

LAPORAN

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009 BATCH II**



TEMA

KETAHANAN PANGAN

JUDUL PENELITIAN

**PEMETAAN BIODIVERSITY BAHAN LIMBAH AGROINDUSTRI UNTUK
FORMULA PAKAN KOMPLIT MENGGUNAKAN ENZIM
LIGNOSELULOLITIK DALAM MENINGKATKAN KETAHANAN PANGAN**

Peneliti Utama : Dr. Mimi Lamid, MP., drh.

Anggota : Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi

Widya Paramita Lokapirnasari, MP., drh

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian
Sesuai Prioritas Nasional

Nomor : 300/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juni 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009**

KKC
KK
LP.243/10
Lam
P

LAPORAN

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**



TEMA

KETAHANAN PANGAN

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

JUDUL PENELITIAN

**PEMETAAN BIODIVERSITY BAHAN LIMBAH AGROINDUSTRI UNTUK
FORMULA PAKAN KOMPLIT MENGGUNAKAN ENZIM
LIGNOSELULOLITIK DALAM MENINGKATKAN KETAHANAN PANGAN**

Peneliti Utama : Dr. Mirni Lamid, MP., drh.

Anggota : Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi

Widya Paramita Lokapirnasari, MP., drh

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian
Sesuai Prioritas Nasional

Nomor : 300/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juni 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Pemetaan Biodiversity Bahan Limbah Agroindustri untuk Formula Pakan Kompil Menggunakan Enzim Lignoselulolitik dalam Meningkatkan Ketahanan Pangan

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Mimi Lamid, MP., drh
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : 132 006 227
 d. Pangkat/Golongan : Penata TK I/ IIID
 e. Jabatan : Lektor
 f. Bidang Keahlian : Nutrisi Pakan Ternak Ruminansia
 g. Fakultas : Kedokteran Hewan
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi	Biologi Molekuler /Enzimologi	F. Sain dan Teknologi	Univ Airlangga
2.	Widya Paramita Lokapimasari, MP., drh	Nutrisi Pakan Ternak Ruminansia	Fakultas Kedokteran Hewan	Univ. Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
 b. Biaya yang diusulkan Tahun I : Rp. 99.748.000
 c. Biaya yang disetujui : Rp. 85.000.000

Surabaya, 1 Desember 2009



Mengetahui
 Dekan
 Fak. Kedokteran Hewan

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh
 NIP. 130 687 305

Ketua Peneliti


 Dr. Mimi Lamid, MP., Drh
 NIP. 132 006 227



Mengetahui :
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair

Prof. Dr. Bambang Sektian Lukiswanto, DEA., drh
 NIP. 131 837 004

enzim lignoselulolitik yang meliputi : 1. Uji aktivitas enzim selulase dan xilanase dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat dan uji aktivitas enzim selulase dengan turunan p-nitrofenol, 2. Pemurnian protein enzim selulase menggunakan amonium sulfat, kromatografi penukar anion dan penentuan massa molekul protein enzim menggunakan SDS page dan Zimogram.

Hasil penelitian diperoleh 5 isolat bakteri yang mampu mendegradasi substrat *carboxyl methyl cellulase* (CMC) dan *oat spelt xilan* dengan metode DNS, yaitu terbentuknya pada media padat. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh isolat BR2 yang mempunyai aktivitas tertinggi, masing-masing aktivitas endo- β -1,4-glukanase sebesar 0,28 U/ml, dan aktivitas endo- β -1,4-xilanase sebesar 8,75-22,63 U/ml. Optimasi suhu enzim selulase diperoleh pada suhu 45 °C dengan aktivitas 1,42 U/ml, sedangkan optimasi suhu enzim xilanase diperoleh pada suhu 50 °C dengan aktivitas 31,17 U/ml. Optimasi pH diperoleh aktivitas selulase sebesar 0.57 U/ml pada pH 6, dan aktivitas xilanase sebesar 65,97 U/ml pada pH 7. Hasil pengukuran aktivitas enzim dengan substrat spesifik turunan p-nitrofenol, diperoleh aktivitas enzim β -glukosidase dari *crude extract* sebesar 1,86 U/ml, dan aktivitas enzim ekso-1,4- β -D-glukanase dari *crude extract* sebesar 2,5 U/ml. Hasil pengukuran aktivitas enzim endo-1,4- β -D-glukanase dengan substrat spesifik *Carboxymethyl cellulose* dari *crude extract* sebesar 3,51 U/ml. Hasil pengendapan ekstrak kasar enzim selulase dan xilanase dengan garam amonium sulfat mencapai aktivitas optimum pada pengendapan 40% dan 60%. Aktivitas enzim selulase hasil pengendapan garam amonium sulfat optimum menggunakan substrat spesifik CMC, pNPG dan pNPC masing-masing sebesar 4,24 U/ml, 2,42 U/ml dan 3,23 U/ml, besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini sebesar 222,9 mg/ml, aktivitas spesifik enzim selulase hasil pengendapan menggunakan substrat CMC, pNPG dan pNPC masing-masing sebesar 0,0152 U/mg, 0,0109 U/mg dan 0,0145 U/mg. Aktivitas enzim xilanase hasil pengendapan garam amonium sulfat optimum menggunakan substrat spesifik *Oat spelt xilan*, pNP-X, pNP-G, pNP-Asam asetat, pNP-A masing-masing sebesar 2,899 U/ml, 0,0167 U/ml, 0,0373 U/ml, 0,0195 U/ml, 0,0284 U/ml. Besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini sebesar 176,55 mg/ml, sehingga dapat diperoleh aktivitas spesifik enzim selulase hasil pengendapan menggunakan substrat *Oat spelt xilan*, pNP-X, pNP-G, pNP-Asam asetat, pNP-A masing-masing sebesar 0,0164

U/mg, $9,459 \times 10^{-5}$ U/mg, $2,113 \times 10^{-4}$ U/mg, $1,1045 \times 10^{-4}$ U/mg, $1,608 \times 10^{-4}$ U/mg. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh massa molekul relatif enzim selulase dan xilanase masing-masing sebesar 49 kDa dan 80 kDa. Tingkat kemurnian setelah diafiltrasi menggunakan substrat *p*NPG sebesar 8,01 kali, dan menggunakan substrat *p*NP-Asam asetat sebesar 49,90 kali. Disarankan penggunaan enzim lignoselulolitik sebagai bahan biokatalis untuk mendegradasi pakan berserat kaya lignoselulosa, dan perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan percobaan *in vivo* pada ternak ruminansia.

SUMMARY

Potency produce waste of agroindustri high enough, but that way problems that happened is lowering of value of nutrition marked with obstetrical height of crude fibre (cellulose, hemicellulose, lignine) and lower crude protein. Cellulose and hemicellulose available only some of small able to be exploited is most castaway become waste. Cellulose molecule and of hemicelulosa represent polysaccharide with tying β - 1-4 glycosidic which is difficult to be digested by bacterium of rumen livestock of ruminantia, so that waste digesting of agroindustry become to lower. Usage of enzymes lignocellulolytic will be able to improve value of nutrition. Enzyme of cellulase consist of three enzyme component there are : endoglucanase (endo-1,4- β - D-Gluconase, or 1,4- - D-Glucan 4-glucanohydrolase), eksoglucanase (exo-1,4- β -D-Glucanase, or 1,4- - Cellobiohydrolase D-glucan) and cellobiase (- or glucosidase - Glucohidrolase D-glucosedi), while enzyme of xylanase consist of five enzyme component there are endo- β -1,4-xylanase, β -xylosidase, - L-Arabinofuranosidase, - D-Glukuronidase, and acetyl xylan esterase. The aim of this research were exploration lignocellulolytic enzymes (cellulase and xylanase) from bacterium of rumen beef cattle, characterization optimum pH and temperature, determine molecular weight of protein cellulase and xylanase enzymes, and purification level of enzymes by diafiltrate and ion exchange chromatography. In this research, identification with *Carboxyl Methil Cellulose* (CMC) and *Oat Splet Xylan* has been done.

The result showed that isolate BR2 have activity of endo-1,4- β -D-Gluconase 0,28 U/m and endo- β -1,4-xylanase 22,63 U/ml. The optimum pH and temperature of celulase and xylanase were 6, 7 , 45 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C. This process was started by producing cellulase and xylanase enzymes from isolate BR2, then precipitated it using ammonium sulphate with optimum concentration of saturated 40% and 60%, and the molecular weight protein of cellulase and xylanase enzymes were 49 kDa and 80 kDa. Based on experiment that cellulolytic enzymes from BR2 could hydrolyzed several specific substrate (CMC, *p*NPG dan *p*NPC), with activities crude extract cellulolytic are 3,51 U/l, 1,86 U/l dan 2,5 U/l. Based on experiment that xylanolytic enzymes from BR2 could hydrolyzed several specific substrate (*Oat spelt xilan*, *p*NP-X, *p*NP-G, *p*NP-acetyl acid,

*p*NP-A), with activities crude extract xylanolytic were 0,433 U/ml, 0,034 U/ml, 0,018 U/ml, 0,008 U/ml, 0,011 U/ml. The best result of this diafiltrate on *p*NPG and *p*NP-acetyl acid had level 8,01 and 49,90 from crude extract.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul: **PEMETAAN BIODIVERSITY BAHAN LIMBAH AGROINDUSTRI UNTUK FORMULA PAKAN KOMPLIT MENGGUNAKAN ENZIM LIGNOSELULOLITIK DALAM MENINGKATKAN KETAHANAN PANGAN.**

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Direktur Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan pendanaan pada penelitian ini.
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
5. Semua pihak yang tidak dapat disebut satu persatu.

Tim penulis menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak terdapat kekurangan. Mudah-mudahan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membaca tulisan ini.

Surabaya, Desember 2009

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASANDAN SUMMARY	ii
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
	Halaman
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim	4
2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim	5
2.3 Selulosa	6
2.4 Enzim Selulase	7
2.4.1 Enzim endoglukanase (endo-1,4- β -D-glucanase)	9
2.4.2 Enzim eksoglukanase (exo-1,4- β -D-glucanase)	9
2.4.3 Enzim cellobiase (β -glucosidase)	9
2.5 Xilan	10
2.6 Enzim Xilanase	12
2.6.1 Enzim β -xilosidase	12
2.6.2 Enzim α -L-arabinofuranosidase	12
2.6.3 Enzim endo- β -xilanase	13
2.7 Pemurnian Enzim	14
2.6.1 Pemekatan Enzim	17
BAB III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.2 Sampel, Bahan dan Alat Penelitian	18
3.2.1 Sampel penelitian	18
3.2.2 Bahan penelitian	18
3.2.3 Alat penelitian	19
	19

3.3	Prosedur Penelitian	19
3.3.1	Pembuatan Media Cair	19
3.3.2	Pembuatan Media Padat	19
3.3.3	Seleksi Isolat	20
3.4	Produksi Enzim Selulase	20
3.4.1	Uji Aktivitas Enzim	20
3.4.2	Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)	21
3.4.3	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	21
3.4.4	Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Substrat Turunan <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> NP)	22
3.5	Produksi Enzim Xilanase	23
3.5.1	Uji Aktivitas Enzim Xilanase	23
3.5.2	Uji Aktivitas Endo- β -Xilanase dengan Metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)	23
3.5.3	Kurva Standar Xilosa	24
3.5.4	Uji Aktivitas Enzim Xilanase menggunakan substrat turunan <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> NP)	24
3.6	Karakterisasi Enzim Selulase dan Xilanase	25
3.6.1	Penentuan Suhu Optimum	25
3.6.2	Penentuan pH Optimum	25
3.7	Pemurnian enzim selulase	26
3.7.1	Pengendapan enzim selulase dengan amonium sulfat	26
3.7.2	Diafiltrasi menggunakan amicon ultra-4 centrifugal filter devices	27
3.8	Analisis Zimogram dan SDS-PAGE	27
BAB IV		
	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1.	Hasil Penelitian	29
4.1.1.	Isolasi dan Seleksi Bakteri Lignoselulolitik	29
4.1.2.	Karakterisasi Enzim Selulase	31
4.1.2.1	Suhu Optimum Enzim Selulase dan Xilanase	31
4.1.2.2	pH Optimum Enzim Selulase dan Xilanase	34
4.1.3.	Uji Aktivitas Enzim Selulase	36
4.1.3.1	Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Substrat Turunan <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> NP)	36
4.1.3.2	Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Substrat Carboxymethyl Cellulose (CMC)	37
4.1.4.	Uji Aktivitas Enzim Xilanase	41

4.1.5. Hasil Pemurnian Enzim Selulase dan Xilanase	41
4.1.5.1 Hasil Pengendapan Enzim Selulase dan Xilanase dengan Amonium Sulfat	41
4.1.5.2. Hasil diafiltrasi enzim selulase dan xilanase	43
4.1.6. Analisis SDS-PAGE dan Zimogram	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1. Kesimpulan	53
5.2. Saran	53
Daftar Pustaka	54

DAFTAR TABEL

TABEL		Halaman
1	Komposisi Monomer (%) Berbagai Sumber Xilan	11
2	Data Aktivitas Isolat Penghasil Enzim Selulase dan Xilanase Asal Bakteri Rumen	30
3	Data optimum suhu enzim selulase dan xilanase	32
4	Data optimum pH enzim selulase dan xilanase	34
5	Aktivitas enzim selulolitik dari <i>crude extract</i> pada berbagai Substrat Turunan <i>p</i> -nitrofenol	37
6	Aktivitas Enzim Xilanase Isolat BR2 pada Berbagai Substrat Spesifik	39
7	Data Aktivitas Enzim Selulase Setelah Pengendapan dengan Amonium Sulfat	41
8	Pemurnian Enzim Selulase	46
9	Pemurnian Enzim Xilanase	46

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR		Halaman
1	Struktur selulosa	7
2	Mekanisme degradasi terhadap selulosa	10
3	Mekanisme degradasi terhadap selulosa	11
4	Hasil uji halo positif pada media CMC	29
5	Hasil uji halo positif pada media <i>oat spelt xilan</i>	29
6	Uji aktivitas selulase dan xilanase menggunakan metode DNS	29
7	Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Selulase dan Xilanase	32
8	Pengaruh pH terhadap Aktivitas Selulase dan Xilanase	35
9	Pengendapan ekstrak kasar enzim selulase dengan amonium sulfat	39

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1 Pembuatan kurva standar glukosa	58
2 Penentuan aktivitas endo-1,4- β -D-glukanase dengan metode DNS	59
3 Pembuatan kurva standar <i>p</i> -nitrofenol	60
4 Pengukuran aktivitas enzim selulase menggunakan substrat turunan <i>p</i> -nitrofenol	61
5 Pembuatan kurva standar xilosa	62
6 Pembuatan reagen	63

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Ketersediaan daging ternak ruminansia (sapi, kerbau, domba dan kambing) mempunyai kontribusi yang cukup besar terhadap kebutuhan konsumsi daging penduduk Indonesia. Peningkatan populasi ternak tentunya akan membutuhkan pakan hijauan dalam jumlah banyak. Disisi lain ketersediaan pakan hijauan sangat tergantung adanya ketersediaan lahan dan musim. Hal ini merupakan problem yang masih sulit diatasi, sehingga memberi peluang pada limbah agroindustri (jerami padi, bekatul, tongkol jagung, tumpi jagung, kulit coklat, kulit kopi) sebagai pakan ternak alternatif.

Potensi produksi limbah agroindustri cukup tinggi, namun demikian permasalahan yang terjadi adalah rendahnya nilai nutrisi yang ditandai dengan tingginya kandungan serat kasar (selulosa, hemiselulosa, lignin) dan rendahnya protein kasar. Selulosa dan hemiselulosa yang tersedia hanya sebagian kecil yang dapat dimanfaatkan sedang sebagian besar terbuang menjadi limbah. Hal ini disebabkan dinding sel limbah agroindustri telah mengalami lignifikasi lanjut membentuk ikatan kompleks dengan lignin. Molekul selulosa dan hemiselulosa merupakan polisakarida dengan ikatan β -1-4 glikosidik yang sulit dicerna oleh bakteri rumen ternak ruminansia, sehingga pencernaan limbah agroindustri menjadi rendah. Mikroba didalam rumen merupakan sumber utama penghasil enzim lignoselulolitik, namun kecernaannya terhadap limbah agroindustri masih rendah

sehingga dibutuhkan pemrosesan terlebih dahulu. Pemrosesan dengan bahan kimia menimbulkan pencemaran lingkungan, sedangkan secara biologis keamanannya lebih terjamin. Penggunaan enzim selulase dan xilanase (kelompok enzim lignoselulolitik) akan mampu meningkatkan nilai nutrisi limbah agroindustri. Enzim selulase terdiri dari 3 (tiga) komponen enzim yaitu : endoglukanase (endo-1,4- β -D-gluconase, atau 1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase), eksoglukanase (exo-1,4- β -D-gluconase, atau 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase) dan cellobiase (β -glucosidase atau β -D-glucosedi glucohidrolase) (Singleton, 2001), kompleks enzim yang penting untuk degradasi komponen hemiselulosa adalah enzim xilanase yang terdiri dari 5 (lima) komponen enzim yaitu β -1,4-endoxilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -D-glukuronidase, dan asetil xilan esterase (Sunna *et al.* , 2000). Informasi penggunaan enzim lignoselulolitik untuk proses enzimatik pada limbah agroindustri masih terbatas. Hasil penelitian pendahuluan oleh tim pengusul telah berhasil mengisolasi lima isolat bakteri lignoselulolitik (selulolitik dan xilanolitik) dari rumen sapi potong (Mirni Lamid , 2005-2006). Penelitian selanjutnya akan mengisolasi enzim dari bakteri tersebut yang akan digunakan sebagai prebiotik untuk proses enzimatik limbah agroindustri. Penambahan enzim lignoselulolitik dapat meningkatkan nilai nutrisi limbah agroindustri, sehingga dapat memberikan respon positif terhadap pertambahan berat badan sapi potong.

Penelitian ini bertujuan untuk karekterisasi enzim lignoselulolitik (selulase dan xilanase), uji aktivitas enzim dengan turunan p-nitrofenol, pemurnian protein

enzim menggunakan amonium sulfat, diafiltrasi dan penentuan massa molekul protein enzim menggunakan SDS-Page dan Zimogram.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan maka dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah kelima isolat bakteri lignoselulolitik dari rumen sapi menghasilkan enzim selulase dan xilanase?
2. Bagaimanakah karakterisasi (penentuan pH dan suhu optimum, dan penentuan berat molekul) enzim selulase dan xilanase dari isolat terpilih asal rumen sapi?
3. Bagaimanakah tingkat kemurnian enzim selulase dan xilanase yang diisolasi dari bakteri terpilih dengan menggunakan amonium sulfat dan diafiltrasi ?

1.3 TUJUAN PENELITIAN TAHUN I

1. Mengeksplorasi enzim lignoselulolitik (selulase dan xilanase) dari bakteri rumen sapi.
2. Menentukan karakterisasi (penentuan pH dan suhu optimum, dan penentuan berat molekul) enzim selulase dan xilanase isolat terpilih asal rumen sapi.
3. Mengetahui tingkat kemurnian enzim selulase dan xilanase yang diisolasi dari bakteri terpilih dengan menggunakan amonium sulfat dan diafiltrasi.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Manfaat penelitian ini untuk memperoleh enzim lignoselulolitik yang dapat digunakan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi diberbagai bidang kehidupan masyarakat, khususnya dalam aplikasi bioteknologi pakan ternak.

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan suatu biokatalis dalam sistem biologi dan menentukan corak perubahan kimia dalam sel yang dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien dengan cara menurunkan energi bebas aktivasi pada keadaan transisi. Keunggulan enzim sebagai suatu biokatalis antara lain daya katalitiknya tinggi, spesifitasnya tinggi, dapat bekerja pada kondisi suhu dan pH yang tidak ekstrem, aktivitas katalitik beberapa enzim dapat dikendalikan, dan dapat diproduksi, sehingga memudahkan penyediaannya (Pelczar dan Chan, 1986).

Reaksi katalitik oleh enzim pada umumnya bersifat cepat membentuk reaksi kesetimbangan tanpa disertai reaksi samping, bekerja dalam larutan encer, berlangsung pada suhu rendah dan kondisi netral (Ottoway dan Apps, 1984). Molekul enzim adalah protein yang dihasilkan oleh sel hidup berupa protein globular yang terbentuk dari rantai polipeptida yang berlipat secara kompak. Konformasi tersier protein globular merupakan bentuk yang paling stabil karena ditunjang oleh berbagai ikatan yang menstabilkan struktur tersier protein. Jenis-jenis ikatan tersebut antara lain : ikatan hidrogen yang terdapat diantara gugus R residu asam amino rantai samping yang berdekatan, ikatan ion diantara gugus R yang berlawanan, interaksi hidrofobik dari gugus R asam amino hidrofobik dan

ikatan kovalen berupa ikatan disulfida dari residu sistein (Ottoway dan Apps, 1984).

2.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim yaitu konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH dan suhu reaksi

1. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim mempengaruhi kecepatan reaksi suatu enzim. Jika konsentrasi tinggi maka laju aktivitas enzim berjalan lebih cepat. Banyaknya substrat yang diubah menjadi produk sesuai dengan tingginya konsentrasi enzim yang digunakan (Stryer *et al.*, 2002).

2. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi suatu enzim. Konsentrasi yang besar dapat mempercepat laju aktivitas enzim. Namun jika konsentrasi substrat diperbesar terus maka tidak ada lagi penambahan laju reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

3. pH

Reaksi – reaksi enzim sangat dipengaruhi oleh pH. Aktivitas maksimum akan dicapai pada pH tertentu , penyimpangan pH akan mengurangi laju aktivitas enzim (Pelczar dan Chan, 1986).

4. Suhu

Meningkatnya suhu akan meningkatkan laju aktivitas enzim, karena atom-atom dalam molekul enzim mempunyai energi yang lebih besar dan adanya

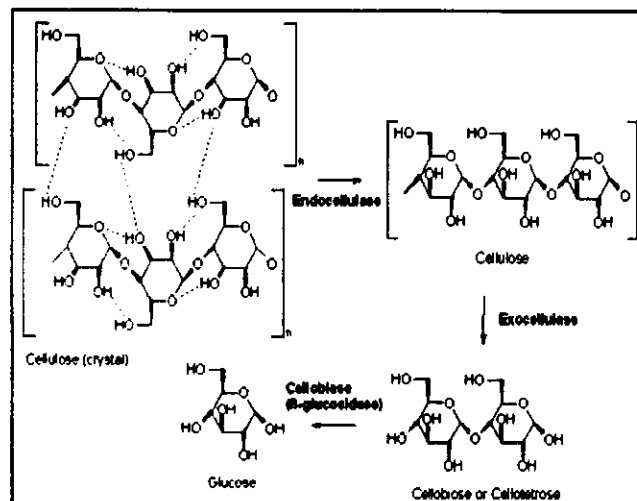
kecenderungan untuk bergerak. Hal ini terjadi karena adanya pembentangan atau membukanya rantai ikatan protein sesudah putusnya ikatan-ikatan yang lemah sehingga laju reaksi keseluruhan akan menurun. Suhu mempengaruhi kestabilan enzim, substrat, aktivitas reaksi dan fungsi pH. Setiap kenaikan diatas 10°C akan meningkatkan dua kali aktivitas enzim. Kebanyakan protein terdenaturasi mulai terjadi pada suhu 45 -50 °C. Beberapa enzim sangat tahan terhadap denaturasi pada suhu tinggi, khususnya enzim hasil isolasi dari mikroorganisme termofilik (Tortora *et al.*, 2002).

2.3 Selulosa

Selulosa, senyawa polisakarida utama dari dinding sel tanaman yang mengandung 100–10,000 unit glukosa seperti ikatan β -1,4-glycosidik, merupakan materi organik yang paling berlimpah di muka bumi ini (Fessenden, 1978), bahkan ada yang sampai 14.000 unit glukosa (Thayer, 1978). Selulosa dihidrolisis oleh enzim selulase yaitu endoglucanase, cellobiohydrolase dan glucosidase.

Selulosa merupakan penyusun dinding sel tanaman, dan juga merupakan penyusun terbanyak di dalam tanaman. Tanaman menggunakan sebagian karbohidrat yang terbentuk dari fiksasi CO₂ untuk membuat bahan organik kompleks seperti selulosa, yang merupakan polimer dari glukosa yang tidak larut air. Tanaman secara normal mengandung selulosa sebanyak 40-50%, komponen penyusun lainnya adalah lignin (20-30%) dan hemiselulosa (10-30%). Ketika tumbuhan mati secara alami selulosa, hemiselulosa, dan lignin akan didegradasi oleh mikroorganisme tanah (Pelczardan Chan, 1993).

Titik pusat pendegradasian selulosa terletak pada pecahnya ikatan 1,4 β -glikosida. Pecahnya ikatan 1,4 β -glikosida menyebabkan selulosa terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu oligosakarida (terutama selobiosa). Selanjutnya oligosakarida akan terhidrolisis menjadi monosakarida (terutama glukosa). Pemecahan ikatan 1,4 β -glikosida dilakukan oleh kelompok enzim selulase (Bondi, 1987).



Gambar 1. Struktur selulosa

Struktur selulosa tersusun atas rantai linear dari ribuan residu glukosa. Residu ini diikat oleh ikatan β -1,4 glikosidik dan distabilkan oleh ikatan internal hidrogen (Liu *et al.*, 2006). Tidak seperti polimer glukosa, pengulangan unit dalam selulosa bukan glukosa tapi unit selobiose (Thayer, 1978).

2.4 Enzim Selulase

Enzim adalah substansi 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 termasuk enzim hidrolis yang menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase dihasilkan oleh mikroorganisme, tanaman dan binatang. Tiga tipe enzim selulase adalah endoglukanase (endo-1,4- β -D-gluconase, atau 1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase), eksoglukanase (exo-1,4- β -D-glucanase, atau 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase) dan cellobiase (β -glucosidase atau β -D-glucosedihidrolase) (Singleton, 2001) dimana memiliki massa molekul relatif yang bervariasi diantaranya adalah Endoglukanase, 52,000 (Li *et al.* 1955); 23,500 - 58,000 (Beldman *et al.* 1985), Exoglukanase, 60,500 - 62,000 (Beldman *et al.* 1985). Cellobiase, 76,000 (Beldman *et al.* 1985). Menurut studi Erikson dan Hamp (1978) berhasil menjelaskan sistem enzimatik dari degradasi hidrolitik selulosa dengan enzim-enzimnya adalah endo-1,4- β -D-glukanase yang memecah ikatan-ikatan β -glikosida sehingga menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas, ekso-1,4- β -D-glukanase yang memecah unit selobiosa dan glukosa dari ujung bukan-pereduksi, dan β -glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa, dan asam selobionat menjadi glukosa dan glukonolakton. Terdapat tiga jenis reaksi katalitik dari selulase yaitu : Pemecah interaksi non-kovalen dalam struktur kristalin selulosa (endoselulase), hidrolisis serat selulosa untuk memecahnya menjadi gula yang lebih kecil (eksoselulase), hidrolisis disakarida dan tetrasakarida ke dalam glukosa (β -glukosidase).

2.4.1 Enzim endoglukanase (endo-1,4- β -D-gluconase)

Endoglukanase berperan dalam rantai polimer untuk memecah ikatan β -glikosida secara acak. Endoglukanase juga memiliki kemampuan memecah ikatan-ikatan β -glikosida untuk mengganggu struktur kristal dari selulosa sehingga menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas.

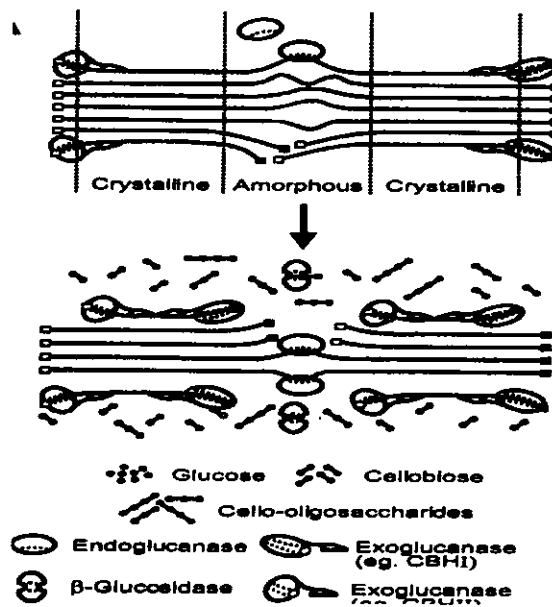
2.4.2 Enzim eksoglukanase (exo-1,4- β -D-glucanase)

Eksoglukanase adalah selulase yang memiliki kemampuan memecah 2-4 unit selobiosa dan glukosa dari ujung bukan-pereduksi yang diproduksi oleh endoselulase dan hasilnya dapat diamati pada disakarida selobiase.

2.4.3 Enzim cellobiase (β -glucosidase)

Cellobiase adalah selulase yang memiliki kemampuan menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa, dan asam selobionat menjadi glukosa dan glukonolakton. Cellobiase juga menghidrolisis dimer glukosa untuk menghasilkan monomer glukosa.

Cellobiase juga akan menyerang selulase untuk melepaskan fragmen kecil dari selulosa dimana akan diserang oleh eksoselulase untuk melepaskan glukosa.



Gambar 2. Mekanisme degradasi terhadap selulosa

2.5. Xilan

Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa pada dinding sel tanaman yang terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel. Xilan adalah heteropolisakarida kompleks dengan rantai tulang punggung homopolimer unit-unit D-xilopiranososa yang terikat β -1,4 (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan dan Prema, 2002). Tulang punggung ini mengikat substituen-substituen seperti O-asetil, α -L-arabinofuranosil, ikatan α -1,2 glukoronat atau asam 4-o-metilglukoronat (Liu *et al.*, 1998, Kulkarni *et al.*, 1999). Kelimpahan xilan di biosfer menjadikan peran enzim xilanase sangat penting (Dung *et al.*, 1993).

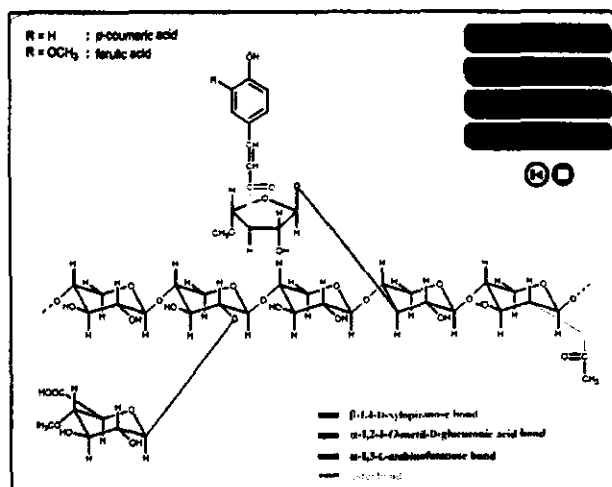
Xilan sebagai komponen utama hemiselulosa, memiliki kerangka dasar residu ikatan 1,4- β -D-xilopiranosil yang rantai sampingnya disubstitusi dengan

asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan α -arabinofuranosil (Subramanian dan Prema, 2002). Komposisi monomer penyusun xilan dari berbagai sumber tumbuhan berbeda-beda dapat dilihat pada Tabel 1, sedangkan struktur xilan terlihat seperti pada Gambar 3.

Tabel 1. Komposisi Monomer (%) Berbagai Sumber Xilan

Jenis xilan	Xilosa	Arabinosa	Glukosa	Manosa	Galaktosa	Asam anhidronat	Asam glukuronat
Kayu	89,3	1	1,4			8,3	-
Dedak padi	46	44,9	1,9		6,1	1,1	-
Jerami padi	22,6	2,46	3,81	0,17	2,66	-	-
Biji jagung	46-54	33-35	-		5-11	-	3-6

Sumber : Coughlan *et al.*, 1992; Saha (2003)



Gambar 3. Struktur xilan tumbuhan (Beg *et al.*, 2001)

Lokasi pemotongan oleh masing-masing enzim xilanase 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 koumarin dari lignin (Beg *et al.*, 2001).

2.6 Enzim Xilanase

Hidrolisis total xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xylanohidrolase) menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida; 1,4- β -D-xilosidase (1,4- β -D-xylanohidrolase) memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh α -L-arabinofuranosidase, α -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Subramaniyan dan Prema, 2002).

2.6.1. Enzim β -xilosidase

β -xilosidase yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis 1,4- β -D-xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai oligosakarida. (Dekker,1983; Reilly,1991). Enzim ini mampu pula menghidrolisis substrat aril-xilosida. Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim β -xilosidase. Sebagian enzim β -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim kurang dapat digunakan dalam industri penghasil xilosa.

2.6.2 Enzim α -L-arabinofuranosidase

Enzim α -L-arabinofuranosidase menghidrolisis ujung nonpereduksi antara ikatan α -L-arabinofuranosida dengan berbagai polisakarida yang mengandung arabinofuranosidase (Debche *et al.*, 2002). Enzim ini merupakan bagian dari glikosida hidrolase yang berperan dalam proses degradasi hemiselulosa seperti arabinoxilan, arabinogalaktan, dan L-arabinan. Adanya substituen L-

arabinofuranosida dalam struktur xilan dapat secara kuat menghambat aktivitas endo-xilanase dan β -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-xilanase dan xilosidase (Debche *et al.*, 2002; Shallom *et al.*, 2002).

2.6.3. Enzim β -1,4-endoxilanase

Endoxilanase mampu memutus ikatan β -1,4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut. Enzim endo- β -xilanase sebagian besar dihasilkan oleh mikroba seperti bakteri dan fungi, dan beberapa diantaranya juga dihasilkan oleh tumbuhan dan hewan (Subramaniyan dan Prema, 2002).

Enzim xilanase dapat digunakan untuk beberapa keperluan antara lain untuk (1) proses pemutihan industri pulp dan kertas, (2) meningkatkan mutu pakan ternak, (3) pengolahan bahan makanan (3) meningkatkan kemampuan dalam mendegradasi material tumbuhan, khususnya limbah pertanian (Beg *et al.*, 2001; Subramaniyan dan Prema, 2002; Shallom *et al.*, 2002). Pada pembuatan kertas dan pulp, xilanase digunakan untuk memecah xilan dan menghilangkan lignin dalam proses *bleaching*. Enzim ini digunakan sebagai pengganti cara kimia sehingga pengaruh racun limbah kimia dapat dihindari dan lebih murah (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995).

Produksi ternak dapat ditingkatkan dengan penggunaan enzim fibrolitik selama pemberian pakan dengan tujuan untuk meningkatkan pencernaan serat yang akan membantu aktivitas mikroorganisme rumen. Pengukuran pencernaan secara *in-situ* menggunakan enzim xilanase produksi *Aspergillus niger* dan *Trichoderma longibrachiatum* dengan pakan alfafa dapat menurunkan persentase NDF dari 68,31 % menjadi 57,97 % (Lierra *et al.*, 2003). Pemanfaatan xilanase yang dikombinasikan dengan selulase akan menjadi sangat penting dimasa mendatang untuk menyediakan bahan dasar yang dibutuhkan untuk dikonversi menjadi bahan lain. Aplikasi selulase dan xilanase pada proses silase rumput mampu melepaskan gula pereduksi hasil fermentasi polisakarida struktural dinding sel tanaman, sehingga penggunaan enzim tersebut dapat memperbaiki konsumsi dan pencernaan pakan untuk ternak ruminansia (Spoelstra *et al.*, 1999). Beauchemin *et al.*, (2003) menyatakan bahwa pemberian *feed additive* berupa enzim terutama selulase dan xilanase dapat meningkatkan efisiensi pakan, baik pada sapi potong maupun sapi perah.

2.7 Pemurnian Enzim

Pemurnian bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa yang tidak dikehendaki. Tahap-tahap pemurnian tergantung dari tujuan akhir, apakah untuk tujuan komersial atau tujuan riset. Enzim yang kasar atau yang dimurnikan sebagian masih dapat dipakai untuk komersial, sedangkan enzim yang murni atau hampir murni dikehendaki dalam riset atau dipakai dalam produk analitik.

Harris (1989) menyebutkan ada tiga strategi dalam pemurnian enzim yang harus diperhatikan :1) Kualitas: perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas protein dengan cara mengurangi proteolisis dan denaturasi, 2) Kuantitas : pemakaian akhir dari protein murni akan menentukan kualitas enzim yang diperlukan, 3) Ekonomis merupakan kunci penting bila akan dipakai dalam industri atau diterapkan dalam skala laboratorium. Pemurnian protein dilakukan berdasarkan sifat kelarutan, ukuran, muatan afinitas pengikatan spesifik dari protein itu sendiri. Oleh karena itu campuran protein selanjutnya dipisahkan dengan berbagai seri pemisahan.

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

Prinsip fraksinasi dengan garam berdasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam, dan

daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan garam-garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi kemudian mengendap (Harris 1989; Scopes 1987). Amonium sulfat merupakan garam yang paling sering digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki daya larut tinggi didalam air, relatif tidak mahal, dan kestabilan protein didalam larutan amonium sulfat tahan bertahun-tahun (Scopes, 1987)

Fraksinasi protein dengan menggunakan pelarut organik aseton berdasarkan pada pengurangan kelarutan protein dan konstanta dielektrika pelarut. Semakin banyak pelarut organik yang ditambahkan, semakin berkurang daya solvasi air dan muatan pada permukaan molekul protein yang hidrofilik. Hal ini akan mengakibatkan molekul-molekul protein cenderung berinteraksi dengan sesamanya, hingga akhirnya protein mengendap. Prosedur fraksinasi pelarut organik aseton dilakukan pada suhu di bawah 0 °C. Pada suhu diatas 10 °C, konformasi protein akan segera berubah yang memungkinkan molekul-molekul pelarut organik mendapatkan jalan masuk ke bagian dalam struktur protein, kemudian merusak interaksi hidrofobik dan akhirnya akan terjadi denaturasi (Scopes 1987; Harris 1989).

Garam berlebih yang terdapat didalam larutan enzim setelah tahap pemurnian dapat dihilangkan dengan cara dialisis. Pada tahap dialisis, protein ditempatkan didalam kantung (membran) semipermeabel yang direndam didalam larutan buffer tertentu. Molekul yang berukuran kecil akan keluar melalui membran, dan molekul yang berukuran besar akan tertahan didalam membran dialisis. Ukuran pori kantung dialisis yang terbuat dari bahan selulosa asetat ini berdiameter 1-20 nm. Ukuran ini menunjukkan berat molekul minimum yang dapat tertahan didalam membran.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga dan penelitian dimulai bulan Agustus 2009 sampai sekarang penelitian masih dalam taraf penyelesaian.

3.2 Sampel, Bahan, dan Alat Penelitian

3.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah lima isolat bakteri lignoselulolitik hasil isolasi dari cairan rumen sapi potong (BR1, BR2, BR3, BR4, BR5) yang merupakan stok dari koleksi Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga.

3.2.2 Bahan Penelitian

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) Agar, yeast ekstrak, NaCl, tripton, NaOH, garam Rochelle, bacto agar, asam sitrat, HCl, tris (hidroksimetil) aminomethan, akuades, fenol, Na-sulfit, *congo-red*, selulosa, glisin, Triton-X 100, sodium dodesil sulfat (SDS), buffer sodium fosfat, amonium persulfat (APS), N,N,N',N' tetrametil-etilendiamin (TEMED), akrilamid-bisakrilamid, coomassie blue, marker protein Novagen, bovine serum albumin (BSA), asam fosfat, reagen Bradford.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu Erlenmeyer 100 dan 250 ml, cawan petri, pipet mikro, autoklaf (Ogawa Seiki, CO, LTD. Osk 6508), sentrifuge dingin, (Beckmann model TJ-6), *shaker incubator* (Heidolph Unimax 1010, Inkubator 1000), *water bath* (Sanyo Rikogaku-kikai/, oven (Isotemp* oven model 655F), *freezer*, lemari es (Sharp matric), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1700), timbangan analitik (OHAUS), *laminar air flow cabinet* (Kottermann), pH meter (Metrohm 744), piranti elektroforesis Mini Protean II (Biorad, USA), tabung Eppendorf dan alat-alat gelas yang biasa dipakai dilaboratorium.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan media cair

Media cair terdiri dari 0,2 g trypton; 0,1 g yeast ekstrak; 0,2 g NaCl. Semua bahan dilarutkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml dengan 20 ml akuades. Kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium *foil*. Larutan ini disterilkan dengan autoklaf selama 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.3.2 Pembuatan media padat

Media cair terdiri dari 0,2 g trypton; 0,1 g yeast ekstrak; 0,2 g NaCl; 0,3 g bacto agar. Semua bahan dilarutkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml dengan 20 ml akuades. Kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium *foil*. Larutan ini disterilkan dengan autoklaf selama 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Selanjutnya setelah dikeluarkan dan sterilisator campuran atau medium ditunggu sampai suam-suam kuku. Lalu medium dituang ke dasar cawan petri dan dibiarkan sampai menjadi dingin dan padat.

3.3.3 Seleksi Isolat

Koloni-koloni yang tumbuh ditanam dalam media padat yang mengandung masing-masing pada substrat *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC) dan *oat spelt xylan* dengan menggoreskan ujung ose ke koloni tersebut kemudian di goreskan pada permukaan media padat, diinkubasi pada suhu 39°C selama 16 jam. Dilakukan pengamatan adanya halo (daerah bening) disekitar koloni kemudian memilih satu isolat dengan halo yang terbesar dan juga menunjukkan aktivitas selulase tertinggi.

Kemudian halo yang diperoleh di uji dengan menggunakan *congo-red* 0.1% yang disiramkan kedalam biakan tersebut. Uji positif ditandai dengan warna daerah halo yang tetap bening dan warna menjadi merah (Miller,1960).

3.4 Produksi enzim selulase

Produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan 1% inokulum ke dalam 100 ml media cair yang mengandung *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) dalam erlenmeyer 500 ml dan diinkubasi pada suhu 39°C selama 16 jam dengan penggoyangan 150 rpm. Hasil inkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya untuk diuji aktivitas enzim selulasenya. Ekstrak kasar enzim selulase adalah supernatan sedangkan pelet selnya dibuang.

3.4.1 Uji aktivitas enzim

3.4.2 Uji aktivitas enzim selulase dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Aktivitas Endo-1,4- β -D-glucanase dilakukan dengan cara menentukan jumlah gula pereduksi yang terbentuk, yaitu dengan menggunakan metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) menggunakan *Carboxymethyl cellulose* (CMC) sebagai substrat spesifik. Aktivitas endo-1,4- β -D-glucanase diuji dengan mencampurkan 100 μ l enzim dan 100 μ l substrat (1% CMC dalam 0,1 M bufer fosfat sitrat pH 7) dimasukkan dalam tabung Ependorf, diinkubasi dalam penangas air pada 50°C selama 30 menit. Sejumlah gula pereduksi yang terbentuk diukur aktivitas enzimnya menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) yaitu dengan menambahkan 600 μ l DNS ke dalam tabung, lalu dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit bersama-sama dengan kontrol (mengandung 100 μ l enzim ditambah 600 μ l DNS dan 100 μ l substrat tetapi tanpa inkubasi) kemudian didinginkan dalam air es selama 20 menit. Volume total uji aktivitas enzim dengan metode DNS dalam penelitian ini sebanyak 800 μ l, sehingga pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan *cuvet* plastik. Selanjutnya, absorbansi dibaca dengan Spektrofotometer pada λ 550 nm. Satu unit aktivitas enzim telah didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1 μ mol produk per satuan waktu untuk setiap ml enzim (Miller, 1960; Puspaningsih, 2004).

3.4.3 Pembuatan kurva standar glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan cara menimbang 10 mg glukosa anhidrat, kemudian dilarutkan dengan 10 ml akuades secara kuantitatif lalu dipindah dalam labu ukur 10 ml. Standar glukosa dibuat pada variasi konsentrasi 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\mu\text{g/ml}$ dari stok glukosa. Dengan menggunakan metode DNS, sebanyak 1 ml larutan standar glukosa masing-masing konsentrasi ditambahkan 3 ml larutan DNS, kemudian dikocok hingga homogen dan dipanaskan pada penangas air mendidih 100°C selama 15 menit kemudian didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi diukur menggunakan Spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 550 nm. Blanko terdiri dari 200 μl akuades dan 600 μl pereaksi DNS. Dari data yang diperoleh kemudian dibuat kurva standar antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.

3.4.4 Uji aktivitas enzim selulase menggunakan substrat turunan *p*-nitrofenol (*p*NP)

Uji aktivitas enzim pendegradasi selulosa yaitu *cellobioside* dan *glucopiranoside* dilakukan dengan substrat turunan *p*-nitrofenol yaitu *p*-nitrofenil cellobioside dan *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosida. Masing-masing enzim diuji dengan mencampurkan 100 μl enzim ditambah 900 μl substrat (1 mM *p*NPG dalam 10 ml buffer fosfat sitrat pH 7) diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μl Na_2CO_3 1 M. Hal yang sama juga dilakukan terhadap substrat *p*NPC untuk mengetahui aktivitas enzim cellobiase/ β -glucosidase. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan. Volume total uji aktivitas enzim dengan substrat spesifik turunan *p*-nitrofenol dalam penelitian ini sebanyak 1100 μl atau setara dengan 1,1 mL,

sehingga pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan *cuvet* plastik. Pengamatan jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan Spektrofotometri pada λ 405 nm. Blangko yang digunakan 100 μ l akuades dan 900 μ l substrat *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosida diperlakukan sama dengan kondisi di atas kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ l Na_2CO_3 1 M. Standar *p*-nitrofenol dibuat pada kisaran 0,1-0,5 mM *p*-nitrofenol dari stok *p*-nitrofenol 10 mM dalam pelarut buffer fosfat sitrat pH 7. Sebanyak 100 μ l masing-masing larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 300 μ l buffer fosfat sitrat pH 7 dan diinkubasi pada suhu 50^oC selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ l Na_2CO_3 1 M. Kemudian absorbansi dibaca dengan menggunakan Spektrofotometer UV VIS pada λ 405 nm.

3.5 Produksi Enzim Xilanase

Sebanyak satu ose koloni tunggal lima isolat bakteri dimasukkan ke dalam 20 ml media cair, diinkubasi dalam *shaker inkubator* selama 16 jam pada suhu 39^oC. Kultur selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 39^oC selama 15 menit. Pelet dibuang, sedangkan supernatan yang mengandung enzim xilanase diambil untuk digunakan analisis selanjutnya.

3.5.1 Uji aktivitas enzim xilanase

3.5.2 Uji Aktivitas Endo- β -Xilanase dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Masing-masing sebanyak 100 μ l enzim dan substrat xilan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf kemudian diinkubasi pada suhu 39^oC dalam penangas air selama 1 jam. Untuk kontrol campurannya sama seperti sampel tetapi tidak

diinkubasi. Sampel dan kontrol lalu ditambahkan 600 μ l DNS, Selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, lalu diinkubasi dalam *icebath* selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. 1 Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol xilosa per menit untuk setiap ml enzim, sedangkan aktivitas spesifik adalah unit enzim dibagi kadar protein (Miller, 1960).

3.5.3 Kurva standar xilosa

Standar xilosa dibuat pada variasi konsentrasi 0.15 - 0.5 mg/ml dari stok xilosa 10 mg/ml. Sebanyak 1 ml masing-masing larutan standar di tambah dengan 1 ml akuades dan 3 ml pereaksi DNS kemudian dikocok kuat. Tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit. Kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi di baca pada panjang gelombang 550 nm. Blanko digunakan dengan mengganti xilosa dengan akuades.

3.5.4 Uji Aktivitas Enzim-enzim Pendegradasi Xilan Menggunakan Substrat Turunan *p*-Nitrofenol (*p*NP)

Uji aktivitas enzim pendegradasi xilan yaitu α -L-arabinofuranosidase, glukoronidase, β -xilosidase, dan asetil xilan esterase dilakukan dengan substrat turunan *p*-nitrofenol (*p*NP) berturut-turut yaitu : *p*NP- α -L-arabinofuranosida, *p*NP- β -D-glukoronida, *p*NP- β -D-xilopiranosida, dan *p*NP-asetat. Masing-masing 1 mM substrat (0,9 ml) diinkubasi bersama-sama enzim (0,1ml) pada suhu 39 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 ml Na_2CO_3 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan secara spektrometri pada panjang gelombang 405 nm. Satu unit aktivitas enzim

didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol *p*-nitrofenol dalam waktu 1 menit pada kondisi percobaan.

Standar *p*-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1 - 0,5 mM *p*-nitrofenol/ml dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/ml dalam pelarut buffer fosfat sitrat pH 7. Masing-masing sebanyak 100 μl larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 300 μl buffer fosfat sitrat pH 7, selanjutnya diinkubasi pada suhu 39 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μl Na_2CO_3 0,4 M. Absorbansi dibaca pada λ 405 nm.

3.6 Karakterisasi enzim selulase dan xilanase

3.6.1 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim selulase dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim selulase pada berbagai variasi suhu yaitu pada suhu 35, 40, 45, 50, 55 dan 60°C (Patthra Pason *et.al*, 2001).

3.6.2 Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum enzim selulase ditentukan dengan esei aktivitas enzim pada pH 5 sampai 9 menggunakan buffer fosfat sitrat pada suhu optimum enzim (Patthra Pason *et.al.*, 2001).

3.7 Pemurnian enzim selulase

Tahapan pemurnian enzim selulase diawali dengan fraksinasi pengendapan amonium sulfat, diafiltrasi menggunakan Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi penukar ion menggunakan *DEAE-Toyopearl* 650 M (Tosoh, Jepang). Hasil pemurnian dianalisis dengan SDS-PAGE dan Zimogram.

3.7.1 Pengendapan enzim selulase dengan amonium sulfat

Tahapan awal pemurnian enzim adalah fraksinasi garam. Ekstrak kasar enzim selulase dari bakteri *Acodothermus cellulolitycus* dengan berbagai prosentase kejenuhan amonium sulfat diendapkan untuk memperoleh kondisi optimum pengendapan selulase dengan amonium sulfat. Prosentase kejenuhan amonium sulfat yang digunakan beragam dari 40-100%. Tabel kejenuhan amonium sulfat yang digunakan adalah berdasarkan Scopes (1987). Penentuan kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum terlebih dahulu dilakukan dalam skala kecil di dalam ependorf, yaitu sebanyak satu mL ekstrak kasar enzim selulase diendapkan dengan amonium sulfat kemudian tabung dibolak-balik hingga garam larut dalam enzim selulase. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Setelah dilakukan sentrifugasi akan diperoleh endapan dan supernatan, endapan hasil sentrifugasi tersebut dilarutkan dalam bufer fosfat sitrat pH 7, kemudian diuji aktivitasnya. Setelah didapatkan kadar kejenuhan amonium sulfat yang optimum, pengendapan enzim selulase dilanjutkan dalam skala besar, yaitu sebanyak 700 mL ekstrak kasar enzim xilanase dijenuhkan dengan amonium sulfat.

Pengendapan dalam skala besar dilakukan dengan merendam ekstrak kasar enzim selulase dalam penangas es, selanjutnya dimasukkan sejumlah amonium sulfat sedikit demi sedikit secara perlahan sambil diaduk dengan pengaduk *magnetic stirrer* sampai amonium sulfat larut dalam enzim. Enzim yang mengendap selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Selanjutnya endapan enzim dilarutkan dalam bufer fosfat sitrat pH 7

hingga tepat larut, kemudian dilakukan diafiltrasi menggunakan Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices.

3.7.2 Diafiltrasi menggunakan amicon ultra-4 centrifugal filter devices

Pada penelitian ini, proses penghilangan garam berlebih dilakukan dengan cara diafiltrasi menggunakan Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices yang berukuran Amicon Ultra 30K device - 30,000 NMWL. Sebanyak 500 μ L enzim selulase hasil pengendapan dengan amonium sulfat optimum dimasukkan ke dalam Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Untuk mendapatkan enzim selulase yang bebas dari amonium sulfat dilakukan pengulangan sentrifugasi sebanyak lima kali. Enzim selulase yang bebas dari amonium sulfat diambil dari filter unit dengan melarutkan enzim selulase dengan dua tetes bufer fosfat sitrat pH 7, selanjutnya ditampung untuk dilakukan uji aktivitas spesifik dan dilanjutkan dengan tahap kromatografi penukar ion.

3.8 Analisis Zimogram dan SDS-PAGE

Enzim yang telah dimurnikan, dianalisis menggunakan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekulnya serta zimogram untuk mengetahui berat molekul suatu protein aktif. SDS-PAGE yang digunakan adalah berdasarkan Laemmli (1970) menggunakan marker berat molekul medium range tertentu.

Pada penelitian ini, analisis SDS-PAGE menggunakan 12% *separating gel* dan 5% *stacking gel* (Laemmli, 1970). Ke dalam tabung Eppendorf dimasukkan sampel (enzim 20 μ L dan sampel buffer 5 μ L). Campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian sampel dimasukkan ke

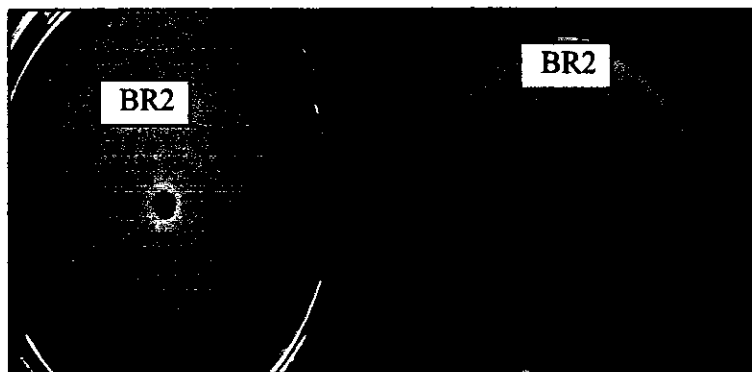
dalam sumur *stacking gel* menggunakan pipet-mikro. Selanjutnya piranti elektroforesis Wealtec (Meadowvale, USA) dipasang, dan 800 mL buffer elektroforesis pH 8,3 dituangkan ke dalam bejana elektroforesis. Proses elektroforesis berlangsung lebih kurang selama 1,5 jam pada tegangan 115 volt. Setelah proses elektroforesis selesai, gel elektroforesis dilepas dari cetakan dan jarak migrasi bromofenol biru diukur dari batas atas gel pemisah. Pita protein akan tampak setelah direndam dalam larutan *staining* yang mengandung *Comassie Blue R-250* untuk memvisualisasikannya (Laemmli, 1970). Hasil visualisasi ini berwarna biru karena larutan *staining* ini mengandung *Coomassie Blue R-250*. Selanjutnya untuk mengetahui posisi enzim selulase target dilakukan *destaining* yang merupakan larutan penghilang warna pada matriks. Proses ini dilakukan sampai diperoleh pita-pita protein berwarna biru dengan latar belakang jernih (Kodorwich *et al*, 2006). Analisis zimogram juga menggunakan 12% *separating gel* dan 5% *stacking gel* (Laemmli, 1970). Pada umumnya, teknik analisis ini hampir sama dengan SDS PAGE, perbedaannya terletak pada pembuatan *separating gel* yaitu dengan menambahkan 1% substrat *Carboxymethyl cellulose*. Setelah proses elektroforesis selesai, campuran polimerisasi gel direndam dengan Triton X-100 untuk merenaturasi protein. Kemudian gel diinkubasi dengan buffer fosfat sitrat pH 7 pada suhu optimumnya (50°C) selama 4-5 jam. Adanya pita protein aktif selulase dapat dilihat dengan merendam gel dalam larutan *Congo red* 0,1% (Tether dan Wood, 1982) selama 30 menit pada suhu kamar dan dilanjutkan pencucian gel beberapa kali dengan larutan NaCl 1 M sampai terlihat pita protein dengan latar belakang merah bata.

BAB IV

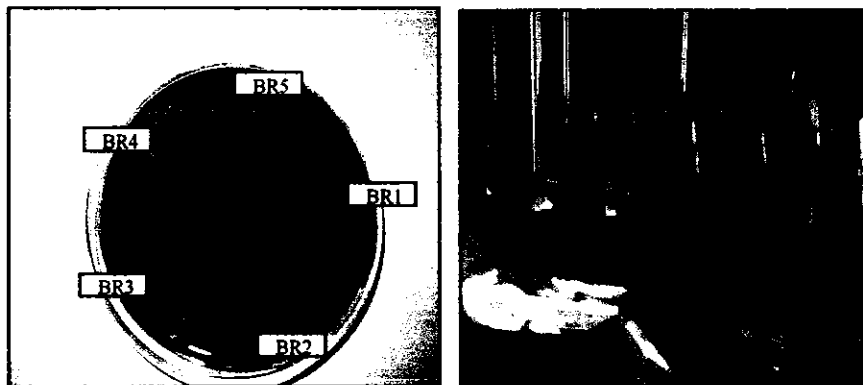
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Isolasi dan seleksi Isolat Bakteri Lignoselulolitik



Gambar 4. Hasil uji halo positif pada media CMC



Gambar 5. Hasil uji halo positif pada media *oat spelt xilan*

Gambar 6. Uji aktivitas selulase dan xilanase menggunakan metode DNS

Hasil seleksi 5 isolat bakteri lignoselulolitik disajikan pada Gambar 4 dan 5. Seleksi bakteri lignoselulolitik masing-masing menggunakan *carboxyl methyl cellulase* (CMC) dan *oat splet xilan* sebagai substrat. Aktivitas selulase dan xilanase ekstraseluler menunjukkan hasil positif yang ditandai halo (pembentukan zona bening disekeliling koloni sel) pada media padat. Dari 5 isolat bakteri yang digunakan terdapat 1 bakteri isolat BR2 yang memberikan indeks halo terbesar yaitu 1,5 cm pada media CMC dan 1,4 cm pada media *oat splet xylan*. Berdasarkan hasil seleksi pada 5 isolat bakteri lignoselulolitik yaitu BR1, BR2, BR3, BR4, BR5 diperoleh isolat BR2 yang mempunyai aktivitas tertinggi, masing-masing aktivitas endo- β -1,4-glucanase sebesar 0,28 U/ml dan aktivitas endo- β -1,4-xilanase sebesar 8,75-22,63 U/ml (Tabel 2). Hasil identifikasi bakteri diketahui bakteri BR2 adalah *Actinobacillus* sp.

Tabel 2. Data Aktivitas Isolat Penghasil Enzim Selulase dan Xilanase Asal Bakteri Rumen

Isolat	Aktivitas enzim selulase (U/ml)	Aktivitas enzim xilanase (U/ml)
BR1	-	10,50
BR2	0,28	22,63
BR3	-	22,63
BR4	-	8,75
BR5	-	9,41

Uji aktivitas enzim endo- β -1,4-glucanase dan endo- β -1,4-xilanase dilakukan dengan metode DNS yang bertujuan untuk mengetahui adanya gugus aldehid pada gula pereduksi yang selanjutnya dioksidasi menjadi karboksil. Asam 3,5-dinitrosalisilat direduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat dalam kondisi

basa. Perubahan warna kuning asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi kecoklatan dari asam 3-amino-5nitrosalisilat. Adanya gugus aldehid ditandai dengan perubahan warna kuning menjadi kecoklatan. Gugus aldehid ini berasal dari selulo-oligosakarida hasil hidrolisis selulosa oleh enzim endo- β -1,4-glucanase dan xilo-oligosakarida hasil hidrolisis xilan oleh enzim endo- β -1,4-xilanase (Gambar 5) (Miller, 1950).

Menurut la Granga *et al.* (1996) beberapa spesies bakteri dan jamur dapat menggunakan selulosa dan xilan sebagai sumber karbon karena mampu menghasilkan selulase dan xilanase. Dikatakan oleh Kulkarni *et al.* (1999) sebagian besar bakteri dan jamur mensekresikan selulase dan xilanase ekstraseluler yang akan memecah selulosa menjadi glukosa, dan xilan menjadi xilosa sehingga mikroorganisme tersebut dapat menggunakan selulosa dan xilan untuk pertumbuhannya.

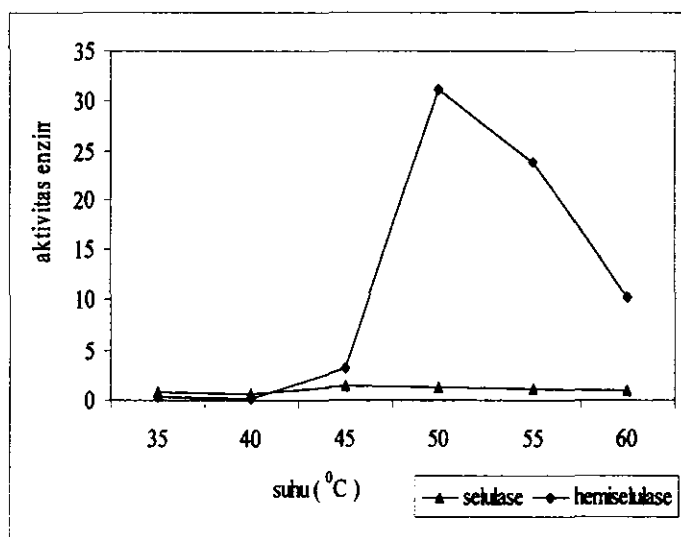
4.1.2 Karakterisasi Enzim Selulase

4.1.2.1. Suhu Optimum Enzim Selulase dan Xilanase

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim selulase dan xilanase adalah suhu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase dan xilanase pada penelitian ini diamati pada suhu 35-60°C. Suhu berhubungan dengan energi yang diperlukan enzim untuk melakukan reaksi. Jika suhu terlalu rendah maka enzim tidak mempunyai energi yang cukup untuk melakukan reaksi, sehingga reaksi tidak dapat berjalan secara maksimal. Pada suhu optimum energi yang diperoleh sama dengan energi yang diperlukan enzim untuk bereaksi sehingga reaksi dapat berjalan dengan baik (Champe dan Harvey, 1994).

Tabel 3. Data optimum suhu enzim selulase dan xilanase

Isolat	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Aktivitas enzim selulase (U/ml)	Aktivitas enzim xilanase (U/ml)
BR2	35	0,86	0,33
	40	0,71	0,15
	45	1,42	3,17
	50	1,32	31,17
	55	1,11	23,75
	60	0,96	10,17

**Gambar 7. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Selulase dan Xilanase**

Hasil penelitian aktivitas enzim enzim selulase dan xilanase isolat BR2 yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung CMC dan *oat splet xylan* pada berbagai suhu disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 7. Hasil optimasi suhu enzim selulase diperoleh pada suhu 45°C dengan aktivitas 1,42 U/ml, akan tetapi pada suhu 50°C dan 55°C enzim selulase ini masih mempunyai aktivitas yang baik yaitu mencapai 92,96 % (1,32 U/ml) dan 78,17 % (1,11 U/ml). Hasil optimasi suhu enzim xilanase diperoleh pada suhu 50°C dengan aktivitas 31,17

U/ml, akan tetapi pada suhu 55 °C enzim xilanase ini masih mempunyai aktivitas yang baik yaitu mencapai 76,20 %(23,75 U/ml). Pada suhu diatas 55 °C kedua enzim tersebut terjadi penurunan aktivitas, hal ini terjadi karena atom - atom dalam molekul enzim mempunyai energi yang cukup besar untuk bergerak yang disebabkan oleh adanya perubahan bentuk struktur enzim akibat meningkatnya getaran thermal komponen atom-atomnya, sehingga protein pembentuk enzim terdenaturasi .

Hasil penelitian suhu optimum ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Lowe *et al.* (1987), bahwa fungi rumen *Neocallimastix frontalis* yang tumbuh pada substrat jerami gandum menghasilkan enzim selulase dan xilanase yang mempunyai aktivitas optimum pada suhu 50 °C, dan Suzuki *et al.*, (2001) melaporkan bakteri *Aeromonas caviae* yang diisolasi dari perut binatang buas menghasilkan enzim β xilosidase yang mempunyai aktivitas optimal pada suhu 50 °C. Pemanfaatan selulase yang dikombinasikan dengan xilanase akan menjadi sangat penting dimasa mendatang untuk menyediakan bahan dasar yang dibutuhkan untuk dikonversi menjadi bahan lain. Beauchemin *et al.*, (2003) menyatakan bahwa pemberian *feed additive* berupa enzim terutama selulase dan xilanase dapat meningkatkan efisiensi pakan, baik pada sapi potong maupun sapi perah.

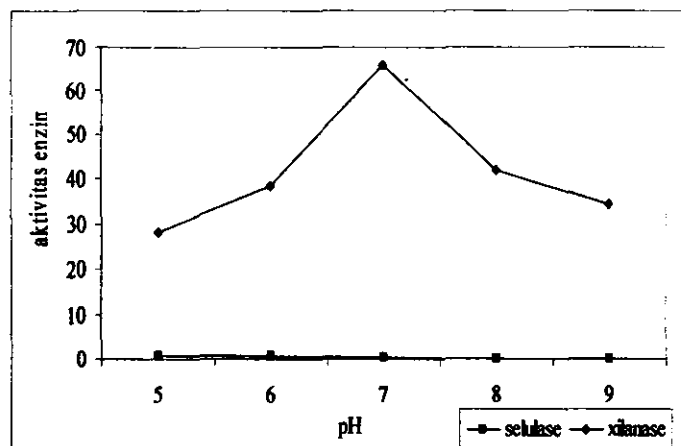
4.1.2.2 pH Optimum Enzim Selulase dan Xilanase

Faktor lain yang mempengaruhi aktivitas selulase adalah pH. Setiap enzim memiliki pH optimum yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. pH berhubungan dengan struktur enzim yang berupa asam amino. Profil aktivitas pH

enzim menunjukkan pH pada saat gugus fungsi yang penting pada sisi katalitik berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan. Dengan adanya perubahan pH maka akan mempengaruhi perubahan ionisasi gugus fungsi asam amino enzim ataupun substrat yang akan mempengaruhi ikatan hidrogen yang terdapat pada enzim. Hal ini menyebabkan konformasi enzim dapat berubah dan dapat mengakibatkan penurunan aktivitas enzim yang disebabkan konformasi enzim tidak sama dengan konformasi substrat (Lehninger, 1982).

Tabel 4. Data optimum pH enzim selulase dan xilanase

Isolat	Variasi pH	Aktivitas enzim selulase (U/ml)	Aktivitas enzim xilanase (U/ml)
BR2	5	0,53	28,33
	6	0,57	38,33
	7	0,42	65,97
	8	0,16	41,67
	9	0,15	34,17



Gambar 8. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase dan Xilanase

Gambar 8 menunjukkan bahwa aktivitas selulase mengalami peningkatan dari pH 5 mencapai aktivitas tertinggi sebesar 0.57 U/ml pada pH 6, pada pH 7 aktivitas selulase mengalami penurunan mencapai 73,68 % (0,42 U/ml) dari

aktivitas pada pH optimum. Aktivitas xilanase mengalami peningkatan dari pH 5 sampai 6 dan mencapai aktivitas tertinggi sebesar 65,97 U/ml pada pH 7, pada pH 8 aktivitas xilanase mengalami penurunan mencapai 63,17 % (41,67 U/ml) dari aktivitas pada pH optimum. Penurunan aktivitas ini kemungkinan disebabkan oleh perubahan konformasi antara enzim dan substrat akibat perubahan pH.

Pada umumnya di dalam rumen ternak ruminansia pH optimum berkisar 6 – 7. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh pH optimum dari enzim selulase dan xilanase sesuai dengan dengan kondisi pH rumen. pH optimum ini merupakan salah satu karakteristik enzim selulase dan xilanase yaitu jumlah ion - ion pada pH tersebut membuat konformasi enzim selulase dan xilanase tepat berpasangan dengan substratnya. Hal ini juga disebabkan enzim yang diperoleh berasal dari bakteri rumen, sehingga pH yang diperoleh sesuai dengan kondisi asalnya. Kondisi yang optimum pada pH 6-7 sesuai untuk perkembangan bakteri selulolitik dan hemiselulolitik dalam rumen untuk mendegradasi pakan berserat menghasilkan produksi VFA. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Owens dan Goetsch (1988), bahwa kondisi pH sangat dipengaruhi lingkungan hidup mikroba dalam mendegradasi pakan. Orskov dan Ryle (1990) juga menyatakan bahwa bakteri selulolitik dan hemiselulolitik memerlukan pH sekitar 6.2 – 7.0 untuk berkembang secara tepat.

4.1.3 Uji Aktivitas Enzim Selulase

4.1.3.1 Uji aktivitas enzim selulase menggunakan substrat turunan *p*-nitrofenol (*p*NP)

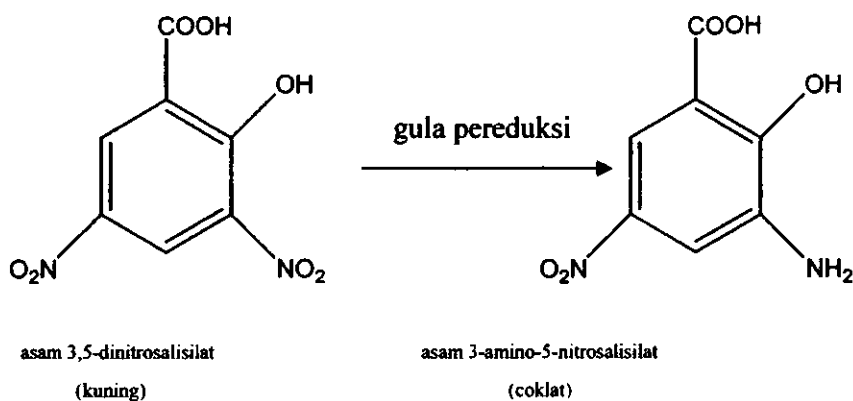
Enzim selulase diuji aktivitas selulolitiknya, dengan mereaksikan enzim selulase dengan substrat *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosida untuk enzim β -glukosidase, dan *p*-nitrofenil sellobiosida untuk enzim ekso-1,4- β -D-glukanase. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan (Renganathan *et al.*, 1995). Pengamatan jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan Spektrofotometri pada λ 405 nm. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol *p*-nitrofenol dalam waktu 1 menit (U/ml) pada kondisi percobaan. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim dengan substrat spesifik turunan *p*-nitrofenol, bakteri BR2 menunjukkan adanya aktivitas enzim β -glukosidase dari *crude extract* sebesar 1,86 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim ekso-1,4- β -D-glukanase dari *crude extract* sebesar 2,5 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri BR2 memiliki aktivitas terhadap enzim β -glukosidase dan enzim ekso-1,4- β -D-glukanase. Hidrolisis selulosa membutuhkan aktivitas sinergisme dari berbagai enzim selulase dengan spesifikasi yang berbeda-beda menghasilkan sistem multienzim (Irwin *et al.*, 2000). Sistem multienzim dari selulase adalah suatu strategi dari mikroorganisme untuk meningkatkan efektivitas hidrolisis selulosa, dimana setiap enzim mempunyai fungsi spesifik (Beg *et al.*, 2001).

Tabel 5. Aktivitas enzim selulase dari crude extract pada berbagai substrat turunan *p*-nitrofenol

Enzim	Substrat	Aktivitas Enzim (U/ml)
β -glukosidase	<i>p</i> NP- β -D-glukopiranosida	1,86
ekso-1,4- β -D-glukanase	<i>p</i> NP-sellobiosida	2,5

4.1.3.2 Uji aktivitas enzim selulolitik menggunakan substrat *Carboxymethyl cellulose* (CMC)

Penentuan aktivitas enzim selulase dari isolat BR2 juga dilakukan terhadap substrat *Carboxymethyl cellulose* yang ditentukan dengan metode DNS. Substrat *Carboxymethyl cellulose* dipecah oleh enzim selulase menjadi monomer-monomernya, diantaranya selulodekstrin/selulo-oligosakarida. Selulodekstrin merupakan gula pereduksi dan dengan adanya larutan DNS maka akan terjadi reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Hal ini dapat dilihat dari perubahan warna dari kuning tua menjadi coklat tua. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Pada pengukuran ini, selain sampel juga digunakan kontrol yang berfungsi untuk membandingkan banyaknya produk yang dihasilkan. Komposisi kontrol sama dengan sampel tetapi berbeda dalam hal proses inkubasi serta urutan

penambahan masing-masing komposisinya. Perlakuan untuk kontrol dilakukan tanpa proses inkubasi, sedangkan sampel dengan diinkubasi. Urutan penambahan komposisi pada kontrol yaitu enzim terlebih dahulu ditambahkan kemudian DNS dan terakhir ditambahkan substrat. Hal ini bertujuan supaya enzim tidak bereaksi dengan substrat. Sedangkan pada sampel yaitu enzim terlebih dahulu ditambahkan substrat kemudian diinkubasi selama 30 menit supaya enzim bereaksi dengan substrat kemudian ditambahkan DNS.

Uji aktivitas menggunakan metode DNS dilakukan dengan menginkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit, pada proses tersebut terjadi degradasi selulosa menjadi selulodekstrin oleh enzim selulase. Pemanasan dalam air mendidih bertujuan untuk menyempurnakan reaksi dengan DNS sedangkan air es berfungsi untuk menghentikan reaksi. Banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm (Miller, 1960).

Satu unit aktivitas enzim selulolitik didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1 μ mol produk per satuan waktu untuk setiap ml enzim (Miller, 1960; Puspaningsih, 2004). Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim endo-1,4- β -D-glukanase dengan substrat spesifik *Carboxymethyl cellulose* dari *crude extract* sebesar 3,51 U/ml. Adanya aktivitas terhadap endo-1,4- β -D-glukanase menandakan bahwa isolat BR2 memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan 1,4- β pada rangkaian selulosa secara acak menghasilkan selulodekstrin/selulo-oligosakarida (Henrissat dan Bairoch, 1996; Miyamoto, 1997).

4.1.4. Uji Aktivitas Enzim Xilanase

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim dengan substrat spesifik turunan *p*-nitrofenol, isolat bakteri BR2 menunjukkan adanya aktivitas asetil xilan esterase sebesar U/ml dan glukuronidase sebesar U/ml, aktivitas α -L arabinofuranosidase sebesar dan aktivitas negatif terhadap enzim β -xilosidase. Hal ini berarti isolat bakteri BR2 tidak memiliki aktivitas terhadap β -xilosidase. Uji aktivitas endo- β -xilanase dilakukan dengan metode DNS pada suhu 50 °C dan pH 7. Aktivitas enzim xilanase pada berbagai spesifik disajikan pada Tabel 7.

Tabel 6. Aktivitas Enzim Xilanase Isolat BR2 pada Berbagai Substrat Spesifik

Enzim	Substrat Spesifik	Aktivitas Unit (U/ml)
endo β -xilanase	Oat spelt xylan	0,433
asetil xilan esterase	<i>p</i> NP-Asam asetat	0,034
Glukuronidase	<i>p</i> NP-G	0,018
α -L arabinofuranosidase	<i>p</i> NP-A	0,008
β -xilosidase	<i>p</i> NP-X	0,011

Isolat bakteri BR2 mampu memanfaatkan xilan sebagai sumber karbon, hal ini ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening pada media agar xilan. Kemampuan ini berkaitan dengan keberadaan enzim-enzim xilanase. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim dengan substrat spesifik, isolat BR2 menunjukkan hasil positif terhadap enzim endo- β -1,4-xilanase, asetil xilan esterase, β -xilosidase, α - glukuronidase dan α -L arabinofuranosidase. Kelima enzim tersebut bereaksi secara bersama-sama untuk mengubah substrak spesifik menjadi gula-gula penyusunnya.

Berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan adanya aktivitas enzim endo- β -1,4-xilanase, asetil xilan esterase, β -xilosidase, α -glukuronidase dan α -L arabinofuranosidase yang secara acak melakukan proses hidrolisis xilan. Mekanisme reaksi endoxilanase merupakan reaksi retensi yang berlangsung dua tahap. Tahap pertama berupa protonasi substrat oleh katalis asam yang akan menyebabkan terjadinya disosiasi dan difusi pada xilobiosa, yang memindahkan enzim pada posisi yang baru terhadap substrat (Subramaniyan dan Prema, 2002). Mekanisme yang lain yaitu eksoendoxilanase akan menghidrolisis ikatan β -1,4-xilosa pada posisi ujung kerangka utama untuk melepaskan xilobiosa. Tingginya aktivitas endo- β -1,4-xilanase pada penelitian ini menyebabkan reaksi hidrolisis xilan dapat berlangsung optimal.

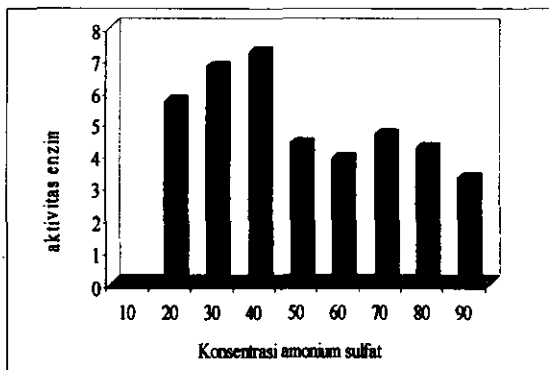
Subramaniyan dan Prema (2002) melaporkan enzim asetil xilan esterase dan glukuronidase akan menghidrolisis gugus samping struktur xilan menjadi asetat dan asam glukoronat, hal ini memberikan kontribusi terhadap produksi VFA yang optimal di dalam rumen dan bermanfaat sebagai sumber energi bagi ternak ruminansia.

4.1.5 Hasil Pemurnian Enzim Selulase dan Xilanase

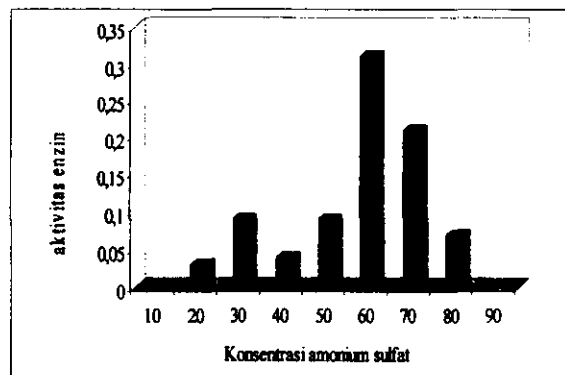
4.1.5.1 Hasil pengendapan enzim selulase dan Xilanase dengan amonium sulfat

Tabel 7. Data Aktivitas Enzim Selulase dan Xilanase Setelah Pengendapan dengan Amonium Sulfat

Isolat	Konsentrasi ammonium sulfat	Aktivitas enzim selulase (U/ml)	Aktivitas enzim xilanase (U/ml)
BR2	10	0	0
	20	5.7	0,03
	30	6.78	0,09
	40	7.22	0,04
	50	4.36	0,09
	60	3.88	0,31
	70	4.66	0,21
	80	4.22	0,07
	90	3.27	0



Gambar 9. Pengendapan ekstrak kasar enzim selulase dengan amonium sulfat



Gambar 10. Pengendapan ekstrak kasar enzim xilanase dengan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan merupakan campuran dari berbagai macam protein lain yang tidak terendapkan dengan sentrifugasi. Untuk memisahkan enzim selulase dengan protein lain tersebut tidak dapat dilakukan hanya dengan sentrifugasi, sehingga dilakukan pengendapan ekstrak kasar dengan amonium sulfat. Pengendapan ekstrak kasar selulase dengan amonium sulfat ini

dilakukan untuk memisahkan protein-protein lain yang terdapat dalam ekstrak kasar enzim, akibatnya aktivitas enzim-enzim selulolitik yang terdeteksi akan memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibanding ekstrak kasarnya. Pemekatan ini dilakukan dengan garam amonium sulfat berdasarkan tabel Scopes, 1987. Penambahan garam amonium sulfat ke dalam larutan protein akan menarik molekul air yang pada awalnya melindungi permukaan molekul protein, akibatnya setiap protein mengendap pada kejenuhan amonium sulfat yang optimum dan terjadi fraksinasi protein. Pengendapan dengan garam amonium sulfat terlebih dahulu dilakukan dalam skala kecil sebanyak 1 ml larutan enzim di dalam ependorf. Selanjutnya setiap persentase kejenuhan amonium sulfat dilakukan uji aktivitas untuk mengetahui aktivitas optimum pada pengendapan amonium sulfat. Setelah diperoleh hasil optimum pada pengendapan kejenuhan amonium sulfat, dilakukan pengendapan dalam skala besar dengan merendam ekstrak kasar dalam penangas es, selanjutnya menambahkan sedikit demi sedikit amonium sulfat ke dalam larutan enzim sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Hal yang perlu diperhatikan pada saat pengadukan yaitu dilakukan dengan kecepatan lambat agar tidak menimbulkan busa. Pengadukan dimaksudkan untuk meningkatkan kontak antara garam dengan air, sehingga terjadi pengendapan enzim. Adanya garam amonium sulfat berfungsi untuk menarik air yang terjebak pada daerah hidrofob, sehingga memungkinkan terjadinya agregasi dan pengendapan molekul-molekul enzim. Hasil pengendapan ekstrak kasar enzim selulase dengan garam amonium sulfat menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase mencapai aktivitas optimum pada pengendapan 40% kejenuhan amonium sulfat.

Selanjutnya hasil pengendapan garam amonium sulfat dipisahkan dengan sentrifugasi, sehingga diperoleh larutan filtrat dan pelet. Pelet tersebut merupakan enzim selulase target, sedangkan filtratnya merupakan campuran berbagai protein terlarut. Selanjutnya pelet tersebut dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat pH 7 karena pada kondisi ini enzim dapat larut dan stabil.

Aktivitas enzim selulase hasil pengendapan garam amonium sulfat optimum menggunakan substrat spesifik CMC, *p*NPG dan *p*NPC masing-masing sebesar 4,24 U/ml, 2,42 U/ml dan 3,23 U/ml. Besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini sebesar 222,9 mg/ml, sehingga dapat diperoleh aktivitas spesifik enzim selulase hasil pengendapan menggunakan substrat CMC, *p*NPG dan *p*NPC masing-masing sebesar 0,0152 U/mg, 0,0109 U/mg dan 0,0145 U/mg.

Aktivitas enzim xilanase hasil pengendapan garam amonium sulfat optimum menggunakan substrat spesifik *Oat spelt xilan*, *p*NP-X, *p*NP-G, *p*NP-Asam asetat, *p*NP-A masing-masing sebesar 2,899 U/ml, 0,0167 U/ml, 0,0373 U/ml, 0,0195 U/ml, 0,0284 U/ml. Besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini sebesar 176,55 mg/ml, sehingga dapat diperoleh aktivitas spesifik enzim selulase hasil pengendapan menggunakan substrat *Oat spelt xilan*, *p*NP-X, *p*NP-G, *p*NP-Asam asetat, *p*NP-A masing-masing sebesar 0,0164 U/mg, $9,459 \times 10^{-5}$ U/mg, $2,113 \times 10^{-4}$ U/mg, $1,1045 \times 10^{-4}$ U/mg, $1,608 \times 10^{-4}$ U/mg.

4.1.5.2 Hasil diafiltrasi enzim selulase dan xilanase

Tahap pemurnian enzim selulase berikutnya setelah dilakukan pengendapan dengan garam amonium sulfat, yaitu dengan cara diafiltrasi. Pada

penelitian ini, proses diafiltrasi dilakukan dengan menggunakan Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices yang berukuran Amicon Ultra 30K device - 30,000 NMWL. Diafiltrasi ini memiliki prinsip yang sama dengan proses dialisis yang umumnya menggunakan tabung selofan. Namun, pada penelitian ini proses dialisis tidak menggunakan tabung selofan. Hal ini dikarenakan selofan merupakan suatu membran semipermeabel yang tersusun atas monomer-monomer selulosa, sehingga dikhawatirkan bila digunakan untuk mendialisis enzim selulase akan terjadi degradasi selulosa oleh enzim selulase. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan tabung amicon ultra-4 centrifugal filter devices yang memiliki prinsip sama dengan tabung selofan. Proses ini dinamakan diafiltrasi karena di dalam *filter unit* amicon ultra-4 centrifugal filter devices ini terdapat membran semipermeabel yang dapat memisahkan senyawa berdasarkan berat molekulnya, sehingga garam amonium sulfat atau partikel kecil lainnya yang terdapat dalam larutan enzim yang dapat mengganggu aktivitas enzim dapat menembus membran, sedangkan protein yang ukurannya lebih besar tertinggal di dalam *filter unit*. Proses diafiltrasi menggunakan amicon ultra-4 centrifugal filter devices ini membutuhkan waktu yang cukup lama, karena untuk mendapatkan enzim selulase yang bebas dari amonium sulfat dilakukan sentrifugasi berulang kali, dimana untuk satu kali sentrifugasi diperlukan waktu ± 20 menit (www.milipore.com). Hal ini berbeda dengan dialisis menggunakan tabung selofan yang tidak membutuhkan waktu terlalu lama, namun banyak membutuhkan buffer yang sesuai dengan kondisi enzim untuk mengeluarkan garam amonium sulfat atau partikel kecil lainnya. Diafiltrasi dihentikan setelah

tidak ada lagi amonium sulfat yang keluar dari *filter unit*. Hal tersebut dibuktikan dengan menguji partikel yang tertampung di dalam *centrifuge tube* dengan menambahkan pereaksi Nessler, jika masih terbentuk endapan coklat kuning maka proses sentrifugasi tetap berlangsung. Endapan coklat kuning tersebut menandakan proses diafiltrasi belum selesai karena masih terdapat amonium sulfat pada larutan enzim. Uji kualitatif amonium sulfat ini tidak dilakukan dengan BaCl_2 karena ion fosfat dari bufer fosfat sitrat tersebut akan membentuk endapan putih $\text{Ba}_3(\text{PO}_3)_2$. Hal tersebut juga akan membentuk endapan putih BaSO_4 , sehingga pereaksi BaCl_2 kurang spesifik terhadap amonium sulfat.

Setelah proses diafiltrasi selesai, diperoleh volume enzim selulase sebesar 6 ml dengan aktivitas enzim menggunakan substrat CMC, *pNPG* dan *pNPC* masing-masing sebesar 5,16 U/ml, 3,19 U/ml dan 3,64 U/ml.

Setelah proses diafiltrasi selesai, diperoleh volume enzim xilanase sebesar 7 ml dengan aktivitas enzim menggunakan substrat *Oat spelt xilan*, *pNP-X*, *pNP-G*, *pNP-Asam asetat*, *pNP-A* masing-masing sebesar 3,277 U/ml, 0,2670 U/ml, 0,060 U/ml, 1,311 U/ml dan 0,21 U/ml.

Dari semua data hasil pemurnian enzim selulase, dapat diinformasikan lebih lanjut melalui suatu tabel pemurnian sebagai berikut :

Tabel 8. Pemurnian Enzim Selulase

Tahap Pemurnian	Substrat	Volume (ml)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kemurnian
Ekstrak kasar	CMC	500	3,51	321,25	0,11	1
	pNPG		1,86	321,25	$5,719 \times 10^{-3}$	
	pNPC		2,5	321,25	$7,686 \times 10^{-3}$	
Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	CMC	4	4,24	222,9	0,0152	1,4
	pNPG		2,42	222,9	0,0109	1,9
	pNPC		3,23	222,9	0,0145	1,9
Diafiltrasi	CMC	6	5,16	69,65	0,0741	6,74
	pNPG		3,19	69,65	0,0458	8,01
	pNPC		3,64	69,65	0,0523	6,80

Tabel 9. Pemurnian Enzim Xilanase

Tahap Pemurnian	Substrat	Volume (ml)	Aktivitas total	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian
Crude (Ekstra seluler)	Oat spelt xylan	500	0,433	49,1	$8,818 \times 10^{-3}$	1
	pNP-X		0,0112	49,1	$2,28 \times 10^{-4}$	
	pNP-G		0,018	49,1	$3,666 \times 10^{-4}$	
	pNP-Asam asetat		0,034	49,1	$6,934 \times 10^{-4}$	
	pNP-A		0,008	49,1	$1,63 \times 10^{-4}$	
Pengendapan Amonium sulfat	Oat spelt xylan	15	2,899	176,55	0,0164	1,86
	pNP-X		0,0167	176,55	$9,459 \times 10^{-5}$	41,49
	pNP-G		0,0373	176,55	$2,113 \times 10^{-4}$	0,58
	pNP-Asam asetat		0,0195	176,55	$1,1045 \times 10^{-4}$	0,16
	pNP-A		0,0284	176,55	$1,608 \times 10^{-4}$	0,99
Dialisis	Oat spelt xylan	7	3,277	37,9	0,08646	9,8
	pNP-X		0,2670	37,9	$7,045 \times 10^{-3}$	30,89
	pNP-G		0,060	37,9	$1,583 \times 10^{-3}$	4,32
	pNP-Asam asetat		1,311	37,9	0,0346	49,90
	pNP-A		0,21	37,9	$5,54 \times 10^{-3}$	33,98

Berdasarkan tabel pemurnian enzim selulase dan xilanase tersebut dapat diinformasikan bahwa hasil pemurnian dari ekstrak kasar hingga pengendapan amonium sulfat menunjukkan masih terdapat protein lain selain protein target. Hal ini terlihat dari tingkat kemurnian yang rendah, sedangkan hasil pemurnian dari diafiltrasi menunjukkan bahwa kandungan protein dalam xilanase sedikit, hal ini dibuktikan dari tingkat kemurnian yang tinggi. Selain itu dapat diinformasikan bahwa terjadi peningkatan kemurnian enzim xilanase setelah dimurnikan dengan diafiltrasi menggunakan substrat *pNP-X*, *pNP-Asam asetat* dan *pNP-A* masing-masing sebesar 30,89, 49,90 dan 33,98 kali dan dari ekstrak kasarnya.

4.1.6 Analisis SDS-PAGE dan Zimogram

Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) merupakan suatu prosedur analisis yang sangat penting dalam karakterisasi protein. Pada penelitian ini analisis SDS PAGE bertujuan untuk mengetahui kemurnian molekul enzim selulase berdasarkan ukuran dan muatan listrik serta menentukan berat molekulnya (Berg *et al.*, 2003). Hal ini sesuai dengan prinsip teori bahwa *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah metode yang murah, *reproducible*, cepat untuk menentukan secara kuantitatif, membandingkan, serta cepat untuk mengarakterisasi protein (Bollag and Edelstein, 1996). Metode ini memisahkan protein terutama berdasarkan berat molekulnya (Laemmli, 1970).

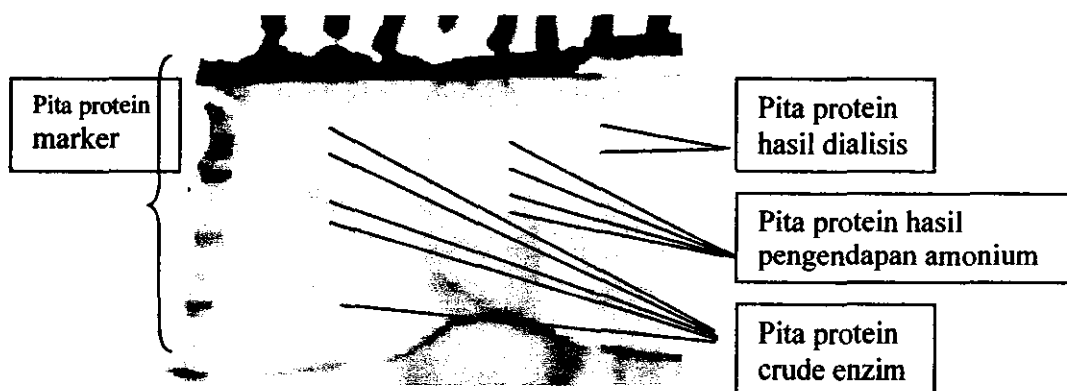
Pada proses SDS PAGE ini, ekstrak kasar enzim selulase, hasil pengendapan dengan amonium sulfat, enzim selulase hasil pemurnian dengan

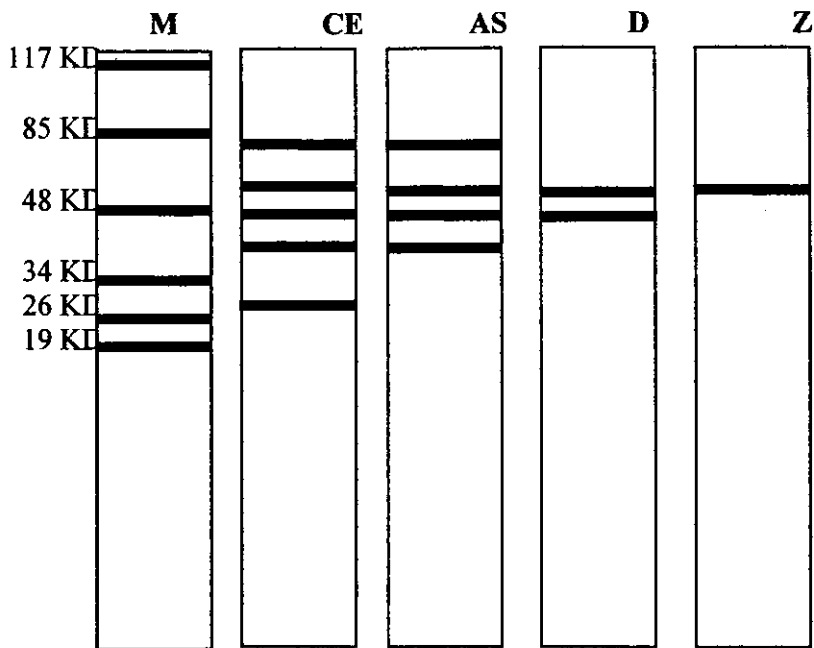
diafiltrasi, fraksi A dan fraksi B yang merupakan hasil terbaik dari kromatografi penukar ion dalam Tris HCl pH 7 serta fraksi A dan fraksi B yang merupakan hasil terbaik dari kromatografi penukar ion dalam Tris HCl pH 8 dianalisis dengan SDS PAGE. Analisis SDS PAGE ini menggunakan dua jenis gel, yaitu *separating* dan *stacking gel*. *Separating gel* merupakan gel tempat pemisahan enzim berdasarkan berat molekulnya. Pada umumnya berada di bawah dari keseluruhan gel poliakrilamida, sedangkan *stacking gel* adalah gel tempat sampel sebelum terjadinya pemisahan enzim, pada umumnya berada di atas *separating gel*.

Selanjutnya piranti elektroforesis Wealtec (Meadowvale, USA) dipasang dan bufer elektroforesis dituang ke dalam bejana elektroforesis. Sebanyak 20 μ l sampel ditambah dengan 5 μ l loading bufer dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Untuk analisis SDS PAGE, sampel dipanaskan dengan penangas air mendidih selama 5 menit untuk menunjukkan aktivitasnya, sedangkan untuk analisis zimogram sampel tidak perlu dipanaskan. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam sumur *stacking gel* dan proses elektroforesis berlangsung selama kurang lebih 1,5 jam pada tegangan 115 volt. Pita protein akan tampak setelah direndam dalam larutan *staining* untuk memvisualisasikannya. Hasil visualisasi ini berwarna biru karena larutan *staining* ini mengandung *Coomassie Blue R-250*. Selanjutnya untuk mengetahui posisi enzim selulase target, gel poliakrilamida direndam dalam larutan *destaining* yang merupakan larutan penghilang warna pada matriks. Proses ini dilakukan sampai diperoleh pita-pita protein berwarna biru dengan latar belakang jernih (Kodorwich *et al*, 2006).

Elektroforesis protein dapat juga dilakukan dengan zimogram dan SDS-PAGE. Kedua teknik ini memiliki metode yang sama dalam persiapan *stacking gel*. Perbedaannya terletak pada pembuatan *separating gel*, pada zimogram perlu ditambahkan substrat dalam campuran polimerisasi gel, dan sampel protein tidak dipanaskan sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel. Selain itu, setelah proses *running* selesai, Adanya pita protein aktif selulase dapat dilihat dengan merendam gel dalam larutan *Congo red* 0,1% (Teather dan Wood, 1982) selama 30 menit pada suhu kamar dan dilanjutkan pencucian gel beberapa kali dengan larutan NaCl 1 M sampai terlihat pita protein dengan latar belakang merah bata.

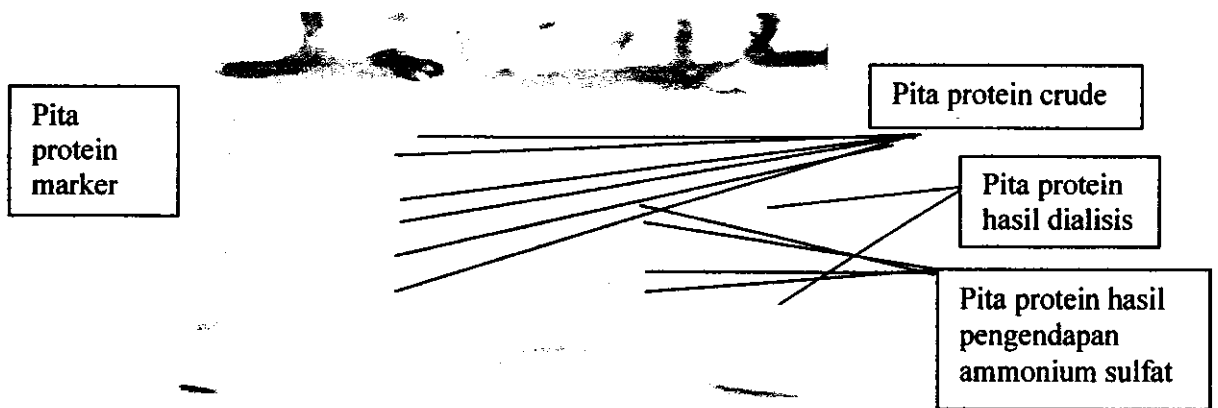
Pada penelitian ini, analisis zimogram bertujuan untuk mengetahui aktivitas protein di dalam gel. Dengan demikian melalui teknik zimogram dapat pula diketahui berat molekul suatu protein aktif. Pita bening dengan latar belakang merah bata menunjukkan adanya pita-pita protein aktif. Hasil analisis zimogram yang positif menunjukkan pita protein aktif selulolitik (gambar 11 dan 12), ini membuktikan bahwa enzim selulase dapat menghidrolisis substrat *Carboxymethyl cellulose*, dan ezim xilanase dapat menghidrolisis *Oat spelt xylan*.

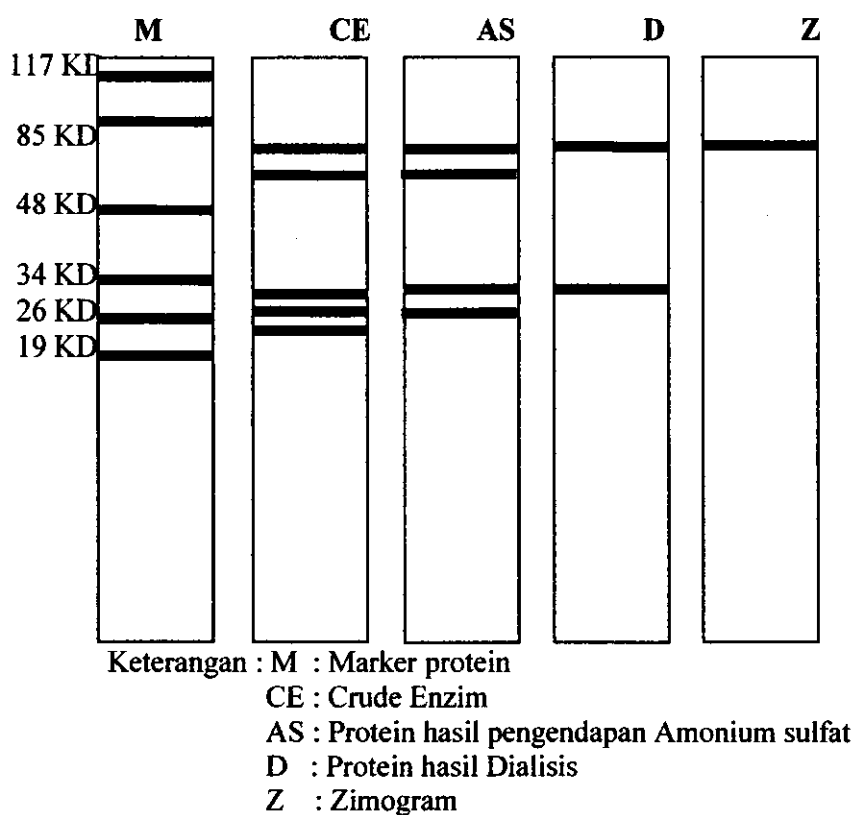




Keterangan : M : Marker protein
 CE : Crude Enzim
 AS : Protein hasil pengendapan Amonium sulfat
 D : Protein hasil Dialisis
 Z : Zimogram

Gambar 12. Gambar Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dan zimogram enzim selulase. Berdasarkan hasil perhitungan massa molekul relative hasil SDS-PAGE dan zimogram, diperoleh informasi bahwa enzim selulase memiliki massa molekul relative sebesar 49 KDa.





Gambar 12. Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dan zimogram enzim xilanase. Berdasarkan hasil perhitungan massa molekul relative hasil SDS-PAGE dan zimogram, diperoleh informasi bahwa enzim xilanase memiliki massa molekul relative sebesar 80 kDa.

Berdasarkan gambar 11 dan hasil perhitungan massa molekul relatif hasil SDS PAGE dan zimogram, diperoleh informasi bahwa enzim xilanase memiliki massa molekul relatif sebesar 80 kDa. Dari hasil massa molekul relatif dan uji aktivitas enzim selulase menggunakan berbagai substrat spesifik menunjukkan bahwa dalam isolat BR2 (*Actinobacillus sp*) memiliki kompleks enzim xilanase yaitu endoglukanase, eksoglukanase dan cellobiase. Hal ini sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa massa molekul relatif enzim selulase bervariasi

diantaranya Endoglukanase 12.500 - 90.000 Da, Eksoglukanase 41.800 – 65.000 Da dan Cellobiase 47.000 Da (Nevell dan Zeronian, 1985).

Berdasarkan gambar 12 dan hasil perhitungan massa molekul relatif hasil SDS PAGE dan zimogram, diperoleh informasi bahwa enzim selulase memiliki massa molekul relatif sebesar 49 kDa. Dari hasil massa molekul relatif dan uji aktivitas enzim selulase menggunakan berbagai substrat spesifik menunjukkan bahwa dalam isolat BR2 (*Actinobacillus sp*) memiliki kompleks enzim selulase yaitu β -1,4-endoxilase, asetil xilan esterase, β -xilosidase, α - glukuronidase dan α -L arabinofuranosidase. Hasil penelitian Cepeljnuk *et al* (2001) enzim β -1,4-endoxilase menunjukkan massa molekul relatif sebesar 58 kDa.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kelima isolat lignoselulolitik dipilih 1 isolat terpilih BR2 yang memiliki indeks halo masing-masing 1,5 cm dan 1,4 cm, aktivitas enzim selulase sebesar 0,28 U/ml dan aktivitas enzim xilanase tertinggi sebesar 22,63 U/ml, sehingga membuktikan bahwa isolat BR2 memiliki aktivitas positif terhadap selulase dan xilanase.
2. Karakterisasi dari enzim selulase dan xilanase yaitu masing-masing memiliki suhu optimum 45 dan 50⁰ C, pH optimum 6 dan 7, dan memiliki massa molekul relatif sekitar 49 kDa dan 80 kDa.
3. Tingkat kemurnian enzim selulase dan xilanase memiliki konsentrasi optimum amonium sulfat masing-masing sebesar 40 % dan 60 %. Tingkat kemurnian setelah diafiltrasi menggunakan substrat pNPG sebesar 8,01 kali, dan menggunakan substrat pNP-Asam asetat sebesar 49,90 kali.

5.2 Saran

1. Enzim lignoselulolitik dapat digunakan sebagai bahan biokatalis untuk mendegradasi pakan berserat kaya lignoselulosa.
2. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan percobaan *in vivo* untuk mengetahui produktivitas ternak ruminansia

DAFTAR PUSTAKA

- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi and W.Z. Yang. 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminant. *J. Anim. Sci.* 81 : E37 – E47.
- Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S., 2001, Microbial Xylanase from The Newly Isolated *Bacillus sp.* Strain BP-23, *Can J Microbial* 39 : 1162-1166.
- Beldman, G., S. Leeuwen, F. Rombouts and F. Voragen, 1985. The Cellulase of *Trichoderma viride*, Purification, Characterization and Comparison of all Detectable Endoglucanases, Exoglucanases and beta-glucosidases, *Eur J. Biochem* : 146-301.
- Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L., 2003, *Biochemistry, Fifth Edition*, United States of America. (189-221).
- Bollag, D.M. and E. Delstein, S.J., 1991. *Protein Methods* New York Willey-Liss.
- Bondi, A.A., 1987, *Animal Nutrition*, Wiley-Interscience Publication, London, 63.
- Champe, P.C and Richard, A. Harvey, 1994, *Biochemistry, Second Edition*, Lippincott Company, Philadelphia.
- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. 1992. *Hemicellulose and Hemicellulose*. Portland Press, London and Chapel Hill.
- Debche, T, Bliard C, Debire P, and O'Donohue MJ. 2002. Probing the Catalytically Essential Residues of the α -L-arabinofuranosidase from *Tremobacillus xylanolyticus*. *Protein Engineering* 15:21-28.
- Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of Hemicellulose: Aspect of Hemicellulose Production by *Tricoderma resei* QM 9414 and Enzymic Saccharification of Hemicellulose, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1127-1146.
- Dung, N.V., S. Vetayaasuporn., Y. Kamlo., N. Abe., J. Kaneko, and K. Izaki. 1993. Purification and Properties of β -1,4-xylanase 2 and 3 from *Aeromonas Caive* W-61. *J. Biosci. Biotech. Biochem* 57:1708-1712.
- Fessenden, R.j., 1982, *Kimia Organik, terjemahan, jilid 2*, Penerbit Erlangga, Jakarta.

- Harris, E.L.V. dan Angal, S., 1989, Protein Purification methods, Department of Biology, University of Essex Wivenhoe Park, Colchester, UK, p.10-11, p.18-19
- Henrissat, B. and A. Bairoch, 1996, Updating The Sequence Based Classification of Glycosyl Hydrolases, *Biochem J.* 316 : 695-696.
- 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.
- Kodorwich., Leslie, J.F., 2006, Zymogram and Preliminary Characterization of *Lactobacillus helveticus* Autolysins, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 61, No 9, 331-339.
- Kulkarni., A. Shendye, and M. Rao. 1999, Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases, *FEMs Microbial. Rev.* 23:411-456
- La Grange, D.C., Pretorius I.S., Glaeyssens M., Van Zhyl W.H. 2001. Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -xylosidase (XylO) and the *Trichoderma reesei* xylanase (Xyn 2) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5512-5519.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature (London)* 227 : 680-685.
- Lehninger, AL., 1982, Dasar – dasar Biokimia, jilid 1, (penerjemah : Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja), Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Li, L., L. Flora and K. King, 1965, Individual Roles of Cellulase Components Derived from *Trichoderma viride*, *Arch Biochem Biophys* 111 : 439.
- Lierra Guerra, J.E., E.Ibarra Lopez, L.E. Soto Angulo, J.J.R. Hernandez Moreno, J.L. Corrales Aguirre, J. Rodriguez Garcia, Y.L.A. Lopez Juarez. 2003. *Alfafa Ruminal Degradation Using Xylanases*. Montes Ureales 532, Fracc. Montebello, Culcan, Sinaloa, C.P. 80227. Mexico. *Isah.* p. 231-332.
- Liu, W., Zhu W., Liu Y., Kong Y., Ma G. 1998 Production Partial Purification and Characterization of Xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Proses Biochem* 33 : 331-326.
- Lowe S. E., Michael K., Theodorou, and Anthony P.J. Trinci. 1987. Cellulases and Xylanases of an Anaerobic Rumen Fungus Grown on Wheat Straw, Wheat Straw Holocellulose, Cellulose, and Xylan. *Applied and Environmental Microbiology*. p.1216-1223.

- Miller Gail Lorenz, 1960, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chem.*, 31 : 426-428.
- Mirmi L., R.S. Kusrieningrum., S.Chusniati. 2005. Inokulasi Bakteri Sellulolitik Pada Jerami Padi Sebagai Upaya Penyediaan Pakan Ternak Ruminansia. Proyek Due-Like Batch III Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mirmi L, N.N. Tri Puspaningsih, Widya Paramita L. 2006. Penggunaan Bakteri Xilanolitik Asal Rumen Sebagai Inokulum pada Jerami Padi sebagai Upaya peningkatan Mutu Pakan Ternak Ruminansia. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Nevell, T.P. and S.H. Zeronian, 1985, *Cellulose Chemistry and Its applications*. John Wiley & Sons, New York.
- Orskov, E.R. and Ryle. 1990. *Energy Nutrition in Ruminant*. Elsevier Application. Jhon Willey and Sons, New York.
- Ottaway, J.H.and Apps, D.K. 1984. *Biochemistry*. Edisi ke-4 Cambridge : ELBS.
- Owens, F.N. and A.L. Goestch. 1988. Ruminant Fermentation In : D.C. Church (Ed0, *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. A Reston Book Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. p. 145-171.
- Pelczar, M.J. and Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jil;id I. UI-Press, Jakarta.
- Puspaningsih, N.N.T. 2004. *Isolation and Characterization of β -Xylosidase and α -L-Arabinofurosidase from Bacillus thermoleovorans IT-08. Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utiliozation*. Mie University. Publihers Co., Ltd.
- Renganathan, V., Lyman, E.S., Li Bin., 1995, Purification and Characterization of a Cellulose-Binding β -Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol 61, No 8.
- Reilly, P.J., 1991. Xylanase: Structure and Function, In Hollander, A. (Ed). *Proceeding of A Symposium on Trend in Biotechnology of Fermentation for Fuels and Chemicals*. Plenum Press. New York.
- Ruiz-Arribas, A. J.M. Fernandez – abalos, P. Sanchez, A.L. Garda and R.I. Santamaria. 1995. Over Production, Purification and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys I) from *Streptomyces halstedii* JM8, *Appl and Environ Mocrrobiol*. 61 (6): 2414-2519.

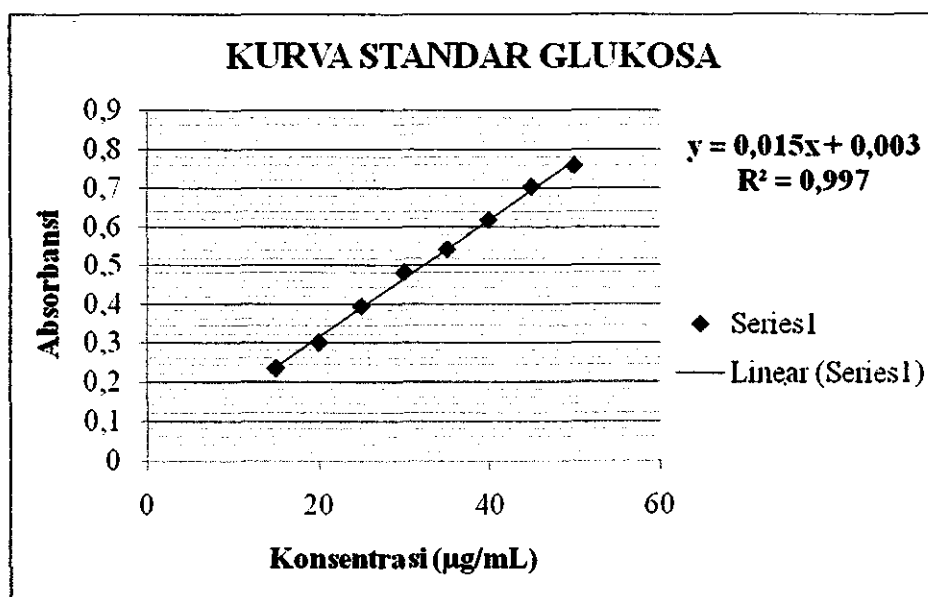
- Saha, B.C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 30: 279-291.
- Shallom, D., Belakhov V., Solomon D., Shoham G., Baasov T., Shoham Y. 2002. Detailed Kinetic Analysis and Identification of the Nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6, a Family 51 Glycoside Hydrolase, *J Biol Chem* 277: 436667-43673.
- Singleton, P., D. Sainsbury, 2001, Dictionary of Biology and Molecular Biology, 3th edition, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester west Sussex PO19 1UD, UK, 70-72, 679.
- Subramaniyan, S and P. Prema. 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology, Molecular Sunna, A., Gibbs M.D., Berququist P.L. 2000. A novel thermostable multidomain 1,4- β -xylanase from *Caldibacillus cellulovorans* and effect of its xylan-binding domain on enzyme activity, *Microbiol.* 146:29447-295
- Scopes, R.K., 1987, Protein Purification Principles and Practice, Edisi ke-2, New York : Springer Verlag.
- Spolestra, S.F., A. Steg and J.M. W. Beuvink. 1990. Application of Cell Wall Degrading Enzymes to Grass Silage. In : *Agricultural Biotechnology in Focus in The Netherlands*. J.J. Dekkers, H.C. van der Plas and D.H. Vuijk (Eds). Pudoc Wageningen p : 165-166.
- Stryer L, Tymoczko JL and Berg JM., 2002, Biochemistry, Fifth Edition, New York: WH Freeman
- Sunna, A., Gibbs M.D., Berququist P.L. 2000. A novel thermostable multidomain 1,4- β -xylanase from *Caldibacillus cellulovorans* and effect of its xylan-binding domain on enzyme activity, *Microbiol.* 146:29447-2955.
- Teather R and Wood P.J., 1982, Use of Red Polysaccharides Interaction in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from The Bovine Rumen, *Applied Environment Microbial*, 777-780.
- Thayer, D.W., 1978, Growth of Seeded Cellulolytic Enrichment Cultures on Mesquite Wood, *Applied Microbiology*, Vol. 36.
- Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, C.L., 2002, Microbiology An Introduction Media Update, Seventh Edition. Pearson Education, Inc : Benjamin Cummings. Pp : 114-119.

Lampiran 1. Pembuatan kurva standar glukosa

Larutan standar glukosa dibuat stok glukosa 1 mg/mL. Blanko yang digunakan adalah 200 μ L akuades dan 600 μ L DNS. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 550 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar glukosa adalah sebagai berikut :

Konsentrasi (μ g/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
15	0,2179	0,2457	0,2318
20	0,2936	0,301	0,2973
25	0,3789	0,4038	0,3914
30	0,4398	0,5225	0,4812
35	0,4995	0,5842	0,5419
40	0,578	0,6592	0,6186
45	0,6794	0,7284	0,7039
50	0,745	0,7711	0,7581

Dari hasil pengukuran absorbansi larutan standar glukosa dibuat kurva antara absorbansi vs konsentrasi sebagai berikut :



Lampiran 2. Penentuan aktivitas endo-1,4- β -D-glukanase dengan metode DNS

Persamaan regresi linear yang diperoleh adalah :

$$y = 0,015 x + 0,003$$

$$R^2 = 0,997$$

Contoh perhitungan aktivitas *crude extract* selulase adalah :

➤ Absorbansi produk (gula pereduksi) = $0,1687 - 0,1443 = 0,0244$

➤ Waktu inkubasi = 30 menit

➤ Berat molekul glukosa = 180

➤ Konsentrasi produk (gula pereduksi) :

$$y = 0,015 x + 0,003$$

$$0,0244 = 0,015 x + 0,003$$

$$x = 1,4267 \mu\text{g/mL}$$

➤ Aktivitas selulase = $\frac{\text{konsentrasi produk} \times \text{FP} \times 10}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM glukosa}}$

$$= \frac{1,4267 \times 1 \times 10}{30 \times 180}$$

$$= \frac{14,267}{5400}$$

$$= 2,64 \times 10^{-3} \text{ U/mL}$$

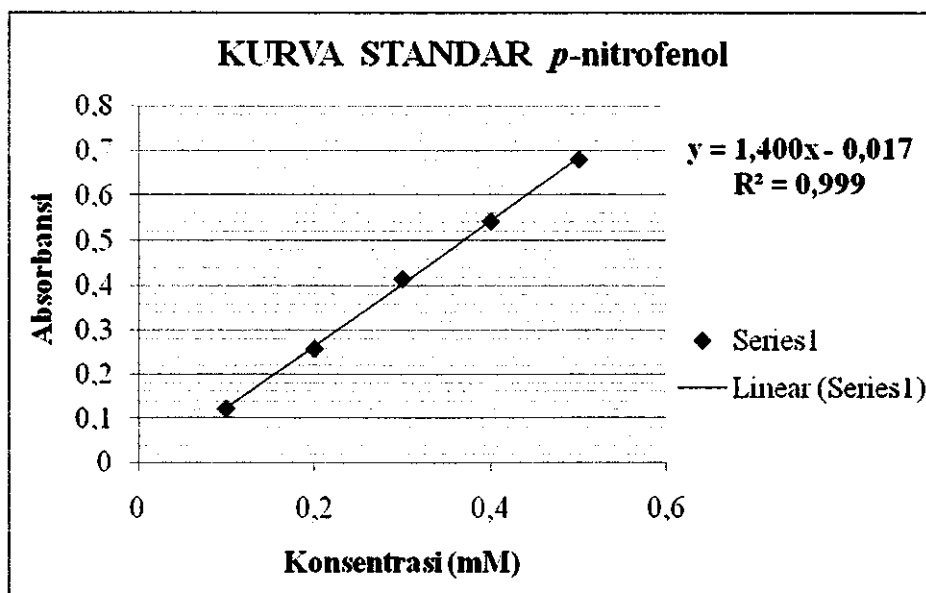
Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk $1 \mu\text{mol}$ produk per menit.

Lampiran 3. Pembuatan kurva standar *p*-nitrofenol

Larutan standar *p*-nitrofenol dibuat stok *p*-nitrofenol 10 mM. Blanko yang digunakan adalah 100 μ L akuades, 300 μ L buffer fosfat sitrat pH 7 dan reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na_2CO_3 . Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 405 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar *p*-nitrofenol adalah sebagai berikut :

Konsentrasi (mM)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
0,1	0,1489	0,0925	0,1207
0,2	0,3557	0,1589	0,2573
0,3	0,6104	0,2185	0,4145
0,4	0,7622	0,3211	0,5417
0,5	0,8779	0,4797	0,6788

Dari hasil pengukuran absorbansi larutan standar *p*-nitrofenol dibuat kurva antara absorbansi vs konsentrasi sebagai berikut :



Lampiran 4. Pengukuran aktivitas enzim selulase menggunakan substrat turunan *p*-nitrofenol

Persamaan regresi linear yang diperoleh adalah :

$$y = 1,400 x - 0,017$$

$$R^2 = 0,999$$

A. Contoh perhitungan *crude extract* enzim β -glukosidase

➤ Absorbansi *p*-nitrofenol = $0,1862 - 0,0227 = 0,1635$

➤ Waktu inkubasi = 30 menit

➤ Berat molekul *p*-nitrofenol = 139,11

➤ Konsentrasi produk *p*-nitrofenol :

$$y = 1,400 x - 0,017$$

$$0,1635 = 1,400 x - 0,017$$

$$x = 0,1289 \text{ mM}$$

➤ Aktivitas selulase = $\frac{\text{konsentrasi produk} \times \text{FP} \times 1000}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM } p\text{-nitrofenol}}$

$$\begin{aligned} &= \frac{0,1289 \times 1 \times 1000}{30 \times 139,11} \\ &= 0,0309 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

B. Contoh perhitungan *crude extract* enzim *exo-1,4-β-D*-glukanase

➤ Absorbansi *p*-nitrofenol = $0,1689 - 0,0227 = 0,1462$

➤ Waktu inkubasi = 30 menit

➤ Berat molekul *p*-nitrofenol = 139,11

➤ Konsentrasi produk *p*-nitrofenol :

$$y = 1,400 x - 0,017$$

$$0,1462 = 1,400 x - 0,017$$

$$x = 0,1166 \text{ mM}$$

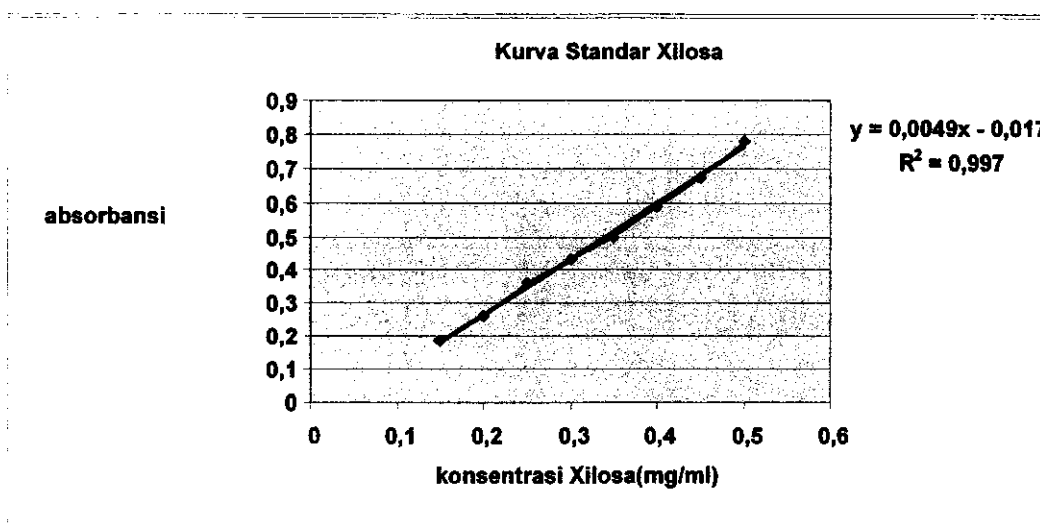
$$\begin{aligned} \text{Aktivitas selulase} &= \frac{\text{konsentrasi produk} \times \text{FP} \times 1000}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM } p\text{-nitrofenol}} \\ &= \frac{0,1166 \times 1 \times 1000}{30 \times 139,11} \\ &= 0,0279 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Pembuatan kurva standar xilosa

Dari hasil pengukuran absorbansi larutan standar dibuat grafik kurva standar absorbansi vs konsentrasi sebagai berikut :

Dari kurva standar standar xilosa diperoleh persamaan regresi linier

$$y = y = 0,0049x - 0,017 \quad R^2 = 0,997$$



Lampiran 6. Pembuatan reagen**Larutan buffer fosfat sitrat**

Larutan stok A asam sitrat 0,1 M dibuat dengan cara menimbang 1,921 gram asam sitrat lalu dilarutkan dengan akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas. Larutan stok B $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M dibuat dengan cara menimbang 5,365 gram lalu dilarutkan dengan akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas. Sebanyak X mL larutan A ditambah Y mL larutan B kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL.

X	Y	pH
24,3	25,7	5
17,9	32,1	6
6,5	43,6	7

Larutan buffer Tris-HCl

Larutan A Tris (hidroksimetil) aminometan 0,2 M dibuat dengan menimbang 2,42 gram lalu dilarutkan dengan akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas, sehingga didapatkan larutan bufer Tris. Sebanyak 50 mL bufer Tris ditambahkan dengan X mL HCl 0,2 M kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL.

X	pH
50	5
60,2	6
39,1	7
28,3	8
5	9

Larutan NaCl 0,5 M

Ditimbang sebanyak 2,925 gram NaCl kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades, kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas serta dikocok sampai homogen.

Larutan NaCl 1 M

Ditimbang sebanyak 5,85 gram NaCl kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades dalam beker gelas, kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas serta dikocok sampai homogen.

Larutan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Ditimbang sebanyak 1 gram NaOH dilarutkan dengan 60 mL akuades, ditambahkan 18,2 gram garam Rochelle, 1 gram asam dinitrosalisilat (ditambahkan perlahan-lahan sambil diaduk dengan stirrer magnetik hingga larut sempurna), 0,2 gram fenol dan 0,05 gram natrium sulfit. Lalu dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, dan diencerkan sampai tanda batas kemudian dikocok sampai homogen.

Substrat Carboxymethyl cellulose 1 %

Ditimbang sebanyak 1 gram *Carboxymethyl cellulose* dilarutkan dalam 100 mL bufer fosfat sitrat pH 7, kemudian disterilkan dengan *autoclave*.

Substrat *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosida (*p*NPG)

Ditimbang sebanyak 3,01 mg *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosida dilarutkan dengan sedikit bufer fosfat sitrat pH 7 dalam beker gelas, kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

Substrat *p*-nitrofenil-cellobiosida (*p*NPC)

Ditimbang sebanyak 4,63 mg *p*-nitrofenil-cellobiosida dilarutkan dengan sedikit bufer fosfat sitrat pH 7 dalam beker gelas, kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

Larutan Na₂CO₃ 1 M

Ditimbang sebanyak 1,06 gram Na₂CO₃ dilarutkan dengan sedikit aquades dalam beker gelas kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambah dengan aquades hingga tanda batas.

Larutan Tris HCl pH 6,8

Ditimbang sebanyak 12,1 gram tris, dilarutkan dalam 50 ml akuades, kemudian ditambah dengan HCl sampai pH-nya 6,8. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan Tris HCl pH 8,8

Ditimbang sebanyak 24,2 gram tris, dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian ditambah dengan HCl sampai pH-nya 8,8. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL. selanjutnya diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan SDS (w/v) 10%

Ditimbang sebanyak 1 gram SDS dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan 50% gliserol (v/v)

Dituang sebanyak 50 mL gliserol 100 % kemudian ditambahkan 50 mL akuades.

Larutan 1% bromophenol blue (w/v), 10 ml

Ditimbang sebanyak 100 mg bromophenol blue dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker. Kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

Larutan APS 10%

Ditimbang sebanyak 0,5 gram amonium persulfat kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuades.

Buffer elektroforesis pH 8,3

Ditimbang sebanyak 3 gram garam tris, 14,4 gram glisin, dan 1 gram SDS dilarutkan dengan akuades, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1000 mL. Diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen kemudian dicek pH-nya menggunakan pH-meter

Larutan staining, 1 liter

Ditimbang 1 gram *Coomassie Blue R-250*, ditambahkan 450 mL metanol, 450 mL akuades, serta 100 mL asam asetat glasial.

Larutan destaining, 1 liter

Dicampur 100 mL metanol, 100 mL asam asetat glasial, serta 800 mL akuades.

Larutan Congo red 0,1 %

Ditimbang sebanyak 0,1 gram *Congo red* dilarutkan dengan sedikit akuades dalam beker gelas kemudian dituang secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas.

Larutan Triton-X 100 2,5 %

Dicampurkan sebanyak 2,5 mL Triton-X 100 dengan 100 mL akuades dalam beker gelas kemudian dilarutkan dengan pengaduk *magnetic stirer*.

Larutan A

Ditimbang sebanyak 5,84 gram akrilamida (30% (b/v) akrilamida) dan 0,16 gram bis-akrilamida (0,8% (b/v) bis-akrilamida), kemudian dilarutkan dengan 20 mL akuades.

Larutan B

Dicampurkan sebanyak 7,5 mL bufer Tris HCl pH 8,8 kemudian 0,4 mL 10% SDS dan 2,1 mL akuades.

Larutan C

Dicampurkan sebanyak 5 mL bufer Tris HCl pH 6,8 kemudian 0,4 mL 10% SDS dan 4,6 mL akuades.

Komposisi gel Zimogram

No.	Reagen	<i>Separating gel 12 %</i>	<i>Stacking gel 5 %</i>
1.	<i>Solution A</i>	3 mL	0,335 mL
2.	<i>Solution B</i>	1,88 mL	-
3.	<i>Solution C</i>	-	0,5 mL
4.	ddH ₂ O : Substrat	1,1271 : 1,5029 (mL)	ddH ₂ O = 1,15 mL
5.	10% APS	37,5 µL	15 µL
6.	TEMED	3,75 µL	2,5 µL

Komposisi gel SDS PAGE

No.	Reagen	<i>Separating gel 12 %</i>	<i>Stacking gel 5 %</i>
1.	<i>Solution A</i>	3 mL	0,335 mL
2.	<i>Solution B</i>	1,88 mL	-
3.	<i>Solution C</i>	-	0,5 mL
4.	ddH ₂ O	2,63 mL	1,15 mL
5.	10% APS	37,5 µL	15 µL
6.	TEMED	3,75 µL	2,5 µL

Gram Negative Bacilli 24E - Oxidase Positive**Specimen Details****Sample ID:** Bakteri**Date:** 17/10/2009**Name:** Ibu Mirni**Sample Type:** Selulolitik**Customer/Department:** FKH Unair**Notes:****Test Results****Octal Code :** 400442100

+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
+ ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Table

	<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>V.alginolyticus</i>	<i>A.faecalis</i> type 11	<i>Px.fluorescens</i> -J5	<i>Moraxella</i> sp.
Preferred ID Choice	YES				
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	78,36%	15,50%	4,57%	1,08%	0,48%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes
1st Test Against	UR=99,9%	MOT=99,9%	ONP=0,1%	ONP=0,1%	ONP=0,1%
2nd Test Against	VP=0,1%	NIT=99,9%	VP=0,1%	VP=0,1%	VP=0,1%
3rd Test Against	MAL=5,0%	ONP=10,0%	SUC=0,1%	SUC=0,1%	SUC=0,1%
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Ferment of Glucose	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	0,1%
Oxidation of Glucose	0,1%	0,1%	0,1%	99,9%	0,1%
Growth in 0% NaCl	89,0%	0,1%	99,9%	99,0%	43,0%
Growth on SS Agar	0,1%	77,0%	78,0%	86,0%	0,1%
Growth in 6% NaCl	5,0%	99,9%	34,0%	43,0%	8,0%
Growth on Cetrimide	n/a	n/a	12,0%	80,0%	n/a
Comment Number			#1		

#1. Previously *A.faecalis*. Usually isolated from the environment