

## AKTIFITAS DAN SDS-PAGE XILANASE

Nazarudin

Universitas Kapuas Sintang, Jalan Oevang Oeray No. 92 Sintang

**Abstrak:** Sejumlah mikroorganisme mampu mendegradasi komponen dinding sel tumbuhan ini, melalui aksi berbagai glikosil hidrolase. Oligomer dan atau monomer yang dihasilkan digunakan oleh bakteri-bakteri tersebut sebagai sumber karbon dan energy. Mikroorganisme selulolitik mengeluarkan beberapa selulase, yang memotong ikatan  $\beta$ 1,4 glikosida yang menghubungkan unit-unit glukosa dalam rantai selulosa. Bakteri selulolitik tersebut seringkali menghasilkan enzim khusus seperti mananase, xilanase, lichenase, pektat-liase) yang menghidrolisis polisakarida nonselulosik yang berasosiasi dengan selulosa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul molekul dari enzim xilanase yang berasal dari isolate aktinomiset I dan II dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan Zimografi. Hasil SDS PAGE isolate II yang diendapkan dengan aseton menunjukkan pembentukan 3 pita protein dengan ukuran masing-masing yaitu 17,89 kDa, 13,85 kDa dan 9,68 kDa. Sedangkan EEK xilanase dari isolat I tampak terbentuk 1 pita dengan ukuran 9,2 kDa.. Analisis zimogram menunjukkan bahwa pita elektroforesis pada gel memiliki aktivitas xilanase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening. Kesimpulan penelitian ini berhasil menghasilkan 3 pita isolat II dan satu pita untuk isolat hasil SDS PAGE EEK xilanase kedua isolate aktinomiset tersebut memiliki berat molekul yang rendah (9-18 kDa).

Kata kunci: aktifitas enzim, SDS PAGE, xilanase, Zimogram

Dinding sel tumbuhan umumnya tersusun atas kompleks agregasi polisakarida yaitu selulosa, hemiselulosa (xilan, manan, glukomanan,  $\beta$ (1,3-1,4) D- glukon, laminarin), dan Pectin. Meskipun sulit untuk di degradasi, beberapa mikroorganisme mampu untuk mendegradasi polisakarida sebagai sumber energi dan karbon. Hemiselulosa merupakan fraksi polisakarida cukup berlimpah pada tumbuhan tingkat tinggi, memiliki berat molekul yang relative rendah dibanding polimer penyusun dinding sel tumbuhan lainnya (selulosa dan lignin) (Puls and Schuseil, 1993; Timell, 1967 dalam Dworkin *et al.*, 2001).

Polimer struktural yang paling umum ditemukan pada hemiselulosa adalah  $\beta$ -1,4-xilan. Xilan merupakan molekul kompleks yang tersusun atas rantai xilosa dengan ikatan  $\beta$ -1,4- yang bercabang yang mengandung arabinosa dan 4-O-asam metal glukoronat. Enzim yang berperan dalam hidrolisis senyawa xilan adalah enzim xilanase (1,4- $\beta$ -

d-xilan xilanohidrolase; EC. 3.2.1.87) (Kansoh dan Nagieb, 2004). Enzim xilanase mendegradasi xilan dengan jalan menghidrolisis ikatan 1,4- $\beta$ -d-xilopiranosil pada xilan (Bayer *et al.*, 2006 dalam Dworkin *et al.*, 2006). Menurut Meryandini *et. al.* (2008) Xilanase mikroba memiliki aplikasi yang luas. Selain itu enzim xilanase digunakan untuk *biobleaching* (pemutih) pada industri kertas (Kansoh dan Nagieb, 2004). Salah satu metode pemisahan protein berdasarkan perbedaan ukuran adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis*). SDS-PAGE pertama kali diperkenalkan pada tahun 1967 oleh Saphiro *et al.* dan telah menjadi metode elektroforesis poliakrilamid paling populer.

Zimografi merupakan metode deteksi enzim spesifik pada pita protein yang dipisahkan melalui elektroforesis. Zimografi dilakukan seperti halnya SDS-PAGE namun dengan mengikutsertakan substrat enzim

dalam elektroforesis. Metode ini menggunakan prinsip reaksi spesifik enzim untuk menghasilkan warna untuk mengungkap posisi enzim pada pita elektroforesis (Dennison, 2002). Mendeteksi adanya aktivitas enzim penghidrolisis polisakarida, zimogram dapat diwarnai dengan pewarna merah kongo (*Congo Red*).

Pewarna merah kongo adalah sejenis garam sodium yang larut dalam air dan menghasilkan warna merah dalam larutan. Kelarutannya lebih baik dalam pelarut organik seperti etanol. Setelah pewarnaan, daerah digesti akan tampak sebagai pita yang bening dengan latar belakang yang terwarnai merah. Pita bening menunjukkan bahwa substrat dalam gel telah terdegradasi oleh enzim. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul molekul dari enzim xilanase yang berasal dari isolate aktinomiset I dan II dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Dan Zimografi.

## METODE PENELITIAN

### Preparasi Enzim Xilanase Ekstra Kasar

Peparasi Isolat menggunakan metode Meryandini *et. al.* (2008) aktinomiset I dan II ditumbuhkan pada media cair xilan dengan komposisi 0,5 g xylan, 10,3 g sukrosa, dan 1 g yeast ekstrak untuk 100 ml media. Kultur tersebut dinkubasikan pada suhu ruang dalam inkubator bergoyang (150 rpm). Enzim ekstrak kasar dari masing-masing isolate dipanen. Isolat I dipanen pada hari ke-8 sedangkan isolat II dipanen pada hari ke-5. Enzim ekstrak kasar dipanen dengan cara mensentrifugasikan kultur pada kecepatan 2800 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan diendapkan.

### Pengendapan Protein Enzim Xilanase Ekstrak Kasar

Pengendapan protein dari enzim ekstrak kasar dilakukan dengan penambahan aseton menurut Scopes (1987). Enzim xilanase ekstrak kasar sebanyak 10 ml dari masing-masing isolate diendapkan dengan aseton dingin (yang disimpan pada suhu -20°C) dengan volume sebagai berikut:

Tabel 1 Konsentrasi aseton v/v

Isolat	Konsentrasi aseton % v/v	Jumlah aseton (ml)
I	80	40,00
II	90	90,00

Selanjutnya campuran di atas diaduk dengan perlahan dengan pengaduk magnetik selama 15 menit (kecepatan 20 rpm dalam kondisi dingin) dan kemudian disimpan dalam lemari es selama semalam. Setelah semalam, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Enzim yang terendapkan dilarutkan dalam buffer.

### Pembuatan SDS PAGE dan Zimogram

Pembuatan Gel Pemisah SDS-PAGE dan zimogram: Komposisi SDS-PAGE

dengan konsentrasi 10%. Larutan A (Larutan Polyarilamid) 10% 3,3 ml Larutan B (Larutan Buffer tris) 2,5 ml. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 10% 50µl. APS (Amonium Peroksida Sulfat) 50 µl. TEMED 5µl. Komposisi Zymogram dengan konsentrasi 10%. Larutan A (Larutan Polyackrilamid) 10% 3,3ml. Larutan B (Larutan Buffer tris) 2,5 ml. Larutan C (Larutan substrat xylan) = 0,08 g + ddH<sub>2</sub>O 4,17 ml. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 10% 50 µl. APS (Amonium Peroksida Sulfat) 50µl. TEMED 5 µl.

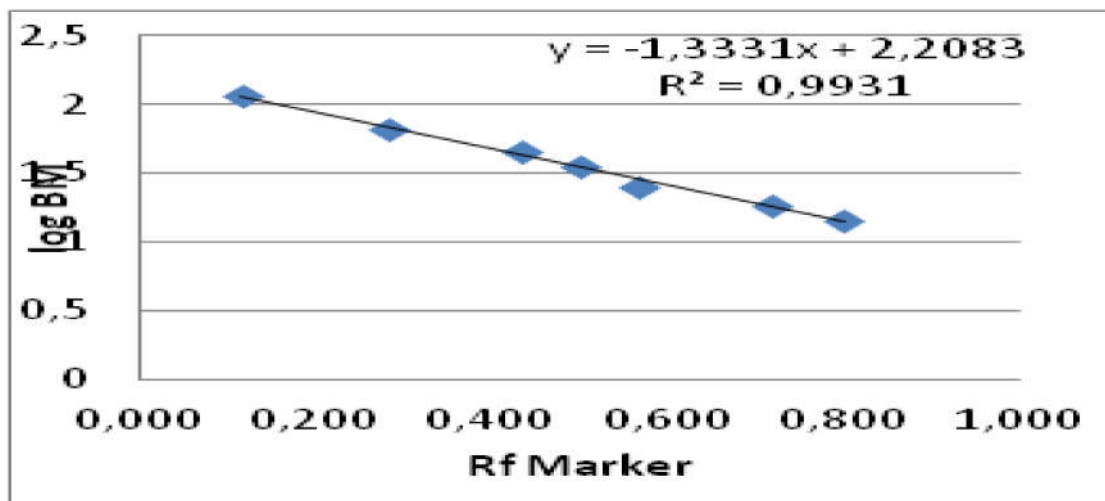
### Silver Staining untuk SDS-PAGE

Setelah gel dirunning, kemudian direndam dalam larutan fiksasi (Metanol 50% (10 ml asam asetat dan 20 ml aquades) minimal selama 2 jam/ semalam sambil diagitasi (goyang pelan). Kemudian dibilas/ dicuci dengan ddH<sub>2</sub>O (d-ionize) selama 10 detik sebanyak 1 kali. Setelah itu Dimasukan ke dalam washing solution yang mengandung 20% etanol untuk mencuci SDS-PAGE yang maasih tersisa. Pencucian ini dilakukan tanpa agitasi selama 20 menit sebanyak 3 kali. Dicuci dengan ddH<sub>2</sub>O selama 10 detik sebanyak 1 kali. Selanjutnya direndam dalam larutan agitasi 1 menit (*sensitize gel*, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,05 g dalam 250 ml dan dicuci lagi dengan ddH<sub>2</sub>O selama 20 detik sebanyak 3 kali. Diwarnai dengan perak nitrat (silver) 0,1% (0,1 g dalam 100 ml aquades) selama 20 menit, kemudian disimpan pada suhu 4°C Dicuci kembali dengan ddH<sub>2</sub>O selama 20 menit sebanyak 2 kali, dipindahkan tempatnya dan dicuci lagi selama 10 mneit sebanyak 1 kali maka terjadi developing (pemunculan pita)

dengan melakukan proses developing yang terdiri dari 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ditambah 0,05% formalin ditambah 0,0004% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hingga pewarnaan cukup kemudian terlihat proteinnya. Ketika protein sudah terlihat maka ditambah dengan larutan stop solution, direndam selama 5 menit. Kemudian terakhir dicuci kembali dengan ddH<sub>2</sub>O selama 5 menit, setelah itu di scanning dan di foto.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

SDS-PAGE merupakan metode yang digunakan secara luas untuk analisis qualitative campuran protein. Metode ini biasanya digunakan untuk memantau purifikasi protein dan karena metode ini didasarkan pada pemisahan protein berdasarkan ukuran, maka dapat pula digunakan untuk menentukan berat molekul relative suatu protein. Untuk menentukan berat molekul dari protein yang belum diketahui ukurannya, mobilitas relatif (Rf) dari protein standar (marker) diukur dan diplotkan dengan logMW (logaritma beart molekulnya) sehingga diperoleh kurva dengan persamaan regresi linear (Walker, 2002).



Gambar 1 Kurva Standar Protein

Berdasarkan hasil SDS PAGE, Enzim ekstrak kasar (EEK) xilanase dari isolate II yang diendapkan dengan aseton menunjukkan pembentukan 3 pita protein dengan ukuran masing-masing yaitu 17,89 kDa, 13,85 kDa dan 9,68 kDa. Sedangkan EEK

xilanase dari isolate I tampak terbentuk 1 pita dengan ukuran 9,2 kDa. Dari hasil SDS PAGE tersebut dapat diketahui bahwa EEK xilanase kedua isolate aktinomiset tersebut memiliki berat molekul yang rendah (9-18 kDa).



Gambar 2 Hasil SDS PAGE Enzim Xilanase Ekstrak Kasar

Sebelum dilakukan SDS-PAGE dan zimogram, terlebih dahulu dilakukan pengendapan terhadap protein yang terkandung dalam enzim xilanase ekstrak kasar. Pengendapan xilanase dilakukan dengan penambahan pelarut organik aseton menurut Scopes (1987). Prinsip pengendapan dengan aseton yaitu penghilangan mantel air pada permukaan molekul protein, sehingga sesama molekul protein akan saling beragregasi dan akhirnya mengendap.

Gel poliakrilamid (PAG) memiliki sifat khusus yang menjadikannya medium yang baik untuk pemisahan protein. Gel ini merupakan gel sintetik yang termostabil, kuat, dan dapat dengan mudah diatur ukuran porinya berdasarkan konsentrasi poliakrilamidnya (%T). Material gel ini tahan dalam gradient bertegangan tinggi dan dapat diwarnai dengan beberapa pewarnaan. Metode SDS PAGE yang digunakan dalam percobaan ini adalah metode *discontinuity electrophoresis*. Metode elektroforesis diskontinyu yang umum digunakan adalah metode yang dikembangkan oleh Laemmli (1970). Metode ini terbukti dapat secara signifikan meningkatkan ketajaman pita hasil elektroforesis. Dalam teknik ini digunakan dua lapis gel yaitu gel pengumpul (*stacking gel*) dan gel pemisah (*resolving gel*).

Selama elektroforesis pada gel pengumpul, gradient ion terbentuk dalam tahap awal elektroforesis yang menyebabkan semua protein berfokus memebntuk pada satu pita tunggal yang tajam. Hal ini dapat terjadi karena daerah gel pengumpul memiliki pori yang besar sehingga matriks gel tidak menghambat migrasi selama pemfokusan atau proses pengumpulan (*stacking*). Sedangkan pada gel pemisah yang memiliki pori yang lebih rapat, kumpulan protein yang terselubungi SDS akan terpisah akibat adanya efek saringan pada gel pemisah (*resolving gel*) yang terletak pada bagian bawah gel pengumpul. Untuk pewarnaan, hasil SDS-PAGE dilakukan dengan pewarnaan perak nitrat (*silver staining*). Pewarnaan *silver* ini lebih sensitive dibandingkan dengan pewarnaan dengan Coomassie Brilliant Blue (50 kali lebih kuat daripada CBB).

Ketika campuran protein dan SDS dipanaskan pada 100°C, deterjen SDS akan membungkus kerangka polipeptida. SDS berikatan dengan polipeptida dalam rasio massa yang konstan yaitu 1,4 g/g polipeptida. Dalam proses ini muatan intrinsic polipeptida akan tertutupi oleh muatan negative dari SDS. Sehingga setelah perlakuan ini struktur polipeptida menjadi seperti batang yang memiliki densitas muatan yang seragam (muatan negative yang sama per satuan

panjang). Akibatnya protein akan memiliki rasio massa dan muatan yang sama sehingga protein-protein dengan berat molekul yang sama/mirip dapat bermigrasi dengan kecepatan yang relative sama. Mobilitas protein ini adalah fungsi linear terhadap logaritma berat molekulnya.

Beberapa pereaksi yang digunakan dalam SDS PAGE memiliki fungsi yang penting. Amonium Persulfat (APS) dan Tetrametiletildiamin (TEMED) berfungsi sebagai inisiator polimerisasi gel poliakrilamid. Bisakrilamid merupakan agen *crosslinking* yang paling umum digunakan bagi gel poliakrilamid. Secara kimiawi senyawa ini tersusun dari dua molekul akrilamid yang

saling berpasangan pada ujung non reaktifnya. Merkuptoetanol berfungsi mereduksi jembatan disulfide pada struktur tersier protein dan memecahkan struktur sub unit oligomer pada struktur kuarternen protein (enzim).

### Zimogram

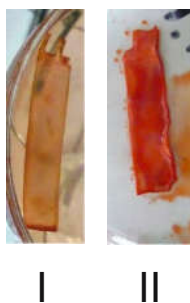
Prinsip zimogram pada dasarnya mirip dengan SDS-PAGE, namun tujuan utama dari zimografi adalah untuk mendeteksi enzim spesifik pada pita protein yang dipisahkan melalui elektroforesis. Deteksi enzim spesifik pada pita elektroforesis dimungkinkan karena dalam elektroforesis zimogram, substrat diikutsertakan sehingga akan terpolimerisasi dalam gel poliakrilamid.



Gambar 3 Pewarnaan kongo red pada zimogram

Hasil zimogram pada gambar 4, zona bening lebih nyata teramati pada hasil zimogram EEK dari isolate I. Pada isolate II terdapat pula zona bening pada zimogram namun tidak terlalu jelas. Adanya zona bening

pada zimogram menunjukkan bahwa pita protein yang membentuk zona tersebut memiliki aktivitas enzim xilanase yang dapat menghidrolisis substrat xilan pada gel menjadi gula sederhana yaitu xilosa.



Gambar 4 Zimogram EEK Xilanase dari isolate I dan II

Pewarnaan yang digunakan dalam percobaan zimogram ini adalah pewarnaan dengan zat warna merah Kongo (Congo red). Pewarna merah kongo merupakan sejenis pewarna amiloid yang akan memberi warna merah jika berikatan dengan polisakarida. Gel terwarnai dengan warna merah karena gel mengandung substrat xilan yang merupakan sejenis polisakarida. Ketika ada pita protein (enzim) hasil elektroforesis yang memiliki aktivitas hidrolisis terhadap xilan, maka polisakarida xilan akan terdegradasi menjadi monomer-monomer xilosa. Xilosa merupakan gula sederhana (bukan polisakarida) yang tidak berikatan dengan zat warna merah Kongo, sehingga terbentuknya xilosa di sekitar pita protein membuat daerah tersebut berwarna bening.

Pada zimogram, merkaptotanol yang dapat mendenaturasi struktur tersier dan

kuarterner enzim tidak diikutsertakan, sebab zimogram bertujuan untuk melihat aktivitas enzimatik dari pita hasil elektroforesis. Demikian pula perlakuan pemanasan tidak diberikan, karena dapat mendenaturasi protein yang ingin dilihat aktivitas enzimatknya.

## KESIMPULAN

Enzim xilanase ekstrak kasar hasil presipitasi aseton dari isolate aktinomiset II memiliki 3 pita SDS-PAGE masing-masing dengan ukuran 17,89 kDa, 13,85 kDa dan 9,68 kDa. Enzim xilanase ekstrak kasar hasil presipitasi aseton dari isolate aktinomiset I menunjukkan 1 pita SDS-PAGE dengan ukuran 9,2 kDa. Analisis zimogram menunjukkan bahwa pita elektroforesis pada gel memiliki aktivitas xilanase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening.

## DAFTAR PUSTAKA

- Dennison C. 2002. *A Guide to Protein Isolation*. Kluwer Academic Publishers. New York.
- Duffaud GD, McCutchen CM, Leduc P, Parker KN, Kelly RM. 1997. *Purification and Characterization of Extremely Thermostable  $\beta$ -Mannanase,  $\beta$ -mannosidase, and  $\alpha$ -Galactosidase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068*. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 63, No. 1. Hal. 169-177.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Editor. 2001. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology Bacteria Volume II*. Springer-Verlag. Newyork
- Jackson ME, Fodge DW, Hsiao HY. 1999. *Effects of beta-mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance*. *Poult. Sci.*, Dec 1999; 78: 1737 - 1741.
- Kanti A. 2005. Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. Biodiversitas Vol. 6. No. 2, Hal. 85-89.
- Meryandini A. Widhyastuti N. Lestari Y. 2008. *Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8*. Makara, Sains, Volume 12, NO. 2 : 55-60
- Miller GL, 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry Vol. 31 No. 3, Hal. 426-428.
- Moreira LRS, Filho EXF. 2008. *An Overview of Mannan Structure and Mannan-Degrading Enzyme Systems*. Mini Review Appl Microbiol Biotechnol. Vol 79 Hal: 165-178.

Richana N, Irawadi TT, Nur A, Syamsu K.  
2008. *Isolasi Identifikasi Bakteri  
Penghasil Xilanase serta  
Karakterisasi Enzimnya*. Jurnal  
Agrobiogen Vol 2 No. 1. Hal: 24-34.

Walker JM. Editor. 2002. *The Protein  
Protocols Handbook*. Edisi Ke-2.  
Humana Press Inc. New Jersey

Wu G, Bryant MM, Voitle RA, Roland Sr DA.  
2005. **Effects of beta-mannanase in  
corn-soy diets on commercial  
leghorns in second-cycle hens**  
**Poult. Sci.**, Jun 2005; 84: 894 - 897.