

TEKNIK ZYMOGRAM DAN APLIKASINYA DALAM RISET ENZIM

Ekowati Chasanah^{*)}

ABSTRAK

Teknik *zymogram* merupakan pengembangan dari teknik elektroforesis yang di dalam gel elektroforesis disisipkan substrat sehingga protein/enzim yang telah dipisahkan sekaligus dapat dipelajari kemampuannya dalam mendegradasi substrat tersebut. Teknik elektroforesis sendiri merupakan teknik yang biasa digunakan dalam bidang biokimia untuk memisahkan campuran yang berisi biomolekul seperti enzim sehingga enzim yang ada akan terpisah berdasarkan muatan dan berat molekulnya. Teknik *zymogram* telah luas digunakan, diantaranya untuk deteksi jenis-jenis enzim yang disekresikan oleh mikroba dan mempelajari karakteristiknya. Dengan semakin berkembangannya peran protein/enzim dalam berbagai bidang kesehatan, teknik *zymogram* semakin populer dan diperluas aplikasinya.

ABSTRACT: *The zymogram technique and its application in enzyme research. By: Ekowati Chasanah*

A zymogram technique is a development technique of electrophoresis in which a substrate is incorporated into the electrophoresis gel to separate protein/enzyme and to analyze the capability of the enzyme to degrade the substrate. An electrophoresis technique is a common technique in biochemistry to separate a mixture containing biomolecules based on their charges and molecular weights. A zymogram technique has been widely used to detect the class and characteristic of the enzymes secreted by microbes. Increasing role of protein/enzyme in various application including health service and drug discovery, the zymogram technique nowadays is even more popular and extensively used.

KEYWORDS: *zymogram, enzyme detection, electrophoresis*

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis penting yang aplikasinya sangat luas dalam industri pangan, pertanian, dan kesehatan. Pemenuhan keperluan enzim untuk industri semakin meningkat, sehingga eksplorasi enzim terus dilakukan secara intensif. Untuk itu, teknik deteksi enzim yang sederhana tetapi dapat digunakan secara luas sangat diperlukan. Di antara teknik yang dikembangkan, teknik *zymogram* merupakan teknik yang dapat digunakan untuk mendeteksi satu atau lebih jenis enzim secara bersamaan dengan menggunakan gel elektroforesis. Dalam *drug discovery*, teknik *zymogram* juga diaplikasikan untuk menapis enzim target dari isomernya yang biasanya berada dalam konsentrasi rendah di dalam campuran kompleks. Karena itu, metode *zymogram* untuk deteksi enzim dan piranti teknik untuk mempelajari karakter dan aplikasinya semakin berkembang pesat.

Zymogram adalah deteksi aktifitas enzim dengan menggunakan teknik elektroforesis yang di dalam gelnya terkandung substrat enzim target. Teknik ini telah lama digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim dan aktifitasnya, terutama enzim yang termasuk dalam golongan hidrolase, secara kualitatif.

Beberapa laporan menyebutkan bahwa teknik *zymogram* telah digunakan secara luas untuk mendeteksi enzim protease di gel elektroforesis (Seung-Ho *et al.*, 1998a; Seung-Ho *et al.*, 1998b; Nack-Shick *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2006), gelatinase (Kleiner & Stetlerstevenson, 1994) dan keratinase (Korkmaz *et al.*, 2003). Deteksi enzim xilanase (Rawashdeh *et al.*, 2005; Hong-Ge *et al.*, 2006), pektin esterase, dan poligalakturonase (Szecsi, 1990) telah dikembangkan baik untuk deteksi secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Aplikasi *zymogram* untuk mendeteksi enzim pendegradasi kitin termasuk kitinase dan kitosanase telah dilaporkan oleh Grenier & Asselin (1990), Grenier (1997), Yuli (2004), dan Chasanah & Suhartono (2005) dengan menggunakan berbagai substrat turunan kitin. Teknik tersebut secara cepat dapat mengidentifikasi jenis enzim yang dikeluarkan oleh suatu mikroorganisme baik menggunakan 1 gel elektroforesis ataupun 2 gel elektroforesis, yang dikenal dengan teknik *overlay* (Chasanah & Suhartono, 2005) untuk mengatasi masalah penggunaan substrat yang bersifat tidak larut air ataupun mendeteksi jenis enzim dalam satu campuran enzim secara bersamaan (Choi *et al.*, 2004).

Metode *zymogram* didasarkan pada pemisahan protein pada Gel Elektroforesis baik dengan

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

Poliakrilamid Gel Elektroforesis (*native* PAGE) maupun Sodium Dodesil Sulfat Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). Apabila dalam teknik *zymogram* pemisahan protein/enzim menggunakan SDS-PAGE yang di dalam preparasi sampelnya ada perlakuan yang menyebabkan protein terdenaturasi seperti penambahan SDS (sodium dodesil sulfat), β -merkaptotanol, dan perlakuan pemanasan, maka perlakuan ini harus diminimalkan agar struktur enzim masih dapat dipertahankan dalam struktur tiga dimensinya. Ketika kondisi yang menyebabkan denaturasi protein/enzim terjadi, maka tahap penghilangan denaturasi harus dilakukan. Aktivitas enzim selanjutnya akan dideteksi sebagai zona bening pada gel melalui pewarnaan tertentu, tergantung dari jenis enzim dan sifat substrat dalam gel elektroforesis. Dalam tulisan ini akan diulas teknik *zymogram* dengan studi kasus pada enzim pendegradasi kitin (kitinolitik).

TEKNIK ELEKTROFORESIS

Elektroforesis merupakan salah satu metode penting yang digunakan untuk pemisahan molekul biologi, karena dengan teknik tersebut struktur biomolekul/biopolimer tetap dapat dipertahankan struktur *native*-nya. Selain itu, teknik ini sangat sensitif terhadap perubahan kecil masa dan muatan (*charge*) sehingga sangat efektif untuk proses pemisahan biomolekul/biopolimer. Cara kerja elektroforesis adalah berdasarkan pergerakan molekul yang berbeda muatan dalam medan listrik. Pergerakan/mobilitas molekul selanjutnya merupakan fungsi dari ukuran, bentuk, dan muatan (Robyt & White, 1987). Untuk mengestimasi berat molekul protein/enzim dilakukan teknik elektroforesis SDS-PAGE. Dalam teknik SDS-PAGE, protein atau enzim dipisahkan dalam kondisi terdenaturasi dengan penambahan detergen SDS yang memiliki sifat polar dan nonpolar. Bagian hidrofobik SDS akan mengikat bagian hidrofobik protein/enzim yang ada di daerah dalam dan bagian polar yang bermuatan negatif akan terpapar di bagian luar. Akibatnya, protein/enzim akan dipisahkan berdasarkan unitnya dan diluruskan akibat struktur sekundernya yang terganggu. Penambahan β -merkaptotanol atau 1,4-ditiotreitol yang biasanya juga dilakukan, bertujuan untuk memecah protein menjadi sub unit terkecilnya. Karena itu, dalam SDS-PAGE, unit-unit protein/enzim akan bermuatan sama, yaitu negatif, sehingga molekul bergerak hanya didasarkan pada perbedaan berat molekul. Unit protein dengan berat molekul rendah akan bergerak lebih cepat dibanding unit protein/enzim yang memiliki berat molekul lebih tinggi. Selain SDS-PAGE, elektroforesis secara *native* juga dikembangkan untuk mengetahui protein/enzim dalam bentuk *native*-nya.

Jika SDS-PAGE mengidentifikasi enzim dalam bentuk unitnya, maka *native* PAGE mengidentifikasi protein/enzim secara utuh.

TEKNIK ZYMOGRAM

Teknik *zymogram* menggunakan prinsip pemisahan biomolekul berdasarkan elektroforesis baik SDS-PAGE ataupun *native* PAGE, dengan menambahkan substrat ke dalam gel pemisah. Kondisi yang menyebabkan protein/enzim terdenaturasi harus diminimalkan, sedemikian sehingga struktur tiga dimensi atau struktur *native*-nya dapat dipulihkan sehingga enzim dapat aktif kembali (renaturasi). Penambahan β -merkaptotanol atau 1,4-ditiotreitol dan perlakuan pemanasan biasanya dihindarkan. Detergen SDS, yang merupakan komponen pada bufer sampel gel elektroforesis, akan dihilangkan dengan proses renaturasi setelah proses pemisahan/elektroforesis selesai. Renaturasi ini dilakukan dengan cara merendam dan mengganti bufer yang ada pada gel elektroforesis sehingga SDS yang ada dalam gel elektroforesis dapat dihilangkan. Bufer renaturasi yang digunakan akan berbeda untuk setiap jenis enzim, demikian juga kondisi optimal proses renaturasi tersebut. Untuk enzim golongan protease, bufer renaturasi yang digunakan adalah Triton X-100 (Kleiner & Stetlerstevenson, 1994; Seung-Ho *et al.*, 1998a; Seung-Ho *et al.*, 1998b; Nack-Shick *et al.*, 2001; Korkmaz *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2006). Selanjutnya, enzim yang telah dipulihkan strukturnya dan menjadi aktif, diinkubasi pada lingkungan optimalnya (dalam bufer dengan pH dan suhu inkubasi yang sesuai untuk enzim) sehingga enzim mampu mendegradasi substrat dalam gel tersebut. Aktivitas enzim dalam gel akan divisualisasi sebagai zona bening sebagai hasil degradasi enzim pada substrat dalam gel dengan pewarnaan tertentu, misalnya dengan *commasie blue* untuk enzim protease dan *congo red* untuk enzim pendegradasi kitin (Kleiner & Stetlerstevenson, 1994; Seung-Ho *et al.*, 1998a; Seung-Ho *et al.*, 1998b; Nack-Shick *et al.*, 2001; Korkmaz *et al.*, 2003; Yuli, 2004; Chasanah & Suhartono, 2005; Choi *et al.*, 2006)

PENGGUNAAN ZYMOGRAM DALAM MEMPELAJARI ENZIM PENDEGRADASI KITIN: STUDI KASUS ENZIM KITOSANASE

Kitin merupakan polimer terbesar kedua yang tersedia di alam setelah selulosa. Di alam, enzim pendegradasi kitin sangat berperan untuk proses daur ulang. Di antara enzim-enzim pendegradasi kitin, enzim kitinase dan kitosanase merupakan jenis enzim pendegradasi kitin yang banyak dipelajari. Keduanya memiliki kemampuan untuk memotong ikatan β -1,4-

glikosida pada rantai kitin untuk kitinase dan kitosan untuk kitosanase. Kitinase (EC 3.2.1.14) akan menghasilkan monomer *N-acetylglucosamine* (GlcNAc), sedangkan kitosanase (EC 3.2.1.132) akan menghasilkan monomer *N-glucosamine* (Gooday, 1990). Perbedaan antara kitin dan kitosan adalah pada posisi atom C kedua monomernya yang diisi oleh gugus *acetylamino* untuk kitin (Gambar 1.) yang akan digantikan oleh gugus amina pada polimer kitosan setelah proses penghilangan asetil pada gugus tersebut. Namun demikian, di alam tidak pernah dijumpai ketersediaan kitosan dengan kondisi atom C ke-2 berupa 100% gugus amina, tetapi berupa campuran gugus amina dan asetilamina. Dikatakan bahwa apabila komposisi gugus amina pada atom C ke-2 berjumlah 70% atau lebih maka polimer tersebut sudah dikatakan kitosan (Hirano, 1997).

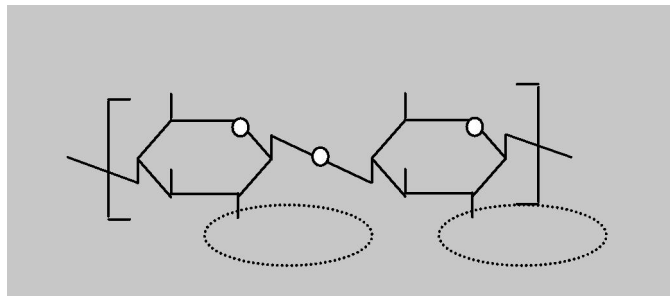
Enzim kitosanase menjadi perhatian selama dekade terakhir ini dengan dilaporkannya aktivitas biologis dari potongan kitosan (kitosan oligomer) yang penting untuk bidang kesehatan dan pangan (Guo-Jane *et al.*, 2000; Sagoo *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004; Chasanah & Suhartono, 2005). Pemotongan secara enzimatis akan menghasilkan produk potongan (oligomer) kitosan yang bersifat spesifik, aman dari bahan kimia sehingga aman untuk dikonsumsi, dan tidak menghasilkan limbah yang berbahaya. Oligomer kitosan memperlihatkan aktivitas mereduksi kolesterol plasma dan mencegah penyakit hati pada penderita kecanduan alkohol, sedangkan oligomer kitosan dengan rantai pendek yaitu tetramer (rantai 4 unit monomer) memperlihatkan sifat sebagai antibakteri (Guo-Jane *et al.*, 2000; Sagoo *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004). Oligomer yang memiliki rantai 2–8 unit monomer memperlihatkan aktivitas anti kapang beberapa *patogen* tanaman (Hirano & Nagao, 1989). Semakin tinggi derajat deasetilasinya (semakin sedikit gugus asetilamino) maka semakin bagus aktivitas biologisnya. Untuk itu, diperlukan enzim kitosanase sebagai bio katalis yang dapat memotong kitosan dengan derajat deasetilasi tinggi dan memotong secara spesifik.

Kemampuan kitosanase dalam memecah kitosan dengan derajat deasetilase 100% dan ketidakmampuan kitinase dalam memecah substrat tersebut membuat teknik *zymogram* dapat digunakan untuk menapis enzim kitosanase melalui perbedaan kemampuan ini. Substrat untuk enzim kitosanase yaitu kitosan memiliki kemampuan kelarutan terbatas pada kondisi elektroforesis, yaitu hanya larut pada pH rendah. Kitosan hanya larut dalam asam lemah seperti asam asetat, sehingga akan menimbulkan masalah (menjadi tidak larut) ketika diaplikasikan ke dalam gel elektroforesis yang memiliki pH 8,8. Karena itu, teknik *overlay* telah dikembangkan untuk mengatasi masalah ini dengan memodifikasi teknik yang telah ada (Chasanah & Suhartono, 2005).

DETEKSI ENZIM KITOSANASE MENGGUNAKAN 2 GEL ATAU OVERLAY

Protokol *zymogram* untuk mendeteksi enzim kitosanase secara *overlay* telah dikembangkan oleh Chasanah & Suhartono (2005), sebagai berikut:

- Pada teknik ini, enzim kitosanase dipisahkan berdasarkan sub unitnya di dalam SDS-PAGE tanpa pendenaturasi β -merkaptotanol atau 1,4-ditiotreitol dan tanpa dipanaskan.
- Selesai proses pemisahan pada SDS-PAGE, protein/enzim pada gel di *renaturasi* dengan cara merendam gel elektroforesis dalam bufer penghilang SDS yang berisi 0,4 M Tris-HCl, 0,02% sodium azida, 2 mM EDTA, 1% kasein (pH 9) selama 2 jam (4 x 30 menit). Setelah itu perendaman dilakukan dalam bufer sodium asetat 0,1 M (pH 4,8) selama 2 x 20 menit, dan dilanjutkan dalam 25% 2-propanol selama 15 menit.
- Setelah proses renaturasi, gel dicuci dengan akuabides yang dilanjutkan dengan pencucian dalam bufer fosfat 0,05 M (pH 6,0). Selanjutnya enzim dalam gel siap bekerja untuk memecah substrat.
- Pemisahan protein/enzim juga dapat secara *native* PAGE, dan ketika digunakan teknik ini maka proses renaturasi dapat dihilangkan.



- Gel yang berisi substrat dibuat dengan komposisi hasil modifikasi dari Grenier *et al.* (1997) yaitu 0,1% substrat kitosan larut dalam asam asetat (1%), 0,1 M (pH 6,0) bufer fosfat 5,0 mL, akuabides 2,3 mL, akrilamid 30% (w/v) sebanyak 2,5 mL dan 0,8% (w/v) BIS, 0,02 mL TEMED, dan 0,1 mL 10% (w/v) amonium persulfat yang dicampur sampai homogen. Campuran tersebut dicetak dalam *plate* elektroforesis sampai padat/beku.

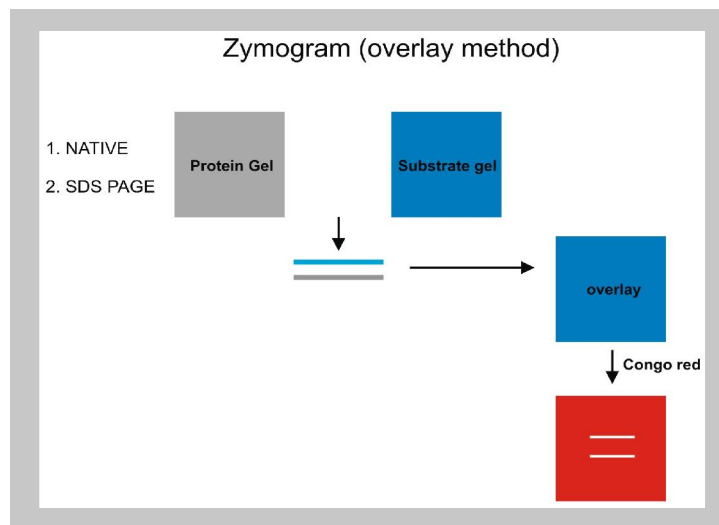
- Selanjutnya, gel substrat ditumpuk (*overlay*) pada gel PAGE (Gambar 2).

- Inkubasi dilakukan pada kondisi optimal kerja enzim, dalam hal ini suhu 55°C pada kondisi lembab (gel dibungkus tisu yang dibasahi dengan bufer protein/enzim). Untuk kitosanase dari *B. licheniformis* MB-2, waktu inkubasi optimum adalah 2 jam.

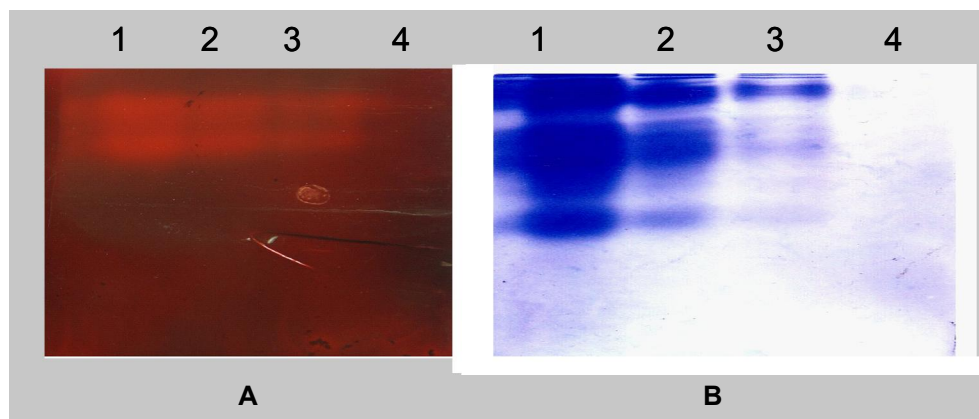
- Pewarnaan dilakukan dengan memindahkan gel substrat pada larutan 1% *congo red* selama 20 menit, diikuti dengan merendam dalam larutan 1 M NaCl selama 5–10 menit.

- Tahap akhir adalah fiksasi gel tersebut dalam larutan asam asetat selama 1 menit. Zona bening dengan latar belakang merah bata menandakan adanya aktivitas enzim kitosanase pada gel tersebut.

Gambar 3 memperlihatkan hasil *zymogram* enzim kitosanase *B. licheniformis* MB-2. Pada percobaan tersebut, ekstrak kasar enzim (20 µL) diaplikasikan dalam SDS-PAGE, menggunakan 10% gel akrilamid. Setelah proses renaturasi, gel substrat ditumpuk pada gel protein/enzim dan diinkubasikan pada suhu 55°C selama 2 jam. Gel protein diwarnai dengan *Coomassie blue* B, dan gel substrat diwarnai dengan larutan 0,1% *congo red* A. Gambar 3B memperlihatkan pita protein/enzim yang menghasilkan aktivitas pada gel substrat (Gambar 3A). Kode 1 adalah sampel yang dikeringbekukan (*freeze dried*), kode 2 adalah hasil dialisis setelah pemekatan dengan amonium sulfat, kode 3 adalah pemekatan amonium sulfat (80% *saturation*) dan 4 adalah enzim kasar (*broth*). Kadar protein sampel adalah 1,425 mg/mL (sampel yang dikeringbekukan); 4,374 mg/mL (hasil pemekatan amonium



Gambar 2. Teknik *overlay* pada deteksi enzim kitosanase.



Gambar 3. Deteksi enzim ekstrak kasar kitosanase *Bacillus licheniformis* MB-2.

sulfat); 0,642 mg/mL (dialisis); dan 0,211 mg/mL (ekstrak kasar). Deteksi enzim menggunakan sistem *overlay* ini memerlukan jumlah/konsentrasi enzim yang lebih besar yaitu 0,003 U per sumur (Chasanah & Suhartono, 2005) dibanding penggunaan 1 gel yang berisi substrat sekaligus. Hal ini dapat dimengerti karena enzim harus memecah substrat pada gel terpisah. Percobaan pada *zymogram* enzim kitinase yang menggunakan 1 gel (enzim dan substrat dalam 1 gel elektroforesis) menghasilkan konsentrasi minimal sebesar 0,0009 U atau 0,059 U/mg/mL per sumur (Situmorang, 2003).

Pada Gambar 4, enzim kitosanase yang digunakan adalah enzim murni dengan aktivitas enzim yang dimasukkan dalam sumur elektroforesis sebesar berturut-turut 0,33 U (baris 1); 0,033 U (baris 2); 0,011 U (baris 3); 0,0033 U (baris 4); dan 0,00033 U (baris 5). Dari gambar ini dapat dilihat bahwa zona bening (pada gambar terlihat putih) dapat dideteksi pada baris 1–4. Konsentrasi terkecil enzim yang mampu membentuk zona adalah sebesar 0,0033 U (baris 4).

APLIKASI TEKNIK ZYMOGRAM UNTUK DETEKSI ENZIM LAIN

a) Deteksi Enzim Proteolitik Pendegradasi Kasein, Gelatin, Kolagen, Fibrin, dan Keratin

Zymogram enzim proteolitik pendegradasi kasein, gelatin, kolagen, fibrin, dan keratin disiapkan dengan menggunakan substrat 1% kasein, 1% gelatin, fibrinogen (0,12%, w/v) dan 100 µl trombin (10 NIH unit/ml). Setelah elektroforesis pada 10 miliAmper (mA) secara konstan, gel diinkubasi selama 30 menit dalam larutan buffer 50 mM Tris (pH 7,4), yang berisi 2,5% Triton X-100. Setelah dicuci dengan *akuades* selama 30 menit yang ditujukan untuk menghilangkan Triton X-100, gel diinkubasi dalam bufer *zymogram* yang berisi 30 mM

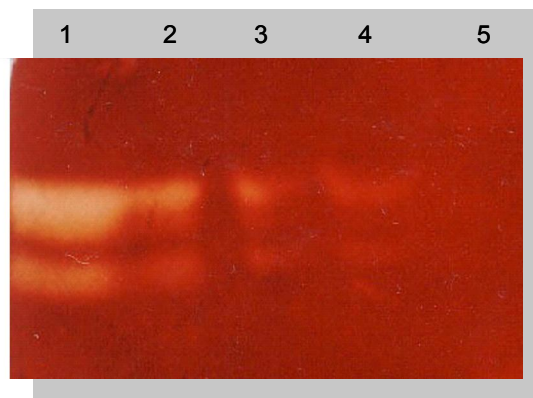
Tris (pH 7,4) dan NaN_3 pada 37°C selama 12 jam. Gel kemudian diwarnai dengan *Coomassie blue* selama 1 jam dan di *destaining*. Zona bening aktivitas enzim akan terlihat dengan latar belakang warna biru (Choi *et al.*, 2001; Korkmaz *et al.*, 2003).

b) Deteksi Enzim Xilanase

Substrat yang digunakan adalah xylan (0,1%). Setelah selesai SDS-PAGE, maka gel dicuci 4 kali selama 30 menit dalam 100 mM buffer fosfat (pH 7,0), yang berisi 25% (v/v) isopropil alkohol (2x yang pertama), yang ditujukan untuk menghilangkan SDS dan merenaturasi protein dalam gel. Gel kemudian diinkubasi selama 20 menit pada kondisi optimal enzim yang dilanjutkan dengan merendam gel ke dalam larutan *congo red* selama 5 menit pada suhu kamar. Pencucian dilakukan dalam larutan 1 M NaCl sampai kelebihan pewarnaan diminimalkan dari zona bening enzim aktif. Tahap akhir, fiksasi dilakukan dengan merendam gel dalam larutan 0,5% asam asetat. *Background* akan berubah menjadi biru gelap disekitar zona bening menandakan aktivitas xilanase (Rawasdeh *et al.*, 2005; Hong-Ge *et al.*, 2006).

c) Deteksi Autolisin

Pada *zymogram*, substrat yang digunakan adalah sel *Micrococcus luteus* dan yang diamati adalah kemampuan *melisis*. Pemisahan protein yang dapat memecah sel *M. luteus* dilakukan pada 14% gel akrilamid dengan voltase konstan 180 volt. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam akuades selama 30 menit, suhu kamar, dan selanjutnya gel dipindahkan pada *buffer* renaturasi yang terdiri dari campuran 50mM Tris-HCl pH 8 yang berisi 1% Triton X-100. Renaturasi dilakukan pada suhu 40°C dengan penggoyangan supaya homogen, selama 2 jam. Aktifitas autolisin akan nampak sebagai garis yang bening dengan latar belakang keruh. Kontras akan



Gambar 4. *Zymogram* metode *overlay* dengan sampel enzim kitosanase murni konsentrasi 0,33 U (baris 1); 0,033 U (baris 2); 0,011 U (baris 3); 0,0033 U (baris 4); dan 0,00033 U (baris 5).

diperoleh apabila gel diwarnai dengan 0,1% (w/v) *methylene blue* dalam 0,01% (w/v) potasium hidroksida (Velcome & Lortal, 1995)

PERKEMBANGAN MUTAKHIR TEKNIK ZYMOGRAM

Teknik *zymogram* yang melibatkan 2 tahapan proses yaitu pemisahan protein/enzim dan deteksi aktivitas enzim telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi enzim dan mempelajari karakter enzim seperti ketahanan suhu, pH, penambahan *additives* seperti detergen, berbagai garam, serta pengaruhnya terhadap aktivitas enzim. Pada perkembangannya, teknik ini juga dapat digunakan untuk membuat peta protein/enzim dan fungsinya apabila dipadukan dengan teknik lain seperti teknik elektroforesis 2 dimensi (2-D) sehingga akan memberikan informasi yang sangat lengkap seperti titik isoelektrik dan berat molekul protein/enzim serta responnya terhadap berbagai substrat. Titik isoelektrik protein/enzim akan diperoleh setelah protein/enzim di-*running* ke dalam *Isoelectric Focusing*, di mana protein/enzim akan dipisahkan dalam gel elektroforesis yang memiliki gradien pH berbeda. Protein/enzim yang telah terpisah tersebut akan di-*running* dalam SDS-PAGE, yang akan menghasilkan pemisahan protein sesuai dengan berat molekulnya. Penambahan informasi seperti kemampuan protein/enzim dalam mendegradasi substrat akan semakin menambah informasi peta protein/enzim yang dihasilkan. Melalui pematangan dengan enzim tripsin maka protein/enzim yang memiliki aktifitas tertentu berdasarkan substratnya akan dapat dilihat pola peptidanya dengan *MALDI-TOF mass spectrometric analysis*. Data yang diperoleh berupa susunan/urutan asam amino ini akan dievaluasi menggunakan data dasar ExPasy pada <http://prospector.ucsf.edu/>, sehingga data protein/enzim yang diteliti dapat dibandingkan dengan *data base* protein/enzim yang telah diidentifikasi sebelumnya. Dari data ini dapat diperoleh peran dan aplikasi ke depan protein/enzim yang diteliti apabila protein/enzim tersebut telah ada di *database*. Apabila belum ada di *database*, maka protein/enzim yang diteliti adalah baru, yang dapat dilanjutkan dengan riset yang lebih mendalam.

PENUTUP

Teknik *zymogram* yang awalnya digunakan sebagai salah satu alat untuk mendeteksi keberadaan enzim secara kualitatif, saat ini telah banyak dikembangkan untuk studi protein/enzim secara kuantitatif. Teknik ini merupakan teknik yang relatif sederhana yang dapat digunakan dan dikembangkan untuk melengkapi studi protein/enzim secara

menyeluruh. Kombinasi teknik ini dengan berbagai teknik elektroforesis seperti penggunaan elektroforesis yang memiliki gradien pH pada gelnya atau yang dikenal sebagai *Isoelectric Focusing* dan elektroforesis 2-dimensi akan menghasilkan peta protein/enzim yang lebih lengkap sehingga informasi fungsi, aplikasi dan kebaruan protein/enzim yang diteliti segera dapat diketahui. *Zymogram* juga dapat diaplikasikan untuk mengetahui kemampuan lisis dari autolisin dengan menggunakan substrat mikroba.

Dalam teknik *zymogram* ini yang perlu diperhatikan adalah jenis substrat yang tepat, bufer renaturasi dan prosesnya termasuk optimasinya, serta pewarnaan untuk visualisasi hasil *zymogram*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chasanah, E. and Suhartono, M.T. 2005. A Direct Screening of Heat Stable Chitosanase by Zymographic Method. *National Seminar on Ligno-cellulose Biomass Proceeding*. UNAIR, Surabaya.
- Choi, Nack-Shick, Dong-Min Chung, Chung Hun Ryu1, Kab-Seog Yoon Pil Jae Maeng, and Seung-Ho Kim. 2006. Identification of Three Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* KCTC 3014. *J. Microbiol. Biotechnol* 16 (3), p.457–464.
- Choi, Nack-Shick, Yoo Ki-Hyun, Yoon Kab-Seog, Maeng P.J., And Kim Seung-Ho. 2004. Nano-scale proteomics approach using two-dimensional fibrin zymography combined with fluorescent SYPRO ruby dye. *J. Biochem and Mol Biol* 37 (3): p. 298–303.
- Choi, Nack-Shick. and Seung-Ho, Kim. 2001. The effect of sodium chloride on the serine-type fibrinolytic enzymes and the thermostability of extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4.J. *Biochem and Mol Biol* 34 (2): 134–138.
- Chung Y.C., Su Y.P., Chen C.C., Jia, G., Wang Hl., Wu JCG., and Lin J.G. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25: 932–936.
- Gooday, G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan from Ratledge C, (ed.). *Biochemistry of Microbial Degradation*. Netherlands: Kluwer Academic Publ. p. 279–12.
- Grenier J. and Asselin A. 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 3 (6): p. 401–407.
- Grenier J., Trudel J., and Asselin, A. 1997. Gel electrophoretic analysis of chitinase, chitosanase and chitin deacetylase. *Chitin Handbook*. Edited by Muzzarelli RAA. and Peter MG. Atec, Grottammare, Italy.
- Guo-Jane T., Yuon W.Z., and Huey S.W. 2000. Antibacterial activity of chitooligosaccharide mixture prepared by cellulose digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Protection*. 63 (6): 747–752.

- Hirano, S. and Nagao, N. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric Biol Chem* 53:3065-3066
- Hirano, S. 1997. *Application of Chitin and Chitosan In Ecological and Environmental Fields*. In Application of chitin and chitosan, (ed.) Goosen MFA. Technomic Pub. Co. Inc, Lancaster, Basil.
- Hong-Ge Chen, Xin Yan, Xin-Yu Liu, Ming-Dao Wang, Hui-Min Huang, Xin-Cheng, Jia, and Jin-An Wang. 2006. Purification and Characterization of Novel Bi-functional Xylanase, XynIII, Isolated from *Aspergillus niger* A-25. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16(7): p. 1132–1138.
- Kleiner DE, Stetlerstevenson W.G. 1994. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Anal Biochem* 218 (2): p. 325–329
- Korkmaz1 H., Ünalı MN. Aslan B., Coral G., Arikın B., Diynçer B., and Çolak O. 2003. Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Annals Microbiol.* 53: p. 85–93.
- Nack-Shick C., Kab-Seog Y., Jin-Young L., Kyoung-Yoen H., and seung-Ho Kim. 2001. Comparison of three substrates (casein, fibrin and gelatin) in zymogram gel. *J. Biochem Mol. Biol.* 34 (6): p. 531–536.
- Rawashdeh R., Ismail, S., and Amjad, M. 2005. Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Afric J of Biotechnol.* 4 (3), p. 251–255.
- Robyt J.F. and White B.J. 1987. *Biochemical Techniques: Theory And Practice*. Waveland Press. Inc.407
- Seung-Ho K. and Nack-Shick C. 1998a. A direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. *Anal Biochem* 263, p.115–116.
- Seung-Ho K. and Nack-Shick C. 1998b. Electrophoresis analysis of protease inhibitors in fibrin zymography. *Anal Biochem.* 270, 179–181.
- Situmorang, S.H. 2003. *Karakterisasi Enzim Kitinase Termostabil Isolate B. Licheniformis Mb-2 Dari Tompaso, Sulawesi Utara Menggunakan Teknik Zymogram*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pangan, IPB, Bogor.
- Sagoo S., Board R., Roller S. 2002. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiol* 19: 175–182.
- Szecsı , A. 1990. Analysis of Pectic Enzyme Zymograms of *Fusarium* species I. *Fusarium lateritium* and Related Species. *J of Phytopatholog* 128 (1): p.75–83.
- Valence, F., and Lortal, S. 1995. Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. *Appl. Env. Microb* 61 (9): 3391–3399
- Yuli, P.E., Suhartono MT., Rukayadi Y., Hwang J.K., and Pyun Y.R., 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp.13.26, *Enzyme Microb Technol*, 35: 147–153.