

**OPTIMALISASI PROSES AMOBILISASI  
*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  REKOMBINAN (pTP510)  
DENGAN PEMANASAN**

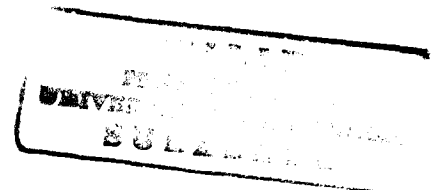
MPK 10/06  
110V  
0

**SKRIPSI**

**ELOK MUBAROH NOVARIDA**



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



**OPTIMALISASI PROSES AMOBILISASI**  
***Escherichia coli* DH5 $\alpha$  REKOMBINAN (pTP510)**  
**DENGAN PEMANASAN**

**SKRIPSI**

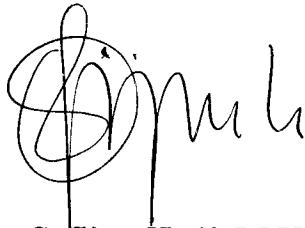
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Airlangga

**ELOK MUBAROH NOVARIDA**  
**NIM : 089912019**

**Tanggal Lulus : 17 Pebruari 2006**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**



**Drs. Sofijan Hadi, M.Kes**  
**NIP. 132 009 466**

**Pembimbing II,**



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

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Judul** : **OPTIMALISASI PROSES AMOBILISASI**  
***Escherichia coli* DH5 $\alpha$  REKOMBINAN (pTP510)**  
**DENGAN PEMANASAN**

**Penyusun** : **ELOK MUBAROH NOVARIDA**

**Nomor Induk** : **089912019**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**



**Drs. Sofijan Hadi, M.Kes**  
**NIP. 132 009 466**

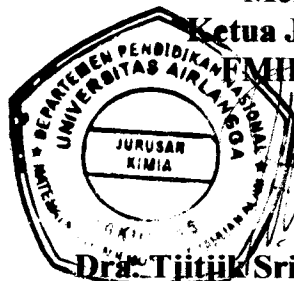
**Pembimbing II,**



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

**Mengetahui :**

**Ketua Jurusan kimia**  
**FMIPA UNAIR,**



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

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

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

**Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga**



*Katakanlah, "Kalau sekiranya lautan menjadi tinta untuk (menulis) Kalimat-kalimat Rabb-ku, sungguh habislah lautan itu sebelum habis (ditulis) Kalimat-kalimat Rabb-ku, meskipun Kami Datangkan Tambahan sebanyak itu (pula)". (QS. Al Kahfi : 109)*

*"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal".(QS. Ali Imran : 190)*

*"...dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan (QS. An-Nahl : 68)*

*"Bertafakkur sesaat lebih baik daripada bangun sholat sepanjang malam". (Abu Darda')*

*"Manusia selalu mencari naungan dari panasnya matahari, tapi ia lupa untuk mencari naungan dari panasnya api neraka".  
( Iman Al- islam)*

**Ibu dan Bapak, terima kasih...  
Atas do'a yang selalu terpanjatkan  
Kasih sayang yang senantiasa tercurahkan  
Pengorbanan dan jerih payah yang diberikan  
Serta bimbingan yang selalu diajarkan  
Semoga semuanya takkan sia-sia.**



**Dengan hormat dan kasih sayang  
kupersembahkan skripsi ini untuk  
Ibu, Bapak, dan kedua Kakakku**

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur ke Hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan kemudahan yang telah diberikan, sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Optimalisasi Proses Amobilisasi *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) dengan Pemanasan” sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana sains.

Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan berkat bantuan dari banyak pihak. Oleh karena itu penyusun mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Sofijan Hadi, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing I, dan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, selaku Dosen Pembimbing II<sup>o</sup> yang telah banyak memberikan bimbingan, ilmu, dan nasehat dengan penuh kesabaran.
2. Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Airlangga.
3. Drs. Handoko Darmo Kusumo, M.Sc, selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan saran dan nasehat.
4. Dr. Afaf Baktir, M.Si, Bapak Purkan, S.Si, M.Si, serta bapak dan ibu dosen kimia Unair atas bekal ilmu yang telah diberikan, semoga menjadi ilmu yang bermanfaat .
5. Ibu dan Bapak yang selalu mendo’akan dan memberi motivasi agar tetap tegar menghadapi rintangan saat penyusunan skripsi ini.
6. Kedua kakakku (Mba’ Ana dan Mas Bashofi), adik-adikku (Sulthon, Auni dan Rofi’) serta keluarga besarku yang kusayangi, terima kasih telah menjadi penghibur dikala duka dan penyemangat disaat kejenuhan datang.

7. Teman-teman kimia Unair, khususnya angkatan '99 yang telah bersama-sama dalam menuntut ilmu. Semoga kita semua mendapatkan apa yang dicita-citakan.
8. Teman-teman di laboratorium biokimia, terutama One, Ani , dan Anita yang telah banyak membantu selama penelitian.
9. Sahabat-sahabatku (Endang, Umi, Nurul, Rita, Dinok, dan Nina) terima kasih atas persahabatan yang terjalin selama ini.
10. Ning Ulfa, Cuyun, Mama, Bean-tea, V-3, dan semua penghuni Sutorejo 40 yang telah menjadi keluarga kedua di Surabaya.
11. Mba' Tarti, Windari, Mba' Yoland, Mba' Naely, dan Mba' Ratna yang telah mewarnai kehidupanku ini dengan kebaikan sehingga menjadi lebih berarti.
12. Pak Damam, Pak Gimam, Mas Rochadi, dan Mba' Yuli terima kasih atas kebaikan-kebaikannya sehingga membantu memperlancar penelitian ini.
13. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penyusun mengharap kritik dan saran dari pembaca untuk penyempurnaan naskah ini.

Surabaya, 26 Februari 2006

Penyusun,

Elok Mubaroh N.



Elok Mubaroh Novarida, 2006. Optimalisasi Proses Amobilisasi *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) dengan Pemanasan. Skripsi di bawah bimbingan Drs. Sofijan Hadi, M.Kes dan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

---

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui suhu amobilisasi optimum *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan pemanasan. Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil mampu menghidrolisis substrat *oat spelt xylan* dan *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida. Suhu amobilisasi optimum ditentukan dengan melakukan amobilisasi dengan variasi suhu 50 °C, 60 °C, 70 °C 80 °C, dan 90 °C. Sel amobil menghidrolisis *oat spelt xylan* menghasilkan gula pereduksi, salah satunya adalah xilosa, sedangkan sel amobil menghidrolisis *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida menghasilkan *p*-nitrofenol yang berwarna kuning. Kadar xilosa ditentukan dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) secara spektrofotometri pada  $\lambda$  550 nm, sedangkan kadar *p*-nitrofenol ditentukan dengan mengukur absorbansinya pada  $\lambda$  405 nm. Aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dalam menghidrolisis *oat spelt xylan* adalah 235,986 U/ml. Hasil ini diperoleh apabila amobilisasi dilakukan pada suhu 60 °C. Sedangkan aktivitas tertinggi dalam menghidrolisis *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida adalah 31 U/ml yaitu pada saat suhu amobilisasi 70 °C. Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan 1 (pTP510) amobil dapat dipakai berulang sebanyak dua kali.

*Kata Kunci : Enzim xilanolitik, Amobilisasi, Pemanasan, Oat spelt xylan, E. coli DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510), p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida.*

Elok Mubaroh Novarida, 2006. Optimalization of Immobilization Process on *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Recombinant (pTP510) by Heating. The Script guided by Drs. Sofijan Hadi, M.Kes and Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, Department of Chemistry, Math and Natural Science Faculty, Airlangga University, Surabaya.

---

### ABSTRACT

The research has been done to know optimum temperature of immobilization process on *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  recombinant (pTP510) by heating. The immobile of *E.coli* DH5 $\alpha$  recombinant (pTP510) could hydrolyze oat spelt xylan and *p*-nitrophenil- $\beta$ -D-xylopyranosida. Optimum temperature of immobilization was determined with various temperature at 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, and 90 °C. The immobile of *E.coli* DH5 $\alpha$  recombinant (pTP510) hydrolyzed oat spelt xylan and produce reducing sugar, dominantly xylose. Whereas, for *p*-nitrophenil- $\beta$ -D-xylopyranosida produce *p*-nitrophenol which has yellow colour. Concentration of xylose was determined by 3,5-dinitrosalysilic acid method using spectrophotometer at  $\lambda$  550 nm, whereas, for *p*-nitrophenol concentration was determined by measured the absorbance at  $\lambda$  405 nm. Optimum xylanolytic activity on oat spelt xylan was 235,983 U/ml. This result can be obtained while immobilization was done at 60 °C. Whereas on *p*-nitrophenil- $\beta$ -D-xylopyranosida, xylanolytic activity was 31 U/ml with optimum temperature of immobilization was 70 °C. The immobile of *E.coli* DH5 $\alpha$  recombinant (pTP510) can be used twice to hydrolyze oat spelt xylan.

*Key Word* : Xylanolytic enzyme, Immobilization, Heating, Oat spelt xylan, *E.coli* DH5 $\alpha$  recombinant (pTP510), *p*-nitrophenil- $\beta$ -D-xylopyranosida.

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT .....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Amobilisasi Enzim .....	6
2.1.1 Amobilisasi dengan metode pengikatan karier .....	7
2.1.2 Amobilisasi dengan metode pengikatan silang .....	8
2.1.3 Amobilisasi dengan pengebakan.....	8
2.2 Amobilisasi Sel Mikroba.....	10
2.3 Tinjauan Tentang Xilan.....	11
2.4 Enzim-enzim Xilanolitik .....	13
2.4.1 Enzim endo- $\beta$ -xilanase.....	13
2.4.2 Enzim $\beta$ -xilosidase.....	14
2.4.3 Enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosida .....	14
2.5 Dinding Sel Bakteri.....	16
2.6 Membran Sitoplasma.....	18
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	21
3.2 Sampel Penelitian.....	21
3.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	21
3.3.1 Bahan kimia.....	21
3.3.2 Alat penelitian .....	21
3.4 Variabel Penelitian .....	22
3.5 Diagram Alir Penelitian .....	23
3.6 Metode Penelitian.....	24
3.6.1 Penyiapan media padat.....	24
3.6.2 Penyiapan media cair .....	24
3.6.3 Peremajaan <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510).....	24

3.6.4	Pembuatan inokulum <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510)	25
3.6.5	Produksi sel <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510)	25
3.6.6	Amobilisasi sel <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) dengan pemanasan	25
3.6.6.1	Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat <i>oat spelt xylan</i>	26
3.6.6.2	Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat <i>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-xilopiranosida</i>	27
3.6.7	Penentuan pemakaian berulang maksimum sel amobil Untuk menghidrolisis <i>oat spelt xylan</i>	27
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Penyiapan Sel <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510)	29
4.2	Penentuan Suhu Amobilisasi Optimum	31
4.3	Penentuan Pemakaian Berulang Sel <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) Amobil	37
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1	Kesimpulan	39
5.2	Saran	39
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Skema klasifikasi amobilisasi enzim	7
2.2	Diagram skematik amobilisasi enzim	11
2.3	Struktur xilan tumbuhan	15
2.4	Dinding sel bakteri gram positif	18
2.5	Dinding sel bakteri gram negatif	18
2.6	Membran sitoplasma bakteri	20
3.1	Diagram alir penelitian	23
4.1	Hasil peremajaan <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) dan <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pBKS+)	30
4.2	Suhu optimum amobilisasi <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) untuk substrat <i>oat spelt xylan</i>	35
4.3	Suhu optimum amobilisasi <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) untuk substrat <i>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-xilopiranosida</i>	36
4.4	Struktur membran bakteri	36
4.5	Pemakaian berulang <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) amobil	38

## DAFTAR TABEL

<b>Nomor</b>	<b>Judul Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Komposisi monomer (%) dari berbagai sumber xilan	12
2.2	Perbedaan karakteristik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif	17



## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Kurva Standar Xilosa
2	Kadar xilosa Hasil Hidrolisis <i>Oat spelt xylan</i> oleh <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Rekombinan (pTP510) yang Telah Diamobilisasi pada Berbagai Suhu Amobilisasi
3	Kurva Standar <i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida
4	Kadar <i>p</i> -nitrofenol Hasil Hidrolisis <i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida oleh <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Rekombinan (pTP510) yang Telah Diamobilisasi pada Berbagai Suhu Amobilisasi
5	Kadar Xilosa Hasil Hidrolisis <i>Oat spelt xylan</i> oleh <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Rekombinan (pTP510) Amobil pada Pemakaian Berulang
6	Aktivitas Xilanolitik <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Rekombinan (pTP510) Amobil

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia sebagai negara agraris menghasilkan limbah pertanian dalam jumlah berlimpah yang belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu komponen yang banyak terdapat dalam limbah tersebut adalah hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan polisakarida yang menyusun dinding sel tumbuhan bersama-sama dengan selulosa dan lignin. Berdasarkan komposisi gula penyusunnya, hemiselulosa diklasifikasikan sebagai xilan, manan, arabinogalaktan, dan arabinan. Xilan dan manan merupakan hemiselulosa utama dalam dinding sel tumbuhan (Hilge *et al.*, 1996).

Xilan dapat dihidrolisis secara sempurna oleh aktivitas sinergis beberapa enzim xilanolitik yaitu : endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dan asetil esterase. Endo-1,4- $\beta$ -xilanase dapat memecah kerangka dasar struktur xilan, sehingga merupakan enzim kunci dalam proses depolimerisasi xilan (Subramaniyan *et al.*, 2002). Enzim xilanolitik dapat diisolasi dari berbagai fungi dan bakteri (Blanco *et al.*, 1993). Pada umumnya enzim xilanolitik yang bersumber dari mikrobial tersebut bekerja pada kondisi optimum pH asam atau pH netral, sedangkan xilan lebih mudah dihidrolisis dalam suasana alkali dibanding netral (Horikoshi, 1999)

Penelitian pendahuluan telah dilakukan oleh Puspaningsih (2004) yang telah berhasil melakukan kloning gen xilanolitik yang diisolasi dari isolat IT-08 ke



dalam inang *E.coli* DH5 $\alpha$  sehingga dihasilkan *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510). Isolat IT-08 merupakan bakteri xilanolitik termofilik. *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) yang dihasilkan menunjukkan aktivitas enzim  $\beta$ -xilosidase dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dengan suhu optimum 70<sup>0</sup>C dan memiliki stabilitas pH pada kisaran 5-8. Hasil ekspresi kedua enzim rekombinan pada kondisi suhu optimumnya mengalami peningkatan aktivitas spesifik 3 kali pada enzim  $\beta$ -xilosidase dan 54 kali pada  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dibanding aktivitas kedua enzim dari isolat asalnya IT-08.

Keberhasilan penelitian tersebut diharapkan mampu membuka peluang yang lebih besar bagi aplikasi enzim xilanolitik dalam berbagai industri. Enzim xilanolitik dapat dimanfaatkan untuk beberapa keperluan antara lain (1) proses pemutihan pada industri pulp dan kertas (2) meningkatkan mutu pakan ternak (3) produksi alkohol, xilitol (4) pengolahan bahan makanan (Beg *et al.*, 2001, Subramaniyan *et al.*, 2002, dan Shallom *et al.*, 2002).

Pada industri pulp dan kertas, proses pemutihan pulp berlangsung pada suhu tinggi dan pH alkali, sehingga diperlukan enzim xilanolitik yang dapat menghidrolisis xilan yang terkandung dalam pulp yang bekerja pada suhu tinggi (>50<sup>0</sup>C) dan pH netral sampai pH alkali. Enzim xilanolitik yang dihasilkan oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) merupakan enzim yang terbebas dari enzim selulase. Hal ini sangat menguntungkan apabila diaplikasikan dalam industri pulp dan kertas karena serat selulosa yang merupakan produk utama industri ini tidak akan mengalami hidrolisis, sehingga dapat meningkatkan kuantitas pulp yang diproduksi.

Dalam suatu proses produksi secara enzimatis, enzim dapat digunakan dalam bentuk terlarut (mobil) atau bentuk tak larut (amobil). Bentuk enzim amobil merupakan terobosan baru yang sedang dikembangkan saat ini (Wiseman, 1985). Penggunaan enzim terlarut dalam reaksi enzimatis mempunyai kelemahan, antara lain enzim yang digunakan sulit didapatkan kembali dalam keadaan aktif dan murni, sehingga tidak dapat dipakai secara berulang-ulang. Hal ini akan meningkatkan biaya produksi, sehingga tidak efektif apabila digunakan dalam industri. Kelemahan ini dapat diatasi dengan memodifikasi enzim menjadi bentuk amobil (Chibata, 1978).

Amobilisasi enzim adalah suatu teknik melokalisasi enzim dalam suatu ruang yang dapat menyimpan aktivitas katalitik dari enzim tersebut yang memungkinkan penggunaan enzim secara berulang dan terus menerus (Chibata, 1978). Enzim amobil dapat digunakan secara menguntungkan dalam bioreaktor yang dioperasikan secara kontinu. Pada prakteknya, amobilisasi enzim dapat dicapai dengan mengikat enzim secara kovalen ke permukaan bahan yang tak larut dalam air ; pengikatan silang dengan bahan yang cocok untuk menghasilkan partikel yang larut ; penjebakan di dalam suatu matrik atau gel yang permeable terhadap enzim, substrat , dan produk ; dengan enkapsulasi ; dan dengan adsorpsi pada zat pendukung (Smith, 1993).

Di industri, metode amobilisasi dengan proses yang cukup sederhana dan ekonomis sangat disukai. Jack dan Zajic (1977) menyebutkan bahwa proses amobilisasi menjadi lebih sederhana dan ekonomis dengan menggunakan sel utuh. Enzim xilanolitik yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510)

merupakan enzim intraseluler dan bersifat termofilik (Puspaningsih, 2004). Penggunaan enzim tersebut untuk proses amobilisasi harus melalui proses ekstraksi enzim dari dalam sel dan dilanjutkan dengan proses pemurnian. Hal ini akan meningkatkan biaya produksi dan membutuhkan waktu yang lama. Untuk keperluan tersebut maka penggunaan teknik amobilisasi sel akan lebih efektif. Sel mikroba dapat difungsikan sebagai matrik penjebak enzim (Chibata, 1978).

Takasaki dan Komyashi (1969) melaporkan jenis amobilisasi sel mikroba dengan pemanasan tanpa perlakuan kimia. Enzim yang terjebak dalam sel tidak akan keluar dari sel, meskipun sel dipanaskan dalam waktu lama dibawah kondisi yang sesuai untuk ekstraksi enzim dari sel dengan autolisis (Chibata, 1978). Pemanasan menyebabkan inaktivasi enzim pengganggu lain yang berperan untuk autolisis dan menahan enzim xilanolitik, dengan demikian sel amobil dapat digunakan secara berulang (Bhatia dan Prabhu, 1980)

Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan amobilisasi sel bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan metode pemanasan. Proses amobilisasi sel bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) diharapkan merupakan metode yang sederhana dan sesuai, karena enzim xilanolitik yang bersifat termofilik akan lebih mudah dipisahkan ekspresinya dengan enzim lain yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) yang bersifat mesofilik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas dapat diambil suatu rumusan masalah sebagai berikut :

1. berapakah suhu amobilisasi optimum sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan pemanasan?
2. sampai berapa kali sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil dapat digunakan secara berulang untuk menghidrolisis *oat spelt xylan* ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. menentukan suhu amobilisasi optimum sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan pemanasan
2. menentukan aktivitas *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil dalam menghidrolisis *oat spelt xylan* secara berulang.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu membuka peluang yang lebih luas dalam teknik pemanfaatan enzim xilanolitik secara efektif dan ekonomis dalam berbagai industri yang menggunakan bahan baku xilan/hemiselulosa.

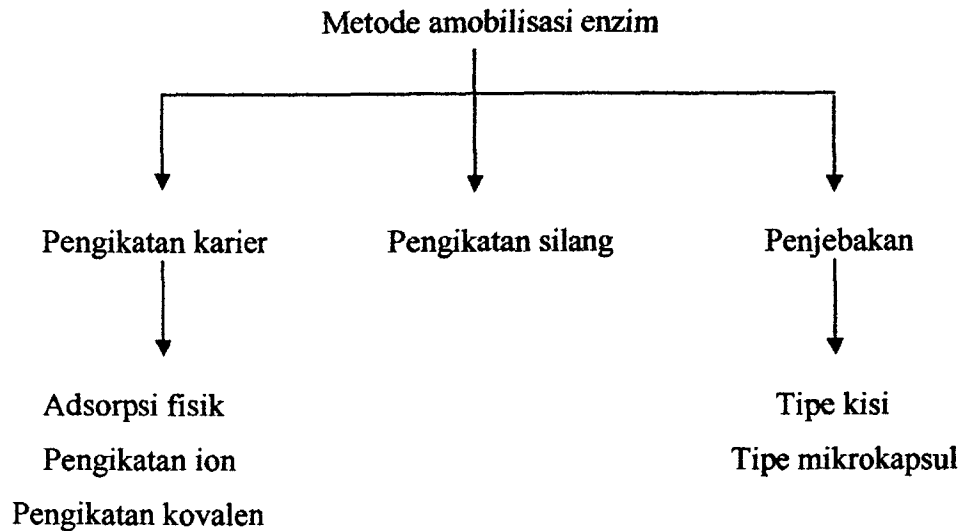
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah suatu teknik melokalisasi enzim dalam suatu ruang yang dapat menyimpan aktivitas katalitik dari enzim tersebut, yang memungkinkan penggunaan enzim secara berulang-ulang dan terus-menerus (Chibata, 1978). Enzim dapat ditahan pergerakannya dalam suatu padatan pendukung (karier) yang berasal dari polimer organik maupun anorganik yang tidak larut dalam air (Chibata, 1978) atau dengan menahannya secara fisik dalam ruang (rongga) bahan (Wirahadikusumah, 1988). Penggunaan enzim amobil dapat mencegah difusi enzim dalam produk reaksi enzimatik sehingga memungkinkan memperoleh kembali enzim tersebut. Dengan demikian enzim dapat digunakan secara berulang-ulang (Chibata, 1978).

Secara umum, ada tiga metode amobilisasi enzim, yaitu: metode pengikatan karier, penjebakan dan pengikatan silang. Metode pengikatan karier berdasarkan pengikatan enzim pada bahan pendukung yang tidak larut dalam air. Metode penjebakan berdasarkan penggabungan enzim ke dalam kisi-kisi gel semipermeabel atau penjebakan enzim dalam polimer semipermeabel. Metode pengikatan silang berdasarkan pengikatan molekul enzim dengan pereaksi bergugus fungsi ganda (Chibata, 1978).



Gambar 2.1. Skema klasifikasi amobilisasi enzim (Chibata, 1978)

### 2.1.1. Amobilisasi dengan metode pengikatan karier.

Pengikatan enzim pada suatu karier yang tidak larut dapat digolongkan atas dasar enzim terikat, yaitu : adsorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen. Sebagai karier dapat digunakan bahan organik maupun anorganik (Chibata, 1978).

Pengikatan karier melalui adsorpsi fisik merupakan metode amobilisasi enzim yang paling mudah dan sederhana. Selain itu, perubahan konformasi protein enzim dan destruksi pusat aktif tidak akan terjadi. Metode ini berdasarkan adsorpsi protein enzim pada permukaan karier yang tidak larut air. Kelemahan metode ini adalah kekuatan ikatan antara protein enzim dengan karier lemah, sehingga memungkinkan lepasnya enzim dari karier saat digunakan sebagai enzim amobil. Pada amobilisasi melalui ikatan ionik, molekul enzim berikatan ionik dengan materi pendukung padat yang mengandung residu-residu penukar ion.

penukar ion. Metode ikatan kovalen berdasarkan pada pengikatan enzim dengan karier yang tidak larut air secara ikatan kovalen (Chibata, 1978).

### **2.1.2. Amobilisasi dengan metode pengikatan silang.**

Metode pengikatan silang adalah pembentukan ikatan kovalen antara molekul-molekul enzim dengan reagen multifungsional, sehingga terbentuk agregat berikatan silang tiga dimensi yang tidak larut air (Chibata, 1978).

Cara pembentukan agregat enzim berikatan silang adalah dengan menambah senyawa pengikat silang ke dalam suatu larutan enzim pada kondisi tertentu. Gugus fungsional dalam molekul enzim yang digunakan untuk pembentukan ikatan kovalen adalah gugus  $\alpha$ -amino ujung (terminal), gugus  $\beta$ -amino dari lisin, gugus fenolik dari tirosin, gugus sulfhidril dari sistein dan gugus imidazol dari histidin. Bahan-bahan kimia yang dapat digunakan sebagai pengikat yaitu: glutaraldehid (basa schiff), turunan isosianat (ikatan peptida), bisdiazobenzidin (kopling diazo), N,N'-polimetilen bisiodoasetoamida (alkilasi) dan N,N'-etilen bismaleimida (ikatan peptida) (Chibata, 1978).

### **2.1.3. Amobilisasi dengan metode penjebakan.**

Metode penjebakan enzim untuk amobilisasi enzim merupakan metode melokalisasi enzim pada kisi suatu matrik atau membran polimer sedemikian rupa sehingga mencegah pelepasan makromolekul protein enzim dan membiarkan penetrasi substrat dan produk yang berukuran relatif kecil (Wiseman, 1985)

Berbeda dengan metode-metode sebelumnya, dalam metode ini tidak terjadi ikatan antara enzim dengan gel atau membran, sehingga enzim tersebut akan stabil.

Dikenal bermacam-macam pengebakan enzim, yaitu : tipe kisi yang terdiri atas pengebakan dalam gel dan dalam serat, dan tipe mikro kapsul (Chibata,1978).

Bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai pengebak enzim adalah polimer sintetik, seperti poliakrilamid, polivinil alkohol dan polimer alami seperti amilum (Wiseman, 1985).

## 2.2 Amobilisasi sel mikroba

Seperti pada amobilisasi enzim, amobilisasi sel mikroba didefinisikan dengan mengganti istilah enzim dengan sel mikroba, yaitu berupa suatu teknik melokalisasi sel mikroba dalam suatu ruang yang dapat menyimpan aktivitas katalitik enzim yang terdapat dalam sel tersebut. Metode amobilisasi sel ini memungkinkan penggunaan sel yang sedang tumbuh , statis (istirahat) atau sel yang mati. Tetapi pada kebanyakan amobilisasi, sel yang mati tetapi masih menyimpan aktivitas enzim lebih banyak digunakan. Penggunaan enzim yang sedang tumbuh untuk diamobilisasi seringkali merancukan pengertian sistem amobilisasi, sebab masih terdapatnya proses fermentasi sel tersebut (Chibata, 1978).

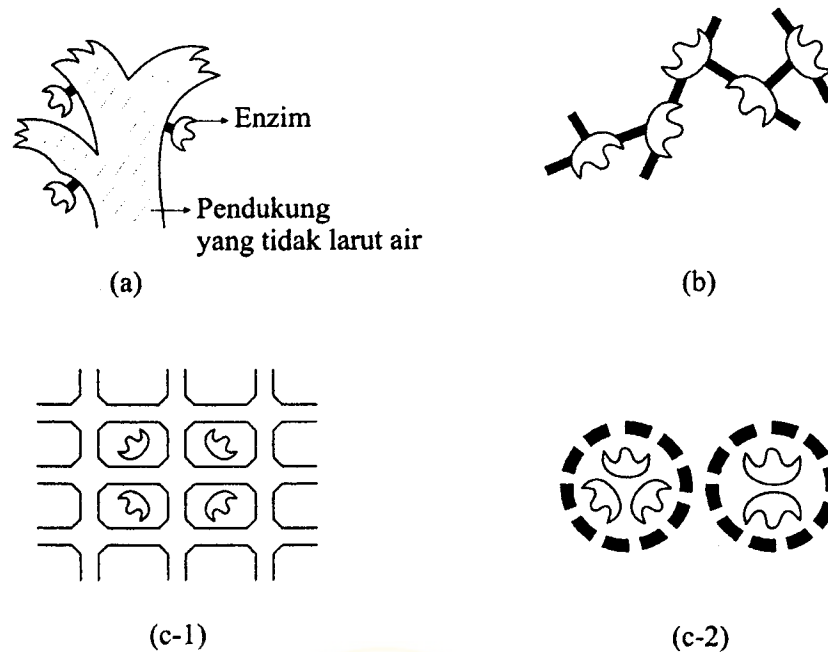
Atas dasar keberadaanya, enzim mikroba ada dua macam, yaitu enzim ekstraseluler dan enzim intraseluler. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang disekresi oleh mikroba selama pembiakannya, sedangkan enzim intraseluler,



untuk memperolehnya harus melalui proses ekstraksi enzim dari dalam sel dan dilanjutkan dengan proses pemurnian. Dalam banyak hal, proses ekstraksi dan pemurnian dapat menyebabkan kurang stabilnya enzim yang diperoleh, bahkan dapat menurunkan aktivitas enzim tersebut. Untuk mengatasi kendala tersebut telah dikembangkan teknik amobilisasi sel mikroba, teknik yang sederhana yaitu sel mikroba difungsikan sebagai matrik penjebak katalis (enzim) (Chibata, 1978).

Secara luas, amobilisasi sel mikroba yang mempunyai sistem multienzim sangat menguntungkan, sebab proses amobilisasi tersebut dapat berfungsi sebagai pengganti metode fermentasi yang melibatkan banyak enzim (multienzim) yang berantai. Metode tersebut dapat diterapkan dengan syarat : (1) mikroorganisme tidak mengandung enzim yang menghasilkan reaksi samping, (2) enzim pengganggu sudah dinaktifasi dengan metode yang sederhana seperti pemanasan atau perlakuan pH, dan (3) produk dan substrat mudah melalui membran sel mikroba (Chibata, 1978).

Tiga metode utama yang dikenal dalam amobilisasi sel mikroba seperti pada amobilisasi enzim, yaitu: pengikatan karier, penjebakan dan pengikatan silang (Chibata, 1978).



Gambar 2.2. Diagram skematik amobilisasi enzim (Chibata, 1978)  
 (a) metode pengikatan enzim pada pendukung, (b) metode pengikatan silang, dan (c) metode penjebakan : (c-1) tipe kisi, (c-2) tipe mikrokapsul

### 2.3 Tinjauan Tentang Xilan

Kata hemiselulosa pertama kali diperkenalkan oleh Schluzze (1891) terhadap fraksi-fraksi yang diekstraksi dari tumbuhan secara alkali. Hemiselulosa tersusun atas heteropolimer xilan, mannan, arabinogalaktan dan arabinan (Beg *et al.*, 2001). Klasifikasi hemiselulosa bergantung pada komposisi gula penyusunnya, Pada umumnya, monomer-monomer penyusun hemiselulosa ialah unit pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (manosa, glukosa, galaktosa), dan gula-asam (Saha, 2003).

Hemiselulosa mempunyai struktur yang amorf, random dan kekuatan strukturnya 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 karena pembelahan struktur kayu oleh enzim akan lebih mudah dalam proses pemutihan pulp dan kertas secara industri. Perlakuan ini akan mengurangi pemakaian teknik konvensional yang menggunakan sejumlah besar bahan kimia seperti klorin yang berdampak buruk terhadap lingkungan.

1,4- $\beta$ -Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa yang memiliki kerangka dasar residu ikatan 4- $\beta$ -D-xilopiranosil yang rantai sampingnya disubstitusi dengan asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan  $\alpha$ -arabinofuranosil (Subramaniyan *et al.*, 2002). Komposisi monomer penyusun xilan berbeda dari berbagai sumber tumbuhan yang berbeda. Adapun persentase kandungan monomer dari sumber xilan yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 2.1. Komposisi monomer (%) dari berbagai sumber xilan (Saha, 2003)

Jenis xilan	Xilosa	Ara binosa	Glukosa	Manosa	Galak tosa	Asam anhidro uronat	Asam glukuronat
<i>Birchwood</i>	89,3	1	1,4	-	-	8,3	-
<i>Rice bran</i>	46	44,9	1,9	-	6,1	1,1	-
<i>Wheat</i>	65,8	33,5	0,3	0,1	0,1	-	-
<i>Arabinoxylan</i>							
<i>Corn fiber</i>	46-54	33-35	-	-	5-11	-	3-6

Lokasi pemotongan oleh masing-masing enzim xilanolitik juga ditunjukkan pada Gambar 3, selain itu ditunjukkan pula lokasi pengikatan xilan dengan lignin melalui pengikatan residu L-arabinosa yang merupakan rantai cabang xilan dengan residu ferulil dan kumarin dari lignin (Beg *et al.*, 2001).

## 2.4 Enzim-enzim Xilanolitik

Hidrolisis total xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu : endo-1,4- $\beta$ -xilanase (1,4- $\beta$ -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) yang menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida, 1,4- $\beta$ -D-xilosidase (1,4- $\beta$ -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.37) yang 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).

### 2.4.1. Enzim endo- $\beta$ -xilanase.

Enzim endo- $\beta$ -xilanase (EC.3.2.1.8) sebagian besar dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri dan fungi, dan beberapa diantaranya juga dihasilkan oleh tumbuhan dan hewan (Subramaniyan *et al.*, 2002). Enzim xilanase yang berasal dari mikroba diklasifikasikan oleh Wang *et al.* (1988) ke dalam dua famili utama berdasarkan sifat fisika-kimianya yang meliputi massa molekul relatif dan titik isoelektriknya (PI). Famili GH10 (disebut juga famili F) merupakan kelompok endo-xilanase dengan massa molekul relatif tinggi dengan harga PI yang rendah. Sebaliknya famili GH11 (disebut juga famili G) mempunyai massa molekul relatif rendah dan harga PI yang tinggi. Perbedaan sifat katalitik dari kedua famili tersebut adalah famili 10 mampu menyerang ikatan glikosidik disebelah titik cabang dan mengarah ke ujung non-pereduksi dengan menggunakan dua residu xilopiranosil non-substitusi antara cabang-

cabang, sedangkan famili 11 menggunakan tiga residu xilopiranosil non-subtitusi. Berdasarkan hal tersebut famili 10 mempunyai beberapa aktivitas katalitik yang sesuai dengan  $\beta$ -xilosidase.

#### 2.4.2. Enzim- $\beta$ -xilosidase.

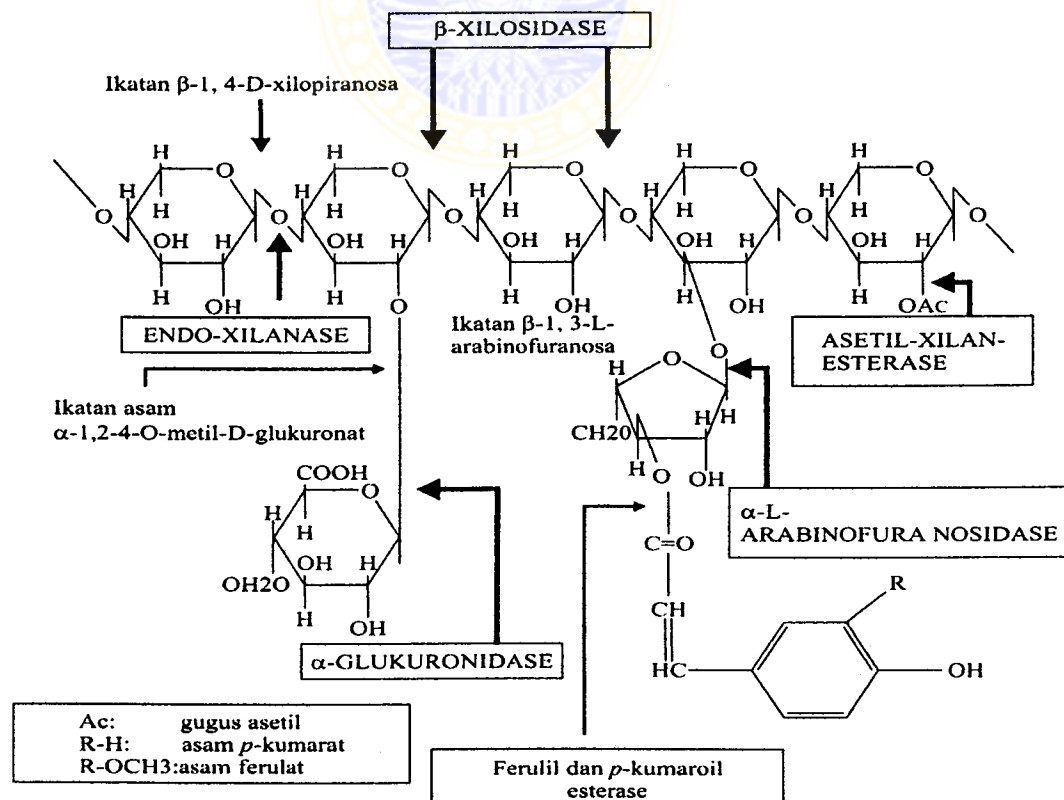
Enzim- $\beta$ -xilosidase (E.C.3.2.1.37) menghidrolisis 1,4- $\beta$ -D-xilooligosakarida dari ujung non-pereduksi dan melepaskan xilosa. Enzim ini mampu pula menghidrolisis substrat aril-xilosida. Selain itu, beberapa enzim  $\beta$ -xilosidase juga memiliki aktivitas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (13 % dari  $\beta$ -xilosidase), namun tidak memiliki aktivitas glikosidase yang lain, seperti  $\beta$ -glukosidase,  $\beta$ -galaktosidase atau  $\beta$ -N-asetilglukosaminidase (Yaw *et al.*, 2000, dan Bravman *et al.*, 2003). Berdasarkan persamaan runtunan N-terminalnya, maka enzim  $\beta$ -xilosidase digolongkan kedalam famili glikosida hidrolase 10, 3, 39, 43, 52 dan 54 (Henrissat *et al.*, 2003).

#### 2.4.3. Enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) menghidrolisis ujung non-pereduksi antara ikatan  $\alpha$ -L-arabinofuranosida dengan berbagai polisakarida yang mengandung arabinofuranosa (Debeche *et al.*, 2002). Enzim ini merupakan bagian dari glikosida hidrolase yang berperan dalam proses degradasi hemiselulosa seperti L-arabinofuranosida, arabinogalaktan dan L-arabinan. Adanya substituen L-arabinofuranosida dalam struktur xilan dapat secara kuat menghambat aktivitas endo- $\beta$ -xilanase dan  $\beta$ -xilosidase yang berakibat menghalangi degradasi total dari

polimer xilan (Shallom *et al.*, 2002). Hal ini disebabkan oleh struktur L-arabinofuranosida yang cukup besar, sehingga akan terjadi halangan ruang bagi aktivitas endo- $\beta$ -xilanase dan  $\beta$ -xilosidase. Oleh karena itu, keberadaan enzim arabinofuranosidase sangat penting dalam degradasi total xilan (Debeche *et al.*, 2002, dan Shallom *et al.*, 2002).

Berdasarkan kesamaan runtunan N-terminalnya, maka enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase digolongkan kedalam 4 famili glikosida hidrolase yaitu, 43, 51, 54 dan 62 (Henrissat *et al.*, 2003). Reaksi hidrolisis famili GH 43 berlangsung melalui mekanisme inversi, sedangkan mekanisme retensi terjadi pada famili GH 51 dan 54. Sementara itu mekanisme reaksi dari GH 62 belum diketahui dengan pasti (Shallom *et al.*, 2002).



Gambar 2.3. Struktur xilan tumbuhan (Beg *et al.*, 2001)

## 2.5 Dinding Sel Bakteri

Hampir seluruh prokariot memiliki dinding sel. Dinding sel merupakan struktur kaku yang memberikan bentuk pada sel. Tebal dinding sel kebanyakan bakteri yang telah dipelajari sejauh ini berkisar antara 10 – 35 nm. Fungsi utama dinding sel adalah melindungi sel bakteri dari kerusakan ketika tekanan air di dalam sel lebih besar daripada di luar sel. Selain itu dinding sel juga berperan sebagai tempat melekatnya flagella (Tortora, 2002).

Dinding sel bakteri disusun oleh suatu makromolekul yang disebut peptidoglikan atau biasa dikenal dengan murein. Peptidoglikan terdiri dari asam N-asetilglukosamin (AGA), asam N-asetilmuramat (AAM) dan peptida yang terdiri dari empat atau lima asam amino, yaitu : L-alanin, D-alanin, Asam D-glutamat, dan lisin atau asam diamino pimelat.

Struktur dasar peptidoglikan adalah rantai glikan yang dihubungkan satu dengan yang lainnya oleh ikatan silang peptida. Ikatan glikosidik antara gula-gula penyusun rantai glikan sangat kuat, tetapi rantai glikan sendiri belum mampu memberikan rigiditas pada rantai peptidoglikan. Struktur peptidoglikan akan lebih kuat apabila antar rantai glikan diikat satu dengan lainnya dengan ikatan silang oleh peptida (Madigan, 2003)

Bakteri gram positif hampir semuanya memiliki dinding sel yang terdiri dari beberapa lapis peptidoglikan. Peptidoglikan yang berlapis-lapis ini menyebabkan struktur dinding sel tebal dan kaku. Beberapa dinding sel bakteri gram positif mengandung asam polisakarida yang disebut asam tekoat. Ada dua kelas asam tekoat, yaitu asam lipotekoat dan asam tekoat dinding.

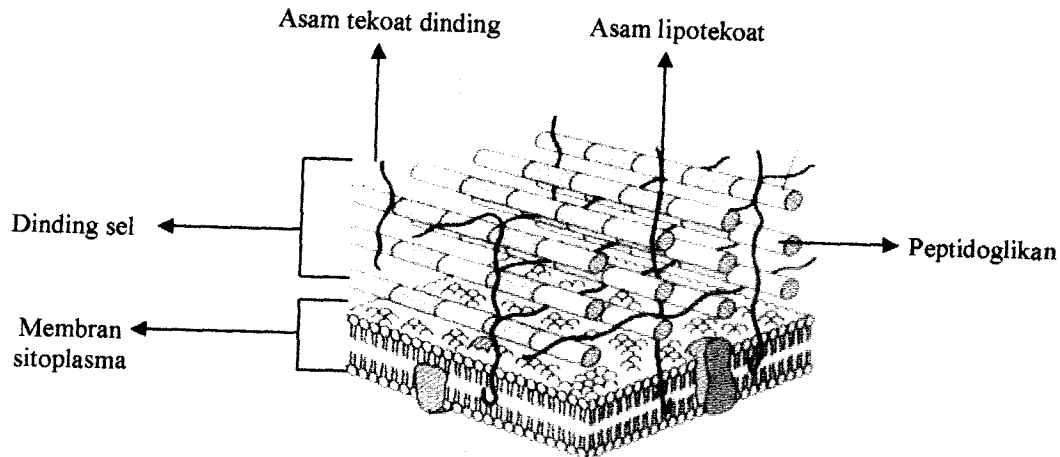
Sedangkan dinding bakteri gram negatif terdiri dari satu atau sedikit lapisan peptidoglikan dan membran luar. Pada dinding sel bakteri gram negatif, ada ruangan berisi cairan yang terletak di antara membran luar dan membran sitoplasma yang disebut periplasma. Periplasma mengandung konsentrasi enzim pendegradasi yang tinggi dan protein transport. Bakteri gram negatif tidak mengandung asam tekoat.

Membran luar dari bakteri gram negatif terdiri dari lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan fosfolipid. Membran luar mengandung protein sebagai tempat masuknya molekul yang disebut pori (Tortora, 2002).

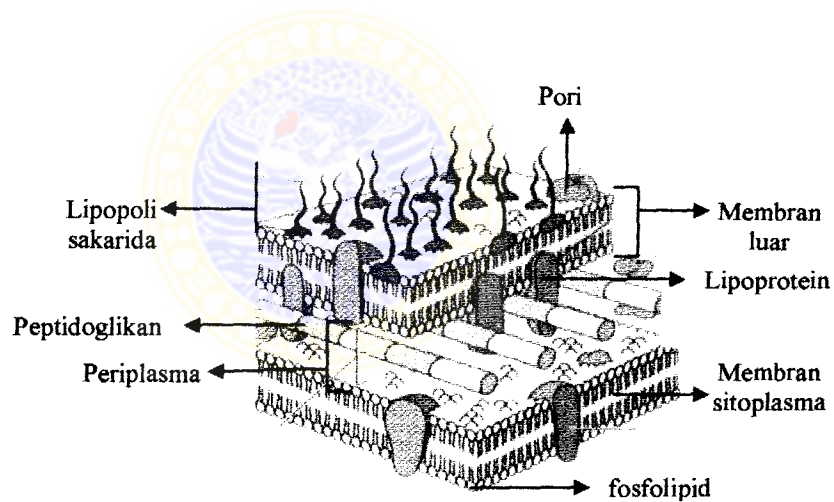
Tabel 2.2. Perbedaan karakteristik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Tortora, 2002)

Karakteristik	Bakteri gram positif	Bakteri gram negatif
Lapisan peptidoglikan	Tebal ( <i>multi-layered</i> )	Tipis ( <i>single-layered</i> )
Periplasma	Tidak ada	Ada
Asam tekoat	Ada	Tidak ada
Membran luar	Tidak ada	Ada
Lipopolisakarida (LPS)	Rendah	Tinggi
Kerusakan dinding sel oleh lisozim	Tinggi	Rendah
Produksi toksin	Sebagian besar eksotoksin	Sebagian besar endotoksin





Gambar 2.4. Dinding sel bakteri gram positif (Tortora, 2002)



Gambar 2.5. Dinding sel bakteri gram negatif (Tortora, 2002)

## 2.6 Membran Sitoplasma

Membran sitoplasma adalah struktur tipis yang terletak pada bagian dalam dinding sel dan membungkus bagian sitoplasma. Ketebalan membran sitoplasma yang didasarkan pada mikrograf irisan-irisan tipis sekitar 7,5 nm. Membran sitoplasma prokariot sebagian besar terdiri dari fosfolipid dan protein.

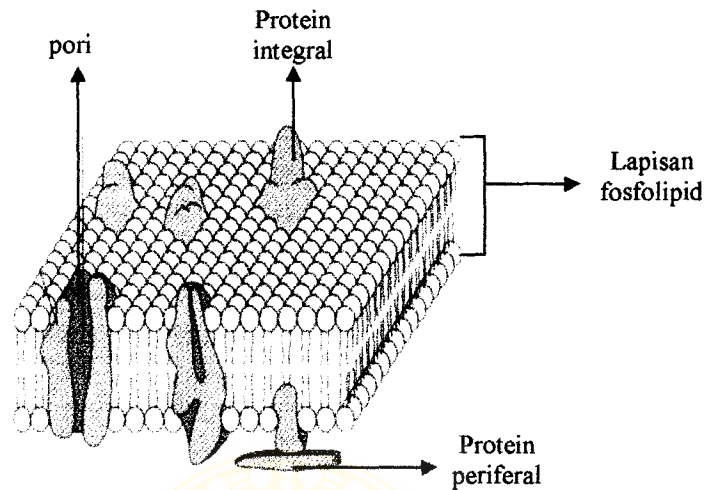
Eukaryotik mempunyai membran sitoplasma yang mengandung sterol (kolesterol) sehingga strukturnya lebih kaku daripada membran sitoplasma prokariot.

Membran sitoplasma merupakan struktur dengan dua lapisan fosfolipid yang tersusun secara paralel dan disebut dengan fosfolipid lapis ganda (*bilayer*). Molekul fosfolipid terdiri dari bagian kepala yang bersifat polar dan bagian ekor yang bersifat non polar. Bagian kepala disusun oleh fosfat dan gliserol yang mudah larut dalam air. Sedangkan bagian ekor tersusun oleh asam lemak yang bersifat hidrofobik sehingga tidak larut dalam air. Bagian kepala terletak pada permukaan fosfolipid lapis ganda, sedangkan bagian ekor terletak di dalam fosfolipid lapis ganda.

Molekul protein dapat disusun pada membran dengan berbagai cara. Protein yang tidak terikat kuat pada membran disebut protein ekstrinsik atau protein perifer. Protein ini dapat diekstrak dari membran dengan mudah. Fungsi protein perifer salah satunya adalah sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi kimia. Protein yang terbenam di dalam struktur membran, bahkan menembus membran disebut protein intrinsik atau protein integral. Beberapa protein integral merupakan saluran yang disebut pori dan berfungsi sebagai tempat keluar masuknya molekul.

Fungsi utama membran sitoplasma adalah sebagai lapisan selektif tempat keluar masuknya molekul dari sel. Membran sitoplasma mempunyai sifat selektif permeabel, sehingga hanya molekul-molekul atau ion tertentu yang dapat melalui membran tersebut. Molekul yang besar, seperti protein tidak dapat melalui membran sitoplasma karena protein mungkin lebih besar daripada pori yang

dibentuk oleh protein integral. Molekul yang lebih kecil, seperti air, oksigen, karbondioksida dan gula sederhana dapat melalui membran sitoplasma dengan mudah (Tortora, 2002).



Gambar 2.6. Membran sitoplasma bakteri (Tortora, 2002)

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2005.

#### **3.2 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian berupa biakan bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

#### **3.3 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **3.3.1. Bahan kimia.**

Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai spesifikasi pro-analisis (p.a), kecuali apabila disebutkan lain. Bahan-bahan tersebut antara lain: tripton, yeast ekstrak, NaCl, natrium karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), natrium fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O), asam sitrat, agar, *oat spelt xylan*, ampisilin, IPTG, X-gal, agar, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dan akuades.

### 3.3.2. Alat penelitian.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas: autoklaf (OSK 6508), steam pressure apparatus (Ogawa Seiki Co., LTD.), cabinet air flow (Koffermann 8580), centrifuge (Model TJ-6 Beckman), timbangan analitik (Ohaus), pH meter (Metrohm 744), oven (Memmert, Jerman), lemari pendingin (Sharp Matric), orbital shaker (TS-330 A Tungtec Instrument Co., LTD.), Sansat Water Bath (SYK-382 Sanyo Rikayaku-Kikai), lemari pembeku (Royal Chest Freezer BD 195), pipet mikro (Eppendorf), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah :

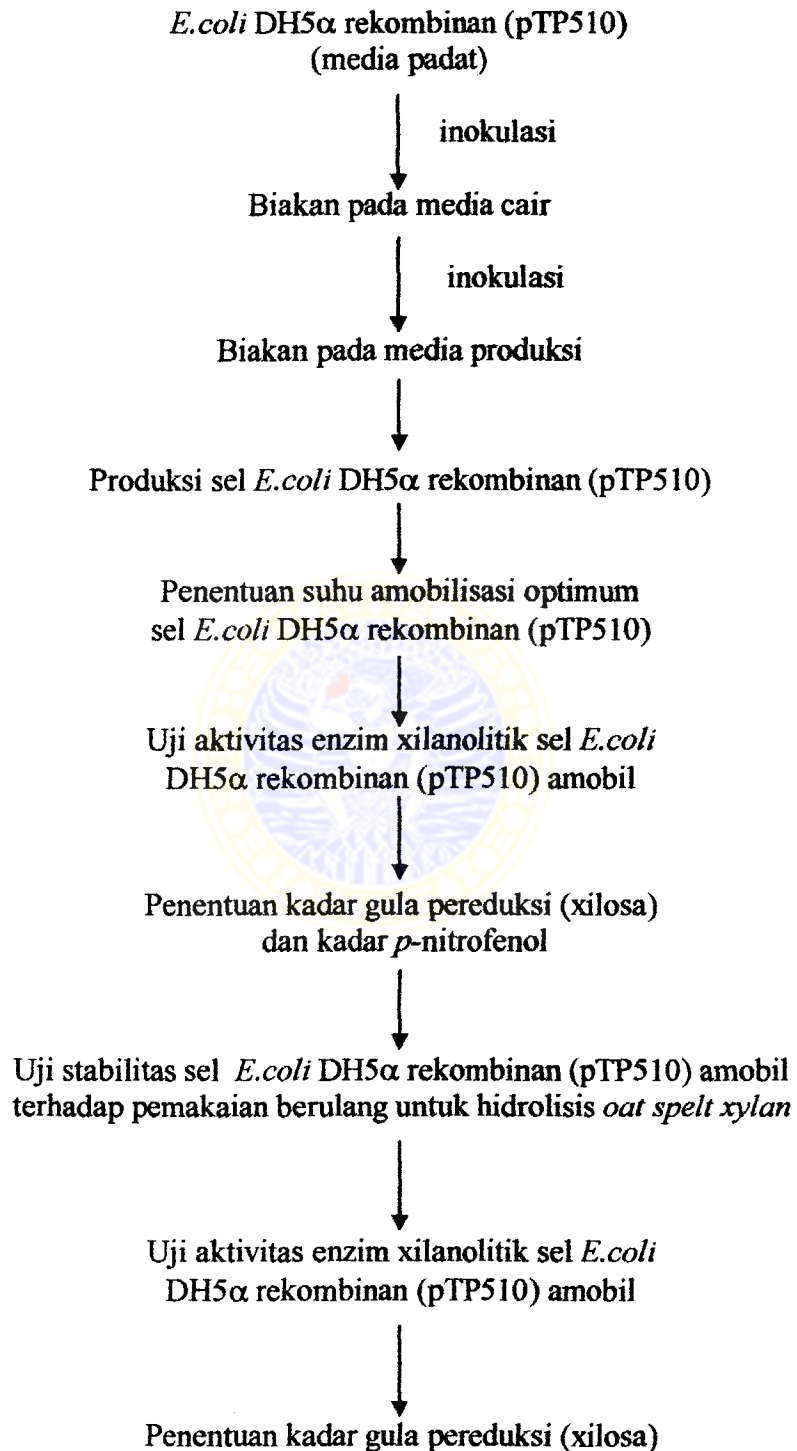
Variabel bebas : suhu amobilisasi sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510)

Variabel terikat : kadar gula pereduksi (xilosa), kadar *p*-nitrofenol

Definisi operasional dari masing-masing variabel tersebut adalah:

Suhu amobilisasi : suhu yang digunakan untuk amobilisasi sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan variasi: 50, 60, 70, 80 dan 90<sup>0</sup>C.

### 3.5 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

### **3.6 Metode Penelitian**

#### **3.6.1. Penyiapan media padat.**

Media padat yang digunakan untuk meremajakan biakan *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) merupakan media Luria Bertani (LB). Media LB dibuat dengan cara melarutkan 0,4 g agar, 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl dan 0,1 g yeast ekstrak dengan 20 mL akuades. Kemudian larutan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah media hangat, ditambahkan ampisilin 20  $\mu$ L (100 mg/mL), 10  $\mu$ l IPTG (1 mM) dan 20  $\mu$ L X-gal (40  $\mu$ g/mL) dan dihomogenkan. Media LB dituang dalam cawan petri secara aseptis.

#### **3.6.2. Penyiapan media cair.**

Media cair yang digunakan adalah media cair LB yang dibuat dengan cara melarutkan 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl, 0,1 g yeast ekstrak dengan 20 mL akuades. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

#### **3.6.3. Peremajaan *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510).**

Peremajaan biakan *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dilakukan dengan cara memindahkan stok biakan lama ke dalam media padat baru yang mengandung IPTG-Xgal dan ampisilin menggunakan ose secara aseptis. Kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama kurang lebih 18 jam.

#### **3.6.4. Pembuatan inokulum *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510).**

Biakan *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dari media padat yang mengandung IPTG-Xgal diinokulasikan secara aseptis menggunakan ose ke dalam 20 mL media cair yang mengandung ampisilan 20  $\mu$ L (100 mg/mL). Kemudian diinkubasi dalam alat penggoyang pada 37  $^{\circ}$ C dengan kecepatan 150 rpm selama kurang lebih 18 jam.

#### **3.6.5. Produksi sel *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510).**

Produksi sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dilakukan dengan memindahkan 1% inokulum ke dalam media cair 1 L yang mengandung ampisilin 1000  $\mu$ L (100 mg/mL). Kemudian diinkubasi dalam alat penggoyang pada suhu 37  $^{\circ}$ C dengan kecepatan 150 rpm selama kurang lebih 18 jam. Sel dipanen dengan sentrifugasi pada suhu 4  $^{\circ}$ C, 6000 g selama 10 menit. Pelet sel dicuci dua kali dengan buffer fosfat sitrat pH 7.

#### **3.6.6. Amobilisasi sel *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP510) dengan pemanasan.**

Sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) sebanyak 0,1 g disuspensikan ke dalam 300  $\mu$ l buffer fosfat sitrat pH 7. Masing-masing 300  $\mu$ l suspensi sel didalam tabung reaksi bertutup dipanaskan dengan variasi suhu 50  $^{\circ}$ C, 60  $^{\circ}$ C, 70  $^{\circ}$ C, 80  $^{\circ}$ C dan 90  $^{\circ}$ C selama 20 menit didalam penangas air. Sel dipisahkan dengan sentrifugasi selama 5 menit. Residu merupakan sel amobil yang siap diuji aktivitasnya (Bhatia dan Prabhu, 1980). Aktivitas enzim xilanolitik sel amobil



ditentukan menggunakan dua substrat yaitu *oat spelt xylan* dan *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida*.

#### **3.6.6.1. Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat *oat spelt xylan*.**

Aktivitas enzim xilanolitik ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis 100  $\mu$ l *oat spelt xylan* (1% dalam 50 mM buffer fosfat sitrat pH 7) oleh 0,1 g sel amobil pada suhu 70 °C selama 60 menit. Gula pereduksi yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi pada 4 °C, 6000 g selama 10 menit (Puspaningsih, 2004) dan ditentukan kadarnya menggunakan metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) secara spektrofotometri ( $\lambda=550$  nm) (Miller, 1959). Uji DNS dilakukan dengan memanaskan gula pereduksi hasil hidrolisis yang sudah ditambah dengan 600  $\mu$ l pereaksi DNS dalam penangas air mendidih selama 15 menit, kemudian didinginkan dalam penangas es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm. 1 unit aktivitas enzim xilanolitik menunjukkan  $\mu$ mol gula pereduksi yang dihasilkan permenit untuk setiap mL suspensi sel.

Standar xilosa dibuat pada kisaran 10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 80  $\mu$ g/ml, dan 100  $\mu$ g/ml dari stok xilosa 10 mg/ml. Masing-masing 1 ml standar xilosa dalam tabung reaksi ditambah 1 ml akuades dan 3 ml pereaksi DNS, kemudian dikocok kuat. Tabung dimasukkan dalam penangas mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam penangas es selama 20 menit, absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm. Sebagai kontrol digunakan sel amobil yang

direaksikan dengan substrat dan diinkubasi pada suhu kamar. Jumlah sel amobil dan substrat yang digunakan sebagai kontrol sama dengan jumlah pada sampel.

### **3.6.6.2. Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida.**

Uji aktivitas enzim xilanolitik dilakukan dengan menginkubasi 900  $\mu$ l *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida dengan pelet sel dari 1,0 g sel amobil (dalam 300  $\mu$ l buffer fosfat sitrat) pada suhu 70<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur *p*-nitrofenol yang dibebaskan. Pengukuran jumlah *p*-nitrofenol dilakukan secara spektrofotometri pada  $\lambda$  405 nm (Puspaningsih, 2004). 1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah suspensi sel amobil yang menghasilkan 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenol dalam waktu 1 menit pada kondisi percobaan.

Standar *p*-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,05 - 0,25 mM *p*-nitrofenol dari stok *p*-nitrofenol 10 mM dalam pelarut buffer fosfat sitrat pH 7. 100  $\mu$ L masing-masing larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 300  $\mu$ l buffer fosfat sitrat dan diinkubasi pada suhu 70<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Kemudian absorbansi ditentukan pada  $\lambda$  405 nm.

### **3.6.7. Penentuan pemakaian berulang maksimum sel amobil untuk menghidrolisis *oat spelt xylan* dan *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida.**

Untuk mengetahui sampai berapa kali sel amobil masih dapat menghidrolisis substrat *oat spelt xylan* secara efektif dilakukan dengan cara

mencuci sel amobil yang telah dipakai dengan buffer fosfat sitrat pH 7 sebanyak dua kali. Sel amobil yang telah bersih digunakan lagi untuk proses hidrolisis. Pelet sel ini dipakai terus untuk hidrolisis sampai aktivitasnya rendah. Aktivitas xilanolitik ditentukan menggunakan cara seperti pada point 3.6.6.1.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

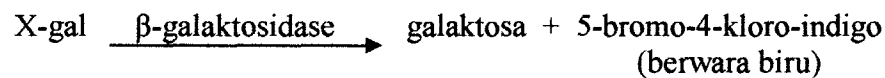
*Eschericia coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) merupakan mikroorganisme penghasil enzim xilanolitik termofilik dengan aktivitas tinggi (Puspaningsih, 2004). Enzim xilanolitik yang dihasilkan adalah enzim intraseluler. Oleh karena itu, diperlukan metode yang efisien untuk memanfaatkan enzim tersebut dalam menghidrolisis ikatan 1,4- $\beta$ -D-xilopiranosida yang terkandung dalam substrat *oat spelt xylan* dan *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida*. Untuk memperoleh aktivitas enzim yang optimum dilakukan optimasi suhu amobilisasi. Selain itu juga dilakukan pemakaian berulang sel amobil yang merupakan salah satu keuntungan dari metode amobilisasi.

#### 4.1 Penyiapan Sel Amobil *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP 510)

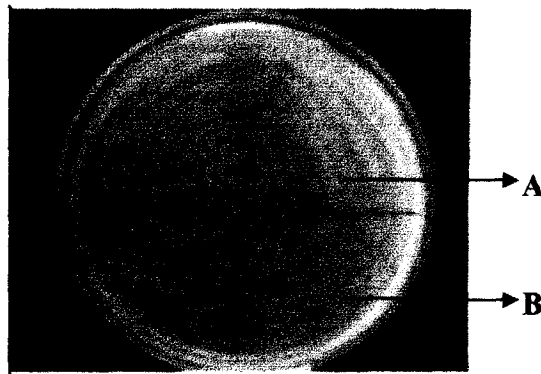
Peremajaan *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) Pada media LB padat yang mengandung ampisilin, X-gal, dan IPTG menghasilkan biakan yang berwarna putih, sedangkan *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pBKS+) berwarna biru. *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pBKS+) merupakan sel yang mengandung plasmid pBKS+ yang merupakan plasmid asal untuk rekombinasi plasmid pTP 510. Hasil dari peremajaan kedua galur *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Perbedaan warna biakan ini disebabkan adanya manipulasi genetik yaitu terjadi inaktivasi gen lac-Z yang terdapat pada plasmid pTP 510 karena insersi gen penyandi enzim xilanolitik. Sedangkan pasmid pBKS+ tidak mengalami

insersi gen penyandi enzim xilanolitik sehingga gen lac-Z tetap aktif. Apabila gen lac-Z aktif, menyebabkan berlangsungnya sintesis  $\beta$ -galaktosidase. Adanya X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranosid) yang merupakan analog substrat laktosa akan dihidrolisis oleh  $\beta$ -galaktosidase menjadi galaktosa dan produk yang berwarna biru yaitu 5-bromo-4-kloro-indigo. Sintesis  $\beta$ -galaktosidase diinduksi oleh IPTG (isopropiltiogalaktosid) yang ditambahkan pada saat pembuatan media LB padat (Brown, 1991).



Untuk mendapatkan pelet sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) dilakukan pembuatan inokulum dengan cara memindahkan biakan dari media padat ke dalam 20 mL media LB cair yang mengandung ampisilin. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama  $\pm$  18 jam. Inokulum yang dihasilkan selanjutnya dipindahkan ke dalam 1 L media produksi dengan waktu dan suhu inkubasi yang sama pada saat pembuatan inokulum. Setelah dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sel dengan media produksi, diperoleh pelet sel dengan berat basah 2 g/l media produksi.



Gambar 4.1. Hasil peremajaan *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) (A) dan *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pBKS+) (B)

## 4.2 Penentuan Suhu Amobilisasi Optimum

Metode amobilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penjebakan dengan cara pemanasan. Sel mikroba difungsikan sebagai matrik penjebak enzim (Chibata, 1978). Metode yang sama pernah digunakan untuk mengubah glukosa menjadi fruktosa (Rahmawati, 1998).

Pemilihan amobilisasi menggunakan metode penjebakan dengan cara pemanasan sel mikroba didasarkan pada sifat dari *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) yang mengekspresikan enzim xilanolitik termofilik secara intraseluler. Untuk mengisolasi enzim tersebut diperlukan beberapa tahap perlakuan yaitu proses lisis sel dan pemurnian. Tahap-tahap isolasi enzim tersebut menyebabkan enzim xilanolitik yang dihasilkan kurang efisien jika dilihat dari segi ekonomi. Dengan amobilisasi menggunakan cara pemanasan sel tahap isolasi dan pemurnian enzim dapat diabaikan. Pemanasan pada saat amobilisasi menyebabkan sel berpori sehingga substrat dapat masuk ke dalam sel dan produk keluar dari sel melalui membran sel. Dengan demikian enzim xilanolitik dapat dimanfaatkan dengan lebih efisien.

Metode penjebakan memerlukan perlakuan tertentu sehingga memudahkan keluar masuknya suatu molekul melalui membran sel. Proses permeabilisasi ini melibatkan pembentukan pori dalam membran tetapi memungkinkan keseluruhan enzim tetap dalam keadaan baik (Smith, 1993). Pemanasan sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) dalam buffer fosfat sitrat dengan pH 7 akan meningkatkan permeabilitas membran sehingga mempermudah transportasi substrat dan produk

melalui membran sel, tetapi enzim xilanolitik tetap berada didalam sel dan tidak kehilangan aktivitasnya.

Peningkatan permeabilitas membran sel disebabkan pemanasan yang mengakibatkan lipid membran menjadi lunak sehingga mudah mengalami kebocoran. Lipid akan bersifat cair pada suhu tinggi dan membeku pada suhu rendah (Lehninger, 1982). Hal lain yang mendukung peningkatan permeabilitas membran adalah lepasnya protein yang menyusun membran sehingga membentuk pori pada membran.

Suhu yang digunakan untuk amobilisasi perlu diperhatikan, karena suhu yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi enzim xilanolitik yang terdapat dalam sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) dan merusak membran sel. Sedangkan suhu yang terlalu rendah menyebabkan pembentukan pori membran kurang optimal

Suhu amobilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50<sup>0</sup> C, 60<sup>0</sup> C, 70<sup>0</sup> C, 80<sup>0</sup> C, dan 90<sup>0</sup> C. Hasil optimasi suhu amobilisasi pada Gambar 2 menunjukkan bahwa suhu amobilisasi optimum *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dalam menghidrolisis *oat spelt xylan* dan *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida* masing-masing adalah 60<sup>0</sup>C dan 70<sup>0</sup> C.

Perbedaan suhu amobilisasi optimum *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) Untuk menghidrolisis *oat spelt xylan* dan *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida* diduga disebabkan karena perbedaan kandungan monomer yang terdapat dalam substrat tersebut sehingga enzim yang bekerja juga berbeda begitu pula kondisinya, termasuk suhu optimumnya.

*Oat spelt xylan* adalah substrat xilan alam yang dijual secara komersial. *Oat spelt xylan* mengandung xilosa, arabinosa, xilooligosakarida dan glukuronat, sedangkan *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida adalah substrat sintetis yang hanya mengandung xilosa.

Enzim xilanolitik yang dihasilkan oleh *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) terdiri dari ekso-xilanase,  $\beta$ -xilosidase, dan L- $\alpha$ -arabinofuranosidase. Enzim yang bekerja menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida hanya enzim  $\beta$ -xilosidase. Enzim  $\beta$ -xilosidase yang sudah dimurnikan mempunyai suhu optimum 70<sup>0</sup> C. Suhu tersebut sama dengan suhu amobilisasi optimumnya. Bila digunakan substrat *oat spelt xylan* enzim xilanolitik yang bekerja menghidrolisis substrat tersebut terdiri dari ekso-xilanase,  $\beta$ -xilosidase, dan L- $\alpha$ -arabinofuranosidase. Enzim ekso-xilanase bekerja menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-xilosa pada bagian ujung dan melepaskan xilobiosa (Saha, 2003). Sedangkan  $\beta$ -xilosidase yang disintesis oleh gen penyandi enzim  $\beta$ -xilosidase yang berasal dari isolat IT 08 diduga memiliki aktivitas ekso-xilanase (Puspaningsih, 2004). Enzim L- $\alpha$ -arabinofuranosidase menghidrolisis rantai cabang xilan menghasilkan L-arabinosa dan xilobiosa. Pemutusan ikatan cabang ini selanjutnya akan mempermudah hidrolisis tulang punggung xilan oleh enzim xilanase dan  $\beta$ -xilosidase. Ketiga enzim tersebut bekerja secara sinergis.

Dari penelitian terdahulu (Puspaningsih, 2004) menyatakan bahwa suhu optimum aktivitas enzim  $\beta$ -xilosidase dan enzim L- $\alpha$ -arabinofuranosidase adalah 70<sup>0</sup> C, sedangkan suhu optimum aktivitas enzim  $\beta$ -xilanase adalah 80<sup>0</sup> C. Pada penelitian ini digunakan sel amobil yang berarti mengandung ketiga enzim diatas,



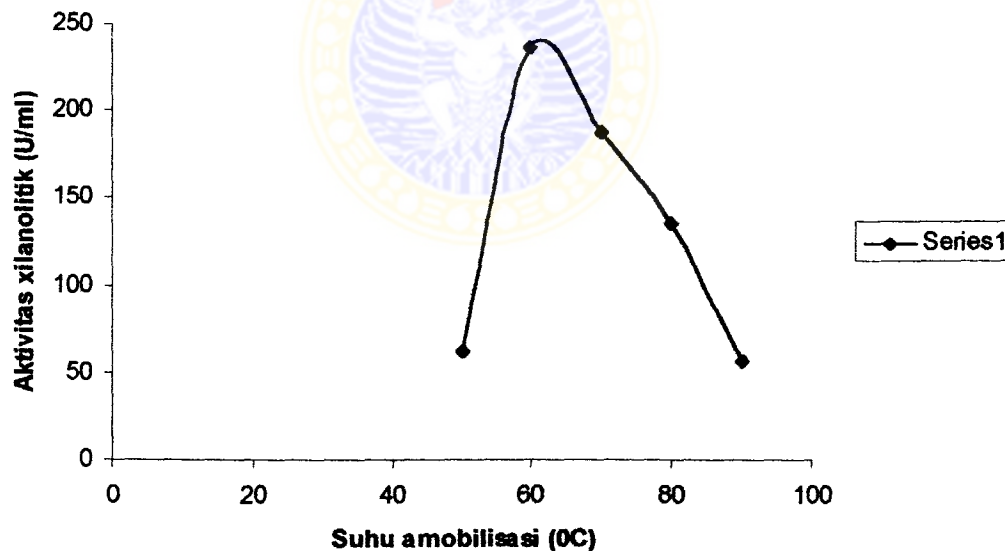
sehingga belum diketahui suhu optimum aktivitas ketiga enzim tersebut bila bekerja bersama-sama. Hasil optimasi suhu amobilisasi menunjukkan bahwa untuk menghidrolisis *oat spelt xylan* diperlukan suhu amobilisasi optimum yaitu 60<sup>o</sup> C. Suhu ini diduga merupakan suhu optimum aktivitas ketiga enzim yang bekerja secara sinergis. Dugaan ini didasarkan pada suhu amobilisasi sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) untuk menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida yang sama dengan suhu optimum untuk aktivitasnya yaitu 70<sup>o</sup> C. Apabila suhu amobilisasi sama dengan suhu optimum aktivitasnya berarti pemanasan saat amobilisasi sel langsung mengenai enzim sehingga suhu amobilisasi 70<sup>o</sup> C menyebabkan konformasi sisi aktif enzim mempunyai kesesuaian yang tinggi dengan substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida . Dengan demikian diduga enzim xilanolitik yang dihasilkan oleh *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) tertambat pada lapisan periplasmik yang menyebabkan enzim dapat dengan mudah terkena panas saat amobilisasi. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Ani (2005) yang mendeteksi adanya aktivitas enzim xilanolitik di daerah periplasmik *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510).

*E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai membran sel yang terdiri dari membran luar, lapisan periplasmik, dan membran dalam. Pada lapisan periplasmik ini biasanya mengandung beberapa protein, termasuk enzim hidrolitik (Madigan, 2003). Struktur membran bakteri gram negatif dapat dilihat pada Gambar 3.

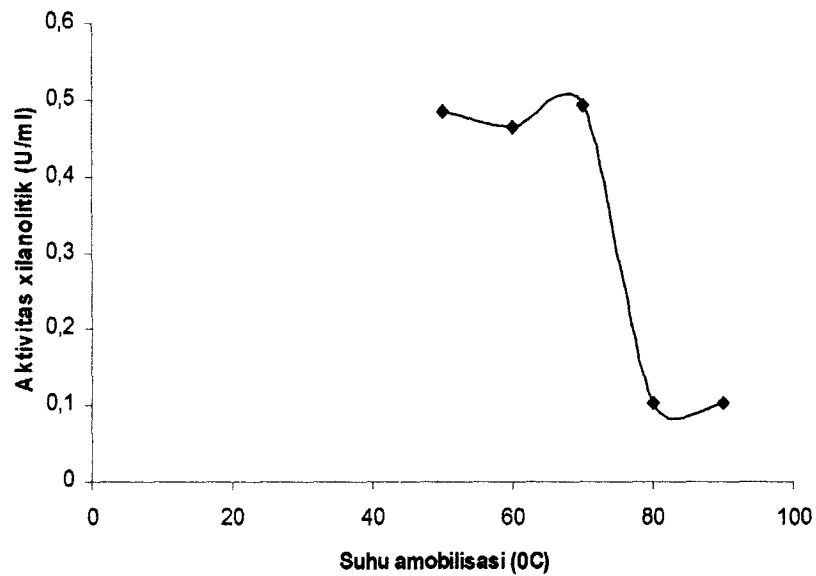
Hasil optimasi suhu amobilisasi pada Gambar 2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan aktivitas enzim xilanolitik pada suhu diatas 70<sup>o</sup> C untuk substrat

*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida dan suhu diatas 80<sup>0</sup> C *oat spelt xylan*. Penurunan aktivitas enzim xilanolitik tersebut disebabkan oleh suhu yang terlalu tinggi pada saat amobilisasi sehingga enzim mengalami denaturasi.

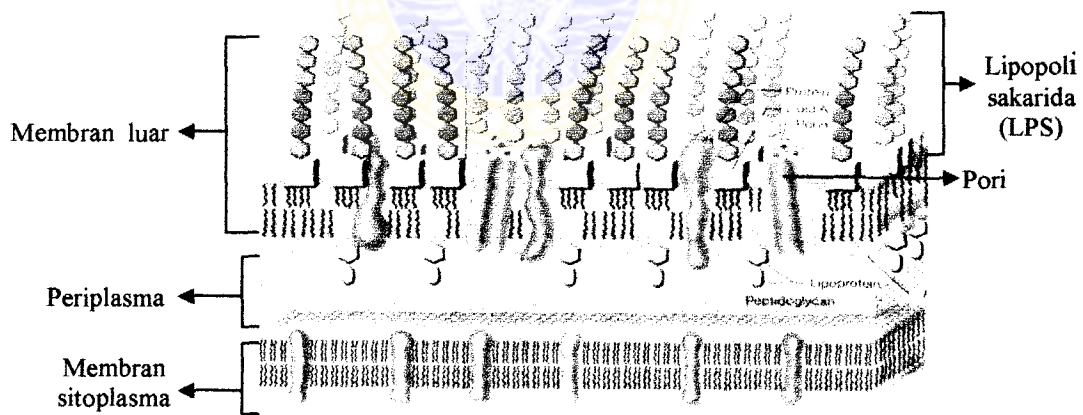
Aktivitas enzim xilanolitik rendah pada suhu amobilisasi 50<sup>0</sup> C dan meningkat tajam pada suhu amobilisasi 60<sup>0</sup> C dalam menghidrolisis *oat spelt xylan*. Hasil ini menunjukkan bahwa faktor pembukaan pori sangat berperan mengingat *oat spelt xylan* adalah polimer yang jauh lebih besar daripada *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida yang merupakan senyawa sederhana. Sedangkan aktivitas enzim untuk menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida tidak mengalami peningkatan yang signifikan pada suhu 50<sup>0</sup> C dan 60<sup>0</sup> C.



Gambar 4.2. Suhu optimum amobilisasi sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) substrat *oat spelt xylan*



Gambar 4.3. Suhu optimum amobilisasi *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) untuk substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida



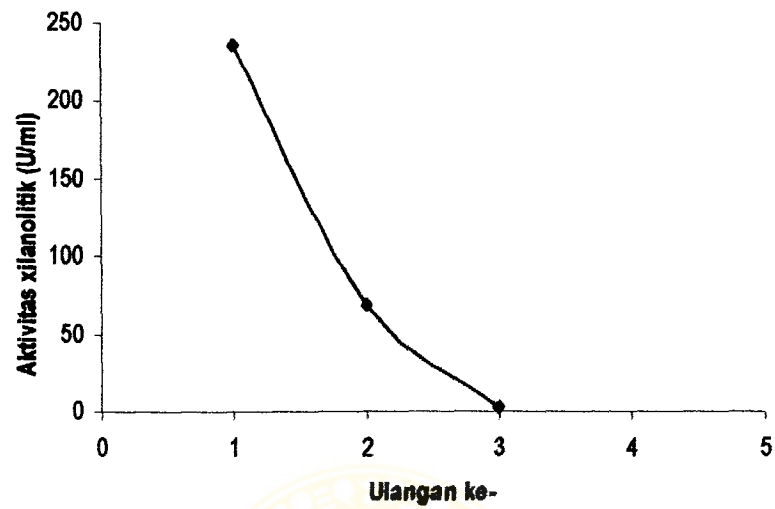
Gambar 4.4. Struktur membran bakteri gram negatif (Madigan, 2003)

#### 4.3 Penentuan Pemakaian Berulang Sel *E. coli* DH5 $\alpha$ rekombinan (pTP 510) Amobil

Keuntungan utama dari imobilisasi sel adalah kemampuan untuk dapat digunakan kembali secara berulang-ulang, sehingga bisa menghemat pemakaian enzim. Pada penelitian ini amobilisasi dilakukan dengan pemanasan yang menyebabkan enzim terjebak di dalam sel. Dalam prakteknya sel yang telah dipanaskan dan menjadi amobil diinkubasi dengan substrat oat spelt xylan secara diskontinyu di dalam tabung tertutup. Setelah mencapai waktu inkubasi optimum yaitu 1 jam reaksi dihentikan dengan cara memisahkan enzim dan produk menggunakan sentrifugasi. Enzim yang berada dalam sel akan lebih mudah dipisahkan hanya dengan cara sentrifugasi. Sel yang mengandung enzim xilanolitik hasil sentrifugasi kemudian digunakan kembali untuk menghidrolisis oat spelt xylan.

Kemampuan sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510) dalam menghidrolisis oat spelt xylan secara berulang dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sel amobil mampu dipakai 3 kali dengan penurunan aktivitas enzim xilanolitik yang tidak terlalu besar. Diduga penurunan aktivitas enzim xilanolitik ini disebabkan oleh adanya enzim yang lolos dari sel. Sentrifugasi yang dilakukan untuk memisahkan enzim dengan produk kemungkinan menyebabkan kerusakan membran sel yang menjebak enzim, sehingga enzim mudah lolos dan larut dalam media. Enzim yang larut dalam media dapat dilihat saat pemanasan hasil hidrolisis enzim xilanolitik dalam uji DNS. Setelah dipanaskan pada 100<sup>0</sup> C selama 15 menit pada larutan hasil

hidrolisis terlihat adanya gumpalan-gumpalan putih yang diduga enzim yang lolos dari sel dan mengalami denaturasi.



Gambar 4.5. Pemakaian berulang Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP 510)

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. suhu amobilisasi optimum sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) untuk substrat *oat spelt xylan* adalah 60 °C dengan aktivitas 235,983 U/ml, sedangkan untuk substrat *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida* adalah 70 °C dengan aktivitas 31 U/ml.
2. sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil dapat digunakan untuk menghidrolisis substrat *oat spelt xylan* sebanyak dua kali.

#### 5.2 SARAN

Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan untuk menentukan konsentrasi substrat, konsentrasi sel amobil, dan waktu inkubasi optimum reaksi hidrolisis xilan secara enzimatik oleh sel *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil.

## DAFTAR PUSTAKA

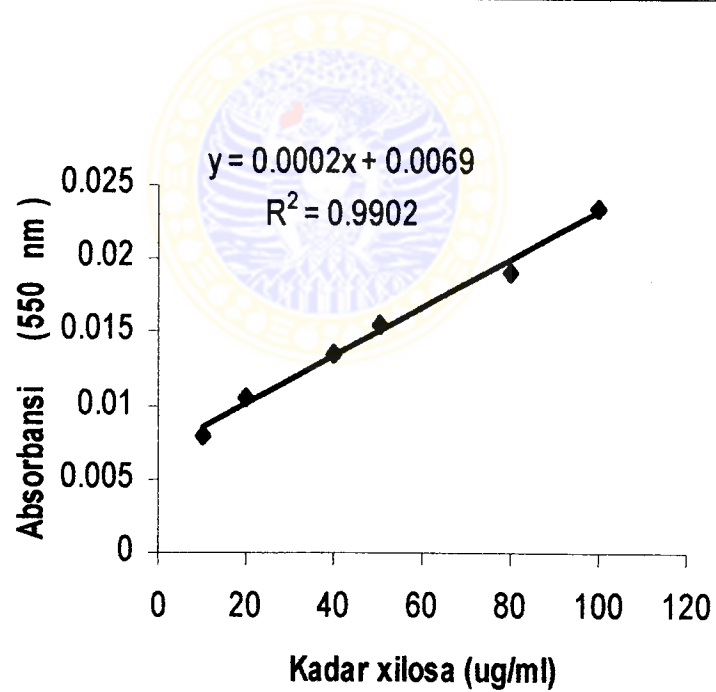
- Bailey, J. E., Ollis, D. F., 1986, **Biochemical Engineering Fundamental**, Second Edition, Mc. Graw-Hill Book Inc., New York. P. 180-202
- Beg QKM, Kapoor, L., Mahajan, G., Hoondal, S., 2001, **Microbial Xylanase and Their Industrial Application** : a review, *Appl Microbial Biotechnology* 56 : 326-338
- Bhatia, M., Prabhu, K.A., **Production of High –Fructose Syrup by a Heat Fixed *Lactobacillus sp.***, *Biotechnology and Bioengineering*, 22, p. 1957-1977
- Blanco, A., Pastor FIJ., 1993, **Characterization of Cellulose-free Xylanases from The Newly Isolated *Bacillus sp* Strain BP-23**, *Can J Microbiology*, 39:1162-1166
- Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belavkov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y., 2003, **Detailed Kinetic Analysis of A Family 52 Glycoside Hydrolase : A  $\beta$ -xilosidase from *Geobacillus stearothermophilus***, *Biochem* 42 : 10528-10536
- Brown, T.A., 1991, **Pengantar Kloning Gena**, Editor Soemantri, A.M., Praseno, Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta.
- Chibata, I., 1978, **Immobilized Enzyme**, John Wiley & Sons, Inc., New York. p 1-92, 196
- Henrissat, B., Coutinho, P., and Deleury, E., 2003, [http://www.CAZy-GH\\_tables.html](http://www.CAZy-GH_tables.html)
- Hilge, M., Gloor, S., Winterhalter, K., Zimmermn, W., Piontek, K., 1996, **Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Two Mannase Isoform from *Thermotomonospora fusca* KW3**, *acta Cryst D* 52: 1224-1225
- Horikoshi, K., 1999, **Alkaliphilic : Some Application of their Product for Biotechnology**, *Microbiol Mol Biol Rev* 63 : 735-750
- Jack, T. R., and Zajic, J.E., 1997, *Adv. Biochem. Eng.* 5 p:125
- Januar, R., 1998, **Amobilisasi Sel *Steratomyces griseus* dengan Pemanasan untuk Produksi Fruktosa**, *Skripsi*, FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya

- Lehninger, A.L., 1982, **Dasar-dasar Biokimia**, diterjemahkan oleh Thenawijaya, M., PT. Gelora Aksara Pustaka, Jakarta
- Miller, L.G., 1959, **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagen for Determination of Reducing Sugar**, *Anal Chem* 31 : 426-428
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003, **Brock Biology of Microorganism**, Tenth Edition, Pearson Education, Inc., USA
- Puspaningsih, N.N.T., 2004, **Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08**, *Disertasi*, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Saha, B.C., 2003, **Purification and Properties of An Ekstracellular  $\beta$ -Xilosidase from A New Isolated *Fusarium proliferatum***, *Bioresources Technol* 90 : 33-38
- Shallom, D., Belakov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y., 2002, **Detailed Kinetic Analysis and Identification of The Nucleophile in  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6, A Family 51 Glycoside Hydrolase**, *J. Biol Chem* 277 : 43667-43673
- Smith, J.E., 1993, **Prinsip Bioteknologi**, Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta p : 143-161
- Subramaniyan, S., Prema, P., 2002, **Biotechnology of Microbial Xylanase : Enzymology, Molecular Biology, and Application**, *Critical Rev Biotechnol* 22 : 33-64
- Takasaki, Y., 1969, **Fermentation Advance**, D. Perlman Ed. Academic, New York P : 561
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2002, **Microbiology An Introduction**, Seventh Edition, Pearson Education, Inc., USA p : 86-91
- Wirahadikusumah, M., 1988, **Teknologi Amobilisasi Enzim dalam Bidang Pengobatan**, Seminar Nasional, Perhibibi, Palembang
- Wiseman, A., 1985, **Hand Book of Enzyme Biotechnology**, Second Edition, Ellis Horwood LTD., New York, p : 15, 56, 148-149, 330-334
- Yawn-kuen Li, Hsin Yao and I-Hong Pan, 2000, **Mechanistic Study of  $\beta$ -Xylosidase from *Tricoderma koningii* G-39**, *J. Biochem* 127 : 315-320



**Lampiran 1. Kurva Standar Xilosa**

Kadar xilosa ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ )
10	0,0080
20	0,0105
40	0,0135
50	0,0155
80	0,0190
100	0,0235



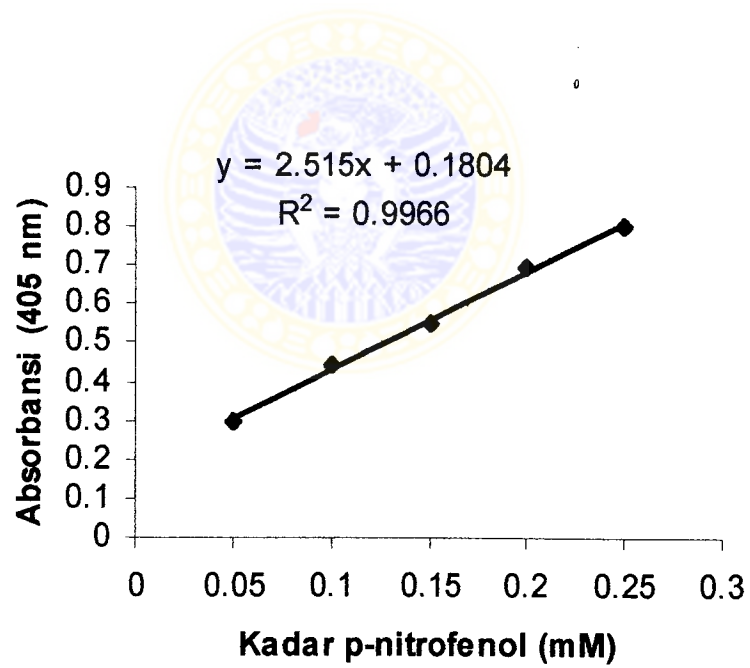
**Lampiran 2. Kadar Xilosa Hasil Hidrolisis *Oat spelt xylan* oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) yang Telah Diamobilisasi pada Berbagai Suhu Amobilisasi.**

Suhu amobilisasi (°C)	Absorbansi ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ )	Kadar xilosa ( $\mu\text{g/ml}$ )
50	0,0975	557,692
60	0,3520	2123,846
70	0,2810	1686,923
80	0,2045	1216,154
90	0,0885	502,308

Kadar xilosa hasil hidrolisis *oat spelt xylan* oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil ditentukan dengan persamaan yang diperoleh dari kurva standar xilosa,  $y = 0,0002x + 0,0069$ , dengan  $y$  adalah nilai absorbansi sedangkan  $x$  adalah kadar xilosa.

**Lampiran 3. Kurva Standar *p*-nitrofenol**

<b>Kadar <i>p</i>-nitrofenol (mM)</b>	<b>Absorbansi (<math>\lambda = 405</math> nm)</b>
0,05	0,2965
0,10	0,445
0,15	0,551
0,20	0,6955
0,25	0,800



**Lampiran 4. Kadar *p*-nitrofenol Hasil Hidrolisis *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) yang Telah Diamobilisasi pada Berbagai Suhu Amobilisasi.**

Suhu amobilisasi (°C)	Absorbansi( $\lambda = 550$ nm) (hasil pengenceran 5 kali)	Kadar <i>p</i> -nitrofenol (mM)
50	1,087	0,3605
60	1,045	0,3438
70	1,116	0,3720
80	0,289	0,0432
90	0,288	0,0429

Kadar *p*-nitrofenol hasil hidrolisis *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil ditentukan dengan persamaan yang diperoleh dari kurva standar *p*-nitrofenol,  $y = 2,515x + 0,1804$ , dengan  $y$  adalah nilai absorbansi, sedangkan  $x$  adalah kadar *p*-nitrofenol.

**Lampiran 5. Kadar Xilosa Hasil Hidrolisis *Oat spelt xylan* oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) Amobil pada Pemakaian Berulang.**

<b>Pemakaian ke-</b>	<b>Absorbansi (<math>\lambda = 550 \text{ nm}</math>)</b>	<b>Kadar xilosa (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
1	0,3520	2123,846
2	0,1080	622,308
3	0,0045	28,615

Kadar xilosa hasil hidrolisis *oat spelt xylan* oleh *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil ditentukan dengan persamaan yang diperoleh dari kurva standar xilosa,  $y = 0,0002x + 0,0069$ , dengan  $y$  adalah nilai absorbansi sedangkan  $x$  adalah kadar xilosa.

**Lampiran 6. Aktivitas Xilanolitik *E.coli* DH5 $\alpha$  Rekombinan (pTP510) Amobil.**

Aktivitas xilanolitik *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil dalam menghidrolisis oat spelt xylan ditentukan dengan persamaan :

$$\text{Aktivitas xilanolitik} = \frac{\text{Kadar (substrat - kontrol)} \times 1000 \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{Massa molekul relatif}}$$

Keterangan :

Faktor pengenceran = 1 kali

Waktu inkubasi = 60 menit

Massa molekul relatif xilosa = 150

Suhu amobilisasi (°C)	Kadar xilosa (µg/ml)	Aktivitas xilanolitik (U/ml)
50	557,692	61,966
60	2123,846	235,983
70	1686,923	187,436
80	1216,154	135,128
90	502,308	55,812

Pemakaian ke-	Kadar xilosa (µg/ml)	Aktivitas xilanolitik (U/ml)
1	2123,846	235,983
2	622,308	69,145
3	28,615	3,162

**Lanjutan Lampiran 6.**

Aktivitas xilanolitik *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) amobil dalam menghidrolisis *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida ditentukan dengan persamaan :

$$\text{Aktivitas xilanolitik} = \frac{\text{Kadar (substrat - kontrol)} \times 1000 \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Waktu inkubasi}}$$

Keterangan :

Faktor pengenceran = 5 kali

Waktu inkubasi = 60 menit

Massa molekul relative *p*-nitrofenol = 139,11

Konversi kadar substrat dari mM ke  $\mu\text{g/ml}$

$$\text{mmol/ml} = \mu\text{g} \times 1000 / \text{Mr} \times 1000 \text{ ml}$$

$$\mu\text{g} \times 1000 / \text{Mr} \times 1000 \text{ ml} = \mu\text{g/ml} \times \text{Mr}$$

Karena pembagian oleh massa molekul relatif *p*-nitrofenol telah dilakukan pada pembuatan kurva baku *p*-nitrofenol (kadar dinyatakan dalam mM), maka pada penentuan aktivitas xilanolitik tidak perlu lagi dilakukan pembagian oleh massa molekul relatif.

Suhu amobilisasi ( $^{\circ}\text{C}$ )	Kadar <i>p</i> -nitrofenol (mM)	Aktivitas xilanolitik (U/ml)
50	0,3605	30,0417
60	0,3438	28,65
70	0,3720	31
80	0,0432	3,6
90	0,0429	3,575