

SKRIPSI

IDENTIFIKASI ENZIM SELULASE ASAL RAYAP (*Macrotermes Sp.*)

DENGAN TEKNIK SDS-PAGE DAN *DOT BLOT*

KH 97/06

Cor.

1



Oleh :

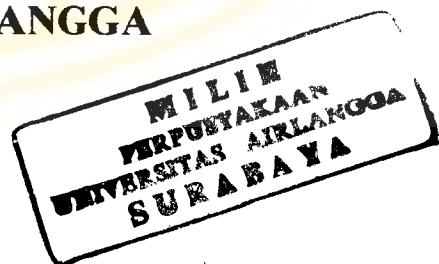
NUGROHO DEDY CAHYONO
SURABAYA – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2005



**IDENTIFIKASI ENZIM SELULASE ASAL RAYAP (*Macrotermes Sp.*)
DENGAN TEKNIK SDS-PAGE DAN *DOT BLOT***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

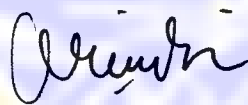
Oleh

NUGROHO DEDY CAHYONO

NIM 060233093

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Arimbi, M.Kes., drh.

Pembimbing Pertama



Adriana M. Sahidu, M.Kes., Ir

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN

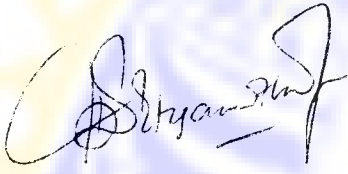
Menyetujui

Panitia Penguji,



Dr. Fedik Abdul Rantam., drh

Ketua



Setiawati Sigit, M.S., drh



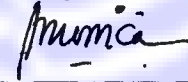
Widya Paramita L., M.P., drh

sekretaris


Arimbi, M.Kes., drh.

Anggota

Anggota



Adriana M. Sahidu, M.Kes., Ir

Anggota

Surabaya, 20 Mei 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.

NIP 130687297

**IDENTIFIKASI ENZIM SELULASE ASAL RAYAP (*Macrotermes Sp.*)
DENGAN TEKNIK SDS-PAGE DAN *DOT BLOT***

NUGROHO DEDY CAHYONO

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi enzim selulase asal rayap (*Macrotermes Sp.*) dengan teknik SDS-PAGE dan *Dot blot*.

Enzim selulase didapatkan dengan cara mengambil cairan perut rayap (*Macrotermes Sp.*) selanjutnya di analisis dengan menggunakan uji SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Electrophoresis*) 15% dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat (AgNO_3) dan uji *Dot Blot*, Kemudian diidentifikasi proteinnya berdasarkan berat molekul (BM) dengan SDS-PAGE dan di analisis reaktivitasnya dengan *Dot blot*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim selulase asal rayap memiliki berat molekul 181,6; 78,5; 53,2; 37,5; 32,3; 23,7; 19,7; 13,6 dan 5,7 kDa dan enzim selulase asal rayap mempunyai reaktivitas terhadap antibodi anti selulase dengan konsentrasi 1/100 dan titer sebesar 5120.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala taufik dan hidayahNya, karena hanya limpahan rahmat, berkah dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan yang berjudul “Identifikasi Enzim Selulase Asal Rayap (*Macrotermes Sp.*) Dengan SDS-PAGE dan *Dot blot*” penulis mencoba untuk mengetahui berat molekul enzim selulase yang ada dalam saluran pencernaan rayap dan reaktivitas enzim selulase sehingga nantinya bisa dijadikan acuan bagi penelitian selanjutnya. Enzim selulase ini bisa dimanfaatkan untuk memperbaiki pencernaan hewan ruminansia, terutama dalam mendegradasi serat kasar.

Dalam penulisan ini penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Arimbi, M.Kes., Drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Adriana M. Sahidu, M.Kes., Ir. selaku dosen pembimbing kedua yang telah membimbing dan memberikan masukan-masukan yang penting sehingga skripsi ini dapat tersusun.

3. Dr. Fedik A. Rantam, Drh., Setiawati Sigit, M.S., Drh., Widya Paramita L., M.P., Drh. Selaku dosen penguji yang telah memberi kritik, saran dan pengarahan dalam penulisan skripsi ini.
4. M. Anam Al-arif. M.P., Drh., yang telah memberikan kepercayaan dan kesempatan ikut dalam penelitian DUE-LIKE BATCH III dan bimbingan secara langsung dalam menyelesaikan penelitian.
5. Suwarno, MSi., Drh., dan Kusnoto, Msi., Drh. atas segala bantuan pikiran dan tenaganya dalam proses penelitian.
6. Ketua Bagian Mikrobiologi dan seluruh staf Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
7. Helen Susilowati A.Md. karyawan Laboratorium *Dengue Haemorrhagic fever* (DHF) TDC Unair yang telah banyak membantu penulis dalam teknik uji SDS-PAGE.
8. Kedua Orang tua-ku Bapak Sugito dan Ibunda Dwi Sulistyani atas segala pengorbanan seluruh jiwa, raga dan hidupnya yang tak ternilai dengan apapun juga, serta adikku Yudi, Fajrin atas segala dorongan moral dan semangat selama penulis menempuh studi.
9. Dini, Astrid dan Rere atas bantuan dan kerjasamanya sehingga penulis bisa menyelesaikan penelitian ini.
10. Sahabat-sahabatku Matrikulasi '98 dan '99 dan teman-teman FKH '01 atas dukungan, saran dan kritiknya.
11. Irma H. yang telah memberikan perhatian dan dukungannya.

12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu secara langsung maupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian dari awal hingga terselesainya tulisan ini.

Penulis sepenuhnya menyadari masih banyak terdapat kekurangan mengingat terbatasnya pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki oleh karena itu saran dan kritik yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kepada Allah SWT semoga kebaikan yang tak ternilai tersebut mendapat balasan dariNya. Semoga tulisan ini dapat berguna bagi pembaca.

Surabaya, Mei 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Rayap.....	7
2.1.1 Klasifikasi.....	7
2.1.2 Kasta Rayap.....	9
2.1.3 Siklus Hidup.....	11
2.1.4 Jenis Rayap.....	13
2.1.5 Saluran Pencernaan Rayap.....	14
2.2 Selulosa.....	16
2.3 Enzim Selulase.....	18
2.4 SDS-PAGE.....	22
2.5 Dot Blot.....	23

BAB III. MATERI DAN METODE.....	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.2 Langkah-langkah Penelitian.....	24
3.3 Jenis Penelitian.....	24
3.4 Materi Penelitian.....	25
3.4.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	25
3.5 Metode Penelitian.....	26
3.5.1 Preparasi Enzim Selulase.....	26
3.5.2 Pembuatan Antibodi Anti selulase.....	27
3.5.3 Analisis Enzim selulase SDS-PAGE 15 %.....	27
3.5.4 Analisis Enzim Selulase dengan <i>Dot blot</i>	32
3.5.5 Analisis Data.....	32
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	33
4.1 Analisis Enzim Selulase dengan SDS-PAGE.....	33
4.2 Analisis Enzim Selulase dengan Dot Blot.....	34
BAB V. PEMBAHASAN.....	36
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
RINGKASAN.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Klasifikasi Rayap.....	8
Gambar 2.2 Siklus Hidup Rayap.....	12
Gambar 2.3 Saluran Pencernaan Rayap.....	15
Gambar 2.4 Struktur Selulosa.....	17
Gambar 2.5 Mekanisme Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatis.....	19
Gambar 2.6 Mekanisme Hidrolisis Enzimatis Terhadap Selulosa.....	20
Gambar 4.1 Hasil Preparasi Protein Enzim Selulase dari Enzim Selulase Murni dan Rayap dengan Teknik SDS-PAGE.....	33
Gambar 4.2 Hasil Uji Enzim Selulase Menggunakan <i>Dot Blot</i>	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Bagan Alir Penelitian.....	47
2. Penentuan Rumus Persamaan untuk Menghitung Berat Molekul (BM) Sampel.....	48
3. Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Selulase asal Rayap Dengan Teknik SDS-PAGE.....	49
4. Nilai <i>Optical Density</i> dan Titer Antibodi Hasil Pengujian Antibodi Anti selulase Kelinci Yang Diuji Dengan Teknik <i>Indirect</i> ELISA.....	50
5. Mandibel Kasta Prajurit Rayap <i>Macrotermes Sp.</i>	51

BABI

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Ketersediaan pakan sepanjang tahun merupakan persyaratan mutlak bagi kelangsungan usaha peternakan. Biaya untuk menyediakan pakan ini menempati posisi terbesar dalam biaya produksi, mencapai 60-80 %. Besarnya biaya tersebut ditentukan oleh jenis dan bangsa ternak yang dikembangkan (Haryanto, 2005).

Pada saat ini kebutuhan pakan dalam negeri semakin meningkat sementara itu hijauan yang merupakan sumber pakan ternak ruminansia semakin terbatas, sehingga perlu dicari alternatif lain yang lebih ekonomis sebagai pakan pengganti yaitu produk samping pertanian. Indonesia merupakan negara agraris yang memiliki produk samping pertanian yang cukup banyak dan tersedia sepanjang tahun, namun pemanfaatan produk samping pertanian tersebut untuk bahan pakan ternak ruminansia belum optimal. Produk samping pertanian tergolong bahan pakan yang berkualitas rendah karena kandungan protein kasarnya yang rendah dan kandungan serat kasarnya yang tinggi (Setyabudi, 2002).

Ternak ruminansia seperti sapi, kerbau, domba dan kambing merupakan ternak herbivora yang memiliki sistem pencernaan yang berbeda dengan ternak non ruminansia (unggas dan babi). Sistem pencernaan ternak ruminansia dapat memanfaatkan pakan berserat tinggi menjadi produk yang bergizi tinggi. Menurut Arora (1989), di dalam rumen ruminansia terdapat

mikrobia penghasil enzim selulolitik, tetapi jumlahnya terbatas karena pemberian nitrogen yang terdapat dalam pakan terbatas sehingga tidak semua mikrobia mampu berkembang biak di dalam rumen. Mikrobia yang terlibat dalam perombakan serat pakan tersebut adalah bakteri selulolitik dan fungi fibrolitik (Ensminger *et al.*, 1990). Tingkat kemampuan ternak untuk merombak serat kasar sangat tergantung pada konsentrasi dan jumlah enzim yang dihasilkan oleh mikrobia tersebut, karena itu penambahan enzim selulase akan sangat membantu pencernaan proses pemecahan serat kasar. Hino *et al.* (2000) menyatakan bahwa penambahan enzim selulase dapat memperbaiki pencernaan serat kasar pada sapi potong terutama sapi yang diberi ransum tinggi konsentrat.

Penggunaan enzim selulase untuk pengolahan pakan ternak di Indonesia masih jarang karena selain harganya yang tergolong mahal, enzim selulase yang diproduksi secara komersial ini masih harus di impor dari beberapa negara (Hafidawati, 1996), sehingga perlu dicari sumber enzim selulase yang mudah dan murah yang berasal dari hewani, salah satunya rayap.

Rayap mempunyai kemampuan untuk mencerna kayu. Hal ini disebabkan di dalam saluran pencernaan hewan tersebut terdapat mikrobia pencerna selulosa. Menurut Amir (1984) rayap *Macrotermes sp.* membutuhkan bakteri dan jamur di dalam saluran pencernaannya untuk merubah selulosa menjadi zat makanan yang dapat dicerna melalui proses enzimatik dengan bantuan enzim selulase. Hasan (1986) menyatakan bahwa

hanya sub famili *Macrotermitinae* saja yang memelihara atau membiakkan jamur di dalam sarangnya. Kemampuan mikrobial di dalam saluran pencernaan rayap dalam menghidrolisis selulosa lebih tinggi dibandingkan dengan sapi. Mikroba rumen dalam waktu 48 jam hanya dapat menghidrolisis selulosa sebesar 60-65%, sedangkan rayap tingkat rendah (*lower termite*) mampu menghidrolisis selulosa kayu lebih dari 90% (Breznak dan Brune, 1994).

Murashima *et al.* (2002) menyatakan untuk mendegradasi kristal selulosa menjadi glukosa dibutuhkan tiga macam enzim yang bekerja secara sinergis yaitu endoglukanase (*endo-1,4- β -glucanase*), eksoglukanase atau selobiohidrolase (*ekso-1,4- β -glucanase*) dan β -glukosidase. Beberapa jenis bakteri seperti *Clostridium*, *Acetovibrio*, *Ruminococcus*, *Streptomyces*, *Microspora*, dan *Cellulomonas* menghasilkan sejumlah endoglukanase dan selobiohidrolase (Tenkanen. *et al.*, 2003). Menurut Gong dan Tsao (1979) beberapa jenis jamur mampu memproduksi kompleks enzim selulase secara lengkap yaitu endoglukanase, selobiohidrolase dan β -glukosidase. Tiga spesies jamur *Trichoderma* yaitu *T. viride*, *T. reesei* dan *T. harzianum* dapat memproduksi enzim endoglukanase, eksoglukanase dan selobiose (Zaldivar *et al.*, 2001). Pada enzim selulase yang dihasilkan oleh genus *Trichoderma*, enzim selobiohidrolase merupakan komponen yang terbanyak (Gong dan Tsao, 1979).

Hal inilah yang mendorong peneliti untuk melakukan penelitian mengenai identifikasi enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan

rayap. Diharapkan dengan diketahui berat molekul dan reaktivitas enzim selulase tersebut dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya dalam mengembangkan suatu sumber enzim pencerna selulosa bagi ternak ruminansia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang ada, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah enzim selulase asal rayap (*Macrotermes Sp.*) dapat diketahui berat molekulnya?
2. Apakah enzim selulase asal rayap (*Macrotermes Sp.*) mempunyai reaktivitas terhadap antibodi spesifik?

1.3 Landasan Teori

Rayap dikenal sebagai serangga pemakan kayu dan bahan berselulosa lainnya, untuk mencerna bahan selulosa yang berasal dari kayu diperlukan enzim selulase yang dapat memecah molekul selulosa menjadi glukosa. Alat pencernaan rayap tidak menghasilkan enzim selulase ini. Adanya enzim selulase berasal dari mikroba yang hidup secara simbiosis mutualisme di dalam saluran pencernaan rayap (Nandika dkk., 2003).

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat diproduksi secara intraseluler atau ekstraseluler. Enzim eksoselulase (ekstraseluler) disekresi oleh tubuh mikroba sehingga terdapat dalam keadaan bebas dalam saluran

pencernaan hewan, sedangkan endoselulase (intraseluler) terdapat dalam tubuh mikroba dan secara in-vitro harus dikeluarkan dengan jalan sonikasi (Judoamidjojo dkk., 1989)

Keuntungan utama yang diperoleh dengan cara sonikasi adalah integritas organel interseluler dapat dipertahankan, dengan demikian bila protein yang diinginkan hanya terdapat pada organel tertentu seperti nukleus, mitokondria atau lisosom, atau terikat pada plasma membran, cara pemurnian dapat dilakukan dengan memisahkan fraksi dari organel itu, sebelum melepaskan protein yang dituju (Sutiman dkk., 1995).

Protein sudah murni hanya dapat secara pasti ditetapkan setelah melakukan *sequencing* (pemetaan susunan asam amino protein tersebut) namun demikian, prosedur analitik yang cukup sederhana dapat dipergunakan untuk mengukur derajat kemurnian protein. Cara yang paling umum untuk pengukuran kemurnian tersebut adalah SDS-PAGE, yang dapat dikerjakan dengan cepat dan sensitif dalam memisahkan polipeptida berdasarkan perbedaan ukurannya. Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-Komplek migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya. Ada dua sistem pada SDS yaitu Kontinyu (*Weber and Osbon*) dan diskontinyu (*Laemmli*). Pada sistem kontinyu campuan protein dilapiskan pada bagian atas dari (*bands* pada bagian atas dari

separating gel). Sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Sedang pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada garis tipis berupa pita atau *band* yang tipis (Rantam, 2003).

Metode *dot blot* dikembangkan untuk semiquantitatif pada uji imun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen diteteskan pada membran yang dilabel dengan antibodi (Rantam, 2003).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Mengetahui berat molekul enzim selulase asal rayap (*Macrotermes Sp.*) dengan teknik SDS-PAGE.
2. Mengetahui reaktivitas enzim selulase asal rayap (*Macrotermes Sp.*) terhadap antibodi spesifik dengan teknik *dot blot*.

1.5 Manfaat penelitian

Diharapkan dari penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya dalam mencari jenis enzim selulase yang terdapat pada saluran pencernaan rayap sehingga nantinya bisa dimanfaatkan sebagai sumber enzim yang dapat digunakan untuk memperbaiki pencernaan hewan ruminansia, terutama dalam mendegradasi serat kasar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rayap

2.1.1 Klasifikasi

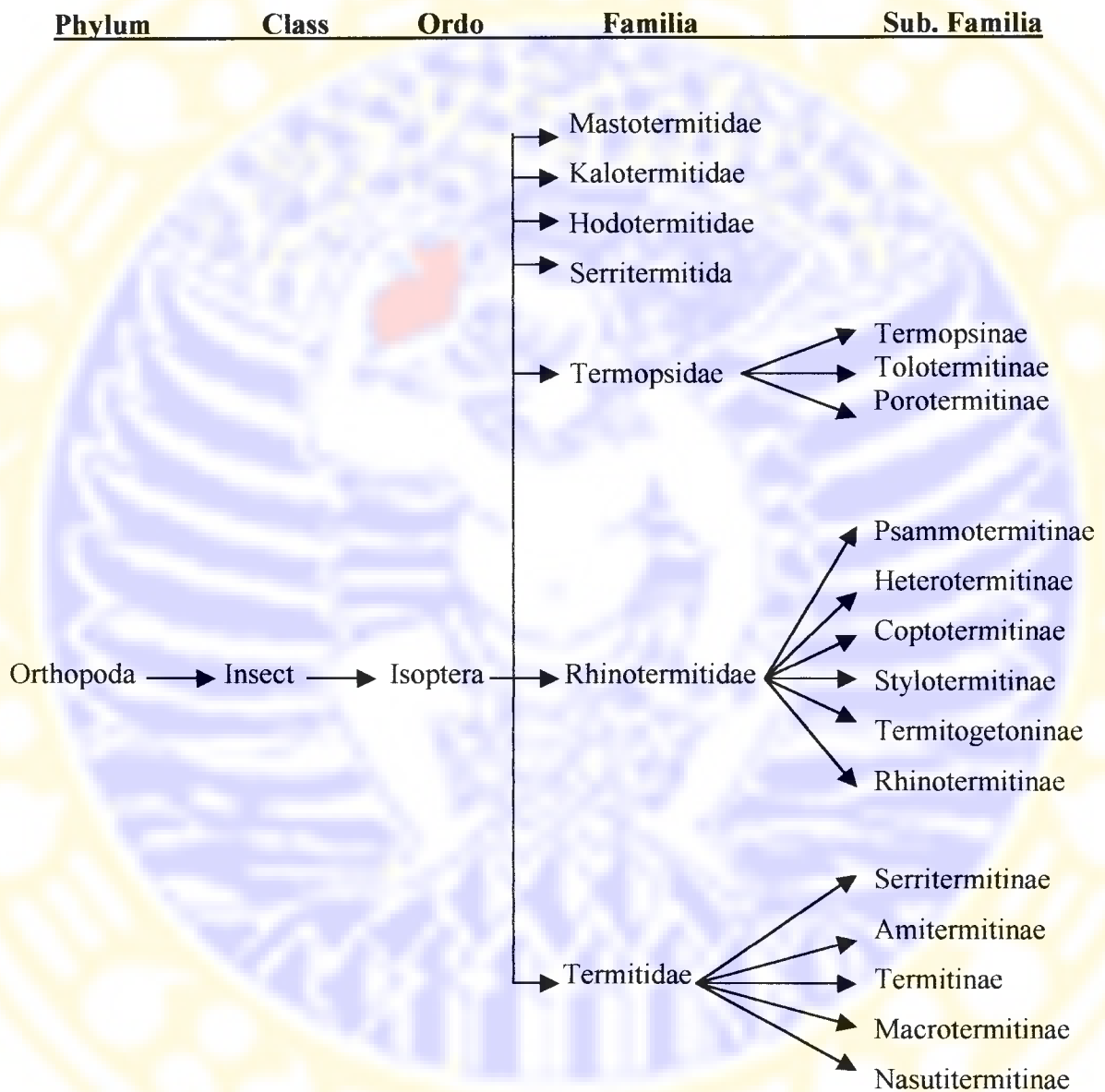
Menurut Roonwal (1976) yang dikutip oleh Tambunan dan Nandika (1989), jenis-jenis rayap yang banyak dijumpai di daerah tropika seperti Indonesia adalah sebagai berikut :

Phylum : *Arthropoda*
Class : *Insecta*
Ordo : *Isoptera*
Familia : *Termitidae*
Genus : *Macrotermes*
Spesies : *Macrotermes Sp.*

Rayap merupakan serangga yang keberadaannya dianggap merugikan manusia karena seringkali merusak bangunan yang terbuat dari kayu. Sampai saat ini telah dikenal 2.800 jenis rayap yang terbagi dalam tujuh famili, yaitu *Mastotermitidae*, *Kalotermitidae*, *Termopsidae*, *Hodotermitidae*, *Rhynotermitidae*, *Serritermitidae* dan *termitidae*. Enam famili pertama disebut *lower termite* yang ditandai dengan adanya protozoa dalam ususnya, sedangkan *Termitidae* disebut *higher termite* karena di dalam ususnya tidak terdapat protozoa (Syaukani dkk., 2001). Ohkuma *et al.*, (2001) menyebutkan bahwa *higher termite* meskipun hanya berasal dari satu famili namun menduduki 85% dari seluruh spesies rayap. Rayap famili *termitidae* mempunyai pola makan yang berbeda-beda, ada kelompok yang



hanya memakan tanah, sedangkan yang lain ada yang menanam jamur dan mengkonsumsinya.



Gambar 2.1 Klasifikasi Rayap (Harris,1971)

2.1.2 Kasta Rayap

Semua jenis rayap hidup sebagai serangga sosial di dalam koloni yang berisi ratusan, ribuan bahkan jutaan individu rayap. Kerjasama yang menguntungkan diantara individu di dalam koloni didasarkan pada pembagian kerja yang dilakukan oleh bentuk-bentuk tertentu yang dinamakan kasta rayap. Setiap kasta melakukan tugas tertentu untuk kehidupan seluruh koloni rayap. Sifat penting yang ditunjukkan dalam pembagian pekerjaan adalah pembatasan fungsi reproduktif pada sepasang atau beberapa individu saja, sebagian besar anggota koloni lainnya adalah rayap steril (mandul).

Amir (1984) menyatakan bahwa setiap koloni rayap terdiri dari kasta-kasta pekerja, prajurit dan setidak-tidaknya satu pasang kasta reproduktif yang disebut raja dan ratu rayap. Selain itu masih ada rayap pra dewasa atau nimfa. Pada rayap *Kalotermitidae*, misalnya rayap kayu kering (*Cryptotermes sp.*) tidak memiliki kasta pekerja sejati, tugas kasta pekerja dilakukan oleh nimfa.

Kasta pekerja merupakan anggota terbesar jumlahnya dalam koloni, berbentuk nimfa keputih-putihan. Kasta pekerja mempunyai mandibulata menyerupai gergaji. Tugas kasta pekerja adalah mengumpulkan makanan, memberikan makanan pada ratu, raja dan prajurit, merawat telur, membuat dan memelihara sarang. Rayap inilah yang sering menghancurkan tanaman, kayu, mebel dan bahan selulosa lainnya (Hasan, 1984)

Kasta prajurit, kepala berwarna coklat tua, mandibel kiri dan kanan simetris dan tidak memiliki gigi marginal. Kasta ini ditandai dengan bentuk tubuh yang kekar karena penebalan (sklerotisasi) kulitnya agar mampu melawan musuh dalam menjalankan tugasnya yaitu mempertahankan kelangsungan hidup koloninya. Kasta prajurit dibedakan menjadi dua macam yaitu kasta prajurit mayor yang mempunyai kepala dengan panjang 4,8-5 mm dan lebar 2,88-3,1 mm, ruas antena 17 ruas, sedangkan kasta prajurit minor mempunyai ukuran kepala dengan panjang 3,07-3,27 mm dan lebar 1,52-1,71 mm serta memiliki 17 ruas (Nandika dkk., 2003).

Kasta-kasta pekerja dan prajurit merupakan bentuk tidak normal yang dirancang untuk keperluan tertentu. Pada rayap, bentuk serangga normal adalah bentuk bersayap dan bermata yang dapat terbang dan melihat, dikenal sebagai sulung atau laron. Sulung-sulung jantan dan betina merupakan calon raja dan ratu rayap pada pembentukan koloni berikutnya.

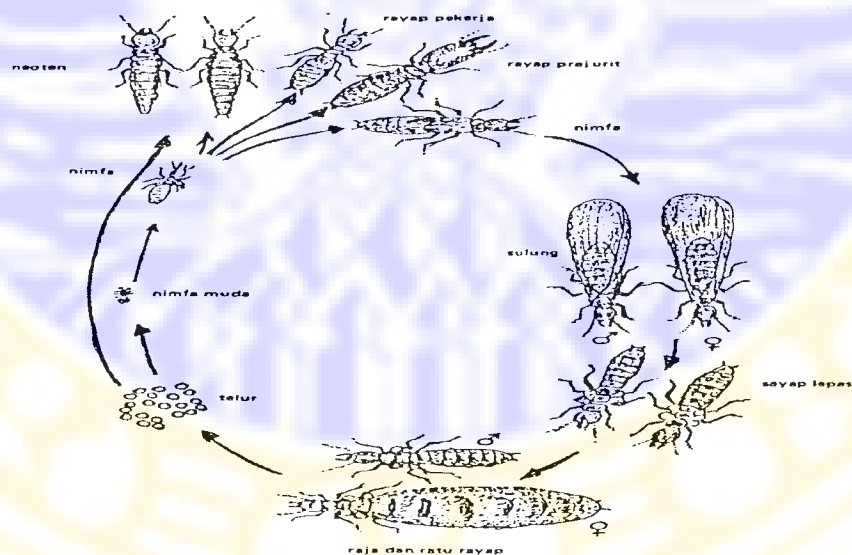
Kasta reproduktif yang utama adalah raja dan ratu rayap. Selama perkembangannya raja rayap tidak memperlihatkan perubahan bentuk yang jelas. Sebaliknya bentuk badan ratu rayap berubah karena perkembangan indung telur di dalam badannya. Perutnya membesar, hampir sebesar ibu jari kaki manusia. Ratu rayap seperti ini dinamakan fisogastrik, merupakan petelur yang sangat efisien. Ratu rayap produktif dapat menghasilkan beberapa butir telur dalam satu menit selama lima

sampai enam tahun. Beberapa jenis rayap menghasilkan kasta reproduktif suplementer atau neoten. Kelompok ini adalah nimfa yang organ reproduksinya berfungsi tanpa meninggalkan koloni terlebih dahulu. Ada dua macam neoten, ialah yang tidak bersayap dan yang bersayap pendek. Seperti halnya ratu rayap, perut neoten membesar, namun tidak pernah mencapai besar ratu rayap sejati. Neoten berfungsi membantu peranan ratu dan raja rayap bila kemampuan menghasilkan telur menurun, atau bila rayap sudah tidak menghasilkan telur lagi. Neoten selalu ada di dalam koloni, jumlahnya bervariasi. Jika, kesuburan ratu dan raja rayap menurun jumlah neoten meningkat, mencapai beberapa ratus individu di dalam koloni (Amir, 1984).

2.1.3 Siklus Hidup

Menurut Amir (1984) siklus hidup rayap hampir sama dengan siklus hidup serangga lainnya. Koloni rayap yang telah masak mempersiapkan sulung. Sementara menunggu saat yang tepat, sulung tetap tinggal di dalam sarang. Pada awal musim penghujan sulung meninggalkan sarang, beterbangan pada pagi, sore atau malam hari. Jumlahnya sangat banyak, namun sebagian besar habis di makan oleh binatang lain. Sulung jantan dan betina yang selamat akan melanjutkan keturunannya. Sulung betina dapat memikat sulung jantan dengan seks hormon, yang telah terbawa angin dapat diterima oleh alat indera sulung jantan. Dengan cara ini sulung jantan dapat mencari jejak untuk

mendapatkan sulung betina, kemudian sulung jantan mengigit ujung perut sulung betina dan berjalan beriring-iring. Setelah kawin pasangan sulung mencari tempat bersarang. Sulung betina bertelur di dalam sarang baru, semua nimfa yang menetas dipelihara oleh induknya, tumbuh menjadi rayap pekerja. Pekerjaan ini berlangsung terus secara lambat sampai jumlah pekerja menjadi banyak. Dalam dua sampai tiga tahun jumlah individu rayap di dalam koloni hanya mencapai beberapa ratus ekor saja. Selanjutnya induk rayap mempersiapkan kasta prajurit untuk melindungi koloninya. Mulai saat ini dilakukan pembagian tugas. Induk rayap yang bersal dari sulung jantan dan betina menjadi raja dan ratu rayap, lainnya menjadi pekerja dan prajurit rayap. Kasta reproduktif neoten segera dipersiapkan untuk membantu ratu menambah jumlah rayap di dalam koloni.



Gambar 2.2 Siklus Hidup Rayap (Amir, 1984)



2.1.4 Jenis Rayap

Menurut Tarumingkeng (2001) penggolongan jenis-jenis rayap merupakan salah satu misteri golongan insekta karena tingginya tingkat kemiripan antar jenis rayap dalam masing-masing famili.

Tarumingkeng (2001) menyebutkan berdasarkan lokasi sarang utama atau tempat tinggalnya, rayap perusak kayu dapat digolongkan dalam tipe-tipe berikut :

1. Rayap pohon, yaitu jenis-jenis rayap yang menyerang pohon hidup, bersarang dalam pohon dan tidak berhubungan dengan tanah. Contoh rayap jenis ini antara lain : *Neotermes tectonae* (Famili *Kalotermitidae*)
2. Rayap kayu lembab, yaitu rayap yang menyerang kayu yang sudah mati dan lembab, bersarang dalam kayu dan tidak berhubungan dengan tanah. Contoh rayap jenis ini antara lain : rayap dari Genus *Glyptotermes* (Famili *Kalotermitidae*)
3. Rayap kayu kering, yaitu rayap yang hidup dalam kayu mati dan telah kering dan tidak berhubungan dengan tanah. Rayap ini umumnya terdapat pada perabot rumah tangga yang terbuat dari kayu misalnya meja dan kursi. Contoh rayap jenis ini antara lain : *Cryptotermes* (Famili *Kalotermitidae*)
4. Rayap Subteran, yaitu rayap yang hidup dalam tanah yang banyak mengandung kayu yang telah mati dan lapuk, tunggak pohon mati dan masih hidup. Contoh rayap jenis ini antara lain : *Coptotermes* dan *Snedorhynotermes* (Famili *Rhynotermitidae*)

5. Rayap tanah, yaitu rayap yang hidup dalam tanah terutama dekat dengan bahan organik yang banyak mengandung selulosa misalnya kayu, serasah dan humus. Jenis rayap ini sangat ganas dan dapat menyerang obyek yang berjarak 200 meter dari sarangnya serta dapat menembus tembok setebal beberapa sentimeter. Contoh rayap jenis ini yang banyak di Indonesia antara lain : *Macrotermes*, *Odontotermes* dan *Microtermes* (Famili *Termitidae*)

Rayap merupakan serangga sosial yang berperan penting dalam dekomposisi bahan-bahan yang kandungan nutriennya rendah, sangat resisten namun keberadaanya di bumi sangat melimpah yaitu selulosa. Sebetulnya rayap tidak menghasilkan enzim selulase, namun dalam saluran pencernaanya terdapat protozoa yang bersimbiose mutualisme (Smith, 2004).

Aanen *et al.* (2002) menyebutkan bahwa hubungan simbiosis tersebut berperan dalam evolusi rayap serta melibatkan berbagai mikroba usus. Meskipun demikian *Macrotermitinae* yang merupakan subfamili *Termitidae* hanya melakukan simbiosis mutualisme dengan jamur dari Genus *Termytomyces*. Jamur tersebut membantu rayap untuk mendegradasi material tanaman misalnya kayu, rumput kering dan dedaunan.

2.1.5 Saluran Pencernaan Rayap

Pencernaan dan penyerapan bahan makanan pada rayap berlangsung di saluran pencernaannya yang dibagi menjadi tiga bagian utama, yaitu usus depan

(*stomadaeum*), usus tengah (*mesenteron*), dan usus belakang (*proctodeum*) (Amir, 1984).

Menurut Nandika dkk. (2003) pada rayap *Macrotermes* ketiga bagian usus terlihat mulai dari mulut, faring, esophagus, tembolok, proventrikulus, ventrikulus, *grastocaeca*, tubulus malphigi, kantung rektum, dan berakhir di anus.



Saluran Pencernaan Rayap *M. gilvus* (Pembesaran 40x)

UD = usus depan	UT = Usus Tengah	UB = Usus Belakang
M = Mulut	F = Faring	E = Esophagus
C = Tembolok (crop)	PV = Proventrikulus	V = Ventriculus
GC = Grastocaeca	TM = Tubulus Malpighi	P = Perut
KR = Kantung Rektum	K = Kolon	T = Rektum
A = Anus		

Gambar 2.3 Saluran Pencernaan Rayap (Nandika Dkk., 2003)

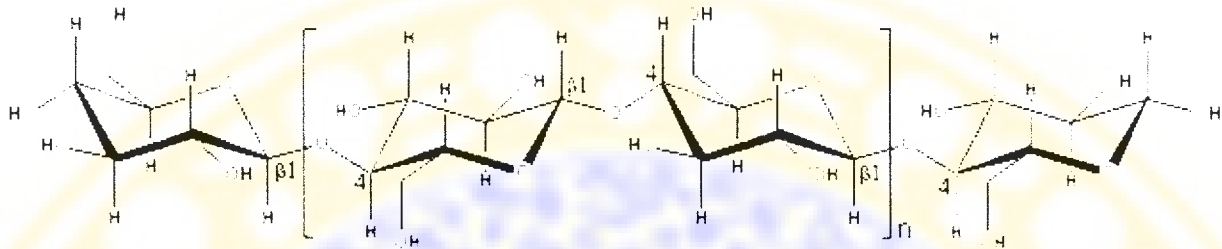
Waktu yang diperlukan untuk proses pencernaan makanan pada saluran pencernaan berbeda-beda diantara jenis rayap. Pada kasta pekerja *Macrotermes* proses pencernaan makanan berlangsung selama 24 jam (penyerapan makanan pada usus depan satu sampai dua jam; usus tengah lebih cepat satu sampai dengan setengah jam dan selebihnya proses pencernaan terjadi di usus belakang). Berdasarkan lamanya proses pencernaan makanan pada setiap bagian saluran pencernaan tersebut dapat dipastikan bahwa proses pencernaan makanan utama

terjadi di usus belakang. Di bagian ini terdapat sejumlah besar organisme simbiosis yang mengeluarkan enzim selulase untuk menguraikan selulosa (Nandika dkk., 2003).

2.2 Selulosa

Selulosa adalah senyawa seperti serabut liat, tidak larut dalam air dan ditemukan pada dinding sel tumbuhan, terutama pada tangkai, batang, dahan dan bagian berkayu dari jaringan tumbuhan. Selulosa terdiri dari rantai linier β -D-glukosa dengan derajat polimerisasi sebesar kurang lebih 14.000 (Schlegel, 1994). Struktur selulosa secara kimia sangat stabil dan tidak larut dalam air. Rantai selulosa berbentuk struktur kristal yang disebut mikrofibril (diameter 2-20 nm dan panjang 100-40.000 nm) (Robinson, 1995).

Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit-unit β -D-glukopiranosida yang terikat satu sama lain dengan ikatan-ikatan glikosida (1 \rightarrow 4). Molekul-molekul selulosa seluruhnya berbentuk linier dan mempunyai kecenderungan kuat membentuk ikatan-ikatan hidrogen intra dan inter molekul. Berkas-berkas molekul selulosa membentuk agregat bersama-sama dalam bentuk mikrofibril pada tempat yang sangat teratur (kristalin) diselingi dengan tempat yang kurang teratur (*amorf*). Mikrofibril membentuk fibril-fibril dan akhirnya serat-serat selulosa. Sebagai akibat dari struktur yang berserat dan ikatan-ikatan hidrogen yang kuat selulosa mempunyai kekuatan tarik yang tinggi dan tidak larut dalam kebanyakan pelarut. (Erosjostrom, 1995).



Gambar 2.4 Struktur selulosa (Chaplin, 2005)

Dalam hidrolisis selulosa secara enzimatik, ada beberapa hal yang penting sehubungan dengan struktur selulosa. Fan dan Lee (1983) mengemukakan bahwa selulosa tersusun atas dua bagian kristal dan *amorf*. Setiap bagian menunjukkan perbedaan dalam kemudahan degradasi enzim oleh serangan enzim. Bagian *amorf* lebih mudah di serang oleh enzim daripada bagian kristal. Selain struktur kristal dan *amorf*, luas permukaan partikel selulosa juga menentukan tingkat degradasi, karena terserapnya molekul enzim pada permukaan partikel selulosa merupakan tahap awal proses degradasi. Judoamidjojo dkk. (1989) menyatakan bahwa perlakuan pendahuluan secara mekanis untuk mengurangi ukuran partikel dan mendorong pembengkakan selulosa merupakan hal penting untuk meningkatkan degradasi selulosa. Selain itu, pra perlakuan kimiawi sebelum proses enzimatik yang dilakukan dengan melarutkan substrat lignoselulosa ke dalam larutan asam atau basa kuat untuk mengurangi lignin juga dapat meningkatkan degradasi selulosa.

2.3 Enzim Selulase

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme perantara dari sel. Lehninger (1983) menyatakan berdasarkan letak enzim yang dihasilkan oleh mikroba dapat dibedakan dua macam enzim yaitu :

- a. Enzim intraseluler, yaitu enzim yang terletak di dalam sel, setelah biakan sel diperoleh maka dilakukan pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim.
- b. Enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang terletak di luar sel, karena enzim ini selama proses biosintesisnya menembus membran dan keluar dari sel mikroba. Untuk mengekstraksi enzim tidak perlu diadakan pemecahan membran sel, kultur mikroba disentrifuge dan supernatannya merupakan ekstrak kasar enzim.

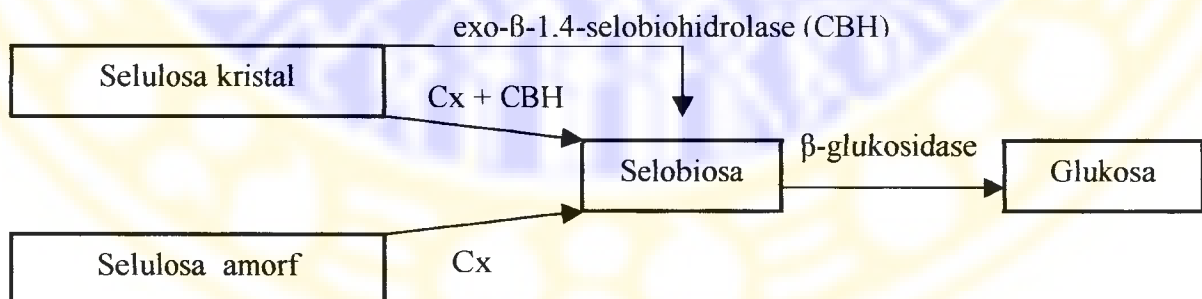
Enzim ekstraseluler bersifat relatif lebih stabil dibanding dengan enzim intraseluler, karena pada saat enzim ini berfungsi tidak perlu dilindungi oleh sel, tingkat kemurniannya tinggi dan lebih mudah dipanen. Sifat-sifat enzim ekstraseluler ini mendorong produksi enzim dalam jumlah besar. Enzim-enzim hidrolase seperti lipase, protease, pektinase, amilase dan selulase merupakan beberapa contoh enzim ekstraseluler.

Menurut Enari (1983), selulase adalah nama umum untuk semua enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan glikosidik -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa dan turunan selulosa lainnya. Nama sistematik selulase adalah -1,4 glukon -4-glukanohidrolase (EC.3.2.1.4).

Ditambahkan oleh Judoamidjojo dkk. (1989) selulase sesungguhnya merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yaitu endoglukanase, selobiohidrolase dan β -glukosidase yang bekerja bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa.

Fan dan Lee (1983) mengemukakan bahwa mekanisme hidrolisis selulosa secara enzimatik sebagai berikut:

- (1) Enzim endo- β -1,4-glukanase (EC 3.2.1.4), "Cx" yang memecah ikatan β -1,4 glukosida secara acak, terutama pada daerah *amorf* untuk menghasilkan selobiosa sebagai produk utama. Tetapi enzim ini tidak aktif pada daerah kristal selulosa.
- (2) Enzim exo- β -1,4-selobiohidrolase (EC 3.2.1.91), "CBH" memisahkan suatu unit selobiosa dari ujung non pereduksi rantai selulosa. Komponen ini tidak terlalu aktif menyerang baik daerah kristal maupun daerah *amorf*, tetapi setiap komponen ini berinteraksi dengan komponen Cx.
- (3) Enzim β -glukosidase (EC 3.2.1.21) menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo- oligosakarida untuk menghasilkan glukosa.

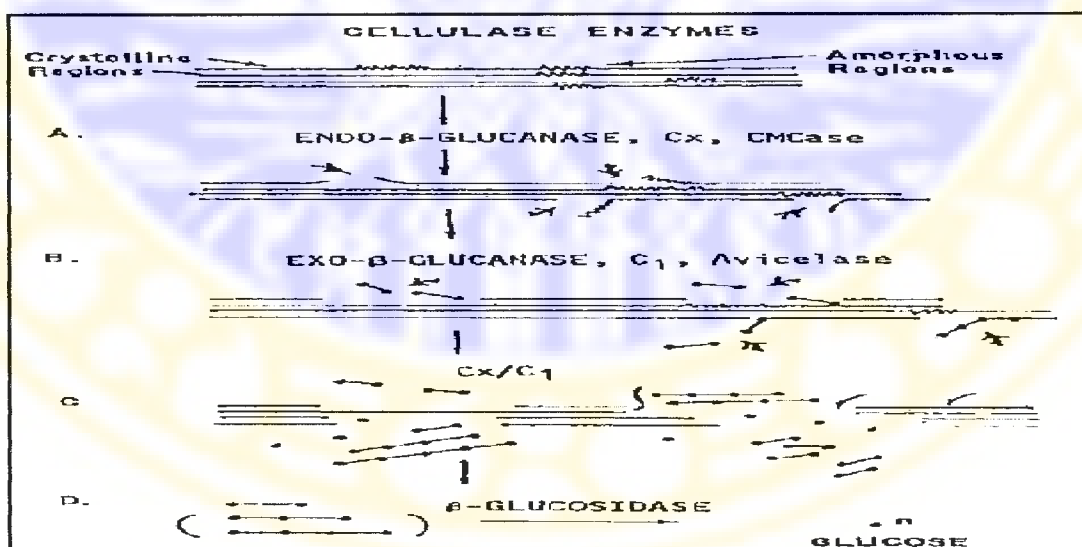


Gambar 2.5 Mekanisme Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatis (Fan dan Lee, 1983)

Enari (1983) menjelaskan konsep mekanisme hidrolisa enzimatis terhadap selulosa memakai gambar yang dikemukakan oleh Montenecourt dan Eveleigh (1979) untuk menerangkan spesifitas substrat masing-masing enzim.

Enzim endoglukanase (EG = Cx) menyerang bagian *amorf* (tak beraturan) serat selulosa, membuka jalan bagi kerja enzim selobiohidrolase (CBH = C1). Setelah itu, kedua enzim tersebut bekerja sama saling membebaskan serat selobiosa dari serat selulosa. Baik enzim endoglukanase maupun selobiohidrolase tak mampu memecah selobiosa sehingga diperlukan enzim lain, yaitu β -glukosidase yang menguraikan selobiosa menjadi glukosa.

Menurut Enari (1983), semua enzim selulolitik dapat memutus ikatan β -1,4-glukosida, perbedaan dari masing-masing enzim terletak pada kespesifikan struktur sekeliling substrat. Perbedaan kespesifikan dari enzim endoglukanase dan selobiohidrolase bersifat tidak mutlak karena keduanya dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glukosida dari seluruh *amorf*.



Gambar 2.6 Mekanisme Hidrolisa Enzimatis terhadap Selulosa (Montenecourt dan Eveleigh, 1979)

Irwin *et al.* (2000) menyatakan bahwa bakteri dan jamur banyak menghasilkan eksoselulase dan endoselulase yang berbeda jumlah dan fungsinya dalam menghidrolisis kristal selulosa. Menurut Miyamoto (1997) *Trichoderma* memproduksi endoglukanase dan eksoglukanase dalam jumlah yang relatif besar, tetapi hanya sedikit memproduksi β -glukosidase, sedangkan *Aspergillus* banyak memproduksi endoglukanase dan β -glukosidase namun hanya sedikit memproduksi eksoglukanase.

Sejumlah endoglukanase ditemukan dalam *Trichoderma reesei* secara kultur filtrat. Struktur utama dari EgII dan EgIII (dahulu diketahui sebagai EgIII) didapat dari kesimpulan masing-masing rangkaian nukleotidanya (Saloheimo *et al.*, 1988). EgII berisi 459 asam amino dengan BM 48,212 kD sedangkan EgIII berisi 418 asam amino dengan BM 42,200 kD.

Dua *cellobiohydrolase* (CbhI dan CbhII) didapatkan dari pemurnian jamur *Trichoderma reesei* secara kultur filtrat. CbhI terdiri dari 60% dari total protein ekstraseluler di dalam kultur filtrat. CbhI mempunyai BM 65 kD dan 10% terdiri dari karbohidrat. CbhII mempunyai BM 53 kD dan 8% terdiri dari karbohidrat (Nummi *et al.*, 1983).

Berbagai bentuk β -glukosidase, baik intraseluler dan ekstraseluler, dilaporkan dihasilkan oleh *Trichoderma reesei* yang mempunyai kisaran nilai PH antara 4,4-4,8 dan BM dari 50 sampai 98 kD (Inglin *et al.*, 1980).

Berbagai macam enzim selulase telah ditemukan dan digolongkan menurut berat molekulnya antara lain :

Berat molekul enzim eksoglukanase sebesar 41,8; 43; 46; 46,3; 48,6; 53; dan 65 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985), 42 kDa (Berghem *et al.*, 1975), 57 kDa (Selby, 1969), 60,5-62 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

Berat molekul enzim endoglukanase sebesar 12,5; 13; 20; 20,5; 26; 28,3; 30; 31; 32; 34; 35; 36,7; 37; 37,5; 48; 49,5; 50; 52; 70; 78; dan 90 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985), 52 kDa (Li *et al.*, 1965), 23,5-58 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

Berat molekul enzim β -glukosidase sebesar 47; 50; 76; 98; 165; 182; dan 332 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985), dan 76 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

2.4 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Electrophoresis*)

SDS-PAGE adalah salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan protein. Pemisahan dengan menggunakan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) yaitu suatu deterjen bermuatan negatif yang dapat mengikat protein. SDS merupakan suatu deterjen anion dedosil sulfat yang digunakan untuk melarutkan virus murni, sedangkan protein penyusunnya dipisahkan dalam pita terpisah sesuai dengan berat molekul dengan elektroforesis gel poliarilamide (SDS-PAGE) (Davis *et al.*, 1994). SDS mempunyai rumus kimia $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ (Lodish *et al.*, 1995).

Selama elektroforesis, SDS dan protein kompleks berpisah melalui *polyacrilamide gel*. Protein yang kecil bergerak melalui pori gel dengan lebih mudah dan cepat daripada protein yang besar. Protein yang terpisah terlihat seperti pita (Lodish *et al.*, 1995).

2.5 Dot Blot

Metode *dot blot* dikembangkan dengan semikuantitatif pada uji imun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen ditetaskan pada membran yang dilabel dengan antibodi. Hal ini tidak dilakukan pemisahan seperti SDS-PAGE, jadi *dot blot* hanya digunakan untuk mengetahui jenis antigen bukan berat molekul protein. Metode ini cukup baik untuk digunakan uji atau skrining dengan sampel yang cukup banyak (Rantam, 2003).

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2004 sampai dengan Desember 2004 di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium *Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Langkah-langkah Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, yaitu preparasi enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap, pembuatan antibodi anti selulase dengan cara menyuntikkan selulase murni pada kelinci kemudian diukur titer antibodinya dengan menggunakan metode *Elisa Indirect*, identifikasi enzim selulase asal rayap dengan metode SDS-PAGE 15 % dan *Dot Blot*

3.3 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik, yaitu untuk mengidentifikasi enzim selulase asal rayap. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui berat molekul enzim yang terdapat dalam saluran pencernaan rayap dan reaktivitas enzim selulase terhadap antibodi spesifik, oleh karena itu penelitian ini termasuk penelitian deskriptif.

3.4 Materi Penelitian

3.4.1 Bahan dan alat penelitian

Jenis bahan dan alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

a. Perlakuan pada hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah kelinci *New Zealand White* jantan berjumlah empat ekor umur tiga bulan dengan berat badan rata-rata 2,5 kg.

Alat-alat yang dibutuhkan meliputi kandang untuk hewan coba, spuit 5 cc, pipet 5 ml dan Vortex.

Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah enzim selulase murni asal jamur *Trichoderma viride*, PBS, *Adjuvant complete* (CFA) dan *Adjuvant Incomplete* (IFA), pakan komersial, sayur hijauan, air PDAM.

b. Preparasi enzim yang berasal dari saluran pencernaan rayap

Alat yang dibutuhkan adalah tabung sentrifuse, sentrifuse, tabung venoject, vortex, *Ultra sonic Homogenizer*.

c. Elektroforesis dengan SDS PAGE 15 %

Meliputi peralatan utama elektroforesis lengkap dengan pengatur voltase, mikropipet, pipet tip, shaker, dan peralatan gelas lainnya. Bahan kimia yang diperlukan antara lain : *Acrlamiide*, Tris Hcl PH 8,8, Tris Hcl PH 6,8, SDS 0,5 %, aquadestilata, Temed, APS 10 %, butanol 10 %, *Elektrophoresis buffer*, *Laemli buffer*, metanol 5 %, asam asetat 7,5 %,

Glutardehide 10%, AgNO_3 , NaOH 0,36%, NH_3 , *formaldehyde* 3,7%, *Zitronensaure* 5 %, gliserol.

d. Immunoblotting (*Dot Blot*)

Peralatan yang diperlukan adalah kertas nitroselulose (NCM), *transblott apparatus*, *shaker*, *petri dish*, *water bath*, dan alat-alat gelas lainnya. Bahan kimia yang diperlukan antara lain : *Tris Buffer Saline* (TBS-Tween) , *creamer* 5 %, aquadestilata, konjugat *goat anti rabbit*, substrat *western blue*, antibodi anti selulase.

3.5 Metode penelitian

3.5.1 Preparasi enzim selulase asal rayap

Sampel rayap (*Macrotermes sp.*) diambil dari tanah pekarangan di Surabaya. Lima puluh ekor rayap di sterilisasi menggunakan ethanol 70%, dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) steril, kemudian dengan menggunakan dua buah pinset, kepala dan perut dipisahkan dengan cara dijepit. Isi perut diambil dengan cara memencet bagian abdomen, kemudian dimasukkan ke dalam tabung venoject yang sudah diisi dengan PBS steril sebanyak 4 ml dan di vortex selama 30 menit (Li *et al.*, 2003). Larutan isi perut rayap tersebut kemudian di sonikasi (untuk membuka sel mikrobia) selama 4 x 5 menit, dan di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama lima menit. Supernatannya dipindahkan ke dalam tabung venoject steril dan endapannya dibuang.

3.5.2 Pembuatan Antibodi Antiselulase

Pembuatan antibodi antiselulase dilakukan dengan cara menyuntikkan selulase murni pada kelinci dengan dosis 500 µg/ekor sebanyak 0,5 ml. Penyuntikan dilakukan sebanyak empat kali (satu kali dengan *complete Freund adjuvant* dan tiga kali dengan *incomplete Freund adjuvant*) dengan interval dua minggu. Dua minggu setelah penyuntikkan terakhir dilakukan pengujian antibodi antiselulase dengan *indirect* Elisa,. Pembuatan antibodi antiselulase digunakan untuk uji *Dot blot*.

3.5.3 Analisis Enzim Selulase dengan SDS-PAGE 15 %

SDS-PAGE adalah salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan protein. Pemisahan dengan menggunakan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) yaitu suatu deterjen bermuatan negatif yang dapat mengikat protein. SDS merupakan suatu deterjen anion sodium dodesil sulfat yang digunakan untuk melarutkan virus murni, sedangkan protein penyusunnya dipisahkan dalam pita terpisah sesuai dengan berat molekul dengan *electrophoresis gel poliacrilamide* (SDS-PAGE) (Davis *et al.*, 1994).

1. Mencetak *Separating Gel* 15 %

Pembuatan *separating gel* dengan cara mencampurkan bahan-bahan untuk penyusunan *separating gel* 15 % yaitu *acrilamide* 3,125 ml, tris HCl pH 8,8 sebanyak 1,2 ml, SDS 0,5% sebanyak 1,2 ml, aquadestilata 1,1 ml, *temed* 5 µl, APS 10% sebanyak 30 µl. Campuran

harus homogen dimasukkan ke dalam gelas *plate* yang telah bersekat untuk melakukan fiksasi dan ditambahkan butanol 5% diatas bagian *separating gel*, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 25 menit agar *separating gel* menjadi padat. Langkah selanjutnya adalah membuang butanol 5 % dan mencuci *separating gel* dengan menggunakan *electrophoresis buffer* yang telah diencerkan 10 kali. Dengan kertas filter, *separating gel* dibersihkan dan dikeringkan.

2. Mencetak *Stacking Gel* 15 %

Membuat *stacking gel* dengan mencampurkan bahan-bahan *stacking gel* sampai homogen yaitu *acrilamide* 0,825 ml, tris HCl pH 6,8 sebanyak 0,8 ml, SDS 0,5% sebanyak 0,8 ml, aquadestilata 0,8 ml, *temed* 4,0 µl, APS 10% sebanyak 20 µl. *Stacking gel* dimasukkan dalam cetakan *running gel* sampai penuh. *Comb* dimasukkan ke dalam *stacking gel*. Di inkubasi pada suhu kamar selama 25 menit sampai *stacking gel* memadat. *Comb* dilepas dan dibersihkan, *stacking gel* dicuci 1 kali dengan *Elektrophoresis buffer*.

3. Menyiapkan Sampel

Suspensi sampel sebanyak 20 µl di masukkan dalam tabung *ependorf* yang tutupnya sudah berlubang dan dicampur dengan *Laemli Buffer* (indikator warna) 10 µl. Tabung *ependorf* yang telah berisi campuran di panaskan dalam suhu 100°C selama 15 menit.

4. *Elektrophoresis*

Gelas plate yang berisi gel dimasukkan ke dalam Bio-Rad dan dituangi dengan *Elektrophoresis Buffer* sebanyak 800 ml. Marker dan sampel dimasukkan ke dalam lubang gel. Menggunakan listrik 125 V, 40 mA sampai marker dan sampel turun. Setelah turun, listrik dimatikan, gel dilepas perlahan dan dimasukkan dalam *petri dish* yang sudah berisi larutan pencucian.

5. Pencucian

Pencucian yang dilakukan ada empat tahap dengan larutan yang berbeda. Pencucian pertama menggunakan campuran metanol 25 ml, *acetic acid* 3,75 ml dan aquadestilata 71,25 ml. *Petri dish* yang berisi gel dan larutan pencuci digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Setelah 30 menit, larutan pencuci dibuang dan diganti dengan larutan pencuci yang kedua yaitu campuran dari metanol 2,5 ml, *acetic acid* 3,75 ml dan aquadestilata 93,75 ml, digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian ketiga dengan larutan *Glutardehide* 10 % yaitu 10 ml *Glutardehide* dengan 90 ml aquadestilata digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian yang terakhir dengan aquadestilata 100 ml selama 30 menit dan pencucian ini dilakukan 3 kali.

6. Pewarnaan

AgNO₃ ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dicampur dengan 4 ml *destilated water*. Kemudian campuran tersebut dimasukkan kedalam

larutan yang terdiri dari NaOH 0,36% sebanyak 21 ml, NH₃ sebanyak 1,4 ml dan aquades 73,5 ml. Larutan dimasukkan kedalam *petri dish* dan digoyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit. Kemudian dibuang dan dicuci dengan 100 ml aquadestilata selama 2 menit sebanyak 2 kali diatas *shaker*.

7. Stop Reaksi

Pengembang warna yang terdiri dari *formaldehyde* 3,7 % sebanyak 50 µl, *Zitronsaure* 5 % sebanyak 100 µl dan 100 ml aquadestilata dimasukkan ke dalam *petri dish* yang berisi gel. Selama 5 menit digoyang diatas *shaker* dengan kecepatan 42. Stop reaksi dimasukkan bersama dengan *acetic acid* 10 %, setelah itu dicuci dengan 100 ml aquadestilata selama 2 menit sebanyak 2 kali, Kemudian dibuang dan diganti oleh larutan yang terdiri dari gliserol 10 ml dan aquadestilata 90 ml agar tidak rusak.

Hasil SDS-PAGE berupa *band* (pita) diukur untuk menghitung berat molekul (BM) sampel. Menurut Rybicki dan Maud (1996), berat molekul (BM) atau massa molekul relatif (Mr) ditentukan berdasarkan log BM atau log Mr dari protein standar dan nilai Rf (*Retardation factor*). Nilai Rf merupakan perbandingan antara jarak migrasi molekul protein dengan jarak migrasi zat warna, Kemudian mencari persamaan dengan menentukan kurva standar dari Rf dan log BM atau log Mr sampel yang diketahui dibaca sebagai log Mr dari sampel setelah menghitung Rf pada agar yang sama.

Menurut Mayer dan Walker (1987), untuk menghitung nilai Mr dari protein yang belum diketahui, mula-mula log 10 Mr dari protein standar dihitung, Kemudian menghitung mobilitas relatif yaitu perbandingan jarak perpindahan protein dengan jarak perpindahan zat warna.

Menurut Rantam (2003), untuk menentukan BM antigen atau antibodi dilakukan dengan menghitung nilai Rf dari masing-masing *band* dengan rumus berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan zat warna dari tempat awal}}$$

Massa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai Rf dan massa molekul relatif dari protein standar. Nilai Rf disimbolkan dengan X, sedangkan Y adalah logaritma massa molekul relatif (log Mr) protein standar.

Nilai Rf dinyatakan sebagai nilai X (variabel bebas) dan nilai log BM atau log Mr marker dalam satuan Dalton (Da) dinyatakan dengan nilai Y (Variabel terikat), kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai X (Rf) sampel dimasukkan ke dalam persamaan untuk mendapatkan nilai BM protein sampel.

3.5.4 Analisis enzim selulase dengan *Dot Blot*

Kertas nitroselulase (NCM) direndam dalam TBS (0,02 M Tris-HCL; 0,5 M NaCl; PH 7,5) selama 15 menit dan dikeringkan selama lima menit. Setelah itu ditetesi 2 μ l enzim selulase asal rayap (1-1000 pg/2 μ l), diinkubasi selama lima menit pada suhu ruang, kemudian dicuci 3 x 5 menit dengan TBS-Tween (TBS yang mengandung 0,05% Tween-20) dan dibloking selama 60 menit dengan *buffer blocking* (0,9% NaCl; 10 mM Tris-HCL; PH 7,4) yang mengandung 5% *creamer*. Pasca bloking, NCM dicuci 3 x 5 menit dengan TBS-Tween, dikeringkan dan ditambah antibodi primer (kelinci) 1:100 dalam TBS-Tween yang mengandung 1% skim milk selama satu jam sambil digoyang diatas *shaker*. Berikutnya NCM dicuci dengan TBS-Tween 3 x 5 menit dan ditambah antibodi sekunder (konjugat) *goat anti rabbit* 1:1.000 selama 1 jam dalam TBS-Tween yang mengandung 1% skim. Setelah itu dicuci 3 x 5 menit dengan TBS-Tween dan dicuci 3 x 5 menit dengan TBS tanpa tween untuk ditambah substrat *Western blue* sebanyak 25 μ l selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pencucian dengan aquadest dan dikeringkan diudara.

3.5.5 Analisis Data

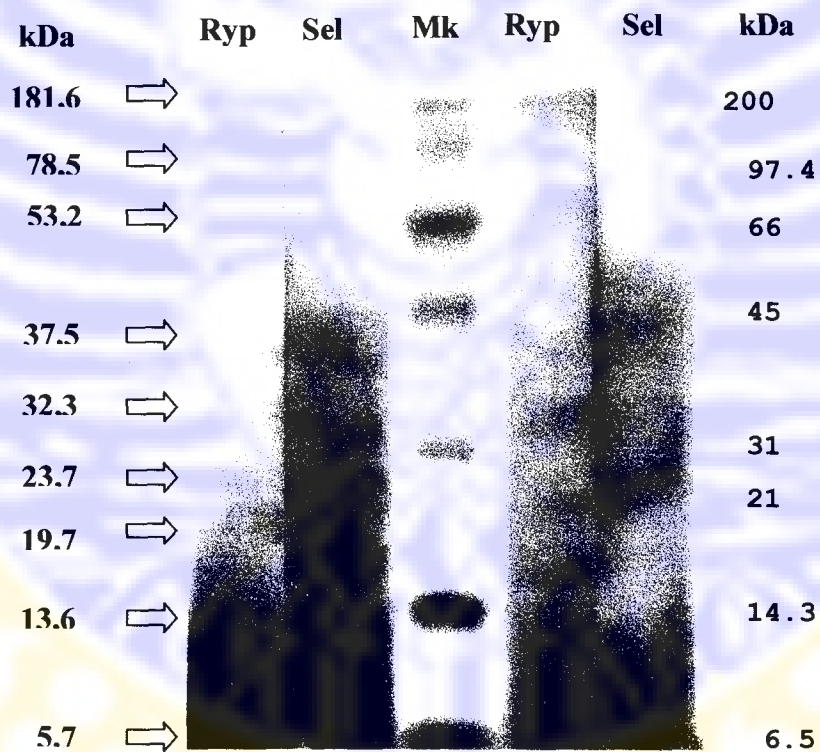
Data yang diperoleh ditampilkan secara deskriptif.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Analisis Enzim Selulase dengan SDS-PAGE

Berat molekul (BM) enzim selulase pada penelitian ini dianalisis dengan melakukan preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE. Hasil preparasi protein terlihat pada Gambar 4.1 yang memperlihatkan pita-pita protein enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap.







Gambar 4.1 Hasil Preparasi Protein Enzim Selulase dari Rayap dengan Teknik SDS-PAGE

Keterangan : Ryp : Rayap; Mk : Marker; Sel : Selulase Murni

Hasil perhitungan menggunakan persamaan regresi antara nilai Rf dan log MR (Da) (Lampiran 3) didapatkan 9 macam enzim selulase berasal dari saluran pencernaan rayap yang mempunyai berat molekul (BM) berturut-turut 181,6; 78,5; 53,2; 37,5; 32,3; 23,7; 19,7; 13,6 dan 5,7 kDa.

4.2 Analisis Enzim Selulase dengan *Dot Blot*

Teknik *Dot Blot* menunjukkan reaksi antigen-antibodi. Pada penelitian ini antigen selulase murni dan selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap direaksikan dengan antibodi anti selulase kelinci. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi poliklonal dapat mengenal epitop yang sama dari enzim selulase asal selulase murni maupun selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap yang mengalami sonikasi.

Antibodi Kelinci 1/100				
No	Selulase murni	Selulase Rayap (Sonikasi)	Selulase Rayap	Kontrol (Bufer)
1				
2				
3				
4				

Gambar 4.2 Hasil Uji Enzim Selulase Menggunakan *Dot Blot*

Keterangan :

Pengenceran Enzim Selulase Murni dan Enzim Selulase asal Rayap

No.	Selulase Murni	Selulase asal Rayap
1	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20% x 1/25
2	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20% x 1/50
3	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20 % x 1/100
4	0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20 % x 1/200

BAB V

PEMBAHASAN

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme perantara dari sel. Enzim selulase yang didapatkan dari saluran pencernaan rayap dapat diproduksi secara intraseluler (endoselulase) atau ekstraseluler (eksoselulase). Untuk mendapatkan enzim ini perlu dilakukan preparasi biologi. Preparasi ini melibatkan beberapa teknik laboratorium seperti homogenisasi jaringan dan sentrifugasi.

Tahap awal preparasi biasanya dilakukan dengan melepaskan protein dari sel tanpa mengakibatkan hilangnya aktivitas biologis protein tersebut. Cara kerja yang biasa dipergunakan untuk membebaskan protein dari sel-sel hewan adalah proses homogenisasi. Sel bakteri, ragi dan sel-sel tumbuhan memiliki dinding sel yang tebal sehingga memerlukan penggunaan sonikasi yang memiliki daya kuat untuk memecah ataupun dengan menggunakan tekanan tinggi. Keuntungan utama yang diperoleh dengan cara homogenisasi adalah bahwa integritas organel intraseluler dapat dipertahankan, sedangkan cara untuk memisahkan organel ataupun bagian sel-sel tertentu dilakukan sentrifugasi.

Pembuatan antibodi anti selulase dilakukan dengan cara menyuntikkan selulase murni pada kelinci dengan dosis 500 µg/ekor sebanyak 0,5 ml. Penyuntikkan dilakukan sebanyak empat kali (satu kali dengan *complete freund adjuvant* dan tiga kali dengan *incomplete freund adjuvant*) dengan interval dua

minggu. Dua minggu setelah penyuntikkan terakhir dilakukan pengujian titer antibodi antiselulase dengan *indirect* ELISA.

Respon pembentukan antibodi antiselulase pada kelinci terhadap selulase murni menunjukkan hasil yang baik terbukti dengan dihasilkannya titer antibodi yang tinggi. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4. Menurut Harlow dan lane (1999) dosis optimum enzim untuk aplikasi pada kelinci sebesar 50-100 µg/ekor, sehingga penggunaan dosis 500 µg/ekor masih dalam kisaran normal. Ketiga kelinci masing-masing dapat menghasilkan titer antibodi 5120, sedangkan pada kelinci kontrol yang hanya diinjeksi dengan PBS menghasilkan titer antibodi 0. Hal ini menunjukkan bahwa selulase yang diinjeksi merupakan imunogen yang baik sehingga menghasilkan antibodi dengan titer yang tinggi. Protein dengan BM > 10 kDa merupakan imunogen yang dapat memicu pembentukan antibodi. Untuk selanjutnya antibodi anti selulase tersebut dapat digunakan untuk tujuan identifikasi enzim dengan teknik *Dot blot*.

Prinsip dasar metode SDS-PAGE adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan massa molekul relatifnya dengan metode elektroforesis menggunakan gel *polyacrilamide*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan massa molekul relatifnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu (Davis *et al.*, 1994).

Hasil analisis enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 9 macam protein yang terbentuk dengan berat molekul masing-masing sebesar: 181,6 kDa; 78,5 kDa;

53,2 kDa; 37,5 kDa; 32,3 kDa; 23,7 kDa; 19,7 kDa; 13,6 kDa dan 5,7 kDa yang diekspresikan dengan pita (*band*) yang tipis dan intensitas warna yang kurang.

Campuran protein yang dianalisis dengan *PAGE* hampir selalu terdiri dari molekul yang berbeda ukuran dan muatannya, bila diseparasi akan didapatkan beberapa zona atau pita yang berbeda. Beberapa faktor berpengaruh dalam separasi yaitu konsentrasi akrilamid dan bis, pH, kekuatan ion, gradien potensial, suhu dan waktu *running* (Sutiman dkk., 1996). Sampel yang akan diseparasi juga mempengaruhi hasil, kebersihan sampel mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel. Pita yang terlihat tajam dan terang akan memudahkan analisis protein dan dokumentasi. Kemurnian sampel dan kadar protein sampel yang baik akan menghasilkan pita protein yang baik dan jelas sehingga dapat memudahkan analisis massa molekul relatif (MR) pada pita yang terbentuk (Kusnoto, 2003).

Hasil analisis enzim selulase dengan teknik *dot blot* menunjukkan bahwa enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap yang mengalami sonikasi maupun tidak menunjukkan hasil positif dengan antibodi anti selulase kelinci.

Hasil penelitian ini terjadi reaksi perubahan warna yang menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi, sehingga dapat disimpulkan bahwa antibodi anti selulase dari kelinci merupakan protein yang reaktif, karena dapat berikatan dengan enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap. Antibodi yang digunakan adalah antibodi poliklonal yang dihasilkan oleh limfosit B. Antibodi ini akan lebih banyak mengenal epitop yang merupakan bagian dari antigen.

Menurut Baratawidjaya (2000), bila antigen dimasukkan ke dalam sistem imun hewan percobaan, semua sel B yang mengenal epitop pada antigen akan dirangsang dan memproduksi antibodi. Darah yang diambil dari hewan tersebut akan mengandung antibodi yang multipel dan akan bereaksi dengan setiap epitop. Serum tersebut disebut poliklonal karena mengandung produk dari banyak sel B. Keuntungan antibodi poliklonal dibandingkan dengan antibodi monoklonal adalah lebih sensitif dalam mengenal antigen walaupun spesifitasnya lebih rendah (Tizard, 1982).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah :

1. Enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap mempunyai berat molekul (BM) berturut-turut 181,6; 78,5; 53,2; 37,5; 32,3; 23,7; 19,7; 13,6 dan 5,7 kDa.
2. Enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap mempunyai rektivitas yang baik terhadap antibodi spesifik.

6.2 Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan terhadap jenis enzim selulase yang terdapat pada saluran pencernaan rayap serta mengetahui aktivitas masing-masing enzim tersebut.

RINGKASAN

Nugroho Dedy Cahyono. Identifikasi Enzim Selulase Asal Rayap (*Macrotermes* Sp.) Dengan Teknik SDS-PAGE dan Dot blot. Penelitian ini di bawah bimbingan Arimbi, M.Kes., Drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Adriana M. Sahidu selaku dosen pembimbing kedua.

Rayap dikenal sebagai serangga pemakan kayu dan bahan berselulosa lainnya, untuk mendegradasi selulosa menjadi glukosa diperlukan tiga macam enzim selulase yang bekerja secara sinergis yaitu endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul enzim selulase yang ada dalam saluran pencernaan rayap. Lima puluh ekor rayap di sterilisasi menggunakan ethanol 70%, dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) steril, kemudian dengan menggunakan dua buah pinset, kepala dan perut dipisahkan dengan cara dijepit. Isi perut diambil dengan cara memencet bagian abdomen, kemudian dimasukkan ke dalam tabung venoject yang sudah diisi dengan PBS steril sebanyak 4 ml dan di vortex selama 30 menit (Li *et al.*, 2003). Larutan isi perut rayap tersebut kemudian di sonikasi (untuk membuka sel mikrobia) selama 4 x 5 menit, dan di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama lima menit. Supernatannya dipindahkan ke dalam tabung venoject steril dan endapannya dibuang.

Supernatan dianalisis dengan menggunakan uji SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Electrophoresis*) 15% dengan menggunakan

pewarnaan perak nitrat (AgNO_3) dan uji *Dot Blot*. Uji SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui berat molekul protein sedangkan uji *Dot Blot* digunakan untuk mengetahui reaktivitas enzim selulase terhadap antibodi spesifik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE memperlihatkan pita-pita protein enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap mempunyai berat molekul (BM) berturut turut 181,6; 78,5; 53,2; 37,5; 32,3; 23,7; 19,7; 13,6 dan 5,7 kDa. Pada teknik *Dot-Blot* hasil penelitian menunjukkan bahwa pada enzim selulase yang di dapat dari saluran pencernaan rayap memiliki reaktivitas yang baik terhadap antibodi anti selulase.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dengan teknik SDS-PAGE dapat diketahui berat molekul (BM) dari enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap. Pada teknik *Dot blot* dapat dianalisis bahwa enzim selulase yang berasal dari saluran pencernaan rayap adalah reaktivitas yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

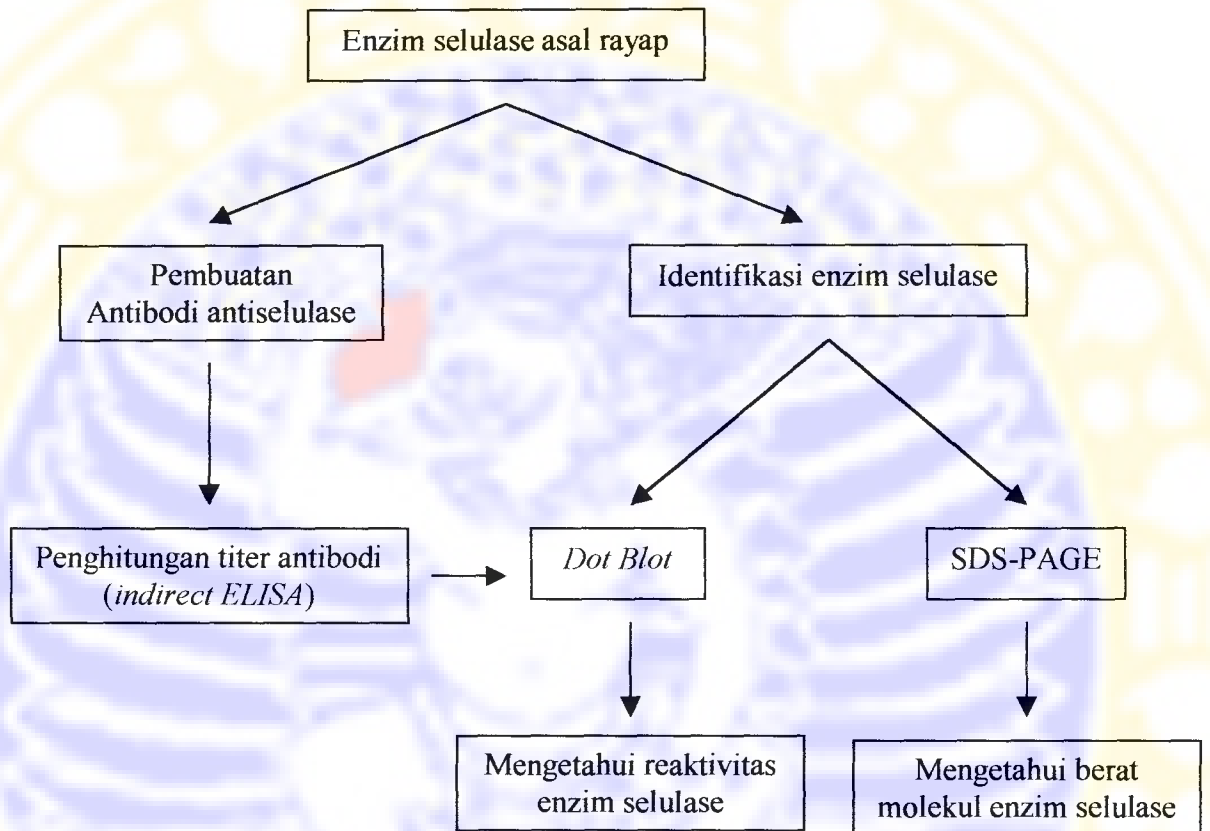
- Aanen, D.K., P. Eggleton, C. Rouland- Lefevre, T. Guldborg-Froslev, S. Rosendahl and J.J Boomsma, 2002. The Evolution of Fungus-growing Termites and Their Mutualistic Fungal Symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. 99(23): 14887-14892.
- Amir, M., 1984. Biologi dan Pengendalian Rayap Sebagai Dasar Pengendaliannya. Seminar Rayap, Hotel Horizon, Ancol, Jakarta.
- Arora, S.P., 1989. Pencernaan Mikroba pada Ruminansia. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Baratawidjaya, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 22-37, 151-158.
- Beldman, G., S. Leeuwen, F. Rombouts and F. Voragen. 1985. The Cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, Characterization and Enzymatic Properties of a beta-1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. Eur. J. Biochem 146-301.
- Berghem, L., L. Pettersson, and U. Axio-Fredriksson, 1975. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation Characterization and Enzymatic Properties of beta-1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*, Eur J. Biochem: 53-55.
- Breznak, J.A. and A. Brune, 1994. Role of Microorganisms in the Digestion of Lignocellulose by Termites. Annu. Rev. Entomol. 39: 453-487.
- Chaplin, M. 2005. Cellulose. London South Bank University. [http : //www.isbu.ac.uk/water/](http://www.isbu.ac.uk/water/)
- Davis, L., M. Kuehl and Battey. 1994. Basic Molecular in Biology. Appleton and Lange Press. Connecticut. 616-689.
- Enari, T. M. 1983. Microbial Cellulase. In : W. M. Fogarty, 1985. Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci. Publishing, New York.
- Ensminger, M.E., J.E. Oldfield and W.W. Heinemann, 1990. Feeds and Nutrition. Second Ed. The Ensminger Publishing Co.
- Erosjostrom. 1995. Kimia Kayu Dasar-Dasar dan Penggunaannya Edisi 2, UGM Press. Yogyakarta.

- Fan, L. T. and Lee, Y., 1983. Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume XXV, John Wiley and Sons Inc., USA.
- Gong, C. S. and G.T. Tsao, 1979. Cellulase and Biosynthesis Regulation. *In* : D. Pearlman (ed.), *Annual Report on Fermentation Process*. Academic Press, New York.
- Hafidawati, 1996. Kelayakan Tekno Ekonomi Pemanfaatan Hasil Samping Pengolahan Kelapa Sawit untuk Produksi Enzim Selulase dan Pakan dalam Skala Industri. IPB. Bogor.
- Haris, W.V. 1971. *Termites Their Recognition and Control*. London: Long Man Group.
- Harlow, E. and D. Lane, 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., New York
- Haryanto, B. 2005. Jerami Padi sebagai Ransum Dasar Ternak Ruminansia. *Warta, Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. Bogor. balitnak.litbang.deptan.go.id
- Hasan, T. 1986. *Rayap dan Pemberantasannya (Penanggulangan dan Pencegahan)*. Jakarta.
- Hino, T., T. Miwa, N. Asanuma, K. Shiraishi, H. Kitamura and H. Mizoguchi, 2000. Effect of Addition of Cellase Preparation on Fiber Digestion in Beef Cattle. *Animal Science Journal*, 71(7); J46-J50.
- Inglin, M., Feinberg, B. A., and Loewenberg, J. R. 1980. Partial Purification and Characterization of A New Intracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 185, 515-519
- Irwin, D.C., S. Zhang and D.B. Wilson, 2000. Cloning, Expression and Characterization of A Family 48 Exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* 267: 4988-4997.
- Judoamidjojo, M., E.G. Said, dan L. Hartono, 1989. *Biokonversi*, Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Kusnoto, 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunologi Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat lokal. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3: 11-13: 14

- Lehninger, A.L., 1983. *Dasar-dasar Biokimia*, terjemahan penerbit Erlangga, Jakarta.
- Li, L., L. Flora and K. King 1965. Individual Roles of Celulase Components Derived from *Trichoderma viride*, *Arch Biochem Biophys* 111: 439.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.C. Zipusky, P. Matsudaria and Darnel. 1995. *Molecular Cell Biology*. Thirth Eddition. Scientific American Book. New York.
- Meyer, R.J., and J.H. Walker. 1987. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanich Publisher. 61-95, 179, 258.
- Miyamoto, K. 1997. *Renewable Biological System for Alternative Sustainable Energy Production (FAO Agricultural Service Bulletin-128)* Osaka, Japan.
- Montenecourt, B. S. and D. E. Eveleigh. 1979. *In* : W.M. Fogarty (ed.). 1983. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applies Science Publ., London.
- Murashima, K., A. Kosugi and R.H. Doy, 2002. Synergistic Effect on Crystalline Cellulose Degradation between Cellulosomal Cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* 184(18): 5088-5095.
- Nandika, D., Rismayadi, Y., Farah, D., 2003. *Rayap Biologi dan Pengendaliannya*. Muhammadiyah University Press. Surakarta.
- Nevell, T.P. and S.H. Zeronian, 1985. *Cellose Chemistry and Its Applications*. John Wiley & Sons, New York.
- Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L., Lappalainen, A., Enari, T. -M., and Raunio, V. 1983. Cellobiohydrolase From *Trichoderma Reesei*. *Biochem. J.* 215, 677-683.
- Ohkuma, M., S. Noda, Y. Hongoh and T. Kudo, 2001. Coevolution of Simbiotic Systems of Termites and Their Gut Microorganism. *RIKEN Review*, 41.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Imunologi Airlangga University Press*. Surabaya.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Institut Teknologi Bandung.
- Roonwal, M. L., 1976. *Termite Life and Termite Control in Tropical South Asia*. Scientific Publisher. Jadhpur.



- Rybicki and M. Purves. 1996. Enzyme-Assisted Immunoelectroblotting (IEB or Western Blotting). Departement of Microbiology. University of Cape Town. ([http:// web. Uct.ac.za/microbiology/western.html](http://web.Uct.ac.za/microbiology/western.html)).
- Saloheimo, M. Lehtovaara. P., Penttila, M., Teeri, T. T., Stahlberg, J., Johansson, G., Petterson, G., Claeysen, M., Tomme, P., and Knowles, J. K. C. 1998. EG III, A New Endoglucanase From *Trichoderma Reesei* : The Characterization of Both Gene and Enzyme. *Gene* 63, 11-21.
- Schelegel, Hans G. 1994. Mikrobiologi Umum. Edisi ke-enam, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Selby, K., 1969. The Purification and Properties of The C1-Component of The Cellulase Complex, *Advances in Chemistry, Series No. 95*, R. Gould, Amer Chem. Soc., Washington, DC., 34.
- Setyabudi, 2002. Amoniasi, Jerami Pakan Bermutu. *Suara Merdeka*. September 30.
- Smith, R.L., 2004. Termites. www.desertmuseum.org/nhsd-termites.html.
- Sutiman Et al., 1995. Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Diktat Kuliah dan Praktikum. Jurusan Biologi, FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Syaukani, A.H. Mahmud dan Mawardinur, 2001. Biologi, Ekologi, Distribusi dan Peranan Berbagai Jenis Rayap di Hutan Primer Ketambe Ekosistem Leuser Sumatera. www.dikti.org/p3m/abstrakPID/tema6.pdf.
- Tarumingkeng, R.C., 2001. Biologi dan Perilaku Rayap. [Hayati-ipb.com/biologi-dan perilaku-rayap.htm](http://Hayati-ipb.com/biologi-dan-perilaku-rayap.htm).
- Tenkanen, M., Marja-Leene Niku-paavola, Linder, M., Viikari, L. (2003) Cellulases in Food Processing. VTT Biotechnology, Espoo, Finland.
- Thayer, D.W. 1978. Growth of "Seeded" cellulolytic enrichment cultures on mosquito wood. *Applied microbiology* vol. 36(2).
- Tizard, I.R. 1982. An Introduction of Veterinary Immunologi. WB. Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partadiredja dan Soehardjo Hardoworo. 1987. AUP.2, 51-99, 314-316, 303-324.
- Zaldivar, M., J.C. Velasquez, I. Conteras and L.M. Perez, 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, A Mutant with Enhanced Production of Lytic Enzymes; Its Potential Use in Waste Cellulose Degradation and/or Biocontrol. *EJB Electronic Journal of Biotech.* 4(3).

Lampiran 1 : Bagan Alir Penelitian

Lampiran 2 : Penentuan Rumus Persamaan untuk Menghitung Berat Molekul (BM) Sampel

Curve Fit

MODEL: MOD_4.

Dependent variable.. LOGYBM Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99792
R Square .99585
Adjusted R Square .99336
Standard Error .03864

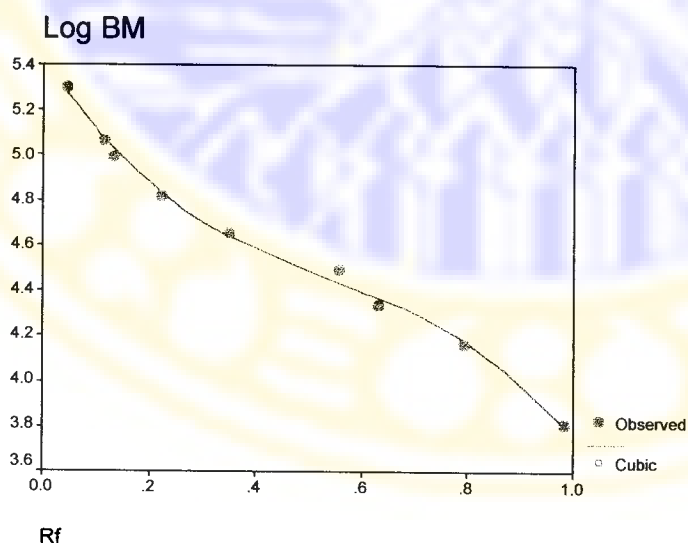
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	1.7919809	.59732695
Residuals	5	.0074660	.00149321

F = 400.02949 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
RF	-3.643820	.464555	-2.542931	-7.844	.0005
RF**2	5.058708	1.056403	3.580567	4.789	.0049
RF**3	-3.087155	.666140	-2.097479	-4.634	.0057
(Constant)	5.429132	.048400		112.172	.0000



Lampiran 3 :

Penentuan Berat Molekul (BM) pada protein berdasarkan pita protein yang terbentuk, menggunakan rumus :

$$R_f = \frac{d}{l}$$

Keterangan :

R_f = Retardation factor

d = Jarak pergerakan protein dari tempat awal

l = Jarak pergerakan warna dari tempat awal

Panjang gel = 120 mm

Lampiran 3 :

**Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein selulase asal Rayap
Dengan Teknik SDS-PAGE**

PP* ke	Jarak pada gel (mm)	Nilai R _f	Y** Da	Antilog Y	BM (kDa)
1	6	0,050	5,254	181551,57	181,6
2	23	0,192	4,895	78523,56	78,5
3	34,5	0,288	4,726	53210,83	53,2
4	49	0,408	4,574	37497,30	37,5
5	57	0,475	4,509	32284,94	32,3
6	75	0,625	4,374	23659,19	23,7
7	84,5	0,704	4,294	19678,86	19,7
8	99	0,825	4,132	13551,89	13,6
9	120	1,000	3,757	5714,78	5,7

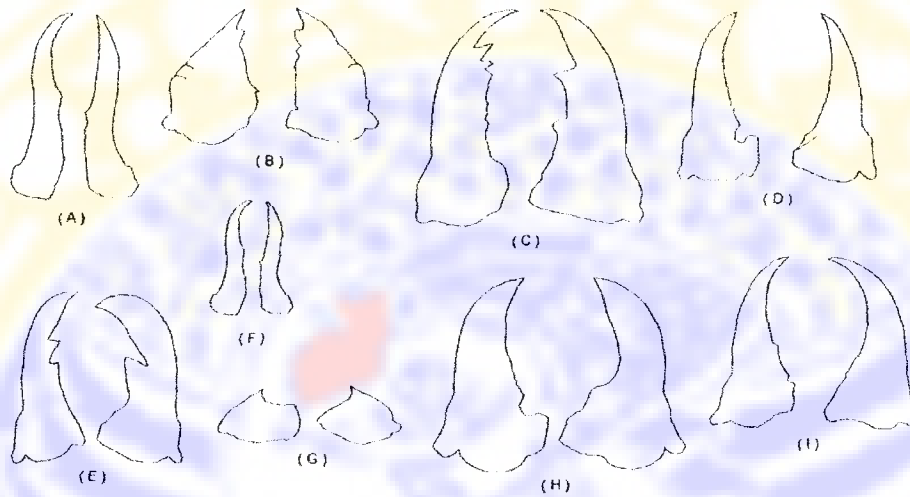
* PP = Pita Protein;

**Persamaan Regresi : $Y = 5,429 - 3,6438 x + 5,0587 x^2 - 3,0872 x^3$;
dimana x = nilai R_f

Lampiran 4 :**Nilai *Optical Density* dan Titer Antibodi Hasil Pengujian Antibodi Anti selulase kelinci Yang Diuji dengan Teknik *Indirect* ELISA**

No. Kelinci	Antigen Coating ($\mu\text{g/ml}$)	Nilai OD	Titer Antibodi
1	10	1,274	2560
2		1,253	2560
3		1,242	2560
4 (kontrol)		0,040	0
COV : 0,080 PBS : 0,006			
1	5	1,317	5120
2		1,358	5120
3		1,242	5120
4 (kontrol)		0,044	0
COV : 0,088 PBS : 0,007			

Lampiran 5 :

**Mandibel Kasta Prajurit**

A : <i>Mastotermes</i>	B : <i>Cryptotermes</i>	C : <i>Neotermes</i>
D : <i>Coptotermes</i>	E : <i>Schedorhinotermes</i>	F : <i>Reticulitermes</i>
H : <i>Nasutitermes</i>	I : <i>Macrotermes</i>	J : <i>Odontotermes</i>