguez *et al.*, 2003).

Xilooligosakarida secara alamiah terdapat dalam buah-buahan, sayur-mayur, bambu, susu nabati, madu dan dapat diproduksi pada skala industri dari bahan-bahan hemiselulosa yang kaya xilan. Xilooligosakarida juga dapat diperoleh dengan mengolah bahan limbah *forestal*, agrikultur atau limbah industri yang bersifat *lignocellulosic*. Mengolah limbah biomassa nabati bermanfaat baik secara ekologis maupun ekonomi, karena bersifat "*biorenewable*" mudah di dapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak. Pengolahan secara enzimatik dan secara kimia dapat digunakan untuk penguraian xilan dari bahan kaya xilan misalnya selulosa dan hemiselulosa. Penguraian hemiselulosa kaya xilan menjadi xilooligosakarida dapat dilakukan melalui hidrolisis (Alonso *et al.*, 2001).



Gambar 2. Skema struktur xilan (Vries and Visser, 2001)

## 2.2. Oligosakarida

Oligosakarida adalah salah satu jenis karbohidrat yang merupakan polimer monosakarida dengan jumlah satuan rantai glikosida antara 2 dan 10. Oligosakarida merupakan serat yang mudah larut. Rantai glikosidik pada oligosakarida dihubungkan oleh ikatan 1-4  $\beta$  glikosidik dimana ikatan ini tidak dapat diurai oleh enzim-enzim pada pencernaan manusia, namun dapat diurai oleh enzim-enzim yang dimiliki oleh bakteri usus tertentu, misalnya *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan golongan *Enterobacteriaceae* lainnya. Dengan demikian, oligosakarida merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri menguntungkan di dalam usus, sehingga kebanyakan oligosakarida disebut sebagai *prebiotik* (Tomomatsu, 1994; Bird, 1988).

Oligosakarida merupakan komponen makanan fungsional yang paling populer di Jepang, banyak digunakan sebagai bahan tambahan dalam bentuk minuman ringan, biskuit, gula-gula/bonbon, dan produk susu. Senyawa yang termasuk dalam oligosakarida antara lain: *Galactosyl-sucrose*, *Galacto-oligosaccharide*, *Galacto-oligosaccharide*, *Xylooligosaccharide*, *Fructo-oligosaccharides*, *Isomalto-oligosaccharides*, *Gentio-oligosaccharides*, dan *Soybean-oligosaccharides* (Bird, 1988).

Produk utama fermentasi oligosakarida adalah *short chain fatty acid* (SCFA), gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>. SCFA meliputi butirrat, propionat, dan asetat. Oligosakarida merupakan sumber dari SCFA baik in vitro maupun in vivo, walaupun hasil relatif per gram dari substrat yang difermentasi belum diketahui pasti. Hasil fermentasi oligosakarida yang diperoleh secara in vitro dapat digunakan untuk memprediksi fermentasinya secara in vivo. Jenis oligosakarida yang difermentasi mempengaruhi produk akhir fermentasi. Jumlah produksi SCFA yang lebih tinggi menunjukkan produksi fermentasi lebih cepat dan lebih awal untuk mencapai tingkat produksi maksimal. Sedangkan jumlah produksi SCFA yang rendah menunjukkan produksi fermentasi lebih lambat dan waktu yang lebih lama untuk mencapai angka produksi maksimal (Cummings *et al.*, 2001).

Pada studi in vitro oleh Wang dan Gibson (1993) menunjukkan bahwa tajin secara konsisten menghasilkan relatif lebih banyak butirrat sedangkan oligofruktosa dan inulin paling rendah. Arabinogalaktan dan polidextrosa menghasilkan lebih banyak propionat, dan oligofruktosa menghasilkan sebagian besar asetat. Pada studi in vitro serupa dengan menggunakan tinja dari 2 subyek yang sebelumnya memakan 20 gram oligofruktosa setiap hari selama 4 minggu, rasio perbandingan asetat : propionat : butirrat selama 12 jam inkubasi adalah 63 : 12 : 25 (Luo *et al.*, 1996).

### **Efek fisiologis oligosakarida pada mikroekologi usus**

Penggunaan oligosakarida sebagai prebiotik, menstimulasi pertumbuhan bakteri menguntungkan di dalam usus manusia maupun hewan. Gastrointestinal manusia mempunyai ekosistem mikrobial kompleks. Pada bagian kolon didiami lebih dari 10<sup>11</sup> bakteri per gram isi kolon. Spesies bakteri utama di dalam kolon adalah dari genus *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, dan semuanya memfermentasi gula. Mikroflora usus terdiri atas bakteri menguntungkan dan bakteri merugikan (Kabel, 2002).

Oligosakarida yang tidak dicerna dan diserap di lambung, akan menjangkau usus dalam keadaan utuh. Di dalam usus oligosakarida dimanfaatkan sebagai sumber karbon untuk metabolisme bakteri menguntungkan, sehingga meningkatkan populasi bakteri menguntungkan dalam kolon utamanya *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacterium sp.* Produk akhir aktivitas metabolisme

oligosakarida tersebut adalah *short chain fatty acids* (SCFA), yaitu : butirrat, propionat, asetat, laktat, serta gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>.

Banyak manfaat positif yang ditimbulkan oleh SCFA pada nutrisi hewan dan manusia. Oligosakarida seperti fruktooligosakarida atau galaktooligosakarida yang cepat difermentasi, mungkin mengoptimalkan metabolisme dan pertumbuhan bakteri usus halus terminal dan usus besar proximal. *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* memfermentasi karbohidrat melalui suatu jalur yang ditengahi oleh enzim-enzim *glycolytic* yang mereka hasilkan dan sebagai produk utama adalah SCFA. Bakteri ini mampu menghidrolisis ikatan *glycosidic* dimana enzim-enzim mamalia tidak mampu menghidrolisisnya (Tjardes *et al.*, 2003).

Efek Produksi SCFA dan peningkatan jumlah bakteri menguntungkan antara lain : meningkatkan fungsi usus, absorpsi kalsium, metabolisme lipid dan mengurangi risiko kanker kolon (Cycroft *et al.*, 2001).

Dengan peningkatan jumlah bakteri ini akan menekan pertumbuhan bakteri merugikan (patogen) misalnya *Escherichia coli* dan *Streptococcus faecalis*. Efek yang sama dapat juga dicapai dengan mengkonsumsi produk makanan yang mengandung bakteri asam laktat yang disebut *probiotik*. Bakteri asam laktat dan sejenisnya relatif tahan terhadap asam lambung sehingga dapat sampai di kolon, dan selanjutnya akan menekan pertumbuhan bakteri yang merugikan (Tomomatsu, 1994; Bird, 1988).

Secara fisiologis, oligosakarida dapat mencegah penyakit kanker dan meningkatkan kesehatan melalui beberapa mekanisme. Peningkatan jumlah bifidobakteria sesudah mengkonsumsi oligosakarida akan terjadi. Selanjutnya, akan mencegah pertumbuhan bakteri patogen yang masuk dari luar tubuh dan bakteri merugikan yang hidup di dalam usus. Fermentasi oligosakarida oleh bakteri menguntungkan akan memproduksi asam lemak rantai pendek (terutama asam asetat dan asam laktat dengan perbandingan 3:2). Disamping itu bakteri menguntungkan (kebanyakan bakteri asam laktat) mempunyai kemampuan menghasilkan zat antimikroba alami seperti bakteriosin (Bird, 1988; Topping, 1999). Dengan terbentuknya zat-zat antimikroba dan pH asam maka akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *Escherichia coli*. Bifidin merupakan antimikroba yang dihasilkan oleh *Bifidobacterium bifidum*, sangat efektif melawan *Shigella dysenteria*, *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli*, dan bakteri lainnya. Konsumsi oligosakarida akan mengurangi metabolit toksik dan enzim-enzim yang merugikan. Dengan konsumsi 3 - 6 gram oligosakarida per hari, akan mengurangi senyawa-senyawa toksis yang ada dalam usus dan enzim-enzim yang merugikan sebanyak 44,6 % dan 40,9 %, masing-masing selama tiga minggu. Konsumsi produk makanan yang mengandung bifidobakteria seperti Yogurt (disebut sebagai *probiotik*), dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen (Bird, 1988; Tomomatsu, 1994).

Pembentukan asam lemak rantai pendek dalam jumlah yang tinggi oleh bifidobakteria, juga mencegah konstipasi dengan merangsang peristaltis usus melalui peningkatan kandungan air feces akibat adanya tekanan osmosis. Penurunan metabolit toksik oleh oligosakarida atau konsumsi bifidobakteria (*probiotik*) akan meringankan beban bahan toksik dalam hati yang berarti melindungi hati (Bird, 1988; Tomomatsu, 1994).

Bird (1988) melaporkan bahwa suplementasi oligosakarida sebanyak 4 gram per hari selama 25 hari akan mengurangi risiko kanker. Kombinasi dari *probiotik* dan *prebiotik* disebut *sinbiotik*. Penurunan kadar kolesterol oleh oligosakarida diduga karena perubahan mikroflora usus. Bakteri *Lactobacillus* (bakteri asam laktat) diketahui akan menurunkan kolesterol darah karena dapat mencegah absorpsi kolesterol dari usus. *Bifidobacteria* juga mampu menghasilkan niasin yang memberi kontribusi terhadap penurunan kolesterol ini (Bird, 1988; Tomomatsu, 1994).

Beberapa makanan secara alamiah mengandung oligosakarida. Misalnya, frukto oligosakarida (FOS) dapat ditemukan dalam bawang, bawang putih, asparagus, dan soybean oligosakarida ditemukan dalam kacang kedelai. Akan tetapi, melalui makanan setiap hari tidak mungkin dapat memenuhi jumlah oligosakarida yang dianggap berkhasiat untuk mencegah penyakit seperti diuraikan di atas, maka konsumsi tambahan diperlukan untuk dapat berfungsi mencegah penyakit dan meningkatkan kesehatan. Misalnya, frukto oligosakarida (FOS) ditambahkan ke dalam susu bubuk untuk balita sebagai *prebiotik* (Tomomatsu, 1994).

Hemiselulosa yang terdiri dari xilosa dan arabinosa adalah berupa serat pangan dengan perbandingan tertentu yang membedakan jenis hemiselulosa tersebut. Nilai gizi dari serat pangan semula dianggap tidak menyumbangkan

energi karena tidak dapat dicerna oleh enzim pencerna manusia. Serat pangan difermentasikan di dalam kolon dan menghasilkan hidrogen, metana, karbon dioksida, serta asam lemak rantai pendek seperti propionat, butirat yang dapat diserap, dan menghasilkan sejumlah energi 0-3 kalori per gram (Muir, 1999; Silalahi, 2000).

Serat terlarut seperti xilosa dan arabinosa akan memperlambat waktu transit dari mulut ke usus dengan mengurangi kecepatan pengosongan lambung, tetapi meningkatkan waktu transit usus. Peningkatan viskositas isi usus akan mengurangi kecepatan transportasi zat gizi dan menghalangi kontak antara zat gizi dengan permukaan mukosa. Dengan demikian, peristaltik usus menurun, kontak antara substrat dengan enzim serta pembentukan misel berkurang.

Serat terlarut dapat difermentasi oleh bakteri di kolon sehingga hanya sedikit mempengaruhi volume feses di kolon, sedangkan serat tak terlarut seperti selulosa akan menambah volume dan memperlunak feses serta mengurangi waktu transit isi kolon (Muir, 1999).

Serat terlarut mengurangi kadar gula sesudah makan dan memperbaiki profil insulin. Serat terlarut bersifat hipoglikemik melalui beberapa mekanisme. Peningkatan viskositas dalam saluran pencernaan dianggap sebagai faktor utama yang mempengaruhi kecepatan penyerapan glukosa. Dengan memperlambat waktu transit dari lambung ke usus halus, berarti mengurangi absorpsi zat gizi. Serat terlarut telah terbukti dapat menurunkan kadar kolesterol darah, sedangkan serat tak terlarut tidak berpengaruh. Bagaimana serat dapat mempengaruhi kolesterol belum diketahui dengan pasti. Tetapi hasil penelitian mengindikasikan karena adanya perubahan sifat fisika-kimia di dalam isi usus, misalnya viskositas akan mengganggu pembentukan misel dan penyerapan lipida. Juga karena peningkatan ekskresi sterol menyebabkan penurunan kadar kolesterol oleh serat (Kritchevsky, 1999). Serat tertentu dapat mengikat garam empedu dan kolesterol netral. Dengan demikian, akan meningkatkan pengeluaran kolesterol dari tubuh. Garam empedu dikeluarkan bersama feses sehingga mengurangi jumlah yang akan diserap kembali (reabsorpsi) melalui sirkulasi entero-hepatik. Akibatnya, menghalangi penyerapan lipida. Di samping itu, kolesterol di dalam hati dan serum akan dipakai dalam sintesis asam empedu untuk menggantikan kekurangan yang terjadi (Kritchevsky, 1999).

Hasil fermentasi bakteri di kolon juga dapat berperan terhadap metabolisme lipida. Asam lemak rantai pendek seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat dan asam butirat, dihasilkan dalam jumlah besar di dalam kolon sebagai hasil fermentasi mikroba terhadap serat pangan tersebut. Asam lemak tersebut cepat diserap ke hati, dan asam propionat hasil fermentasi diduga dapat menghambat sintesa kolesterol di dalam hati (Kritchevsky, 1999).

Banyak mekanisme yang dikemukakan, tetapi mekanisme yang utama ialah bahwa serat pangan akan menambah volume feses. Dengan demikian, akan mengencerkan isi usus sehingga interaksi mukosa dengan karsinogenik berkurang (Kritchevsky, 1999).

### 2.3. Prebiotik

Prebiotik adalah bahan makanan *undigestible* yang mempunyai pengaruh baik terhadap host dengan menstimulasi aktivitas, pertumbuhan yang selektif, atau keduanya terhadap satu jenis atau lebih bakteri kolon. Prebiotik yang paling potensial adalah karbohidrat misalnya oligosakarida (terdiri dari 2-10 unit monosakarida) (Gibson & Roberfroid, 1995).

Prebiotik secara ilmiah mulai dikenal manfaatnya bagi kesehatan manusia sejak tahun 1907 oleh seorang ahli mikrobiologi Rusia Metchnikof dimana mengkonsumsi yogurt mengandung *Lactobacillus* menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri patogen (Collin & Gigson, 1999).

Bahan makanan yang dikelompokkan sebagai prebiotik bersifat : 1) Tidak dihidrolisis enzim atau diserap pada traktus gastrointestinal bagian atas; 2) Substrat selektif untuk satu atau sejumlah bakteri yang menguntungkan dalam kolon; 3) mampu mengubah mikroflora kolon menjadi komposisi yang menguntungkan kesehatan (Colin & Gigson 1999; Mac Farlane & Cumming, 1999).

Pada masa sekarang prebiotik dan probiotik sangat gencar diteliti manfaatnya. Menyikapi hal ini perlu diluruskan bahwa tidak semua bahan dapat digunakan sebagai prebiotik. Demikian juga bakteri yang disuplementasi sebagai probiotik harus memenuhi standar kesehatan berlaku saat ini.

Prebiotik yang terdapat dalam bahan makanan secara potensial menguntungkan bagi yang mengkonsumsi. Bahan komersial prebiotik

mengandung oligosakarida dan *dietary fibers*. Prebiotik dapat diperoleh melalui proses sebagai berikut: 1) ekstraksi langsung polisakarida alami dari tumbuhan, 2) proses hidrolisis polisakarida alami, 3) proses enzimatik dengan menggunakan enzim misalnya *hydrolase*, *glycocyl transferase*, atau *xylanase* (Roberfroid, 2000; Grizard & Bartheuf, 1999).

### Manfaat prebiotik untuk kesehatan

Efek langsung prebiotik pada kesehatan, antara lain : meningkatkan *Lactobacillus* dan *Bifidobakteria* dan memelihara kesehatan saluran-cerna; menekan risiko gastroenteritis akut utamanya diare dan konstipasi; meningkatkan efisiensi pemanfaatan zat gizi, meningkatkan penyerapan kalsium dan tembaga; meningkatkan gula darah; meningkatkan metabolisme lemak (Grizard & Bartheuf, 1999) .

Prebiotik termasuk makanan fungsional yang dapat mempengaruhi fungsi tubuh sehingga mempunyai efek positif bagi kesehatan. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa prebiotik yang tidak diserap mempunyai efek pencahar ringan sehingga mengurangi risiko terjadinya konstipasi. Prebiotik yang berupa serat tersebut akan difermentasi oleh bakteri sehingga menghasilkan *short chain fatty acid* (SCFA) yang mempunyai efek fisiologi positif bagi kesehatan. Pemberian probiotik pada diare dapat mempercepat pemulihan mukosa usus yang rusak sehingga masa diare lebih singkat. Prebiotik juga bermanfaat untuk pencegahan diare pada anak (Collin & Gibson, 1999).

Dengan stimulasi bakteri kolon yang menguntungkan (*Lactobacillus* atau *Bifidobacterium*) maka prebiotik mempunyai keuntungan untuk kesehatan, antara lain: 1) efek proteksi kanker kolorektal dan infeksi usus dengan menghambat pembusukan oleh bakteri *Clostridium perfringens* dan bakteri patogen (misalnya *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*); 2) memperbaiki metabolisme glukosa dan lipid; 3) memperbaiki bioavailabilitas mineral esensial, 4) mengurangi faktor karsinogenik. Mekanisme kerja bakteri baik di kolon dalam menghambat pertumbuhan bakteri merugikan pada mukosa usus belum sepenuhnya jelas. Namun demikian beberapa laporan menunjukkan dengan cara kompetisi untuk mengadakan perlekatan pada enterosit, meskipun diduga bahwa prebiotik umumnya meningkatkan jumlah atau aktivitas *Bifidobacteria* dan bakteri asam



laktat, dimana kelompok bakteri tersebut memiliki efek menguntungkan bagi pencernaan (Gizard & Barhomeuf, 1999) .

### BAB III

## METODE PENELITIAN

### 3.1. Efek In Vitro Xilo-oligosakarida asal tongkol jagung terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus casei* (Penelitian mahasiswa S1 atas nama Shindy Purnamasari)

#### A. Produksi enzim xilanase

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan biakan bakteri *Bacillus subtilis* PC-01 ke dalam 10 ml media inokulum yang telah dibuat. Biakan diinokulasikan dalam *shaker incubator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 150 rpm selama  $\pm$  18 jam. Sebanyak 1 % biakan inokulum dimasukkan kedalam 1000 mL media produksi. Biakan diinkubasi dengan kondisi seperti di atas. Sel dipanen setelah  $\pm$  18 jam pertumbuhan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim xilanase.

#### B. Pengendapan enzim xilanase dengan amonium sulfat (*Salting Out*)

Kedalam 1000 ml larutan ekstrak kasar enzim dalam gelas beker dimasukkan 310 gram amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai kadar amonium sulfat mencapai prosentase kejenuhan 60%. Gelas beker direndam dalam penangas es selama proses pengadukan berlangsung. Tabel kejenuhan amonium sulfat yang digunakan berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat (Scopes,1987). Penghitungan jumlah amonium sulfat untuk mencapai prosentase kejenuhan tertentu terdapat pada lampiran 1. Proses pengadukan berlangsung selama 30 menit, kemudian disimpan dalam lemari es selama 12 jam. Setelah 12 jam, larutan campuran enzim dan amonium sulfat disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4°C. Pelet diambil dan dilarutkan dalam bufer fosfat sitrat 100 mM pH 5, kemudian didialisis.

### C. Dialisis

Dialisis dilakukan dengan cara memasukkan enzim ke dalam tabung selofan yang salah satu lubangnya telah disimpul. Setelah setengah dari volume tabung terisi oleh larutan enzim, kemudian ujung yang lain dari tabung diikat dengan kuat. Tabung selofan yang berisi enzim tersebut kemudian direndam dalam bufer fosfat sitrat 50 mM pH 5 sambil diaduk perlahan dengan pengaduk magnetik dan diletakkan dalam penangas es. Dialisis dilakukan sampai fraksi enzim terbebas dari amonium sulfat dan dilakukan penggantian bufer setiap 4 jam, 12 jam dan 24 jam. Proses dialisis selesai ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih saat penambahan larutan  $\text{BaCl}_2$  kedalam bufer. Setelah proses dialisis selesai, larutan enzim dikeluarkan dari tabung selofan kemudian diukur volumenya dan diuji aktivitasnya.

### D. Uji aktivitas enzim xilanase

Aktivitas enzim xilanase ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat hemiselulosa A. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  substrat dan 100  $\mu\text{l}$  enzim diinkubasi pada suhu 60 °C selama 1 jam. Hasil inkubasi ditambah 600  $\mu\text{l}$  pereaksi DNS, dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit bersama-sama dengan kontrol, kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 550 nm. Kontrol yang digunakan 100  $\mu\text{l}$  enzim, 100  $\mu\text{l}$  substrat dan 600  $\mu\text{l}$  pereaksi DNS diperlakukan sama dengan kondisi di atas tetapi tanpa diinkubasi. Standar xilosa dibuat pada kisaran 0,15-0,50 mg xilosa/ml dari stok xilosa 10 mg/ml. Masing-masing 1 ml larutan standar dicampur dengan 1 ml akuades, kemudian ditambah 3 ml pereaksi DNS dan 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  $\lambda$  550 nm. Blanko digunakan dengan mengganti xilosa dengan akuades.

### E. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis

Sampel hemiselulosa A dan B hasil isolasi ditambah dengan enzim xilanase dengan perbandingan substrat : enzim = 1 : 1 (volume). Hidrolisis dilakukan pada suhu 70 °C dengan waktu inkubasi selama 24 jam.

## F. Pemurnian xilo-oligosakarida dengan *Candida guilliermondii*

*Candida guilliermondii* ditumbuhkan dalam media yang mengandung larutan xilo-oligosakarida hasil hidrólisis tongkol jagung, pepton 0,3%, yeast extract 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  secara aerob pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 3 hari. Setelah 3 hari, dilanjutkan dengan sentrifugasi. Supernatan yang didapatkan mengandung xilo-oligosakarida. Komposisi oligosakarida ini kemudian dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan HPLC.

## G. Analisis produk pemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis

Jumlah komponen senyawa oligosakarida yang terdapat dalam produk hidrolisis, dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan berbagai macam perbandingan eluen. Eluen yang digunakan adalah propanol :  $\text{CH}_3\text{CN}$  : air (5:3:2) atau propanol : air : ammonia (70:29:1) atau juga n-butanol : asam asetat : air (2:1:1) yang memberikan pemisahan terbaik dan eluen ini digunakan sebagai monitor dalam proses pemisahan selanjutnya. Jika dengan eluen berbeda, muncul spot yang sama pada kromatogram maka semakin murni hasilnya. Oligosakarida bukan merupakan senyawa UV aktif sehingga diperlukan penampak noda. Penampak noda yang digunakan adalah asam sulfat : metanol : air (1:9:10). Setelah disemprot dengan penampak noda, kemudian dikeringkan dan dipanaskan di atas *hotplate* pada suhu  $80\text{-}100^\circ\text{C}$  setelah itu diamati warnanya. Warna yang terbentuk adalah dari ungu hingga kecoklatan.

## H. Uji aktivitas prebiotik

Bahan medium MRSB (deMan, Rogosa, Sharpe Broth), ditimbang sesuai intruksi pada label produk (52 gram/liter). Ditimbang 10,4 gram media MRS broth kemudian dilarutkan dalam gelas beker dengan 200 ml akuades. Larutan diaduk sampai homogen dan diukur pada pH 7, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Selanjutnya media dituang ke dalam botol kultur 10 ml. Pada masing-masing botol yang berisi MRSB tersebut ditambahkan xilo-oligosakarida sesuai konsentrasi. Botol yang berisi medium hangat ditempatkan pada inkubator dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 12 jam.

### H.1. Pembuatan biakan bakteri uji

Pada penelitian ini bakteri uji yang digunakan adalah *Lactobacillus casei* yang diisolasi dari yakult dengan media MRSA dan diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 48 jam. Biakan bakteri uji *Lactobacillus casei* diperbanyak pada medium MRSA plate yang diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 48 jam.

### H.2. Pembuatan suspensi bakteri uji

Dari biakan bakteri uji umur 48 jam, diambil 1 koloni dengan diameter 0,5 mm, kemudian disuspensikan pada 5 ml MRSB dan dikocok dengan vortex. Setelah homogen diinkubasi pada kondisi CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 3 jam. Suspensi bakteri siap diinokulasi pada media fermentasi.

### H.3. Uji pengaruh xilo-oligosakarida terhadap *Lactobacillus casei*

Media dasar yang digunakan adalah MRSB (deMan, Rogosa, Sharpe Broth) volume 10 ml. Media uji *lactobacillus casei* dibuat menjadi 4 variasi, yakni kontrol, media yang ditambahkan xilo-oligosakarida standar, media ditambahkan xilo-oligosakarida dari hemi A dan media yang ditambahkan xilo-oligosakarida dari hemi B. Konsentrasi xilo-oligosakarida yang ditambahkan pada masing-masing variasi media adalah 5% (Zaenudin, 2004). Komposisi dari media uji adalah sebagai berikut : 0% (kontrol) : 9 ml MRSB +1 ml suspensi bakteri uji; 5% : 8,5 ml MRSB + 0,5 ml xilo-oligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji. Masing-masing variasi media diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam.

### H.4. Penghitungan jumlah sel bakteri uji

Jumlah sel bakteri uji dihitung dengan menggunakan metode *total plate count*. Untuk menghitung jumlah bakteri uji, dari masing-masing lama inkubasi (6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam) diambil 100 µl sampel hasil fermentasi. Sampel yang diambil ini kemudian ditambahkan 900 µl larutan NaCl, sehingga volume akhir pengenceran menjadi 1 ml. Dari larutan tersebut kemudian dibuat pengenceran sampai 10<sup>-10</sup> dengan pengenceran bertingkat. Dari masing-masing pengenceran diambil 20 µl, diinokulasi ke dalam *rogosa plate agar* dengan cara

*drop plate*. Selanjutnya diinkubasi dalam CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37°C, selama 48 jam. Jumlah koloni bakteri *Lactobacillus casei* yang tumbuh dihitung dan jumlah selnya dinyatakan dalam colony forming unit/ml (CFU/ml). Jumlah koloni bakteri uji yang dihitung adalah plate dengan jumlah koloni 30 sampai 300.

Karena sampel yang diambil dari masing-masing pengenceran sebesar 20 µl, maka untuk mengetahui jumlah sel sebenarnya dalam 1 ml sampel, harus dikalikan dengan 50 sebagai faktor pengenceran sehingga rumus di atas menjadi:

$$\text{Jumlah sel bakteri (CFU/ml)} = \text{jumlah koloni yang dihitung} \times \frac{1}{\text{pengenceran}} \times 50$$

### **3.2. Mekanisme sinergi enzim xilanolitik rekombinan dalam hidrolisis xilan (Penelitian mahasiswa S2 atas nama One Asmarani)**

#### **A. Produksi enzim xilanolitik**

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan masing-masing biakan bakteri (pET Xyl, pET Abfa dan pET Exo-xyl) dari *E. coli* DH5α ke dalam 10 mL media inokulum yang sebelumnya ditambahkan 10 µL ampisilin (100 mg/mL). Biakan diinokulasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama ±16-18 jam. Satu persen biakan inokulum dimasukkan ke dalam 250 mL media produksi yang sebelumnya ditambahkan 20 µL ampisilin (100 mg/mL). Biakan pET Abfa diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama ±16-18 jam. Biakan pET Xyl dan pET Exo-xyl diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama ±2,5 jam, kemudian ditambahkan 250 µL 0,4M IPTG/100 mL media dan diinkubasi kembali seperti kondisi sebelumnya. Semua sel dipanen setelah waktu inkubasi selesai dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 20 mL bufer fosfat 50 mM pH 8, kemudian disentrifugasi kembali. Pelet sel dilarutkan dengan 5 mL bufer A dan diilisis dengan ultrasonikator dengan frekuensi 20 Hz selama 2 menit diulang 2 kali.

Enzim xilanolitik didapat dari supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit (Puspaningsih, 2004).

## **B. Pemurnian enzim xilanolitik rekombinan**

Enzim xilanolitik rekombinan dari pET Xyl, pET Abfa dan pET Exo-xyl dimurnikan dengan resin Ni-NTA. Tiap 5 mL supernatan enzim xilanolitik rekombinan dicampur dengan 1 mL resin Ni-NTA dalam kolom yang berbeda, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Khusus supernatan enzim Abfa, sebelumnya dipanaskan selama 30 menit pada suhu 70<sup>0</sup>C, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Ditampung hasil inkubasi tiap enzim dengan resin Ni-NTA. Cuci 5 kali tiap kolom dengan 0,5 mL bufer A lalu ditampung. Cuci 5 kali tiap kolom dengan 0,5 mL bufer B kemudian ditampung kembali. Hasil pemurnian ditentukan dengan SDS-PAGE (Puspaningsih, 2004).

## **C. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan**

### **C.1. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan dengan substrat p-nitrofenil-β-D-xilopiranosida (pNP-X)**

Sebanyak 100 μL enzim xilanolitik rekombinan ditambah 900 μL substrat p-nitrofenil-β-D-xilopiranosida (pNP-X) diinkubasi pada suhu 70<sup>0</sup>C (Abfa) dan 50<sup>0</sup>C (xyl dan exo-xyl) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Blangko yang digunakan 100 μL aquades dan 900 μL substrat pNP-X diperlakukan sama dengan kondisi sampel di atas. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah p-nitrofenol yang bebas. Pengamatan jumlah p-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan spektrofotometri pada λ 405 nm.

Standar p-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1-0,5 mM p-nitrofenol/mL dari stok p-nitrofenol 10 mM/mL dalam pelarut bufer PC pH 6. Seratus μL masing-masing larutan standar p-nitrofenol dicampur dengan 300 μL bufer PC pH 6 dan diinkubasi pada suhu 70<sup>0</sup>C dan 50<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 600 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Absorbansi dibaca pada λ 405 nm (Puspaningsih, 2004).

Sebelumnya untuk pengukuran dengan spektrofotometri UV dilakukan penentuan  $\lambda$  maks, dan untuk selanjutnya  $\lambda$  maks tersebut digunakan untuk pengukuran absorbansi sampel.

## **C.2. Uji aktivitas enzim xilanolitik rekombinan dengan substrat xilan (metode DNS)**

Aktivitas enzim xilanolitik rekombinan ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat xilan (*oat-spelt xylan*). Seratus  $\mu$ L substrat tersebut ditambah 100  $\mu$ L enzim diinkubasi pada suhu 70<sup>o</sup>C (Abfa) dan 50<sup>o</sup>C (xyl dan exo-xyl) selama 60 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 600  $\mu$ L pereaksi DNS dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm. Kontrol yang digunakan 100  $\mu$ L enzim, 100  $\mu$ L substrat xilan dan 600  $\mu$ L pereaksi DNS tanpa diinkubasi diperlakukan sama dengan kondisi di atas.

Standar xilosa dibuat pada kisaran 0,1-1 mg xilosa/mL dari stok xilosa 10 mg/mL. 1 mL masing-masing larutan standar dicampur dengan 1 mL aquades, kemudian ditambah 3 mL pereaksi DNS, dikocok kuat. Tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera dinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm (Miller, 1959; Puspaningsih, 2004).

Sebelumnya untuk pengukuran dengan spektrofotometri UV dilakukan penentuan  $\lambda$  maks, dan untuk selanjutnya  $\lambda$  maks tersebut digunakan untuk pengukuran absorbansi sampel.

## **3.3. Karakterisasi enzim xilosidase rekombinan yang diekspresikan oleh sistem *Bacillus megaterium* (pSMX) (Penelitian mahasiswa S3 atas nama Sri Sumarsih)**

### **A. Uji ekspresi $\beta$ -xilosidase rekombinan**

#### **A.1. Produksi enzim $\beta$ -xilosidase rekombinan**



Sel transforman *B. megaterium* ditumbuhkan dalam medium cair LB (+Tc) pada 37°C dengan pengocokan 250 rpm hingga OD<sub>578</sub> = 0,3-0,4 kemudian ditambahkan 5% xilosa dan diinkubasi kembali. Sebelum induksi sebagian sampel diambil sebagai kontrol. Sampel diambil setiap 30-60 menit sampai tercapai OD<sub>578</sub> = 1,5 (sel mencapai fase stasioner). Sampel disentrifugasi untuk memisahkan sel dan supernatan. Supernatan merupakan enzim ekstraseluler. Sel yang diperoleh disuspensikan kembali dalam buffer lisis dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Lisat disentrifugasi untuk memisahkan fraksi tak larut (pelet) dari fraksi larut (supernatan). Fraksi tak larut dilarutkan dengan buffer sonikasi. Untuk mengetahui di fraksi mana protein target ditemukan, maka dilakukan analisis masing-masing fraksi (larut dan tak larut) dengan SDS-PAGE. Selanjutnya, protein target ditentukan aktivitasnya dengan substrat pNP-β-D-xilopiranosida.

## A.2. Uji aktivitas enzim β-xilosidase rekombinan

Enzim β-xilosidase yang dihasilkan *B. megaterium* rekombinan (ekstraseluler dan intraseluler) ditentukan aktivitasnya terhadap substrat turunan p-nitrofenol (pNP) yaitu pNP-β-D-xilopiranosida. Masing-masing enzim sebanyak 100 µl dan 900 µl substrat pNP-β-D-xilopiranosida 1 mM diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah p-nitrofenol yang dilepaskan secara spektrofotometri pada λ 405 nm.

1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol p-nitrofenol pada kondisi percobaan.

## B. Karakterisasi enzim β-xilosidase rekombinan

Karakterisasi meliputi penentuan suhu optimum enzim xilosidase rekombinan, penentuan pH optimum, dan analisis Massa Molekul relatif dengan SDS-PAGE.

### 3.4. Sub-kloning gen penyandi enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari sistem *E.coli* ke dalam sistem sel ragi *S. cerevisiae* (Penelitian mahasiswa S3 atas nama I Nengah Wirajana)

#### A. Disain primer dan amplifikasi PCR gen penyandi $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik yang terdapat dalam plasmid pTP510

Sepasang primer didesain untuk mengangkat gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik (*Abfa*) yang terinsersi dalam pTP510 dengan teknik PCR. Primer *forward* dan primer *reverse* dirancang dengan penambahan urutan sisi pengenalan enzim restriksi yang sesuai dengan MCS (*multiple cloning site*) vektor ekspresi pYES2. Disain primer dilakukan dengan menggunakan program *Clone Manager*.

Sebelum dilakukan amplifikasi dengan teknik PCR, plasmid pTP510 dan pYES2 diperbanyak dalam sel inangnya masing-masing dan dilakukan isolasi plasmid *mini-prep*. Selanjutnya dilakukan analisis restriksi dan dilihat dengan elektroforesis gel agarosa untuk mengecek kebenaran plasmid yang digunakan. Plasmid pTP510 digunakan sebagai templet dalam PCR.

Amplifikasi dilakukan dengan kondisi : pre-denaturasi 95°C selama 5 menit; siklus sebanyak 30 kali terdiri dari denaturasi (95°C selama 1 menit), *annealing* (54°C selama 30 detik), dan polimerisasi (72°C selama 2 menit); selanjutnya diakhiri dengan polimerisasi 72°C selama 7 menit. Amplikon yang dihasilkan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa.

#### B. Kloning produk PCR ke dalam plasmid ekspresi pYES2 di sel inang *E. coli*

Amplikon gen *Abfa* dengan ujung 5' *Sac* I dan ujung 3' *Xho* I dan vektor pYES2 dipotong dengan enzim restriksi *Sac* I dan *Xho* I. Hasil pemotongan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Selanjutnya fragmen gen dan vektor tersebut dimurnikan dari gel dengan *gel clean Kit* dan diligasi dengan enzim ligase. Hasil ligasi ditransformasi ke sel inang *E. coli* TOP10. Transforman yang tumbuh di media LB ampisilin (LBA) diisolasi plasmidnya dengan cara *mini-prep*.

Selanjutnya plasmid hasil isolasi dianalisis restriksi dan analisis struktur gen Abfa secara parsial. Untuk uji ekspresi enzim ekstraseluler, transforman ditumbuhkan pada media LBA yang ditambahkan 4-methylumbelliferyl  $\alpha$ -L-arabinofuranosida 2 mM.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Efek In Vitro Xilo-oligosakarida asal tongkol jagung terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus casei* (Penelitian mahasiswa S1 atas nama Shindy Purnamasari)

##### A. Hidrolisis Hemiselulosa secara Enzimatis

Setelah aktivitas enzim xilanase diketahui, maka dapat dilakukan hidrolisis terhadap hemiselulosa. Hidrolisis hemiselulosa secara enzimatis mempunyai sifat yang spesifik. Hidrolisis hemiselulosa dilakukan pada suhu 70°C selama 24 jam. Hemiselulosa yang dihidrolisis adalah hemiselulosa A dan hemiselulosa B. Hasil hidrolisis hemiselulosa kemudian dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan HPLC.

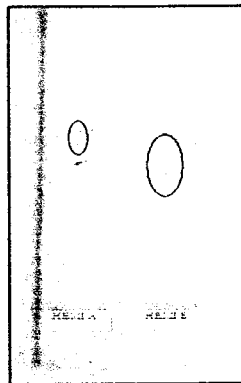
Kelompok enzim xilanolitik dapat menghidrolisis hemiselulosa karena xilan merupakan penyusun hemiselulosa. Enzim xilanolitik ini menghidrolisis ikatan glikosida pada  $\beta$ -1,4-D-xilopiranosida,  $\alpha$ -1,3-L-arabinofuranosida sehingga menghasilkan monomer-monomer xilosa dan arabinosa. Xilo-oligosakarida dihasilkan karena adanya aktivitas enzim endo-xilanase yang memutus ikatan glikosida pada hemiselulosa secara acak (*Puspaningsih, 2004*).

##### B. Analisis Hasil Hidrolisis Hemiselulosa

###### Analisis KLT

Xilo-oligosakarida dan monomer-monomer gula hasil hidrolisis hemiselulosa A dan B dari tongkol jagung secara enzimatis dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Eluen yang digunakan adalah butanol : asam asetat : air (2:1:1), karena dapat memberikan pemisahan yang terbaik (*Tjahjandarie, 2006*). Oligosakarida bukan merupakan senyawa UV aktif karena tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga dalam analisisnya diperlukan penampak noda. Penampak noda yang digunakan adalah asam sulfat dalam metanol dengan perbandingan asam sulfat : metanol :air (1:9:10). Selanjutnya pelat KLT dipanaskan dan diperoleh spot berwarna gelap (ungu sampai kecoklatan) yang berarti positif terdapat xilo-oligosakarida dan monomer-monomer

gula. Dalam analisis KLT, senyawa xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa A dan B dibandingkan dengan xilo-oligosakarida standar. Dari hasil analisis KLT, diperoleh bahwa xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa B memiliki derajat polimerisasi (DP) lebih tinggi dibandingkan dengan xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa A. Hal ini didasarkan pada hasil spot KLT dimana xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa A mempunyai harga Rf yang lebih tinggi dibandingkan dengan hemiselulosa B. Semakin tinggi harga Rf spot xilo-oligosakarida maka semakin rendah derajat polimerisasi (DP) xilo-oligosakarida, sedangkan pada pelat KLT tampak spot yang mempunyai Rf tertinggi merupakan spot untuk monomer-monomer gula. Hasil analisis KLT untuk senyawa xilo-oligosakarida dari hemiselulosa A dan B dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil analisis KLT senyawa xilooligosakarida dari Hemi A dan B

### C. Uji Xilo-oligosakarida sebagai Prebiotik pada *Lactobacillus casei*

Hasil hidrolisis hemiselulosa A dan B secara enzimatik yang berupa xilo-oligosakarida kemudian diujikan pada *Lactobacillus casei* yang merupakan probiotik. Pada tahapan ini, media tumbuh *Lactobacillus casei* ditambahkan dengan xilo-oligosakarida dari hemi A, xilo-oligosakarida dari hemi B dan xilo-oligosakarida standar. Pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada masing-masing media tumbuh diamati dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh setelah proses inkubasi dalam beberapa variasi waktu yakni 6, 12, 18 dan 24 jam (Zaenudin, 2004). Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan jumlah koloni pada media kontrol yakni media tanpa penambahan xilo-oligosakarida. Jumlah sel *Lactobacillus casei* dinyatakan dalam *colony forming unit* (CFU/ml).

Jumlah koloni bakteri yang dihitung adalah koloni bakteri dalam plate dengan jumlah koloni 30-300. Data jumlah sel *Lactobacillus casei* dalam beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh dapat dilihat pada tabel 1 berikut :

**Tabel 1. Jumlah sel *Lactobacillus casei* (CFU/ml) dalam beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh**

Waktu Inkubasi	kontrol		XOS		XA		XB	
	CFU/ml	log (CFU/ml)	CFU/ml	log CFU/ml	CFU/ml	log CFU/ml	CFU/ml	log CFU/ml
6 jam	2,49. $10^7$	7,397	$3,96 \cdot 10^7$	7,597	$3,99 \cdot 10^7$	7,601	$4,37 \cdot 10^7$	7,637
12 jam	3,19. $10^8$	8,503	$2,46 \cdot 10^7$	9,391	$2,55 \cdot 10^9$	9,407	$2,75 \cdot 10^9$	9,439
18 jam	2,81. $10^9$	9,449	$4,40 \cdot 10^7$	9,643	$4,43 \cdot 10^9$	9,646	$4,67 \cdot 10^9$	9,669
24 jam	2,10. $10^9$	9,332	$2,94 \cdot 10^{12}$	12,468	$3,05 \cdot 10^{12}$	12,484	$3,20 \cdot 10^{12}$	12,505

Keterangan:

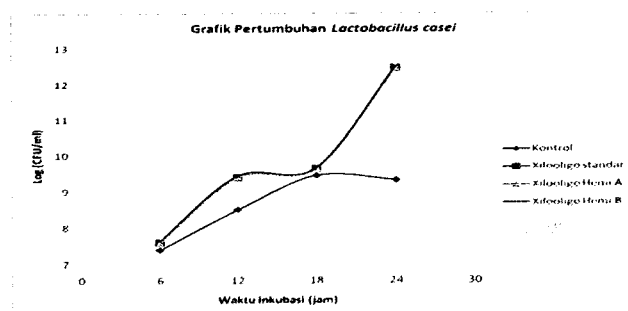
kontrol : Media tumbuh *L casei* tanpa penambahan xilo-oligosakarida

XOS : Media tumbuh *L casei* + xilo-oligosakarida standar

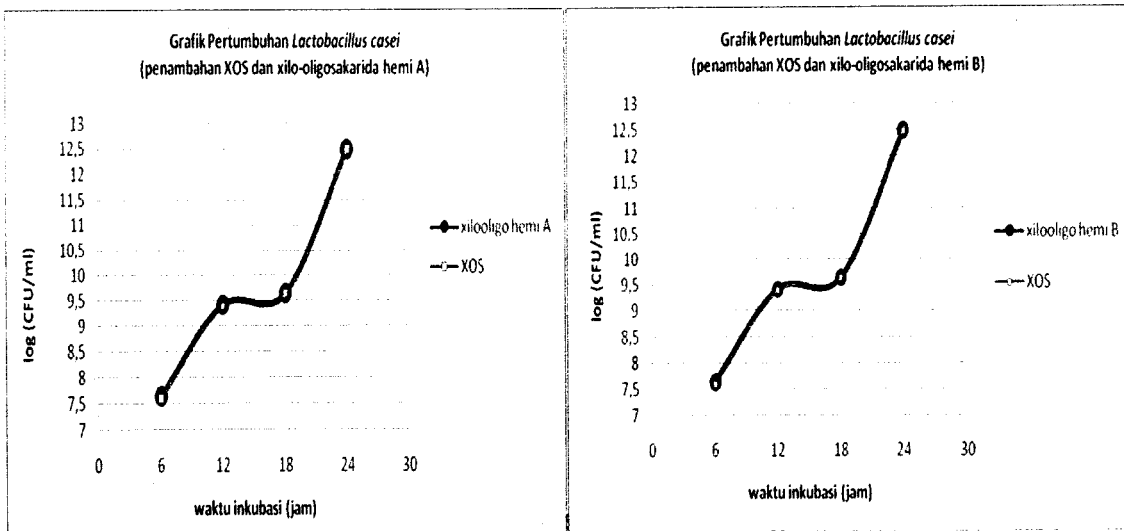
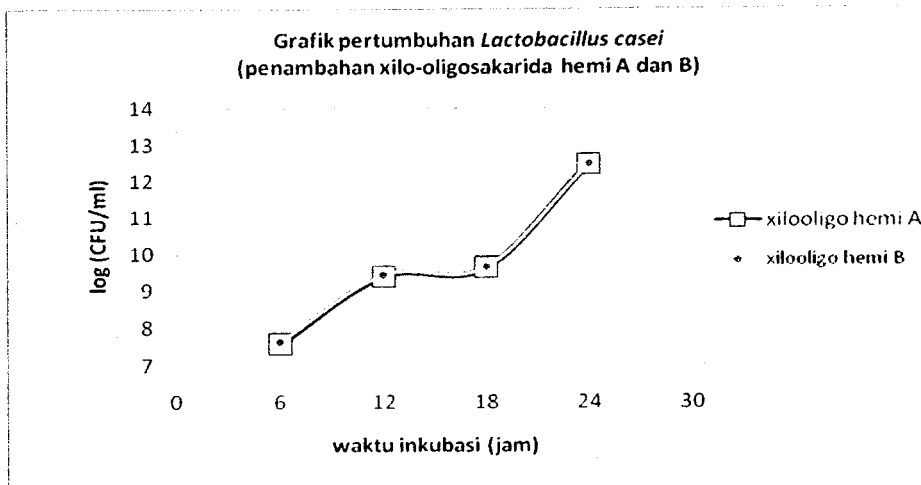
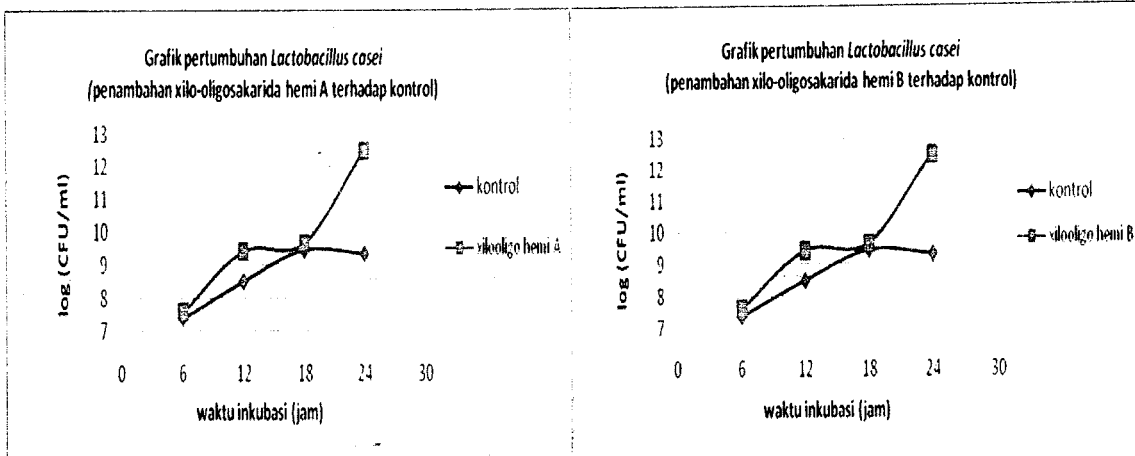
XA : Media tumbuh *L casei* + xilo-oligosakarida dari hemi A

XB : Media tumbuh *L casei* + xilo-oligosakarida dari hemi B

Grafik pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh adalah sebagai berikut:



**Gambar 4. Grafik pertumbuhan *Lactobacillus casei***



xilo-oligosakarida dari hemi B lebih meningkat dibandingkan dengan kontrol.

Pada media kontrol, sumber karbon yang digunakan untuk proses fermentasi *Lactobacillus casei* hanya berasal dari glukosa yang terkandung dalam media pertumbuhan (MRSB) sehingga setelah inkubasi selama 18 jam bakteri mulai masuk dalam fase stasioner dan mati.

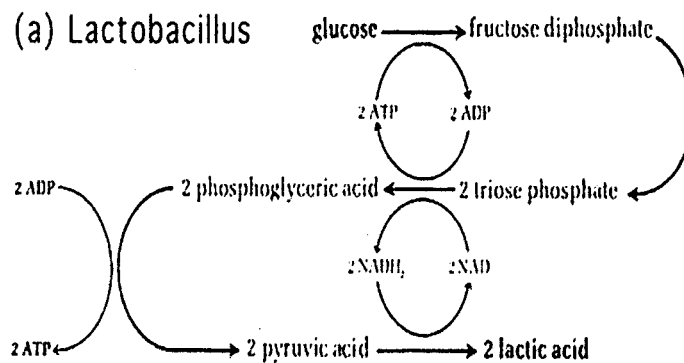
Pada media uji, yakni media tumbuh yang ditambahkan xilo-oligosakarida baik standar, dari hemi A dan hemi B, pertumbuhan *Lactobacillus casei* cenderung meningkat setelah inkubasi 24 jam. Hal ini berbeda dengan pertumbuhannya pada media kontrol. Pada media uji, sumber karbon yang tersedia adalah glukosa yang berasal dari media MRSB dan xilo-oligosakarida yang ditambahkan pada media. Pada saat inkubasi selama 12 jam, *Lactobacillus casei* menggunakan glukosa terlebih dahulu dalam metabolismenya dibanding xilo-oligosakarida. Hal ini terjadi karena ukuran glukosa lebih kecil dibanding xilo-oligosakarida sehingga dapat langsung dimanfaatkan untuk metabolisme. Sementara pada saat inkubasi selama 18 jam, pertumbuhan *Lactobacillus casei* terlihat tetap tidak meningkat maupun menurun. Hal ini terjadi karena kuantitas glukosa dalam sel menurun sehingga kuantitas dari cAMP meningkat dan dapat berasosiasi dengan CAP membentuk cAMP-CAP. cAMP-CAP ini berperan sebagai aktivator enzim transkriptase. cAMP-CAP akan berikatan dengan RNAPolimerase kemudian berikatan dengan promotor sehingga xilanase dapat terekspresi. Selain itu adanya xilo-oligosakarida dalam media tumbuh berfungsi sebagai inducer yang dapat mengikat represor sehingga ekspresi gen dapat berjalan (terjadi sintesis xilanase). Dari sini akan terjadi induksi oleh xilo-oligosakarida, dimana xilo-oligosakarida yang masuk ke dalam sel akan didegradasi oleh enzim  $\beta$ -xilosidase menjadi xilosa. Xilosa yang dihasilkan ini akan digunakan sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme *Lactobacillus casei*. Hal ini dapat dilihat pada grafik pertumbuhan, dimana pada saat inkubasi 24 jam pertumbuhan *Lactobacillus casei* mengalami peningkatan, berbeda dengan pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada media kontrol.

*Lactobacillus casei* merupakan kelompok spesies bakteri asam laktat heterofermentatif fakultatif ("kelompok II") yang dapat memproduksi asam laktat dari gula heksosa melalui *Embden-Meyerhof pathway* dan gula pentosa melalui *phosphoketolase pathway*. Glukosa (gula heksosa) yang berasal dari media tumbuh MRSB akan dimetabolisme menjadi asam laktat melalui *Embden-Meyerhof pathway* sedangkan xilosa hasil degradasi xilo-oligosakarida oleh enzim

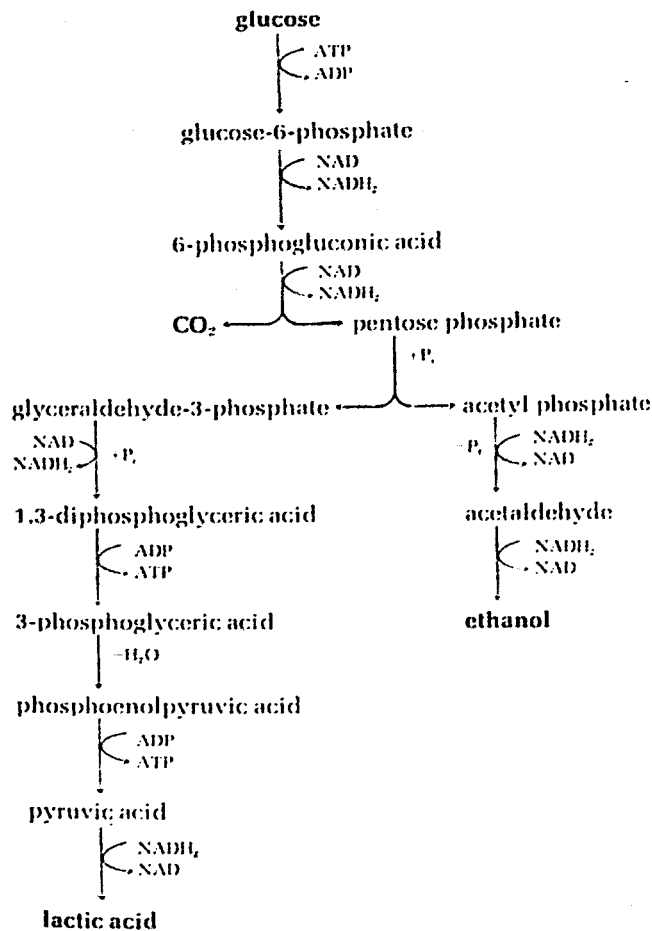


$\beta$ -xilosidase akan dimetabolisme melalui *phosphoketolase pathway*. Namun sebelum memasuki jalur ini xilosa yang merupakan gula pentosa terlebih dahulu dikonversi menjadi heksosa melalui jalur pentosa fosfat. Bakteri patogen tidak mampu mendegradasi xilo-oligosakarida karena molekulnya terlalu besar. Dinding sel bakteri patogen berbeda dengan probiotik, bakteri patogen memiliki LPS (lipopolisakarida) atau endotoksin pada dinding selnya sehingga dapat menghalangi molekul besar untuk masuk ke dalamnya (Todar, 2006). Dengan demikian, penambahan xilo-oligosakarida dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Mekanisme metabolisme heksosa dan pentosa menjadi asam laktat melalui *Embden-Meyerhof pathway* dan *phosphoketolase pathway* adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Embden-Meyerhof pathway pada pembentukan asam laktat (Todar, 2006)



Gambar 6. Phosphoketolase pathway pada pembentukan asam laktat  
(Todar,2006)

*Lactobacillus casei* yang merupakan bakteri asam laktat jenis heterofermentatif mampu menghasilkan asam laktat sebagai produk mayor dan SCFA (Short-chain Fatty Acid) seperti asam asetat, asam propionat dan asam butirat. Keberadaan SCFA dalam larutan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* diidentifikasi dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Hasil analisis SCFA dengan GC adalah sebagai berikut :

**Tabel 2. Hasil analisis larutan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* pada beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh**

Sampel	Waktu inkubasi	S C F A (Mmol)		
		Asam asetat	Asam propionat	Asam butirat
Kontrol	12 jam	11,0993	0,0217	0,0231
	18 jam	11,9955	-	0,0209
	24 jam	10,0497	0,0115	0,0234
XOS	12 jam	10,1767	0,1916	2,4179
	18 jam	15,4743	0,2939	0,0200
	24 jam	18,506	0,2541	-
XA	12 jam	9,3229	0,4039	1,0769
	18 jam	13,5451	-	0,0316
	24 jam	14,2178	-	-

Keterangan:

kontrol :Media tumbuh *L casei* tanpa penambahan xilo-oligosakarida

XOS :Media tumbuh *L casei* + xilo-oligosakarida standar

XA :Media tumbuh *L casei* + xilo-oligosakarida dari hemi A

Keberadaan SCFA dalam larutan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* juga dibuktikan dengan adanya penurunan pH sebagai berikut :

**Tabel 3. Rata-rata pH larutan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* pada beberapa variasi waktu inkubasi dan media tumbuh**

Waktu inkubasi	pH		
	Kontrol	XOS	XA
6 jam	6	6	6
12 jam	5	4,8	4,8
18 jam	4,5	4	4
24 jam	4	3,8	3,8

Dari data rata-rata pH, dapat dibuktikan bahwa keberadaan SCFA dalam larutan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* menurunkan pH secara ekstrim dari pH awal inkubasi yakni 7. Penurunan pH yang sangat ekstrim ini dapat mengakibatkan bakteri patogen mati karena pada umumnya bakteri patogen hidup pada pH netral.

Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa xilo-oligosakarida dapat meningkatkan pertumbuhan probiotik, menghambat pertumbuhan bakteri patogen sekaligus mematikan bakteri patogen.

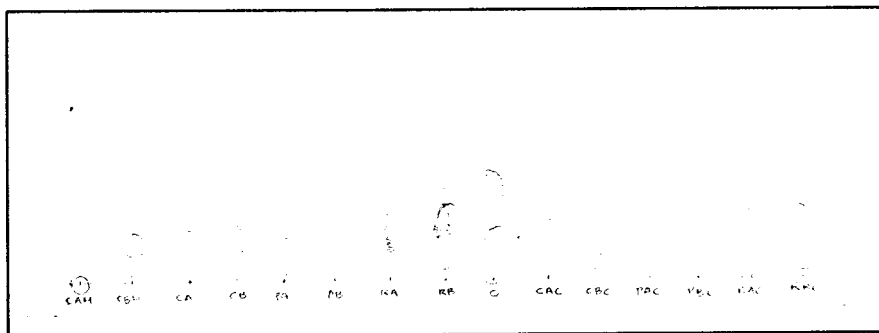
#### **D. Pemurnian Xilo-oligosakarida dengan *Candida guilliermondii***

*Candida guilliermondii* merupakan organisme anaerob fakultatif yang mampu melakukan metabolisme sel, baik dalam suasana anaerob maupun aerob. Proses peragian (fermentasi) pada *Candida guilliermondii* berlangsung secara aerob maupun anaerob. Karbohidrat sederhana yang tersedia dalam larutan dapat dimanfaatkan untuk melakukan metabolisme sel dengan cara mengubah karbohidrat menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dalam suasana aerob. Tahap awal pada pemurnian xilo-oligosakarida ini adalah peremajaan biakan *Candida guilliermondii* dengan menumbuhkan *Candida guilliermondii* pada media padat Sabaroud Dextrose Agar (SDA). Kemudian satu koloni *Candida guilliermondii* ditumbuhkan dalam media cair yang ditambahkan 1 ml xilo-oligosakarida selama 3 hari pada suhu 30 °C. Selanjutnya, media cair tersebut disentrifugasi dan dihasilkan pelet yang merupakan sel dari *Candida guilliermondii* dan supernatan yang mengandung xilo-oligosakarida yang terpisah dari monomer-monomer gula. *Candida guilliermondii* mampu memetabolisme monomer-monomer gula xilobiose dan xilotriose menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O, sedangkan untuk xilo-oligosakarida dengan derajat polimerisasi lebih besar dari 3 tidak dapat dimetabolisme oleh *Candida guilliermondii* (Yoshida, 1990). Hasil pemurnian xilo-oligosakarida menggunakan *Candida guilliermondii* kemudian diidentifikasi menggunakan KLT dan HPLC.

### E. Analisis hasil pemurnian menggunakan KLT

Pada analisis hasil pemurnian xilo-oligosakarida dengan *Candida guilliermondii* menggunakan KLT, diperoleh spot dengan harga Rf rendah yang merupakan spot dari xilo-oligosakarida dan spot monomer-monomer gula yang berada di sekitar batas atas pelat KLT. Setelah proses pemurnian dengan *Candida guilliermondii*, spot monomer-monomer gula tidak tampak lagi pada plat KLT. Pada xilo-oligosakarida hasil hidrolisis tongkol jagung hanya tampak 1 spot xilo-oligosakarida pada plat KLT dan spot ini juga terlihat pada hasil pemurnian xilo-oligosakarida dengan *Candida guilliermondii*. Spot xilo-oligosakarida ini jika dibandingkan dengan spot xilo-oligosakarida standar, merupakan xilotetraosa yang tidak mampu dimetabolisme oleh *Candida guilliermondii*. Spot xilobiose dan xilotriose pada xilo-oligosakarida hasil hidrolisis tongkol jagung tidak terlalu tampak jelas pada plat, sehingga tidak dapat dibedakan antara spot xilobiose dan xilotriose sebelum dan sesudah pemurnian. Hal ini disebabkan xilo-oligosakarida hasil hidrolisis tongkol jagung kuantitasnya sedikit dan derajat polimerisainya rendah dibawah 4 sehingga dapat termetabolisme oleh *Candida guilliermondii*. Analisis KLT ini belum dapat membuktikan kemampuan *Candida guilliermondii* dalam hal metabolisme xilobiose dan xilotriose. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis KLT terhadap pemurnian xilo-oligosakarida dengan *Candida guilliermondii* pada xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A dan B dari sumber limbah pertanian lain yang kaya akan hemiselulosa dengan kandungan xilo-oligosakarida yang lebih tinggi dari tongkol jagung.

Berikut adalah gambar hasil analisis KLT terhadap xilo-oligosakarida sebelum dan sesudah dimurnikan dengan *Candida guilliermondii*.



Gambar 7. Hasil analisis KLT terhadap xilo-oligosakarida sebelum dan sesudah dimurnikan dengan *Candida guilliermondii*

## Keterangan :

- CAH : Hemi A dari tongkol jagung tanpa hidrolisis enzimatis  
 CBH : Hemi B dari tongkol jagung tanpa hidrolisis enzimatis  
 CA : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A tongkol jagung (24 jam)  
 CB : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B tongkol jagung (24 jam)  
 PA : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A batang kelapa sawit (24 jam)  
 PB : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B batang kelapa sawit (24 jam)  
 RA : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A jerami padi (24 jam)  
 RB : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B jerami padi (24 jam)  
 O : xilo-oligosakarida standar  
 CAC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A tongkol jagung (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*  
 CBC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B tongkol jagung (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*  
 PAC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A batang kelapa sawit (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*  
 PBC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B batang kelapa sawit (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*  
 RAC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A jerami padi (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*  
 RBC : xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi B jerami padi (24 jam) setelah pemurnian dengan *candida guilliermondii*.

Sumber hemiselulosa lain yang digunakan pada penelitian ini adalah jerami padi dan batang kelapa sawit. Proses hidrolisis Hemiselulosa dari jerami padi dan batang kelapa sawit dilakukan secara enzimatis sesuai dengan prosedur hidrolisis dari limbah tongkol jagung seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Masing-masing xilo-oligosakarida dari hasil hidrolisis Hemi A dan B limbah jerami padi dan batang kelapa sawit dimurnikan dengan *Candida guilliermondii*. Hasil pemurnian pada xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A dan B tersebut kemudian dianalisis dengan KLT dan dibandingkan dengan xilo-oligosakarida sebelum dimurnikan. Berdasarkan spot pada pelat KLT, xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemi A dan B

dari jerami padi menghasilkan xilo-oligosakarida dengan 4 spot variasi derajat polimerisasi (DP). Setelah dibandingkan dengan xilo-oligosakarida standar yang mempunyai variasi derajat polimerisasi 2 hingga 5, 2 dari 4 spot tersebut merupakan xilobiose dan xilotriose. Analisis KLT pada xilo-oligosakarida jerami padi yang sudah dimurnikan dengan *Candida guilliermondii* menghasilkan 2 spot dengan harga Rf yang rendah, sedangkan xilo-oligosakarida dengan harga Rf yang tinggi (xilobiose dan xilotriose) dan monomer-monomer gula tidak tampak lagi pada pelat KLT.

Hasil analisis KLT terhadap produk xilo-oligosakarida hasil hidrolisis jerami padi ini dapat membuktikan bahwa *Candida guilliermondii* dapat memetabolisme xilobiose dan xilotriose. Sebagai pembanding dilakukan analisis KLT terhadap hemiselulosa A dan B tongkol jagung yang hanya diautoklaf tanpa dihidrolisis dengan enzim xilanase (autohidrolisis). Pada analisis tersebut didapat spot yang masih tertahan di batas bawah pelat KLT dan tidak dapat terelusi karena hemiselulosa A dan B tanpa dihidrolisis secara enzimatik merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul tinggi.

Dengan demikian, hal ini membuktikan adanya kerja enzim *endo- $\beta$ -xilanase* yang dapat menghidrolisis polisakarida menjadi xilo-oligosakarida.

#### **F. Analisis hasil pemurnian menggunakan HPLC**

Hasil hidrolisis hemiselulosa A dan B dari tongkol jagung selanjutnya dianalisis menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) untuk mengetahui kandungannya secara kuantitatif. Analisis HPLC ini menggunakan kolom polimer-NH<sub>2</sub> (mikrobondapak, Waters 2487). Kolom merupakan *stationary phase* (fase diam) yang berisi separating material. Separating material ini akan memberi penahanan pada sampel. Kolom polimer-NH<sub>2</sub> ini bersifat base phase (nonpolar), sementara karbohidrat bersifat polar sehingga pemisahan yang terjadi berlangsung sempurna. Detektor yang digunakan adalah *refractive index* dan ELSD (*Evaporative Light Scattering Detector*). *Mobile phase* (fase gerak) yang digunakan adalah acetonitril : metanol : air dengan perbandingan (60% : 20% : 20%), kecepatan alir 1  $\mu$ l/menit, konsentrasi senyawa standar 1000 ppm, volume injeksi 20  $\mu$ l, dan suhu kolom menggunakan suhu ruang.

Analisis HPLC pada penelitian ini dilakukan secara isokratik, dimana dari awal hingga akhir pemisahan menggunakan fase gerak yang sama. Pada umumnya, analisis karbohidrat khususnya xilo-oligosakarida menggunakan metode gradien karena waktu retensinya cukup lama sehingga harus digunakan penggantian pelarut (fase gerak) pada waktu tertentu.

Data hasil analisis HPLC dari hidrolisis enzimatis pada hemiselulosa A dan B tongkol jagung dan setelah pemurniannya dengan *Candida guilliermondii* adalah sebagai berikut :

**Tabel 4. Data analisis HPLC untuk hasil hidrolisis hemiselulosa A dan B tongkol jagung dan setelah pemurniannya dengan *Candida guilliermondii***

Sampel	Glukosa (%)	Xilosa (%)	Arabinosa (%)	Xilo-oligosakarida (%)
CA	5,0	0	0	4,6
CB	6,0	0	0,1	4,9
CAC	0,9	0,1	0	1,0
CAB	0,6	0,2	0	1,0

Keterangan:

CA : Hasil hidrolisis enzimatis pada hemiselulosa A tongkol jagung

CB : Hasil hidrolisis enzimatis pada hemiselulosa B tongkol jagung

CAC : Hasil hidrolisis enzimatis pada hemiselulosa A tongkol jagung  
+ *Candida guilliermondii*

CBC : Hasil hidrolisis enzimatis pada hemiselulosa B tongkol jagung  
+ *Candida guilliermondii*

Dari tabel di atas, diketahui bahwa hemiselulosa B pada tongkol jagung memiliki kandungan xilo-oligosakarida yang lebih besar dibandingkan dengan hemiselulosa A yaitu sebesar 4,9 %. Hasil pemurnian xilo-oligosakarida dari hemiselulosa A dan B tongkol jagung dengan *Candida guilliermondii* terlihat mengalami penurunan masing-masing menjadi 1 %. Hal ini disebabkan xilo-



oligosakarida pada hemiselulosa A dan B dari tongkol jagung merupakan xilobiose dan xilotriose yaitu xilo-oligosakarida dengan derajat polimerisasi 2 dan 3 yang dapat dimetabolisme oleh *Candida guilliermondii*. Sedangkan 1 % xilo-oligosakarida yang tersisa merupakan xilo-oligosakarida dengan derajat polimerisasi lebih dari 3. Dari sini dapat disimpulkan bahwa xilo-oligosakarida dapat dimurnikan dengan *Candida guilliermondii* dan monomer-monomer gula yang lain seperti, glukosa dan arabinosa pada xilo-oligosakarida hasil pemurnian dengan *Candida guilliermondii* mengalami penurunan karena telah dimetabolisme oleh *Candida guilliermondii* untuk proses asimilasi. Dari sini dapat disimpulkan bahwa xilo-oligosakarida dapat dimurnikan dengan *Candida guilliermondii* dan monomer-monomer gula yang lain seperti, glukosa dan arabinosa pada xilo-oligosakarida hasil pemurnian dengan *Candida guilliermondii* mengalami penurunan karena telah dimetabolisme oleh *Candida guilliermondii* untuk proses asimilasi.

#### **4..2. Mekanisme sinergis enzim xilanolitik rekombinan dalam hidrolisis xilan (Penelitian mahasiswa S2 atas nama One Asmarani).**

Enzim xilanolitik rekombinan dapat diproduksi oleh pET Xyl, pET Abfa dan pET Exo-xyl. Enzim xilanolitik rekombinan yang dihasilkan yaitu enzim  $\beta$ -xilosidase (xyl), enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (abfa) dan enzim exo-xilanase (exo-xyl). Enzim xyl dan abfa secara sinergis menghidrolisis xilan (*oat-spelt xylan*) menjadi xilosa sebagai produk utamanya di samping arabinosa dan xilobiosa (Puspaningsih, 2004). Hasil analisis struktur gen penyandi enzim xilanolitik pada pTP510 sebelumnya telah berhasil ditemukan enzim exo-xilanase yang berlokasi di bagian hulu dari gen xyl (Puspaningsih, 2004). Enzim xilanolitik rekombinan yang berhasil diproduksi dan dimurnikan, selanjutnya akan diuji aktivitasnya kemudian dibuktikan dan dianalisis adanya mekanisme sinergis dari ketiga enzim xilanolitik rekombinan tersebut dalam menghidrolisis xilan.

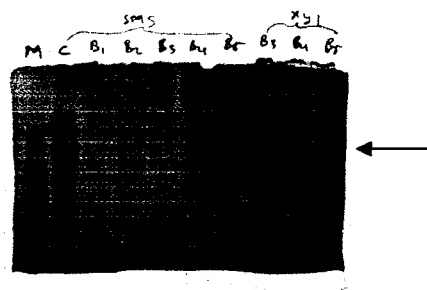
##### **A. Isolasi Enzim Xilanolitik Rekombinan**

Enzim xilanolitik rekombinan (xyl, abfa dan exo-xyl) merupakan enzim intraseluler sehingga perlu dilakukan sonikasi untuk melisis dinding sel bakteri,

karena pada penelitian sebelumnya (Kumalawati, 2005) aktivitas xilanolitik tertinggi teramati pada enzim intraseluler.

## B. Pemurnian Enzim Xilanolitik Rekombinan

Ketiga enzim xilanolitik rekombinan (xyl, abfa dan exo-xyl) dimurnikan secara kromatografi afinitas dengan resin Ni-NTA (Ni-NTA His•Bind Resin). Resin ini digunakan untuk pemurnian satu tahap secara cepat pada protein yang mengandung sequen His•Tag dengan cara kromatografi pengkhelat logam. Dicampurnya resin Ni-NTA dengan enzim bertujuan mereaksikan sequen His•Tag yang akan terikat dengan kation  $Ni^{2+}$  kemudian terjebak dalam resin Ni-NTA tersebut. Setelah protein yang tak terikat dilepaskan, target protein akan terikat kembali dengan dielusikannya imidazol, ini terjadi saat pencucian dengan bufer A dan B. Pemurnian dengan resin ini didasarkan bahwa akan terjadi afinitas antara 6–10 Histidin dengan penjebakan ion logam  $Ni^{2+}$ . Logam akan dikhelat oleh kelompok kovalen reaktif kuat. Dalam resin Ni-NTA, digunakan *nitriloacetic acid* (NTA) sebagai pengkhelat yang memiliki 4 sisi yang dapat berinteraksi dengan ion logam. NTA secara kimia meminimalkan pelepasan ion logam selama proses pemurnian, dan masih bekerja dengan ditambahkan  $\beta$ -mercaptoethanol untuk mereduksi ikatan disulfida (Novagen, 2001). Hasil pencucian dengan bufer B dianalisis dengan SDS-PAGE. Hasil pemurnian enzim abfa, xyl dan exo-xyl belum murni, ini ditunjukkan oleh gambar di bawah ini.

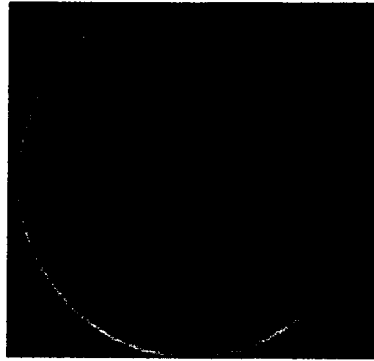


Gambar 8. Hasil pemurnian enzim dengan SDS-PAGE

## C. Uji Aktivitas Enzim Xilanolitik Rekombinan

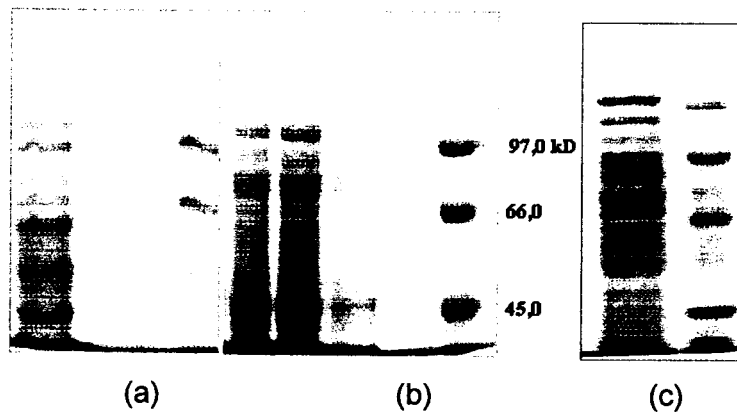






Gambar 9. Foto hasil uji xilosidase dengan MUX menunjukkan dua biakan sel yang berfluoresensi merupakan transforman yang positif menghasilkan  $\beta$ -xilosidase.

### B. Analisis dengan SDS-PAGE



Gambar 10. Analisis dengan SDS-PAGE protein *B. megaterium* MS941 rekombinan. (a) Protein ekstraseluler, (b) Protein intraseluler 5 jam setelah + xilosa (c) Protein intraseluler 18 jam setelah + xilosa

Gambar 8 menunjukkan adanya pita protein dengan berat molekul sekitar 60,0 kD, yang diperkirakan merupakan pita protein dari enzim  $\beta$ -xilosidase yang diekspresikan secara ekstraseluler oleh *B. megaterium* rekombinan. Pita protein dengan berat molekul 60,0 kD tidak terdapat pada protein intraseluler baik protein larut maupun protein tidak larut (Gambar 9).

**C. Perhitungan jumlah sel dalam inokulum**

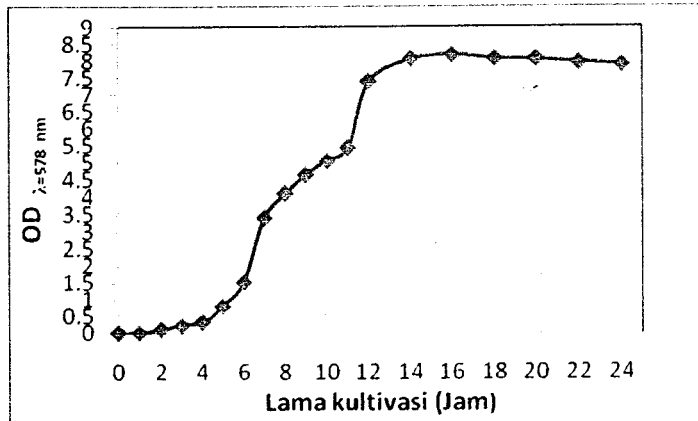
Dalam 100 µl suspensi sel :

-pengenceran  $10^4$ x terdapat 160 koloni, jumlah sel =  $1,6 \times 10^6$  sel bakteri

-pengenceran  $10^5$  x terdapat 17 koloni, jumlah sel =  $1,7 \times 10^6$  sel bakteri

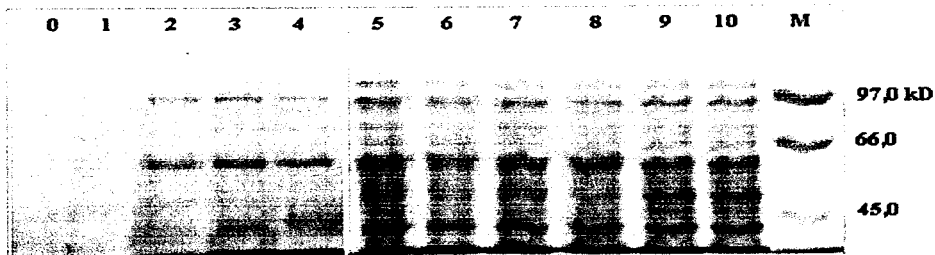
Jadi, jumlah sel dalam inokulum rata-rata =  $1,65 \times 10^7$  sel/ ml.

**f. Kurva pertumbuhan *B. megaterium* MS941 rekombinan**



Gambar 11. Kurva pertumbuhan *B. megaterium* MS941 rekombinan

**g. Pengaruh waktu kultivasi**



Gambar 12. Analisis SDS-PAGE protein dalam medium kultur selama kultivasi *B. megaterium* MS941 rekombinan (0-10 jam setelah penambahan xilosa 5%). M : marker protein

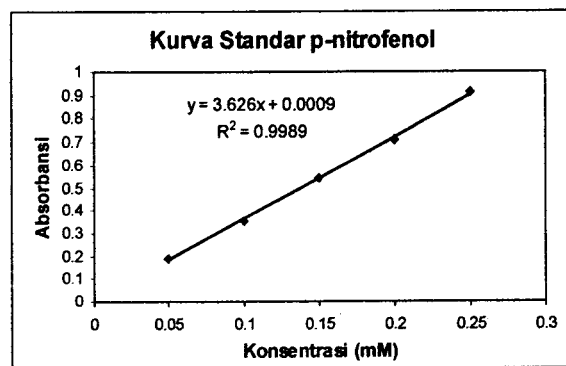
Gambar 11. menunjukkan hasil analisis SDS-PAGE protein ekstraseluler yang diekspresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan pada inkubasi 0-10 jam setelah penambahan xilosa 0,5%. Adanya pita protein sekitar 60,0 kD menunjukkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan mampu mengekspresikan

$\beta$ -xilosidase dan mensekresikannya ke medium kultur sejak 2 jam inkubasi setelah penambahan induser xilosa.

Enzim  $\beta$ -xilosidase yang dihasilkan dan disekresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan ke dalam medium kultur, selanjutnya ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNPX). Gambar 11. memperlihatkan profil aktivitas  $\beta$ -xilosidase dalam medium kultur selama kultivasi 10 jam setelah penambahan xilosa 5%.

**D. Uji aktivitas  $\beta$ -xilosidase terhadap substrat pNP- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNPX)**

**a. Kurva standar p-nitrofenol**

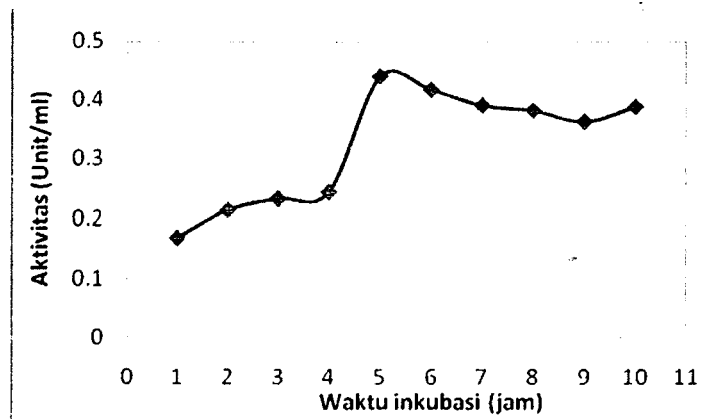


Pengukuran aktivitas  $\beta$ -xilosidase terhadap substrat pNPX dilakukan triplo :

$$\text{Absorbansi rata-rata (Y)} = \frac{A_{405 \text{ nm}} - \text{kontrol}}{3}$$

$$\text{Aktivitas } \beta\text{-xilosidase} = \frac{(Y - 0,0009) \times 10}{3,626} \text{ Unit/ ml.}$$

**b. Aktivitas  $\beta$ -xilosidase selama kultivasi *B. megaterium* MS941 rekombinan**



Gambar 13. Profil aktivitas  $\beta$ -xilosidase selama kultivasi *B. megaterium* MS941 rekombinan

**c. Pengaruh Suhu terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase dalam medium kultur**

Tabel 5. Pengaruh Suhu terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase dalam medium kultur

No.	Suhu °C	Absorbansi $\lambda_{405 \text{ nm}}$ Rata-rata	Aktivitas Unit/ ml	Aktivitas Unit/ml. menit
1.	37	0,039 $\pm$ 0,019	0,1050 $\pm$ 0,049	0,0035 $\pm$ 0,0163
2.	50	0,052 $\pm$ 0,017	0,1409 $\pm$ 0,044	0,0046 $\pm$ 0,0014
3.	60	0,070 $\pm$ 0,016	0,1907 $\pm$ 0,041	0,0063 $\pm$ 0,0014
4.	70	0,045 $\pm$ 0,005	0,0940 $\pm$ 0,011	0,0031 $\pm$ 0,0003

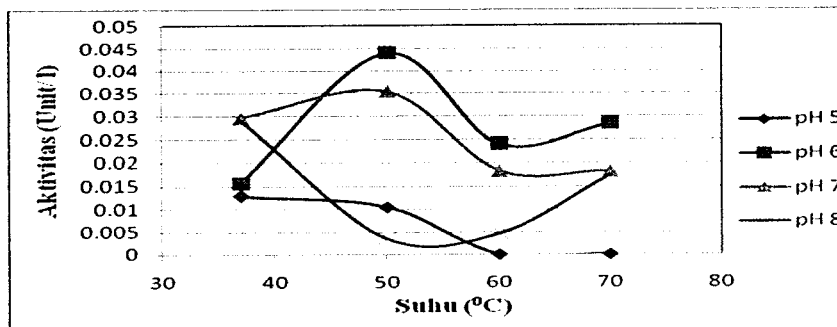


### E. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas $\beta$ -xilosidase

#### a. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas $\beta$ -xilosidase medium kultur

Tabel 6. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase medium kultur (Supernatan).

No.	Suhu °C	pH	Absorbansi $\lambda_{405}$ nm Rata-rata	Aktivitas Unit/ ml
1.	37	5	0,0056 $\pm$ 0,0039	0,0129 $\pm$ 0,0082
		6	0,0066 $\pm$ 0,0051	0,0157 $\pm$ 0,0117
		7	0,0117 $\pm$ 0,0017	0,0297 $\pm$ 0,0023
		8	0,0105 $\pm$ 0,0021	0,0291 $\pm$ 0,0032
2.	50	5	0,0047 $\pm$ 0,0042	0,0105 $\pm$ 0,0091
		6	0,0168 $\pm$ 0,0024	0,0440 $\pm$ 0,0042
		7	0,0137 $\pm$ 0,0051	0,0354 $\pm$ 0,0117
		8	0,0022 $\pm$ 0,0016	0,0036 $\pm$ 0,0019
3.	60	5	0	0
		6	0,0096 $\pm$ 0,0040	0,0240 $\pm$ 0,0086
		7	0,0075 $\pm$ 0,0028	0,0182 $\pm$ 0,0052
		8	0,0026 $\pm$ 0,0022	0,0047 $\pm$ 0,0035
4.	70	5	0	0
		6	0,0112 $\pm$ 0,0007	0,0284 $\pm$ 0,0004
		7	0,0075 $\pm$ 0,0009	0,0182 $\pm$ 0,0025
		8	0,0071 $\pm$ 0,0004	0,0173 $\pm$ 0,0023



Gambar 14. Grafik Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase

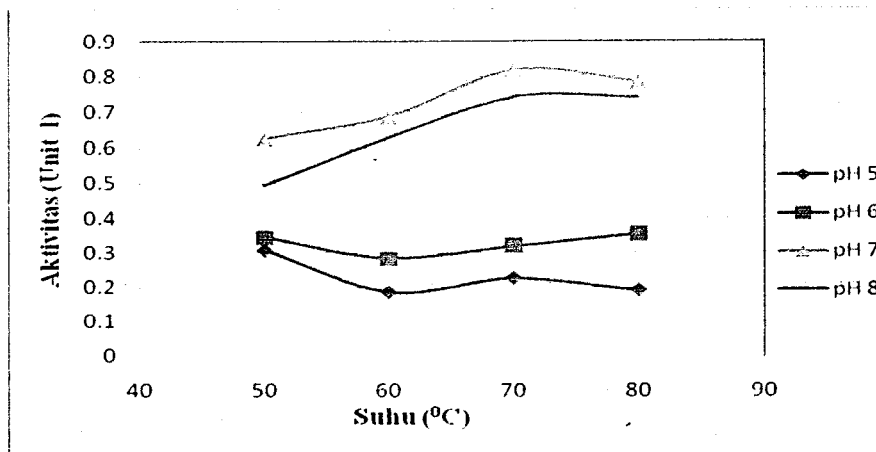
**b. Serbuk enzim (0,5 gram/ ml)**

Liofilisasi :

250 ml medium kultur *B. megaterium* MS942 rekombinan menghasilkan 1,7 gram serbuk enzim.

**Tabel 7. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase medium kultur**

No.	Suhu °C	pH	Absorbansi $\lambda_{405}$ nm Rata-rata	Aktivitas Unit/ ml	Aktivitas Unit/ml. menit
1.	50	5	0,112 $\pm$ 0,0509	0,3064 $\pm$ 0,1378	0,0102 $\pm$ 0,0045
		6	0,126 $\pm$ 0,0291	0,3450 $\pm$ 0,0770	0,0115 $\pm$ 0,0026
		7	0,228 $\pm$ 0,0232	0,6263 $\pm$ 0,0615	0,0208 $\pm$ 0,0205
		8	0,180 $\pm$ 0,0359	0,4939 $\pm$ 0,0965	0,1643 $\pm$ 0,0032
2.	60	5	0,069 $\pm$ 0,0132	0,1878 $\pm$ 0,0012	0,0062 $\pm$ 0,0004
		6	0,104 $\pm$ 0,0336	0,2843 $\pm$ 0,0902	0,0095 $\pm$ 0,003
		7	0,251 $\pm$ 0,0150	0,6874 $\pm$ 0,0389	0,0229 $\pm$ 0,0013
		8	0,229 $\pm$ 0,0157	0,6290 $\pm$ 0,0408	0,0209 $\pm$ 0,0013
3.	70	5	0,083 $\pm$ 0,0132	0,2264 $\pm$ 0,0340	0,0075 $\pm$ 0,0011
		6	0,117 $\pm$ 0,0165	0,3202 $\pm$ 0,0043	0,0107 $\pm$ 0,0014
		7	0,297 $\pm$ 0,0286	0,8174 $\pm$ 0,0764	0,0272 $\pm$ 0,0025
		8	0,271 $\pm$ 0,0210	0,7448 $\pm$ 0,0684	0,0248 $\pm$ 0,0022
4.	80	5	0,070 $\pm$ 0,0043	0,1914 $\pm$ 0,1164	0,0064 $\pm$ 0,0002
		6	0,129 $\pm$ 0,0315	0,3533 $\pm$ 0,0844	0,0117 $\pm$ 0,0028
		7	0,285 $\pm$ 0,0294	0,7835 $\pm$ 0,0786	0,0261 $\pm$ 0,0262
		8	0,269 $\pm$ 0,0192	0,7393 $\pm$ 0,0504	0,0246 $\pm$ 0,0017

Gambar 15. Grafik Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas  $\beta$ -xilosidase

#### F. Pemurnian enzim $\beta$ -xilosidase dengan kolom Ni-NTA

Tabel 8. Penentuan aktivitas  $\beta$ -xilosidase hasil pemurnian

No.	Sampel	Absorbansi $\lambda_{405 \text{ nm}}$	Aktivitas Unit/ ml
1.	Supernatan	0,0106 $\pm$ 0,0063	0,0267 $\pm$ 0,015
2.	Serbuk enzim	0,1170 $\pm$ 0,0088	0,3201 $\pm$ 0,0218
3.	Efluen	0,0337 $\pm$ 0,0103	0,0904 $\pm$ 0,0259
4.	Fraksi A1	0,0050 $\pm$ 0,003	0,0113 $\pm$ 0,0104
5.	Fraksi A2	0	0
6.	Fraksi A3	0	0
7.	Fraksi B1	0	0
8.	Fraksi B2	0,083 $\pm$ 0,01	0,2264 $\pm$ 0,0726
9.	Fraksi B3	0	0

**Tabel 9. Penentuan kadar protein**

No.	Sampel	Absorbansi $\lambda_{750 \text{ nm}}$	Kadar protein $\mu\text{g/ ml}$
1.	Supernatan	0,257 x 10	2907,06
2.	Serbuk enzim	0,331 x 10	3787,84
3.	Efluen	0,331 x 10	3787,84
4.	Fraksi A1	0,331 x10	3787,84
5.	Fraksi A2	0,313 x 10	3555,21
6.	Fraksi A3	0,837	293,98
7.	Fraksi A4	0,375	901,27
8.	Fraksi A5	0,233	202,20
9.	Fraksi B1	0,245	216,08
10.	Fraksi B2	0,259	232, 29
11.	Fraksi B3	0,131	84,14
12.	Fraksi B4	0,123	74,88

**Perhitungan Aktivitas spesifik**

1. Serbuk enzim (500 mg/ ml) :

- Aktivitas 0,3201 Unit/ml
- Kadar protein 3,788 mg/ ml
- Aktivitas spesifik = 0,0845 Unit/ mg protein

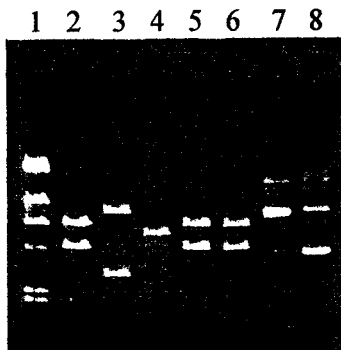
2. Hasil pemurniandengan kolom Ni-NTA (fraksi B2)

- Aktivitas 0,2264 Unit/ ml
- Kadar protein 232,29  $\mu\text{g/ ml}$
- Aktivitas spesifik 0,9746 Unit/ mg protein

#### 4.4. Sub-Kloning gen penyandi $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (pET-abfa/pTP510) ke dalam sistem *S.cerevisiae*

##### A. Disain primer dan amplifikasi PCR gen penyandi $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *Bacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik yang terdapat dalam plasmid pTP510

Plasmid pTP510 dan pYES2 diperbanyak dalam sel inangnya masing-masing, berturut-turut dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dan *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Hasil isolasi plasmid *mini-prep* dan pemotongan dengan enzim restriksi *SacI* dan *XhoI* dilihat menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 16).



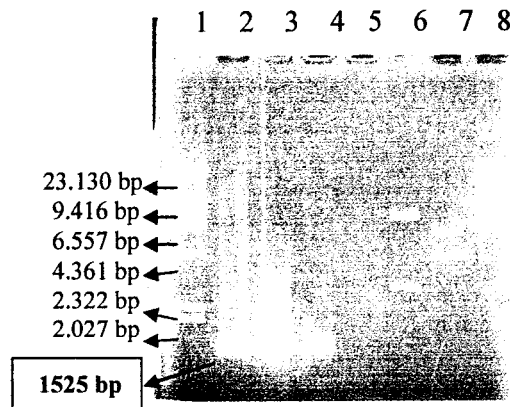
**Gambar 16.** Elektroforegram pTP510 dan pYES2 serta hasil pemotongan dengan *SacI* dan *XhoI*. Keterangan : 1. DNA  $\lambda$ -Hind III, 2. pTP510(1)-*XhoI*, 3. pTP510(1)-*SacI*, 4. pYES2-*XhoI*, 5. pTP510(1)-*XhoI*, 6. pTP510(2)-*XhoI*, 7. pTP510, 8. pYES2.

Dari elektroforegram di atas (Gambar 16) menunjukkan bahwa analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *SacI* terhadap pTP510 menghasilkan dua fragmen DNA berukuran sekitar 8.300 pb dan 3.100 pb, sedangkan pemotongan dengan enzim *XhoI* menghasilkan dua fragmen DNA juga berukuran sekitar 6.500 pb dan 4.500 pb. Hasil ini sesuai dengan ukuran plasmid pTP510, yaitu sekitar 11.400 pb. Plasmid pYES2 yang dipotong dengan *XhoI* memberikan satu pita yang terlihat dalam elektroforegram di atas dengan ukuran sekitar 5.900 pb; yang sesuai dengan ukuran plasmid ini.

Amplifikasi gen dengan cara PCR membutuhkan sepasang primer yang sesuai. Sepasang primer (primer *forward* dan *reverse*) didisain berdasarkan urutan nukleotida gen yang akan diamplifikasi dan urutan sisi pengenal enzim restriksi yang terdapat pada *multiple cloning site* (MCS) dari vektor ekspresi yang digunakan. Urutan sisi pengenal enzim restriksi yang sesuai dengan MCS pada vektor pYES2 dan tidak ada dalam gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *Bacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik yang terdapat dalam plasmid pTP510 adalah enzim *SacI* dan *XhoI*. Maka selanjutnya primer *forward* didisain mengandung urutan sisi pengenal *SacI* pada ujung 5' primer, dan pada ujung 3' primer *forward* didisain sesuai dengan urutan nukleotida ujung 5' gen yang diamplifikasi (mulai dari kodon start ATG). Primer *reverse* didisain mengandung urutan sisi pengenal *XhoI* pada ujung 5' primer, dan pada ujung 3' primer didisain sesuai dengan urutan nukleotida ujung 3' gen yang diamplifikasi (mulai dari kodon stop TAA).

Program *Clone Manager* digunakan untuk membantu perancangan sepasang primer berdasarkan ketentuan yang telah dijelaskan di atas. Hasil analisis campuran sepasang primer yang dirancang dengan templet pTP510 menghasilkan sepasang primer *forward* untuk gen *Abfa* (primer F-*Abfa*) dan primer *reverse* (primer R-*Abfa*) pilihan yang sesuai dengan ketentuan primer yang baik. Primer F-*Abfa* mempunyai urutan nukleotida 5'-GCGAGCTCATGGCTACAAAAAAGCAACC-3', yang dicetak tebal GAGCTC merupakan sisi pengenal *SacI*. Sedangkan primer R-*Abfa* memiliki urutan nukleotida 5'-GCCTCGAGTTATCGTTTTCTAAACGAATCAC-3', yang dicetak tebal merupakan sisi pengenal *XhoI*.

Kondisi PCR yang dilakukan sesuai dengan ketentuan seperti yang dijelaskan pada bagaian metode di atas. Amplikon yang dihasilkan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 17). Hasil yang diperoleh mengindikasikan telah diperoleh amplikon gen *Abfa* berukuran 1525 bp dengan ujung 5' *Sac I* dan 3' *Xho I*.



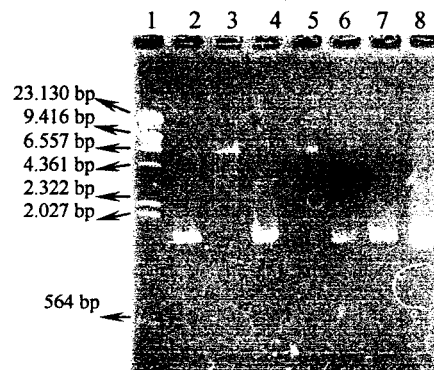
**Gambar 17.** Elektroforegram gel agarosa hasil amplifikasi PCR pTP510 dengan primer F-Abfa dan primer R-Abfa untuk memperoleh amplicon gen Abfa berukuran 1525 bp dengan ujung 5' Sac I dan 3' Xho I. Keterangan : 1.Marker DNA  $\lambda$  HindIII; 2. Amplicon A 1 $\mu$ l; 3. Amplicon A 2 $\mu$ l; 4. Amplicon B 1 $\mu$ l; 5. Kontrol negatif 2 $\mu$ l; 6. pTP510 dipotong Sac I 8 $\mu$ l; 7. pTP510 dipotong Xho I 5 $\mu$ l; 8. pTP510 2 $\mu$ l

### B. Kloning produk PCR ke dalam plasmid ekspresi pYES2 di sel inang *E. coli*

Amplicon gen abfa dengan ujung 5' *SacI* dan ujung 3' *XhoI* dan vektor pYES2 masing-masing dipotong dengan enzim restriksi yang sama, yaitu *SacI* dan *XhoI* secara bersama-sama dalam satu tabung Ependorf (*double digest*) menggunakan buffer 1 (Biolabs). Enzim restriksi dinon-aktifkan dengan pemansan 65°C selama 20 menit (sesuai petunjuk pabrik, Biolabs). Hasil pemotongan dengan kedua enzim tersebut dilihat dengan elektroforesis gel agarosa (Gambar 18) .

Fragmen gen Abfa dan vektor pYES di atas yang telah dipotong dengan kedua enzim *SacI* dan *XhoI* selanjutnya dimurnikan dari gel dengan *gel clean kit*. Hasil pemurnian tersebut, gen abfa (*SacI* dan *XhoI*) dan vektor pYES2 (*SacI* dan

*Xho*I) diligasi dengan enzim ligase. Selanjutnya akan dilakukan transformasi hasil ligasi ke sel inang *E. coli* TOP10.



**Gambar 18.** Elektroforegram hasil pemotongan amplikon dan vektor dengan *Sac*I & *Xho*I. Keterangan: 1.Marker DNA  $\lambda$  *Hind*III; 2.Amplikon abfa (A) dipotong *Sac*I dan *Xho*I (5 $\mu$ l); 3. Vektor pYES2 (A) dipotong *Sac*I dan *Xho*I (5 $\mu$ l); 4. Amplikon abfa (B) dipotong *Sac*I dan *Xho*I (5 $\mu$ l); 5. Vektor pYES2 (B) dipotong *Sac*I dan *Xho*I (5 $\mu$ l); 6. Amplikon abfa (B); 7. Amplikon abfa (A1); dan 8. Amplikon abfa (A).

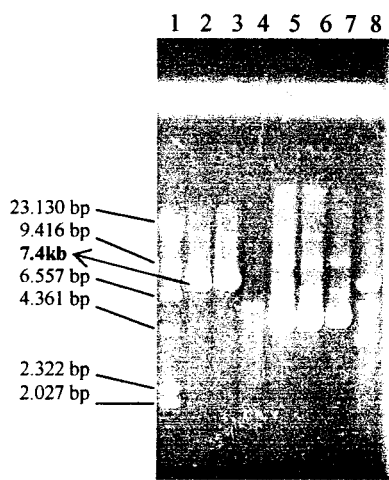
Selanjutnya fragmen gen abfa (amplikon) dan vektor pYES di atas yang berturut-turut disebut sebagai *Abfa-SacI-XhoI* dan *pYES2-SacI-XhoI* disambungkan atau diligasi dengan bantuan enzim T4 ligase pada suhu 16°C selama 2 jam. Hasil ligasi ini yang merupakan DNA rekombinan selanjutnya diberi nama pYES2-Abfa. Sebelum pYES2-Abfa dimasukkan ke dalam sel inang dengan metoda transformasi, DNA rekombinan ini disimpan di -20°C.

Untuk memudahkan melakukan transformasi ke sel inang ragi *S. cereviae* dan menentukan struktur gen *Abfa* hasil ligasi, maka dilakukan transformasi DNA rekombinan ke sel inang *E. coli* terlebih dahulu. Dalam penelitian ini digunakan *E. coli* strain TOP10 karena sesuai genotif sel inang ini sesuai dengan vektor pYES2 yang digunakan. Transformasi sel *E. coli* strain TOP10 dilakukan dengan cara membuat sel kompetennya terlebih dahulu.



Kompeten sel dibuat dengan cara kimia, yaitu perlakuan dinding sel bakteri dengan  $\text{CaCl}_2$ . Transformasi sel dilakukan dengan perlakuan perubahan suhu yang mendadak, dari suhu  $0^\circ\text{C}$  ke  $42^\circ\text{C}$  kemudian kembali ke  $0^\circ\text{C}$ , sehingga DNA yang bermuatan relatif negatif terhadap dinding sel yang relatif lebih positif karena perlakuan  $\text{CaCl}_2$  dapat masuk ke dalam sel inang. Sel inang yang membawa DNA rekombinan (pYES2-Abfa) selanjutnya disebut sebagai transforman.

Transforman yang tumbuh di media LB ampisilin diisolasi DNA plasmidnya untuk dilakukan uji dengan enzim restriksi. Hasil analisis restriksi dari DNA plasmid transforman dapat dilihat pada gambar 19 di bawah ini.



Gambar 19. Elektroforegram DNA plasmid hasil isolasi dan analisis restriksi transforman *E. coli* strain TOP10 pembawa pYES2-abfa. Keterangan : 1. Marker DNA  $\lambda$  *HindIII*; 2. pYES2-abfa A dipotong *SacI*; 3. pYES2-Abfa B dipotong *SacI*; 4. pYES2 dipotong *SacI*; 5. pYES2-abfa A; 6. pYES2-abfa B; 7. pYES2-abfa C; 8. pYES2.

Berdasarkan data elektroforegram pada gambar di atas dapat disimpulkan bahwa transforman *E. coli* strain TOP10 telah membawa DNA rekombinan pYES2-Abfa dengan ukuran sekitar 7,4 kb. Telah diketahui bahwa ukuran plasmid pYES2 adalah sekitar 5,9 kb dan ukuran gen Abfa yang diamplifikasi dari plasmid pTP510 sekitar 1,5 kb, sehingga apabila kedua DNA tersebut diligasi maka akan menghasilkan DNA berukuran sekitar 7,4 kb.

## BAB V

### KESIMPULAN

1. Kloning dan ekspresi gen penyandi  $\beta$ -xilosidase asal *E.coli* DH5 $\alpha$  (pTP510) ke dalam sistem *Bacillus megaterium* telah berhasil dikarakterisasi
2. Xilo-oligosakarida hasil hidrolisis hemiselulosa alam baik hemiselulosa total, A, dan B asal tongkol jagung oleh enzim xilanase mampu berperan dalam meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota*
3. Xilosidase rekombinan (pET-xyl) telah berhasil dimurnikan dengan cara kromatografi afinitas (Ni-NTA)
4. Gen penyandi arabinofuranosidase telah berhasil disub-kloningkan ke dalam vektor ragi.

## BAB VI

### RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA

#### Rencana Kerja Tahun III :

- a. Kloning dan ekspresi gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*abfa*) ke dalam sel inang *Saccharomyces cerevisiae*.  
(dilakukan oleh 1 mahasiswa S3 yang telah lulus ujian kualifikasi a.n. I Nengah Wirajana)
- b. Karakterisasi enzim arabinofuranosidase rekombinan yang diekspresikan oleh ragi *S. cerevisiae* rekombinan.
- c. Analisis efek sinergisme enzim xilanolitik rekombinan (dilakukan oleh mahasiswa S2 atas nama One Asmarani).

#### Jadwal Kegiatan Tahun III

No.	Kegiatan	Bulan ke							
		3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Kloning, ekspresi dan karakterisasi gen penyandi arabinofuranosidase di ragi <i>S. Cerevisiae</i> . (dilakukan oleh mahasiswa S3 atas nama I Nengah Wirajana)								
	a.Penyusunan proposal	X							
	b.Ujian Proposal		X						
	c.Kegiatan penelitian	X	X	X	X	X	X		
	d.Ujian disertasi (tertutup)							X	

2.	<p>Penelitian Lanjutan ekspresi gen penyandi xilosidase di <i>Bacillus megaterium</i>.</p> <p>(dilakukan oleh mahasiswa S3 atas nama Dra.Sri Sumarsih,MSi)</p> <p>a. Ujian kelayakan</p> <p>b. Ujian tertutup dan terbuka</p>			X		X		X	
3.	<p>Penelitian sinergisme aktivitas enzim xilanolitik rekombinan.</p> <p>(dilakukan oleh 1 orang mahasiswa S2 atas nama One Asmarani)</p> <p>a. Pemurnian enzim xilanolitik rekombinan</p> <p>b. Uji sinergisme</p> <p>c. Ujian Proposal</p> <p>d. Ujian tesis</p>	X	X	X		X	X		X
4.	Penyusunan laporan akhir								X
5.	Laporan akhir dan seminar								X

## BAB VII

### DAFTAR PUSTAKA

- Alonso JL, Vaquez MJ, Dominguez H, Parajo JC., 2001, Xilooligosaccharides: Manufacture and Aplication, *J. Food Science and Technology*, 11:387 – 93.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H. and Nissen-Meyer, J., 1998, Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EFand JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2269–2272.
- Apajalahti, J. H., Kettunen, H., Kettunen, A., Holben, W. E., Nurminen, P. H., Rautonen, N. and Mutanen, M., (2002, Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4986–4995.
- Axelsson, L., 1998, Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp.1-72. In S. Salminen and A. Von Wright (eds). *Lactid Acid Bacteria: Microbiology and Fungsional Aspects*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, 1994, Bailey dan Scott's Diagnostic microbiology 19<sup>th</sup> ed, Mosby-Year Book Inc, Missouri, p: 101-02, 170-74.
- Bird, A R., 1999, Prebiotics: A role for dietary fibre and resistant starch. *Asia Pacific J. Clin Nutr.*, 8: S32-S36.
- Bouhnic Y, Flourie B, Apochart P, Grammet G, Durand M, Rambaud JC, 1997, Administration of transgalacto-oligosaccharides increases faecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans, *Journal of Nutrition*, 127: 444 – 48.
- Buddington RK, 2001, The use of Nondigestible Oligosaccharides to Manage the Gastrointestinal Ecosystem, *J. Microbiol. Ecol. Health Diss*, 13:9-15.
- Collin MD, Gibson GR, 1999; Probiotics prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Nutr*, 69 (suppl): 1052S-7S.

- Cycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rostall RA, 2001, A Comparative In Vitro Evaluation on the Fermentation properties of Prebiotic Oligosaccharides, *Journal of Applied Microbiology*, 91:878-97.
- Cummings JH & Macfarlane GT, 1991 The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70 : 443-459.
- Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN, 2001, Prebiotic Digestion and Fermentability, *American Journal of clinical nutrition*, 73(2): 415S – 20S.
- Dominguez Herminia, Alanso JL, Garrote Gil, Carlos Juan, 2003, Xilooligosaccharides: Properties and Technologies, *Electron Journal Environ. Agric Food Chem*; 2(1): 1579-4377.
- Erikson KL, Hubbard LE, 2000; Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* 130: 403S-409S
- Fox, PF., PLH, McSweeney, and CM, Lynch., 1998, Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese, Aust, *J. Dairy Technol.*, 53:83-89
- Fuller, R. and Gibson, G. R. ,1998, Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4:477-480.
- Gibson GR & Roberfroid MB, 1995, Dietary Modulation of the Human colonic microbiota: Introducing the Concept of Prebiotic. *Journal of Nutrition* 125: 1401-12.
- Grizard D, Barthomeuf C, 1999, Non-Digestible Oligosaccharides Used as Prebiotic Agent, *Journal Reprod Nutr Dev*, 39(5):563-88.
- Hanafiah KA, 2005, Rancangan Percobaan Alikasi, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Hendayana Sumar, 2006, Kimia Pemisahan, PT emaja Rosdakarva, Bandung.
- Irianto Koes, 2002, Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme, CV. Yrama Widya, Bandung.
- Kaur Narinder & Gupta AK, 2002 Application of Inulin and Oligofructosa in Health and Nutrition, *J.Biosci*, 27(7): 703-14.
- Kabel MA, 2002, Characterisation of Complex Xylo-oligosaccharides from Xylan Rich by- products, Tesis Wageningen University, Maandag,p. 1-114.

- Kritchevsky, D., 1999, Dietary fibre in health and disease: An overview. *Asia Pacific J Clin Nutr.*, 8: S1-S2.
- Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C, et al., 1996, Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am J Clin Nutr*, 63:939-45.
- Macfarlane GT, Gibson GR & Cummings JH, 1992, Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon, *Journal of Applied Bacteriology*, 72:57 - 64.
- MacFarlane GT, Cumming JH, 1999; Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br.Med.J.* 318: 999-1003.
- Muir, JG., 1999, Location of colonic fermentation events: Importance of combining resistant starch with dietary fibre. *Asia Pacific J Clin Nutr.*, 8: S14-S21
- Naruszewicz, M., Johansson, M.-L., Zapolska-Downar, D. and Bukowska, H., 2002, Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1249-1255.
- Nath Devyani S, 2006, Studies on Xylan Degrading Enzymes From alkalophilic Therophilic *Bacillus* sp., Thesis, Biochemical Sciences Division, Pune, p.1-136.
- Purwoko Tjahjadi, 2007, Fisiologi Mikroba, Bumi Aksara, Jakarta.
- Roberfroid MB, 2000, Prebiotic and Probiotik: Are They functional Foods? *Am. J. clin. Nutr.*, 6:162S-87S
- Saha BC, 2003, Hemisellulose bioconversion, *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 30:279-291.
- Silalahi, 2000, Indonesian Food and Nutrition Progress, *Journal Hypocholesterolemic Factors in Foods: A Review.*: 7(1): 26-35.

- Smiricky- Tjardes M. R., Flickinger E. A., Grieshop C. M., Bauer L. L., Murphy M. R., and FaheG. C. y, 2003 In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora, *J. Anim. Sci.* 2003. 81:2505–14
- Sudjadi, 2007, Kimia Farmasi Analisis, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Sullivan A, Nord CE, 2002; Probiotic in human infections, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 625-627.
- Tjardes Smiricky MR, Flickinger EA, Grieshop CM, Bauer LL, Murphy MR , 2003, In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora, *J. Animal Science*, Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana, 81:2504-14.
- Todar Kenneth, 2006, The Diversity of metabolism in Procaryotes, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology
- Tomomatsu H ,1994, Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* October issue, 61-65.
- Topping, DL.,1999, Physiological effects of dietary carbohydrates in the large bowel: Is there a need to recognize dietary fibre equivalents? *Asia Pacific J Clin Nutr.*, 8: S22-S26.
- Tri Puspaningsih, 2005, degradasi Limbah Kelapa Sawit dengan enzim Xilanolitik Rekombinan, Penelitian RUTXII/2005-2006, Menristek, Jakarta.
- Vernazza CL, Rabiou BA, Gibson GR, 2006, Human colonic Microbiology and the Role of Dietary intervention Introduction to Prebiotic, review, pp:1-28
- Vries R.P. and Visser J., 2001. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides: *Mcrobiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Mycobiology, p. 497-522.
- Wang X, Gibson GR., 1993, Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol*,75:373–80.
- Williams, T Stanley, Holt, G John, Staley, T James, Sneath AH, Peter., 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland USA.



**DRAFT ARTIKEL ILMIAH**

## EKSPRESI GEN PENYANDI $\beta$ -XILOSIDASE DALAM SISTEM pHIS1525/ *Bacillus megaterium* MS941

Sri Sumarsih, Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Sofijan Hadi, Ami Soewandi, J.S.  
Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga Surabaya

### *Abstract*

*The aim of this research was to express the  $\beta$ -xylosidase gene in the pHIS1525/*Bacillus megaterium* MS941 system. The xyl gene was amplified from pTP510 and cloned into pHIS1525 in *E. coli* DH10 $\beta$ . The recombinant plasmid was transformed into *B. megaterium* MS941 by protoplast transformation. Transformants were selected by growing the recombinant *B. megaterium* MS941 on solid LB medium containing tetracycline (10  $\mu$ g/ml). The expression of  $\beta$ -xylosidase was assayed using 0.2% methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xyloside (MUX) and the proteins were analyzed by SDS-PAGE method. The  $\beta$ -xylosidase activity was determined toward p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (pNPX) as a substrate and p-nitrophenol releasing was measured by UV/Vis spectrophotometer at  $\lambda=405$  nm.*

*This research showed that recombinant *B. megaterium* MS941 expressed the  $\beta$ -xylosidase gene (xyl) and secreted it into the culture medium. The SDS-PAGE analysis of extracellular protein (culture medium) showed a 60,0 kD protein band. The recombinant *Bacillus megaterium* MS941 expressed and secreted the  $\beta$ -xylosidase into culture medium 5 hours after adding 5% xylose. The  $\beta$ -xylosidase activity was 0,441 unit/ml toward pNPX as a substrate.*

**Key words:**  *$\beta$ -xylosidase, pHIS1525, *Bacillus megaterium* MS941, protoplast, methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xyloside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside*

### PENGANTAR

Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa dalam dinding sel tanaman, yang memiliki kerangka dasar residu 1,4-D-xilopiranosil yang rantai sampingnya tersubstitusi dengan gugus asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan  $\alpha$ -arabinofuranosil. Degradasi sempurna xilan merupakan proses banyak tahap yang melibatkan aktivitas beberapa enzim hidrolitik yang bekerja secara sinergis, yaitu (1) endo-1,4- $\beta$ -xilanase, (2) 1,4- $\beta$ -D-xilosidase, (3)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glukuronidase dan asetil esterase (Yang *et al.*, 2004).

Enzim xilanolitik mendapat banyak perhatian dari kalangan peneliti dan industri karena peranannya dalam penyempurnaan biokonversi biomassa lignoselulosa menjadi produk-produk yang bermanfaat. Enzim xilanolitik dan juga glikosidase lain, menunjukkan aktivitas glikosintase untuk sintesis oligosakarida misalnya sintesis 4-

metilumbeliferil  $\beta$ -D-1,4-xilooligosida yang merupakan substrat untuk uji  $\beta$ -D-xilanase (Czjzek *et al.*, 2005; Eneyskaya *et al.*, 2005).

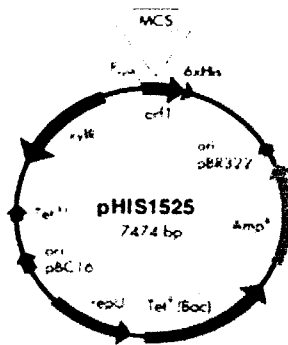
Plasmid pTP510 merupakan plasmid hasil rekombinasi gen penyandi enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dalam plasmid pBluescriptKS+/sel inang *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid ini mengekspresikan 3 jenis gen penyandi enzim xilanolitik-termofilik, yaitu gen penyandi ekso-xilanase (*ekso-xyl*),  $\beta$ -xilosidase (*xyl*) dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*abfa*) (Puspaningsih, 2005). Sekuens gen penyandi  $\beta$ -xilosidase dalam pTP510 tersebut telah terdaftar dalam *Gene Bank* dengan nomor akses DQ345777. Sedangkan dalam Genpept, enzim  $\beta$ -xilosidase tercantum dengan nomor akses ABC 75004, yang tersusun atas 511 residu asam amino dengan berat molekul 57.993 Da. Enzim  $\beta$ -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 ini telah berhasil dikristalkan dan dipelajari strukturnya (Rohman *et al.*, 2007)

*Escherichia coli* disebut sebagai "*workhorse*" untuk produksi berbagai protein rekombinan dengan berbagai sistem ekspresi. Namun demikian, *E. coli* tidak dapat memproduksi beberapa protein yang mengandung ikatan disulfida kompleks, atau protein mamalia yang membutuhkan modifikasi postranslasi untuk aktivitasnya. Pada umumnya protein yang diover-ekspresi sering kali diproduksi dalam bentuk *inclusion body*, akibatnya protein yang aktif biologi hanya dapat diambil dengan proses denaturasi dan *refolding* yang rumit dan mahal (Choi and Lee, 2004; Schallmeyer *et al.*, 2004).

Bakteri Gram positif *Bacillus megaterium* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan sel inang lain untuk produksi protein rekombinan. Bakteri ini mampu mengekspresikan DNA heterolog. Berbeda dengan *B. subtilis*, *B. megaterium* tidak menghasilkan protease alkalin dan dikenal stabil dalam replikasi dan pemeliharaan plasmid. Pada dinding selnya juga tidak ditemukan adanya endotoksin. Akhir-akhir ini, beberapa sistem ekspresi *B. megaterium* telah dikembangkan untuk produksi protein rekombinan intraseluler dan ekstraseluler. Beberapa vektor dan galur *B. megaterium* telah dikembangkan untuk produksi beberapa protein rekombinan, misalnya glukosiltransferase (Wang *et al.*, 2005), levansucrase (Malten *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006), dextransucrase dan penisilin amidase (Yang *et al.*, 2006) serta fragmen antibodi scFv (Jordan *et al.*, 2007).

Vektor ekspresi pHIS1525 telah dikonstruksi untuk keperluan produksi dan sekresi protein heterolog. Plasmid pHIS1525 merupakan *shuttle vector* *E. coli*/*B.*

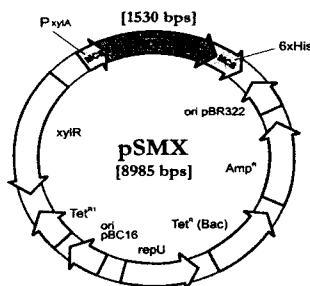
*megaterium* yang mengandung *signal peptide* yang terdiri atas sekuens penyandi esterase ekstraseluler asal *Bacillus*, sehingga memungkinkan untuk sekresi protein target ke dalam medium kultur.



Gambar 1. Peta restriksi pHIS1525

Sistem pHIS1525 ini juga dilengkapi dengan adanya 6x *His-tag* untuk tujuan pemurnian protein satu tahap dan deteksi protein target (Mobitec, 2004; Malten *et al.*, 2006; Hollman *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini dipelajari ekspresi gen penyandi  $\beta$ -xilosidase (gen *xyl*) dalam sistem pHIS1525/ *B. megaterium* MS941. Pada tahap penelitian sebelumnya telah dilakukan amplifikasi gen *xyl* dari pTP510 dan telah berhasil diklonkan ke dalam plasmid pHIS1525 dengan sel inang *E. coli* DH10 $\beta$ , menghasilkan plasmid rekombinan pHIS1525-*xyl* yang kemudian dinamakan pSMX.



Gambar 2. Peta restriksi plasmid pSMX

Selanjutnya, plasmid rekombinan pSMX ini ditransformasikan ke dalam sel *B. megaterium* MS941 melalui transformasi protoplas, untuk mengetahui ekspresinya di *Bacillus megaterium*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Sampel penelitian

1. Plasmid rekombinan pTP510 dalam *E. coli* DH5a yang merupakan hasil penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2003) dan disimpan sebagai koleksi di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FMIPA-Unair, Surabaya
2. Plasmid pHIS1525/*E. coli* DH10 $\beta$ , sel *Bacillus megaterium* MS941 diperoleh dari Institute of Microbiology, Technical University Braunschweig, Germany

### Cara Kerja

Proses transformasi plasmid rekombinan ke *B. megaterium* MS941 dilakukan dengan prosedur standar transformasi protoplas Puyet *et al.*(1987) yang dimodifikasi (Barg *et al.*, 2005 dan MoBiTec, 2004)

### Penyiapan protoplas

Satu koloni tunggal sel *B. megaterium* MS941 diinkubasi dalam medium LB pada 37<sup>0</sup>C dengan pengocokan 100 rpm semalam. Sebanyak 1 ml prekultur diinokulasikan ke dalam 50 ml medium LB dan diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C dengan pengocokan 250 rpm hingga OD<sub>578nm</sub> = 0,1. Sel dipisahkan dengan sentrifugasi 5000 rpm, 4<sup>0</sup>C selama 15 menit dan disuspensikan dengan 5 ml SMMP, ditambahkan 50  $\mu$ l lisozim dan diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C dengan pengocokan sangat lambat. Terbentuknya protoplas (20-80%) diamati dengan mikroskop. Protoplas dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan diresuspensikan dengan 5 ml SMMP.

### Transformasi DNA rekombinan pSMX ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941

Ke dalam tabung *Falcon* 12 ml yang berisi berisi 0,5-1  $\mu$ g DNA (dalam SMMP), ditambahkan 500  $\mu$ l suspensi protoplas dan 1,5 ml PEG-P kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu 20<sup>0</sup>C. Ke dalam campuran ditambahkan 5 ml larutan SMMP, kemudian dicampur dengan membolak-balik tabung. Panen sel dilakukan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Sel dilarutkan dalam 500  $\mu$ l SMMP dan diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C selama 90 menit. Pada saat yang sama disiapkan 2,5 ml *top agar* dan inkubasi dalam penangas air (maksimum 43<sup>0</sup>C). Kemudian sel dipipet dan dicampur dengan *top agar* dan segera dituang dan disebar di atas medium padat LB (+ Tc 10  $\mu$ g/ ml), selanjutnya diinkubasi pada 37<sup>0</sup> semalam. Koloni sel yang tumbuh digoreskan pada medium padat LB (+ Tc 10  $\mu$ g/ ml) yang baru dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C semalam dan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

## Uji ekspresi gen penyandi $\beta$ -xilosidase dengan metilumbelliferil- $\beta$ -D-xilosida (MUX)

Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) ditutup (*overlay*) dengan larutan agar 0,5% dalam bufer fosfat sitrat pH 6,0 yang mengandung MUX 0,2%. Biakan diinkubasi pada suhu 60<sup>o</sup> C semalam. Biakan (transforman) yang positif mengekspresikan  $\beta$ -xilosidase akan berpendar jika diletakkan di atas transluminator UV.

### Analisis protein dengan SDS-PAGE

Kultur sel *B. megaterium* MS941 rekombinan ditumbuhkan dalam medium LB (+Tc) pada 37<sup>o</sup>C dengan pengocokan 250 rpm hingga OD<sub>578 nm</sub> = 0,3-0,4 dan setelah ditambahkan larutan xilosa 0,5% diinkubasi kembali pada 37<sup>o</sup>C selama 5 jam. Sampel disentrifugasi 13.000 rpm pada 4<sup>o</sup> C selama 10 menit dan diperoleh supernatan (protein ekstraseluler). Supernatan dipisahkan dengan pengendapan aseton 70%. Pelet sel disonikasi dua kali pada 20 kHz selama 2 menit sehingga diperoleh protein intraseluler. Selanjutnya, protein yang diperoleh (protein ekstraseluler dan intraseluler) dianalisis dengan SDS-PAGE.

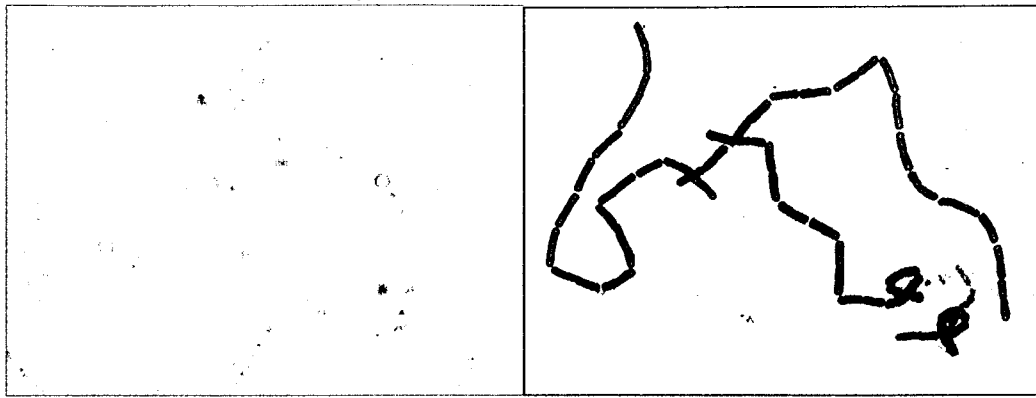
### Uji aktivitas enzim $\beta$ -xilosidase rekombinan

Aktivitas  $\beta$ -xilosidase ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida. Enzim sebanyak 100  $\mu$ l dicampur dengan 900  $\mu$ l substrat pNP- $\beta$ -D-xilopiranosida 1 mM diinkubasi pada suhu 50<sup>o</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah p-nitrofenol yang dilepaskan secara spektrofotometri UV-vis pada  $\lambda$  405 nm.

## HASIL PENELITIAN

### Transformasi DNA plasmid rekombinan ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941

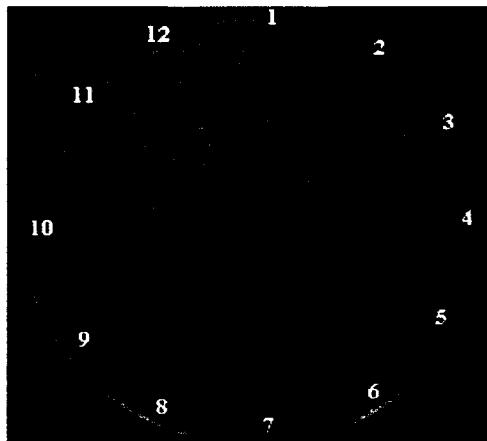
Transformasi plasmid rekombinan pHIS1525-*xyI* (yang selanjutnya disebut pSMX) dilakukan dengan transformasi protoplas. Gambar 3(a) merupakan foto mikroskopis protoplas *B. megaterium* MS941, sedangkan Gambar 3(b) merupakan sel *B. megaterium* MS941 setelah transformasi dan telah mengalami proses regenerasi, sehingga dinding sel sudah terbentuk kembali.



(a) (b)  
Gambar 3. Foto mikroskopis (a) protoplas *B. megaterium* MS941  
(b) sel *B. megaterium* MS941 setelah transformasi (perbesaran 1000x)

#### Uji kspresi gen penyandi $\beta$ -xilosidase oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan

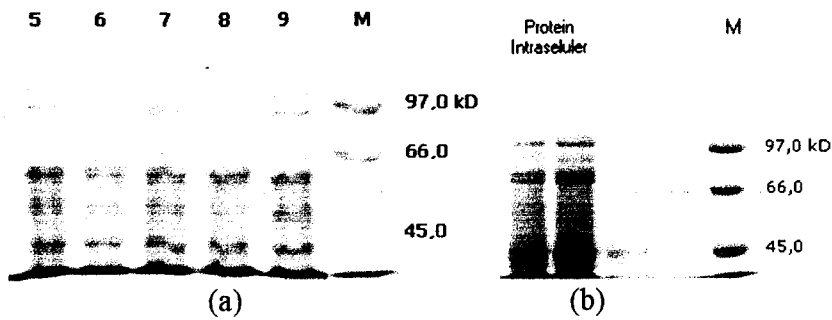
Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) yang ditutup (*overlay*) dengan larutan agar 0,5% yang mengandung MUX 0,2% nampak berpendar ketika dilihat di atas transluminator UV (Gambar 4.). Hal ini menunjukkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan menghasilkan  $\beta$ -xilosidase, yang menghidrolisis substrat MUX menghasilkan senyawa umbelliferol yang berpendar di bawah sinar UV.



Gambar 4. Foto hasil uji  $\beta$ -xilosidase dengan MUX. Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) yang ditutup dengan larutan agar 0,5% yang mengandung MUX 0,2%

Hasil analisis protein ekstraseluler (medium kultur) *B. megaterium* MS941 rekombinan dengan metode SDS-PAGE, menunjukkan adanya pita protein dengan

ukuran sekitar 60,0 kD, mendekati ukuran  $\beta$ -xilosidase yaitu 57.993 Dalton (Gambar 5a.). Pita protein ini tidak terlihat pada protein intraseluler (Gambar 5b.).



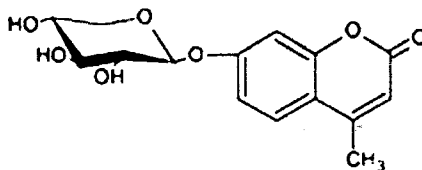
Gambar 5. Hasil analisis SDS-PAGE (a) protein ekstraseluler 5-9 jam setelah penambahan xilosa 0,5 %  
(b) protein intraseluler

Enzim  $\beta$ -xilosidase yang dihasilkan dan disekresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNPX). Dari hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa  $\beta$ -xilosidase yang diekspresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan 5 jam setelah penambahan xilosa, mempunyai aktivitas sebesar 0,441 Unit/ ml.

## PEMBAHASAN

Proses transformasi DNA plasmid rekombinan (pSMX) ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941 dilakukan di dalam medium yang isotonik dan mengandung polietilen glikol (PEG). Kondisi isotonik untuk menjaga agar sel tidak lisis, sedangkan PEG untuk menginduksi masuknya DNA ke dalam protoplas dan regenerasi dinding sel bakteri.

Metilumbelliferil- $\beta$ -D-xilosida (MUX) merupakan substrat dari enzim  $\beta$ -xilosidase yang mempunyai struktur :



Enzim  $\beta$ -xilosidase menghidrolisis ikatan glikosidik pada senyawa MUX, melepaskan xilosida dan menghasilkan senyawa umbelliferol yang dapat berfluoresensi di bawah sinar UV. Dari 12 biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan yang diuji, ada dua



biakan (yaitu biakan nomor 1 dan 3) yang nampak berpendar ketika dilihat di atas transluminator UV (Gambar 3.). Hal ini menunjukkan bahwa biakan nomor 1 dan 3 menghasilkan enzim  $\beta$ -xilosidase. Enzim tersebut menghidrolisis ikatan glikosidik pada senyawa metilumbelliferil- $\beta$ -D-xilosida (MUX), yang menghasilkan senyawa umbelliferol yang berpendar di bawah sinar UV. Hal ini membuktikan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan 1 dan 3 mengekspresikan  $\beta$ -xilosidase.

Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan (1) mampu mengekspresikan  $\beta$ -xilosidase dan mensekresikannya ke medium kultur. Analisis SDS-PAGE terhadap protein ekstraseluler (medium kultur) pada inkubasi 5-9 jam setelah penambahan xilosa 0,5% menunjukkan adanya pita protein di sekitar 60 kD (Gambar 4a.). Sedangkan dalam protein intraseluler tidak nampak adanya pita protein di sekitar 60 kD (Gambar 4b.). Pita protein dengan ukuran sekitar 60 kD mendekati ukuran  $\beta$ -xilosidase dari *G. thermoleovorans* IT-08. Dalam *Genpept*, enzim  $\beta$ -xilosidase dari *G. thermoleovorans* IT-08 yang tercantum dengan nomor akses ABC 75004, tersusun atas 511 residu asam amino dengan berat molekul 57.993 Da. Sehingga dapat disimpulkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan mampu mengekspresikan  $\beta$ -xilosidase dan mensekresikannya ke medium kultur. Tidak adanya pita protein dengan ukuran sekitar 60,0 kD menunjukkan tidak adanya protein  $\beta$ -xilosidase yang tersimpan di dalam sel.

Enzim  $\beta$ -xilosidase yang dihasilkan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNPX). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghidrolisis pNP- $\beta$ -D-xilopiranosida menghasilkan 1  $\mu$ mol p-nitrofenol. Medium kultur *B. megaterium* MS941 rekombinan 5 jam kultivasi setelah penambahan xilosa 0,5% menunjukkan aktivitas  $\beta$ -xilosidase sebesar 0,441 Unit/ ml terhadap substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida.

Dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa gen penyandi  $\beta$ -xilosidase dapat diekspresikan oleh *Bacillus megaterium* MS941 rekombinan sebagai enzim ekstraseluler.

#### KEPUSTAKAAN

Barg, H.; Malten, M.; Jahn, M.; Jahn, D. 2005. Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*, *Microbial Processes and Products*, Edited by: Barredo JL. Totowa, Humana press, **18**: 205-224.

- Choi, J.H. and Lee, S.Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant protein using *Escherichia coli*, *Appl. Microbial biotechnol*, **64**:625-635
- Czjzek, M.; David, A.B.; Bravman, T.; Shoham, G.; Henrissat, B. and Shoham, Y. 2005. Enzyme-substrate complex structures of a GH39  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*, *Journal of Molecular Biology*, **353**: 838-846.
- Eneyskaya, E.V.; Ivanen, D.R.; Shabalin, K.A.; Kulminskaya, A.A.; Backinosky, L.V.; Brumer III, H. and Noustroev, K.N. 2005. Chemo-enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylooligosides : New substrates for  $\beta$ -D-xylanase assays, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **3**: 146-151.
- Jordan, E.; Hust, M.; Roth, A.; Biedendieck, R.; Schirrmann, T., Jahn, D. and Dubel, S. 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell Factories*, **6** :2
- Malten, M.; Biedendieck, R.; Gamer, M.; Drews, A.; Stammen, S.; Buchholz, K.; Dijkhuizen, L., and Jahn, D. 2006. A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, export and One-Step Purification of Affinity-Tagged heterologous Levansucrase from Growth Medium, *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 1677-1679
- MoBiTec. 2004. *Bacillus megaterium*. Protein Expression System, Product Information and Instruction
- Puspaningsih, N.N.T. 2003. Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E.coli* DH5 $\alpha$ , Penelitian S3-IPB, Bogor dan *JSPS-Short Course Program*, September-November, Mie University, Japan
- Puspaningsih, N.N.T.; Suwanto A.; Suhartono M.T.; Suminar S.A.; Kimura T., dan Ohmiya, K. 2005. *Cloning of Clustered Gene for Thermostable Xylan-Degrading Enzymes  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of Bacillus thermoleovorans IT-08*, International Workshop on Biorefinery and Bioenergy, Kyoto 9-10 Februari 2005, Japan
- Rohman, A.; Oosterwijk, N.; Kralj, S.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B.W. and Puspaningsih, N.N.T. 2007. Purification, crystallization and preliminary x-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase *Geobacillus thermoleovorans*, *Acta Crystallographica*, **F63**, 932-935.
- Schallmeyer, M.; Singh, A. and Ward, O.P. 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, **50** : 1 – 17
- Wang, W.; Hollmann, R.; Furch, T.; Nimtzm, M.; Malten, M.; Jahn, D. and Deckwer, W. 2005. Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase, *Proteome science*, **3**: 4
- Yang, Y.; Biedendieck, R.; Wang, W.; Gamer, M.; Malten, M.; Jahn, D. and Deckwer, W. 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell Factories*, **5**: 36.

**Efek *In Vitro* Xilooligosakarida Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus casei*  
(Studi Pendahuluan Pemanfaatan Xilooligosakarida Sebagai Kandidat Prebiotik)**

Asnia Zainuddin<sup>1</sup>, Eddy Bagus W<sup>2</sup>, Ni Nyoman Tri Puspaningsih<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Asnia Zainuddin, Jurusan MIPA FKIP Universitas Pattimura

<sup>2</sup> Eddy Bagus W, Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

<sup>3</sup> Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga

<sup>3</sup>Contact person : nyomantri@yahoo.com

**ABSTRACT**

The objectives of this study were to find the *in vitro* effect of xylooligosaccharide on the cell count of *Lactobacillus casei Shirota strain*, to identify the effect of xylooligosaccharide on the production of lactic, acetic, propionic and butiric acid (short chain fatty acid = SCFA), to determine the best concentration of xylooligosaccharide for the increase of *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count, and to prove the effect of xylooligosaccharide on the change of pH value. This was a laboratory experimental study using complete randomized design with 4 treatments, i.e. MRS broth media added xylooligosaccharide with concentrations of 0% (control), 1%, 3%, and 5%, which were inoculated with *Lactobacillus casei Shirota strain* and incubated for 6, 12, 18 and 24 hours. Each treatment was repeated 6 times. The *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count was counted using Dropplate Methods. Data obtained were analyzed statistically using two way ANOVA with significance level of 5%. Least Significance Difference (LSD) test was undertaken to compare the effect among those treatments to *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count. The type and level of organic acids, i.e., lactic, acetic, propionic, and butiric acids (SCFA), formed in incubation time of 12 hours, were measured using Gas Chromatography and the change of pH value during incubation time was measured using pH paper. Data obtained were analyzed descriptively. Results showed that xylooligosaccharide addition with concentrations of 0%, 1%, 3%, and 5% in MRS Broth media with incubation times of 6, 12, 18, and 24 hours provided highly significant interaction effect on the cell count of *Lactobacillus casei Shirota strain* with  $F_{counted} = 4585.01$  and P (probabilitas) value was 0.000 ( $p < 0.05$ ), Adjusted R squared was 1.000 or 100%. The result of Least Significance Difference (LSD) test showed that xylooligosaccharide addition with concentrations of 1%, 3%, and 5% with incubation time of 6, 12, 18, and 24 hours provided significantly different effects on *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count. The result of gas chromatography showed that the addition of xylooligosaccharide with concentrations of 0%, 1%, 3%, and 5% in MRS Broth media with incubation time of 12 hours could increase *Lactobacillus casei Shirota strain* metabolism activity that produced lactic, acetic, propionic, and butiric acids with the highest lactic acid level of 0.86% after addition treatment of 5% xylooligosaccharide. The reduction of pH value was along with the increase of *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count and the increase of incubation time, with the lowest pH value of 3.8 after the addition of 5% xylooligosaccharide with incubation time of 24 hours. The result of correlation test revealed correlation between the increase of *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count and the pH value, where the increase of bacterial number resulted in the increase of lactic acid production that, in turn, caused the reduction of pH value. In conclusion, the addition of xylooligosaccharide with concentrations of 1%, 3%, and 5% in MRS Broth media with incubation periods of 6, 12, 18, and 24 hours can increase *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count, increase the metabolism activity of *Lactobacillus casei Shirota strain*, capable in producing SCFA in incubation time of 12 hours, and results in the reduction of pH value. The addition of 5% xylooligosaccharide provides the best effect for increasing the *Lactobacillus casei Shirota strain* cell count.

**Key Words:** xylooligosaccharide, microflora intestine, *Lactobacillus casei*, gas chromatography.

## PENGANTAR

Mikroekologi usus sangat kompleks dan hasil aktivitas metabolisme dari beberapa jenis bakteri usus tertentu mempunyai peranan penting dalam nutrisi dan kesehatan manusia. Jika keseimbangan mikroekologi usus terganggu, bakteri merugikan akan meningkat, sehingga kesehatan tubuh akan terganggu. Oleh karena itu kesehatan saluran pencernaan utamanya kesehatan usus memegang peranan penting dalam menentukan kesehatan tubuh (Gibson & Roberfroid, 1995). Salah satu cara untuk memanipulasi mikroekosistem usus dengan tujuan meningkatkan koloni bakteri menguntungkan adalah dengan konsumsi probiotik, prebiotik, atau kombinasi keduanya yang dikenal dengan sinbiotik.

Probiotik adalah suplemen makanan berupa mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh inang (Fuler, 1989), sedangkan prebiotik adalah bahan makanan yang tidak dapat dicerna dan tidak diserap pada saluran pencernaan bagian atas, memberikan pengaruh menguntungkan bagi kesehatan karena dapat menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas bakteri menguntungkan di kolon sehingga dapat meningkatkan kesehatan tubuh (Gibson & Roberfroid, 1995). Prebiotik umumnya merupakan karbohidrat yang tidak dapat dicerna, biasanya dalam bentuk oligosakarida dan *dietary fiber*, misalnya inulin, *galacto-oligosaccharide*, *fructo-oligosaccharide*, *isomalto-oligosaccharide*, *lactofructo-oligosaccharide* (*lactosucrose*), dan *lactulose* (Gibson & Roberfroid, 1995).

Secara umum, *undigestible* karbohidrat misalnya oligosakarida, merupakan sumber karbon bagi bakteri menguntungkan yang hidup di usus. Oligosakarida tersebut akan difermentasi oleh bakteri menguntungkan dan sebagai produk akhirnya adalah asam lemak rantai pendek (Short Chain Fatty Acid = SCFA) berupa asam laktat, butirir, propionat dan asetat, yang mempunyai dampak fisiologi positif bagi tubuh inang (Macfarlane *et al.*, 1992, Fuler & Gibson, 1998). Selain SCFA juga dihasilkan gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> (Cummings & Macfarlane, 1991; Tomomatsu, 1994; Cummings *et al.*, 2001).

Xilooligosakarida merupakan salah satu jenis oligosakarida yang mempunyai sifat fisika-kimia menarik, yaitu stabil pada suatu cakupan pH dan temperatur yang luas, bahan rendah kalori, sulit untuk dicerna, merupakan serat yang larut dalam air, dan mempunyai sifat organoleptik yang sesuai untuk dicampurkan ke dalam makanan. Dengan sifat fisika-kimia yang dimiliki xilooligosakarida mempunyai nilai penting untuk digunakan sebagai bahan prebiotik (Dominguez *et al.*, 2003).

Secara alami xilooligosakarida terdapat dalam buah-buahan, sayur-mayur, susu nabati, madu dan dapat diproduksi pada skala industri dari bahan hemiselulosa yang kaya xilan. Xilooligosakarida juga dapat diperoleh dengan mengolah bahan limbah *forestal*, agrikultur

atau limbah industri yang bersifat *lignocellulosic* (Alonso *et al.*, 2001). Di Indonesia, bahan-bahan ini mudah di dapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak, sehingga pemanfaatan xilooligosakarida sebagai bahan prebiotik akan sangat menguntungkan baik secara ekologis maupun ekonomi.

Pemanfaatan xilooligosakarida sebagai prebiotik masih dalam tahap pengembangan (Dominique *et al.*, 2003). Studi *in vitro* adalah cara mudah untuk mengevaluasi karakteristik kandidat prebiotik, karena hasil evaluasi kandidat prebiotik secara *in vitro* dapat digunakan untuk memprediksi hasilnya secara *in vivo* (Cummings *et al.* 2001).

Studi *in vitro* oleh Okazaki *et al.* (1990), membuktikan bahwa xilooligosakarida dapat meningkatkan jumlah koloni *Bifidobacteria*. Selanjutnya studi *in vivo* oleh Kuang *et al.* (2004), membuktikan bahwa xilooligosakarida dan fruktooligosakarida dapat meningkatkan populasi bifidobakterium, menurunkan pH cecap, menurunkan konsentrasi serum triglyserides, serta mereduksi *precancerous colonic lesion* pada colon tikus. Dari studi-studi tentang xilooligosakarida, belum ada laporan tentang efek *in vitro* xilooligosakarida terhadap pertumbuhan dan aktivitas *Lactobacillus casei*, sementara *Lactobacillus casei* merupakan salah satu jenis bakteri menguntungkan di dalam mikroflora usus dan banyak digunakan sebagai probiotik. Studi-studi klinis membuktikan bahwa kehadiran *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* di dalam usus dapat menghambat bakteri patogen, meningkatkan imunitas tubuh, dan antikarsinogen (Macfarlane & Cumming, 1999; Sullivan & Nord, 2002).

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian tentang efek *in vitro* xilooligosakarida terhadap pertumbuhan dan aktivitas *Lactobacillus casei*, yang hasilnya diharapkan menjadi bahan acuan dan sebagai studi awal untuk pemanfaatan xilooligosakarida hasil degradasi limbah pertanian secara enzimatis sebagai bahan prebiotik.

## **BAHAN DAN CARA KERJA**

### **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini Xilooligosakarida merek Wako, dan bakteri uji *Lacobacillus casei strain Shirota*.

### **Analisis Data**

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan: media MRSB ditambah 0% xilooligosakarida (kontrol), media MRSB ditambah 1% xilooligosakarida, media MRSB ditambah 3% xilooligosakarida, dan media MRSB ditambah 5% xilooligosakarida. Variabel yang diamati adalah jumlah sel *Lacobacillus casei strain Shirota* pada lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam; produksi asam organik yaitu asam laktat, asam

asetat, asam propionat, dan asam butirat (Short chain fatty acid=SCFA) pada lama inkubasi 12 jam; dan perubahan nilai derajat keasaman (pH) pada lama inkubasi 6, 12, 18 dan 24 jam. Data jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan analisis varian dua jalur (*two way ANOVA*) dengan tingkat kepercayaan 5 % ( $\alpha = 0,05$ ). Untuk membandingkan perlakuan mana yang berbeda nyata dilakukan uji lanjut LSD (*Least Significant Difference*). Data dianalisis dengan program *software* sistem SPSS. Sedangkan data produksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat serta perubahan nilai derajat keasaman (pH) dianalisis secara deskriptif.

## Cara Kerja

### Pembuatan media kultur fermentasi.

Media MRSB ditimbang sesuai instruksi pada label produk (52 gram per liter). Kemudian ditambahkan akuades dan diaduk sampai homogen, pH media diatur hingga 7,0, dipanaskan pada autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup> selama 15 menit. Selanjutnya media dituang ke dalam botol kultur sebanyak 10 ml, sesuai jumlah perlakuan dan replikasi. Pada masing-masing botol yang berisi MRSB tersebut ditambahkan xilooligosakarida dengan konsentrasi 0%, 1%, 3%, 5%. Botol yang berisi medium hangat ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37 °C selama satu malam.

### Perbanyak isolat dan pembuatan suspensi bakteri uji

Koloni isolat *Lactobacillus casei strain Shirota* yang diisolasi dari Yakult Indonesia dibiakkan pada media MRSA (deMan, Rogosa, and Sharpe Agar) plate dengan cara goresan dan diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37<sup>0</sup> C selama 48 jam. Dari biakan bakteri uji umur 48 jam diambil 1 koloni dengan diameter 0,5 mm, disuspensikan pada 5 ml MRSB dan divortex. Setelah homogen diinkubasi pada kondisi CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37<sup>0</sup> C, selama 3 jam. Suspensi bakteri siap diinokulasi pada media fermentasi. Kepadatan suspensi bakteri uji adalah 10<sup>6</sup> CFU/ml.

### Pembuatan larutan stok xilooligosakarida standar

Larutan stok xilooligosakarida standar dibuat dengan konsentrasi 10 % (berat/ vol), yaitu dengan menimbang 5,5 gram xilooligosakarida dan dilarutkan dalam 55 ml MRSB (deMan, Rogosa, Sharpe Broth). Diaduk sampai homogen, difilter dengan millipur 0,45 µm.

### Uji pengaruh xilooligosakarida terhadap jumlah sel *Lactobacillus casei*

Media dasar yang digunakan adalah MRSB (deMan, Rogosa, and Sharpe Broth), volume 10 ml, dengan konsentrasi xilooligosakarida 0 %, 1 %, 3 %, dan 5 %, yaitu:

0 % XOS (X0 = kontrol) : 9 ml MRSB + 1ml suspensi bakteri uji

1 % XOS (X1): 8 ml MRSB + 1 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

3 % XOS (X3): 6 ml MRSB + 3 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

5 % XOS (X5): 4 ml MRSB + 5 ml stok xilooligosakarida + 1 ml suspensi bakteri uji

Masing-masing perlakuan dibuat 6 kali ulangan dan diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37° C selama 6 , 12 , 18 dan 24 jam.

### **Penghitungan jumlah sel bakteri**

Jumlah sel bakteri uji dihitung pada masing-masing lama inkubasi (6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam), diambil 50 µl sampel hasil fermentasi, dibuat pengenceran sampai 10<sup>-10</sup> dengan NaCl 0,98 %. Dari masing-masing pengenceran diambil 20 µl, diinokulasikan pada MRS agar plate dengan metoda *drop plate*. Selanjutnya diinkubasi pada CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37° C, selama 48 jam. Jumlah koloni *Lactobacillus caseistrain Shirota* yang tumbuh dihitung dan jumlah sel *Lactobacillus caseistrain Shirota* dinyatakan dalam *colony forming unit/ml* (Log CFU/ml).

### **Pengukuran nilai derajat keasaman (pH)**

Nilai derajat keasaman (pH) diukur pada setiap perlakuan setelah inkubasi 0, 6,12, 18, dan 24 jam dengan menggunakan kertas pH universal.

### **Analisis *short chain fatty acid* (SCFA)**

Satu ml sampel hasil kultur fermentasi, disentrifus pada 7000 rpm selama 5 menit , supernatan disaring dengan milipur 0,45 µl. Supernatan yang telah disaring, diambil 0,5 µl dan diinjeksikan ke dalam sistem Kromatografi Gas. Alat Kromatografi Gas yang digunakan adalah merek Shimadzu GC 8, jenis kolom gelas ( GP 10 % SP 1200 on 1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), panjang kolom 2 meter, diameter kolom 3 mm, suhu injektor 220<sup>0</sup> C, suhu kolom 130<sup>0</sup> C,

Jenis detektor adalah *Flame Ionisation Detector* (FID), suhu detektor 220<sup>0</sup> C, dan tekanan Nitrogen (N<sub>2</sub>) sebagai gas pembawa adalah 1,3 ml/ cm<sup>2</sup> . Data dari U.V. detector diintegrasikan menggunakan paket *software Value Chrom<sup>TM</sup>*. Produksi butirrat , propionat, asetat dan laktat pada masing-masing sampel dihitung dengan kurva kalibrasi eksternal dengan menggunakan standar asam laktat, asam asetat, asam propionat dan asam butirrat.

## HASIL

### Jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*

Variabel yang diamati adalah jumlah sel yang tumbuh pada media MRS agar plate yang diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 37<sup>0</sup> C selama 48 jam, dengan inokulum berasal dari perlakuan setelah lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel (Log CFU/ml) *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan dan lama inkubasi disajikan pada **Tabel 1.** berikut ini.

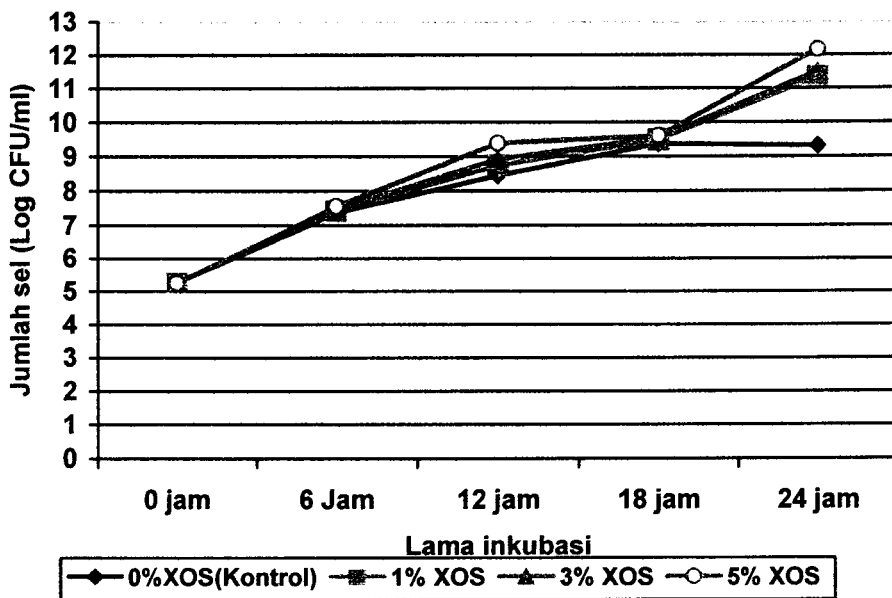
**Tabel 1.** Rata-rata jumlah sel (Log CFU/ml) dan standar deviasi *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama inkubasi 6, 12, 18, dan 24 jam (XOS = xilooligosakarida).

Lama inkubasi (jam)	0 % XOS (kontrol)	1 % XOS	3 % XOs	5 % XOS
	Rata-rata ± Std.deviasi	Rata-rata ± Std. deviasi	Rata-rata ± Std. deviasi	Rata-rata ± Std. deviasi
6	7,397 ± 0,0109	7.452 ± 0,0036	7,494 ± 0,0563	7,588 ± 0,0029
12	8,468 ± 0,0369	8,762 ± 0,0219	8,948 ± 0,0125	9,235 ± 0,0101
18	9,397 ± 0,0216	9,507 ± 0,0249	9,564 ± 0,0099	9,625 ± 0,0211
24	9,334 ± 0,0104	11,352 ± 0,0159	11,523 ± 0,0428	12,185 ± 0,0145

Hasil analisis varians dua arah (*two way anova*) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh langsung antara perlakuan dan lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam, terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*. Perlakuan memberikan nilai F hitung sebesar 110256,339 dan sangat signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini berarti ada perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* antar perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida. Lama waktu inkubasi memberikan nilai F hitung sebesar 137256,4 juga sangat signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini berarti terdapat perbedaan rata-rata jumlah *Lactobacillus casei strain Shirota* antar lama waktu inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Hasil interaksi antar perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam memberikan nilai F hitung sebesar 4585,011 dan signifikan pada  $\alpha = 0,05$ . Hal ini berarti terdapat pengaruh interaksi antara perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama inkubasi terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*, dengan nilai Adjusted R Squared sebesar 1,000 berarti



variabilitas jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* yang disebabkan oleh perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida, lama inkubasi dan interaksi antara perlakuan berbagai konsentrasi xilooligosakarida dan lama waktu inkubasi adalah sebesar 100 %. Hubungan interaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 1, dimana peningkatan konsentrasi xilooligosakarida dan bertambahnya lama waktu inkubasi menyebabkan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* semakin meningkat pula.



**Gambar 1.** Grafik rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan dan lama inkubasi 0, 6, 12, 18, dan 24 jam.

Selanjutnya untuk membandingkan efek setiap perlakuan dan lama inkubasi terhadap rata-rata jumlah *Lactobacillus casei strain Shirota*, analisis dilanjutkan dengan uji *Least Significance Difference* (LSD), yang hasilnya disajikan pada **Tabel 2** dan **Tabel 3**.

**Tabel 2.** Hasil Uji *Least Significance Difference* (LSD) perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan (XOS = Xilooligosakarida)

Perlakuan	0% XOS (Kontrol)	1% XOS	3% XOS	5% XOS
0% XOS(Kontrol)		0.618 *	0,732 *	1,008*
1% XOS				0,390 *
3% XOS				0.276 *
5% XOS				

\* : Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$ .

Hasil uji LSD pada tabel 2. menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan penambahan xilooligosakarida 1%, 3%, 5% berbeda nyata dengan kontrol (0% XOS) ( $P < 0,05$ ). Demikian pula antara perlakuan 1% XOS, 3% XOS dan 5% XOS juga berbeda nyata.

**Tabel 3.** Hasil Uji *Least Significance Difference* (LSD) perbedaan rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada lama inkubasi.

Lama Inkubasi	6 jam	12 jam	18 jam	24 jam
6 jam		1,370 *	2,040 *	3,616*
12 jam			0,670*	2,246 *
18 jam				1,576*
24 jam				

\* Berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$ .

Hasil uji LSD lama inkubasi terhadap rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada Tabel 3, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara rata-rata jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam pada  $\alpha = 0,05$ .

#### Produksi SCFA (*Short chain fatty acid*)

Kadar dan jenis asam organik yang terbentuk yaitu asam laktat, asam asetat, asam propionat, asam butirrat (SCFA = *short chain fatty acid*) dianalisis menggunakan kromatografi gas (KG). Variabel yang diamati adalah produksi asam laktat, asam asetat, asam propionat

dan asam butirat pada lama inkubasi 12 jam. Hasil analisis SCFA dengan kromatografi gas disajikan pada **Tabel 4**.

**Tabel 4.** Hasil analisis asam laktat, asam setat, asam propionat dan asam butirat dengan kromatografi gas pada lama inkubasi 12 jam.

No.	Kode Sampel	M a c a m A n a l i s a			
		Asam Laktat %	Asam Asetat %	Asam Propionat %	Asam Butirat %
1.	X0-12	0,518	0,276	0,022	0,011
2	X1-12	0,669	0,384	0,0003	0,001
3	X3-12	0,836	0,219	0,029	0,002
4	X5-12	0,855	0,251	0,012	0,001

Keterangan: X0 -12 : Media MRSB (kontrol) pada 12 jam

X1 -12 : Media MRSB + 1 % xilooligosakarida pada 12 jam

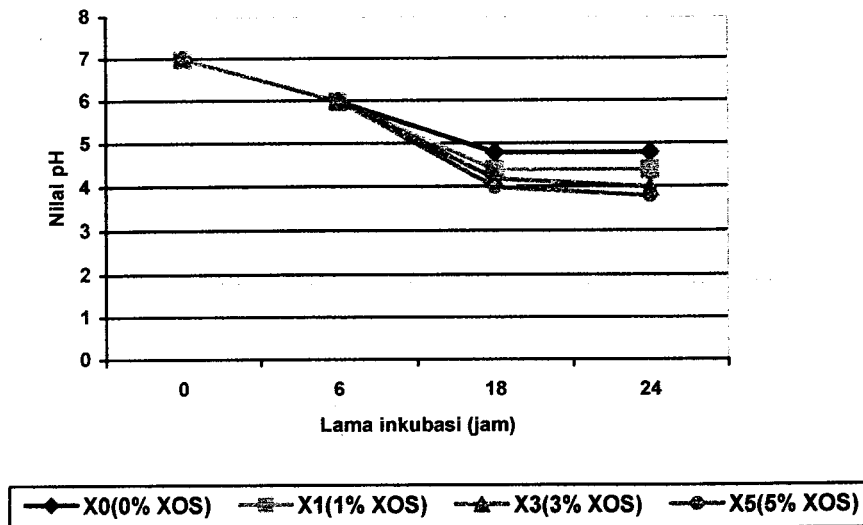
X3 -12 : Media MRSB + 3 % xilooligosakarida pada 12 jam

X5 -12 : Media MRSB + 5 % xilooligosakarida pada 12 jam

Pada **Tabel 4**. terlihat bahwa kadar asam laktat setelah inkubasi 12 jam pada perlakuan penambahan xilooligosakarida 1% (X1-12), 3% (X3-12), dan 5% (X5-12) lebih tinggi dibanding kontrol 0% (X0-12). Penambahan xilooligosakarida 5 % (X5-12) memberikan jumlah produksi asam laktat 0,8545 lebih tinggi dibanding dengan jumlah produksi asam laktat semua perlakuan. Sedangkan produksi asam asetat , asam propionat, dan asam butirat juga berbeda-beda untuk semua perlakuan.

#### **Derajat keasaman (pH)**

Nilai derajat keasaman (pH) sebelum inkubasi adalah 7,0 menurun sejalan bertambahnya waktu inkubasi. Rata-rata nilai pH pada perlakuan dan lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam, disajikan dalam grafik garis pada gambar 2.



**Gambar 2.** Grafik nilai pH setiap perlakuan pada lama inkubasi 0, 6, 12, 18, dan 24 jam.

Dari **Gambar 2**, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama waktu inkubasi maka nilai pH semakin rendah. Nilai pH pada lama inkubasi 6 jam, untuk kontrol maupun pada perlakuan penambahan xilooligosakarida standar 1%, 3 %, dan 5% mempunyai nilai yang sama yaitu 6,0. Hal ini berarti tidak ada perubahan nilai pH untuk semua perlakuan pada lama inkubasi 6 jam. Nilai pH dengan lama inkubasi 12 jam pada kontrol tanpa penambahan xilooligosakarida adalah 5,6 dan terus menurun sampai 4,2 pada lama inkubasi 24 jam. Pada perlakuan penambahan xilooligosakarida standar 1%, nilai pH adalah 5 dan turun menjadi 4,4 pada lama inkubasi 18 jam dan 4,2 pada inkubasi 24 jam. Sedangkan perlakuan penambahan xilooligosakarida standar 3%, nilai pH pada inkubasi 12 jam adalah 5,0 menurun sampai 4,0 pada lama inkubasi 24 jam. Demikian pula untuk perlakuan penambahan 5% xilooligosakarida nilai pH adalah 4,8 dan menurun sampai 3,8 pada lama inkubasi 24 jam. Hal ini berarti ada perbedaan rata-rata nilai pH pada perlakuan dan lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Dari gambar 2. diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama waktu inkubasi maka nilai pH semakin rendah.

## PEMBAHASAN

Sebagaimana makhluk hidup dan jenis mikroba lainnya, *Lactobacillus casei* strain *Shirota* memerlukan nutrisi untuk pertumbuhannya, baik makronutrien maupun mikronutrien. Karbon merupakan salah satu jenis makronutrien. Untuk organisme autotrof dapat menggunakan CO<sub>2</sub> atau karbonat sebagai satu-satunya sumber karbon sedangkan organisme heterotrof, disamping menggunakan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon, juga membutuhkan satu

atau lebih zat organik misalnya glukosa, asam amino dan mineral. *Lactobacillus casei strain Shirota* adalah salah satu jenis bakteri heterotrof yang memanfaatkan golongan karbohidrat misalnya Oligosakarida dan *dietary fiber* sebagai salah satu sumber karbonnya (Purwoko,2007; Irianto, 2006). Penggunaan xilooligosakarida sebagai media tambahan pada media dasar MRSB (*deMan Rogosa Sharp Broth*) bermanfaat sebagai sumber nutrisi tambahan untuk pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota*. Pada kontrol, tanpa penambahan xilooligosakarida (0% XOS), jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* meningkat pada lama inkubasi 6 dan 12 jam, namun pada lama inkubasi 18 sampai 24 jam pertambahan jumlah sel hampir sama bahkan tetap. Hal ini disebabkan pada lama inkubasi 6 dan 12 jam *Lactobacillus casei strain Shirota* mengalami fase eksponensial atau fase logaritmik dalam pertumbuhannya, dimana pada fase eksponensial ini pembelahan sel berlangsung cepat, massa menjadi dua kali lipat. Sedangkan pada lama inkubasi 18 dan 24 jam, pertumbuhannya telah masuk dalam fase stasioner, dimana pada fase ini pertumbuhan mulai diperlambat dan akhirnya mengalami jumlah bakteri yang berbiak sama dengan jumlah bakteri yang mati dan pada kurva pertumbuhan fase ini menunjukkan garis yang hampir horizontal. Keadaan ini disebabkan semakin berkurangnya persediaan nutrisi, akumulasi metabolik toksik misalnya bakteriosin, dan asam-asam organik, serta perubahan pH yang menjadi asam.

Penambahan xilooligosakarida dengan konsentrasi 1 %, 3 %, dan 5% pada media dasar MRSB (*deMan, Rogosa, and Sharp Broth*) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* dibanding kontrol, dan pada hasil aktifitas metabolismenya memproduksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat (*Short Chain Fatty Acid = SCFA*). Hal ini disebabkan xilooligosakarida yang mengandung senyawa karbon digunakan oleh *Lactobacillus casei strain Shirota* sebagai sumber nutrisi dalam proses metabolisme, sehingga dengan meningkatnya metabolisme maka, meningkat pula energi yang dihasilkan untuk pembelahan sel dan mengakibatkan bertambahnya jumlah sel. Hal ini sesuai dengan apa yang dikemukakan oleh Rowland dan Wise (1985) bahwa, *Lactobacillus casei* merupakan salah satu jenis mikroflora dominan pada usus manusia, dimana mikroflora usus mendapatkan substrat pertumbuhannya dari diet misalnya oligosakarida, serat makanan, dan protein yang belum sempat tercerna sampai di usus, serta dari sumber endogen misalnya musin yaitu penyusun klikogen utama dari mukus yang melapisi dinding saluran cerna. Macfarland dan Macbain (1990) mengemukakan bahwa bakteri dalam jumlah besar di usus utamanya di kolon adalah bakteri anaerob yang memperoleh energi dari proses fermentasi, dimana bahan utama fermentasi tersebut adalah

makanan yang masuk berupa karbohidrat yang sulit dicerna misalnya *starch*, polisakarida *non-starch*, oligosakarida dan serat tumbuhan.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa, pada perlakuan penambahan xilooligosakarida memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap pertumbuhan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* berturut-turut dari konsentrasi 5%, 3 %, dan 1 %, baik pada lama inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Dan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi maka jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota* pada setiap perlakuan juga mengalami peningkatan. Hal ini disebabkan penambahan xilooligosakarida memberikan persediaan nutrisi yang lebih, utamanya sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme sel. Sehingga walaupun pada lama inkubasi 18 dan 24 jam merupakan fase stasioner bagi pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota*, namun dengan tersedianya sumber karbon yang cukup menyebabkan masih meningkatnya proses metabolisme, yang mengakibatkan masih meningkatnya jumlah sel. Namun jika persediaan nutrisi berkurang maka aktivitas metabolisme juga akan menurun, dan jumlah sel pun akan berkurang, dan akhirnya akan mengalami kekurangan nutrisi, terakumulasinya senyawa-senyawa toksik yang dihasilkan oleh bakteri yang menyebabkan kematian bagi sel-sel bakteri (Purwoko, 2007). Hal ini sesuai dikemukakan oleh Kailasapathy dan Chin (2000) bahwa kehadiran karbohidrat terbukti meningkatkan survivabilitas *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* secara *in vitro*. Oligosakarida tertentu misalnya fruktooligosakarida telah dilaporkan mampu menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus* dan bakteri usus tertentu dan mempunyai dampak fisiologis menguntungkan bagi kesehatan tubuh (Fuller dan Gibson, 19980).

Macfarlane *et al.*(1992), mengemukakan bahwa fermentasi karbohidrat adalah sumber energi utama bagi mikroflora usus misalnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, namun seiring dengan pergerakan bahan cerna disepanjang distal kolon, ketersediaan karbohidrat akan berkurang, hingga protein dan asam amino akan menjadi sumber energi metabolik dominan untuk bakteri di daerah distal kolon. Hal ini akan menyebabkan meningkatnya bakteri merugikan (patogen) di usus sebab protein dan asam amino adalah merupakan sumber nutrisi utama bagi bakteri merugikan (patogen). Oleh karena itu diet karbohidrat yang sulit dicerna tetap dibutuhkan untuk menjaga keseimbangan mikroflora di usus, yang akhirnya memunculkan konsep prebiotik.

Pada produksi SCFA, pemanfaatan xilooligosakarida tersebut akan didegradasi oleh enzim  $\beta$ -xilosidase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus casei strain Shirota* menjadi xilosa. Selanjutnya xilosa yang merupakan pentosa melalui fermentasi mengalami proses glikolisis menjadi asam piruvat. Dalam proses metabolisme selanjutnya asam piruvat akan diubah

menjadi asam laktat, asam asetat, asam propionat, asam butirat (SCFA) dan gas. Hal ini dikarenakan *Lactobacillus casei strain Shirota* merupakan kelompok jenis bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif fakultatif, yang berarti bakteri ini dapat bersifat heterofermentatif (homolaktat) maupun homofermentatif (heterolaktat). Bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dapat memproduksi asam laktat sebagai produk mayoritas dari fermentasi karbohidrat dan sebagian kecil asetat melalui jalur heksosa difosfat (HDP) atau disebut juga *Embden – Meyerhoff Pathway*. Sedangkan bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif dapat menghasilkan laktat dari fermentasi karbohidrat melalui jalur heksosa monofosfat (HMP) atau biasa juga disebut jalur fosfoketolase atau jalur pentosa fosfat atau jalur *warburg dicken*. Dalam hal ini karena kuman *Lactobacillus casei strain Shirota* bersifat heterofermentatif fakultatif, maka dalam proses metabolismenya dapat menghasilkan asam laktat melalui kedua jalur fermentasi tersebut. Brock dan Madigan (1991) bahwa asam laktat yang terbentuk pada proses fermentasi sebagian besar diubah menjadi asam asetat, asam propionat dan butirat melalui jalur asetil-KoA.

Hasil analisis menunjukkan bahwa hasil metabolit *Lactobacillus casei strain Shirota*, baik kontrol maupun pada perlakuan penambahan xilooligosakarida pada media MRSB (*deMan, rogosa, and Sharp Broth*) mengandung asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Namun pada perlakuan dengan penambahan xilooligosakarida memperlihatkan jumlah asam laktat yang lebih banyak dibanding kontrol. Hal ini menunjukkan penggunaan xilooligosakarida pada penelitian ini dapat meningkatkan aktivitas metabolisme *Lactobacillus casei strain Shirota* sehingga mampu memproduksi SCFA lebih banyak dibanding kontrol. Sebagaimana yang dikemukakan oleh cummings (1995), di dalam usus, karbohidrat utamanya oligosakarida dan *dietary fiber* akan difermentasi oleh bakteri asam laktat misalnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* menjadi asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid*=SCFA) terutamanya laktat, asam asetat, propionat dan butirat, serta sejumlah metabolit lainnya seperti etanol, suksinat, gas CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> dan H<sub>2</sub>S (Levit *et al.*, 1995). Wang dan Gibson (1993) bahwa produksi SCFA dan gas merupakan produk dari aktivitas mikroflora pada fermentasi, namun pola untuk menghasilkan produk ini, oleh masing-masing mikroflora berbeda dan masih banyak yang belum diketahui.

Efek produksi SCFA dan peningkatan jumlah bakteri menguntungkan antara lain adalah meningkatkan fungsi usus, absorpsi kalsium, metabolisme lipid dan mengurangi resiko kanker kolon (Cycroft *et al*, 2001). Menurut cumming (1995), manfaat SCFA terhadap kesehatan, antara lain adalah SCFA yang dihasilkan oleh fermentasi bakteri baik, diabsorpsi oleh mukosa usus dan berperan dalam pemenuhan kebutuhan energi inang. Asam laktat akan

menjadikan kondisi usus menjadi asam sehingga bakteri patogen yang tidak tahan asam akan mati, asetat akan dimetabolisir pada sel otot, ginjal, jantung dan otak. Propionat merupakan prekursor glukoneogenik yang menekan sintesis kolesterol dalam hati. Hal ini dibuktikan dengan percobaan *in vitro* oleh Pereira *et al.*, (2003) terhadap penurunan kadar kolesterol yang disebabkan tingginya kadar propionat oleh *Lactobacillus fermentum*. Naruszewicz *et al.* (2002) membuktikan bahwa *Lactobacillus plantarum* dapat menurunkan tekanan darah, fibrinogen dan kolesterol LDL serta menaikkan kolesterol HDL. Sedangkan butirir merupakan sumber energi utama untuk kolonisasi, dimana butirir dimetabolisir oleh epitel kolon dan berfungsi sebagai regulator pertumbuhan dan diferensiasi sel. Disamping itu butirir memegang peranan penting dalam mencegah kanker (Topping and Clifton, 2001; Kruh, 1982).

Rata-rata nilai derajat keasaman (pH), nilai pH pada awal fermentasi untuk semua perlakuan adalah sama 7,0 dan secara umum pH menurun sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Perubahan pH disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik yang berifat asam utamanya asam laktat. Sebagaimana dikemukakan oleh Alvarez-Olmas dan Oberhelman (2001) bahwa dalam fermentasi karbohidrat oleh bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik seperti laktat dan asetat yang membuat asam pH disekitarnya, sehingga organisme patogen tidak mampu hidup. Dengan demikian perubahan pH menjadi asam akan menyebabkan efek antimikroba bagi mikroba patogen, sebaliknya bakteri asam laktat masih dapat hidup dalam suasana asam dengan pH optimum 3 – 8 (Djaafar dkk.(1996). Mekanisme lain dari sifat antimikroba ini bahwa bakteri asam laktat juga menghasilkan peptida antimikroba misalnya bakteriosin, dimana bakteriosin mempunyai sifat daya hambat karena polipeptidanya mampu bergabung dengan protei-protein lapisan membran sel, sehingga membran sel tidak dapat berfungsi dengan baik dalam hal menyeleksi molekul-molekul keluar masuk sel (Anderssen *et al.*,1998). Apajalahati *et al.* (2002), membuktikan bahwa pemberian inulin pada diet tikus, mengakibatkan peningkatan jumlah bakteri caecum dan peningkatan SCFA, sehingga terjadi reduksi pH.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Penambahan xilooligosakarida pada media MRSB (*deMan Rogosa Sharp Broth*) dengan konsentrasi 1 %, 3 %, dan 5 % , memberikan efek yang signifikan terhadap penambahan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*.



2. Aktifitas pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota* pada perlakuan dengan penambahan xilooligosakarida mampu memproduksi asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat (*Short chain fatty acid* = SCFA) sehingga menyebabkan penurunan nilai pH pada media.
3. Penambahan 5 % xilooligosakarida pada media MRSB (deMan Rogosa Sharp Broth) dengan lama inkubasi 24 jam memperlihatkan hasil yang terbaik terhadap peningkatan jumlah sel *Lactobacillus casei strain Shirota*
4. Hasil Penelitian ini membuktikan bahwa xilooligosakarida cukup prospektif untuk diaplikasikan sebagai prebiotik.

### Saran

1. Perlunya mengadakan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk membuktikan efek xilooligosakarida dengan konsentrasi terbaik pada pertumbuhan *Lactobacillus casei strain Shirota* yang ditemukan dalam penelitian ini. Dan perlu membuktikan efeknya terhadap pertumbuhan bakteri patogen baik secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk mempertimbangkan penggunaannya sebagai bahan prebiotik.
2. Perlunya mengadakan penelitian lebih lanjut tentang efek xilooligosakarida terhadap jumlah produksi SCFA oleh jenis bakteri usus yang lain baik bakteri menguntungkan maupun bakteri patogen, secara *in vitro* maupun secara *in vivo*.
3. Perlunya penelitian lebih lanjut tentang efek SCFA baik secara *in vitro* maupun terhadap hewan coba bahkan penerapan efeknya pada manusia.
4. Perlu melakukan penelitian tentang jenis dan kadar butanol dan gas yang dihasilkan selama fermentasi xilooligosakarida oleh bakteri *Lactobacillus casei* ataupun oleh jenis bakteri lainnya.

### KEPUSTAKAAN

- Alonso JL, Vaquez MJ, Dominguez H, Parajo JC., 2001, Xilooligosaccharides: Manufacture and Application, *J. Food Science and Technology*, 11:387 – 93.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H. and Nissen-Meyer, J., 1998, Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2269–2272.
- Apajalahti, J. H., Kettunen, H., Kettunen, A., Holben, W. E., Nurminen, P. H., Rautonen, N. and Mutanen, M., (2002, Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4986–4995.

- Cummings JH & Macfarlane GT, 1991 The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 443-459.
- Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN, 2001, Prebiotic Digestion and Fermentabilitation, *American Journal of clinical nutrition*, 73(2): 415S – 20S.
- Dominguez Herminia, Alanso JL, Garrote Gil, Carlos Juan, 2003, Xilooligosaccharides: Propertis and Technologies, *Electron Journal Environ. Agric Food Chem*;2(1): 1579-4377.
- Fuller, R. and Gibson, G. R. ,1998, Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clincinal Microbiology and Infection*, 4:477–480.
- Gibson GR & Roberfroid MB, 1995, Dietary Modulation of the Human colonic microbiota: Introducing the Concept of Prebiotic. *Journal of Nutrition* 125: 1401-12.
- Irianto Koes, 2002, Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganism, CV.Irama Widya, Bandung.
- Kruh, J. ,1982, Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent on cells in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 42: 65–82.
- Macfarlane GT, Gibson GR & Cummings JH ,1992, Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon, *Journal of Applied Bacteriology*, 72:57 - 64.
- MacFarlane GT, Cumming JH, 1999; Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br.Med.J.* 318: 999-1003.
- Purwoko Tjahjadi, 2007, Fisiologi Mikroba, Bumi Aksara, Jakarta.
- Sullivan A, Nord CE, 2002; Probiotic in human infections, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 625-627.
- Tomomatsu H ,1994, Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* October issue, 61-65.
- Topping, D. L. and Clifton, P. M., 2001, Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81, 1031–1064.
- Wang X, Gibson GR., 1993, Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol*,75:373–80.