

## Uji Aktivitas Enzim Xylanase Ekstraselular dan Intraselular Bakteri Endofitik Tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr.

SHIRLY KUMALA<sup>1\*</sup>, WIBOWO MANGUNWARDYO<sup>2</sup>, DIAH DETHRIAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila  
Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

<sup>2</sup>Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia, Kampus UI Depok

Diterima 20 Maret 2006, Disetujui 23 Juni 2006

**Abstract:** Assay for xylanase enzyme activity of endophytic bacteria from *Brucea javanica* (L.) Merr. has been carried out. Parts of the plants used in this study were stem, leave and fruit. Samples were collected from Bogor, Cianjur and Tawangmangu. To evaluate the enzyme activity the fungi were shake-fermented for 14 days. The supernatant were used to examine the extracellular enzyme and biomass for intracellular enzyme, using DNS methode to test the activity of enzyme. The results showed that from ten isolates only four isolates produced xylanase enzyme. Isolate 2.3.1 and 2.3.6 produced extra and intracellular enzyme, while isolate 2.1.15 and 2.3.13 only produced extracellular xylanase enzyme.

**Key words:** fermentation, xylanase, endophytic, *Brucea javanica* (L.) Merr.

### PENDAHULUAN

Enzim merupakan senyawa yang diperlukan makhluk hidup, merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis reaksi kimia pada sel makhluk hidup<sup>(1)</sup>.

Enzim dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan di industri. Konsumsi enzim untuk keperluan industri di Indonesia masih harus diimpor dari luar negeri dalam jumlah yang sangat besar. Hal ini akan memerlukan biaya yang sangat besar sehingga perlu dicari alternatif lain untuk dapat memenuhi ketersediaan enzim di dalam negeri yaitu dengan menggunakan enzim yang diperoleh dari hasil fermentasi mikroba<sup>(2)</sup>.

Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraselular dan intraselular. Ekstraksi enzim intraselular memerlukan proses perusakan sel dan volume yang didapatkan lebih kecil daripada ekstraksi enzim ekstraselular<sup>(2)</sup>. Produksi enzim dari mikroba lebih menguntungkan karena biayanya relatif lebih murah, cepat, dan mudah dikontrol pada tingkat produksi yang tinggi<sup>(3)</sup>.

Ketersediaan enzim di dalam negeri perlu diatasi, Indonesia sebagai salah satu negara yang memiliki hutan hujan tropis terbesar di dunia amat potensial

sebagai sumber mikroba yang bermanfaat.

Kehidupan mikroorganisme di alam semesta sangatlah luas dan banyak, dan hampir di semua bagian bumi ini terdapat mikroba<sup>(4)</sup>. Jutaan bahkan milyaran jenis mikroba yang ada baru sebagian kecil yang diisolasi dan dimanfaatkan oleh manusia. Salah satu jenis mikroba yang hidup di dalam jaringan hidup tanaman dikenal sebagai mikroba endofitik. Mikroba endofitik merupakan mikroba yang seluruh atau sebagian hidupnya berada di dalam jaringan hidup tanaman inang. Hubungan yang terjadi adalah simbiosis mutualistik. Mikroba endofitik tidak membahayakan tanaman yang ditumpangi tetapi justru memberi banyak keuntungan pada tanaman inangnya, antara lain membantu meningkatkan pertumbuhan tanaman inang, tahan terhadap kekeringan dan gangguan serangan hama.

Sedangkan tanaman inang hanya memberikan kebutuhan nutrisi mikroba endofitik<sup>(5)</sup>. Secara umum metabolisme mikroba menghasilkan metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer merupakan kebutuhan pokok untuk hidup dan tumbuh sedangkan metabolit sekunder bukan merupakan kebutuhan pokok mikroba untuk hidup dan tumbuh<sup>(5)</sup>.

Penelitian terhadap tanaman yang potensial untuk mendapatkan mikroba endofitik perlu dikembangkan. Salah satu di antaranya yaitu tanaman buah makassar (*Brucea javanica* (L.) Merr.). Mikroba endofitik yang diisolasi dari tanaman

\* Penulis korespondensi, Hp.08129026821,  
e-mail: fskumala@yahoo.com

ini diharapkan dapat menghasilkan metabolit sekunder enzim, yang dapat dimanfaatkan oleh industri kertas. Penggunaan enzim xilanase dalam industri kertas sebagai pemutih sangat diharapkan karena dapat mengurangi pemakaian klorin yang dapat mencemarkan lingkungan<sup>(6)</sup>. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim xilanase ekstraselular dan intraselular bakteri endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr.

#### BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Isolat bakteri endofitik dari tanaman buah Makassar (*Brucea javanica* (L.) Merr.), yang diperoleh dari daerah Bogor, Cianjur dan Tawangmangu. Mueller Hinton broth (MHB) (Oxoid), Nutrien Agar (NA) (Oxoid), xilan (Sigma, Beech Wood), dinitro salisilat (DNS) (Sigma, Beech Wood), xilosa (Fluka), dan standar 0,5 Mc. Farland.

**METODE. Isolasi dan seleksi bakteri endofitik.** Isolasi dilakukan dengan metode sterilisasi permukaan dan tanam langsung<sup>(7,8)</sup>. Pengamatan morfologi bakteri endofitik dilakukan secara makroskopik berdasarkan kriteria: warna koloni, tepi koloni, permukaan koloni bakteri. Selain itu juga dilakukan pengamatan secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram.

**Produksi enzim dengan fermentasi goyang.** Isolat bakteri endofitik yang berumur 24 jam yang telah ditumbuhkan di Nutrien Agar disuspensikan pada 5 ml Mueller Hinton broth, kekeruhannya disetarakan dengan suspensi standar 0,5 Mc. Farland<sup>(9)</sup>. Setelah itu diambil 1,0 ml, dimasukkan dalam Erlenmeyer 50,0 ml yang berisi 9 ml medium fermentasi F4 untuk kemudian dilakukan fermentasi goyang. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama tiga hari dengan kecepatan shaker 170 rpm. Supernatan dipisahkan dari biomassa dengan sentrifugasi berkecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Biomassa dan supernatan dari hasil sentrifugasi digunakan untuk pengujian aktivitas enzim.

**Pemecahan sel.** Untuk mendapat enzim intraselular, biomassa yang didapatkan dari hasil fermentasi dipecah dengan menggunakan glass bead. Perbandingan volume glass bead dengan biomassa adalah 50% dengan larutan dapar fosfat 0,04 M kemudian di homogenkan selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm.

**Pengujian aktivitas enzim xilanase.** Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode DNS (dinitro salisilat). Untuk penetapan panjang gelombang serapan maksimum xilosa, dibuat larutan stok xilosa 1 mg/ml. Dari larutan stok xilosa, dipipet 0,5 ml kemudian diinkubasi pada suhu 48°C selama

10 menit, setelah itu ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS, dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, ditambahkan air suling hingga 50,0 ml. Setelah itu serapan diukur pada  $\lambda$  300-600 nm.

**Pembuatan kurva baku xilosa.** Kurva baku dibuat dengan konsentrasi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml. Masing-masing konsentrasi diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS, dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, lalu ditambahkan air suling hingga 50,0 ml. Setelah itu serapan diukur pada  $\lambda$  371,5 nm.

**Uji aktivitas enzim xilanase.** Sebanyak 0,5 ml supernatan enzim ditambah dengan 0,5 ml larutan xilan 1% (b/v) dan diinkubasi pada 48°C selama 10 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 1,0 ml. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Ditambahkan air suling hingga 50,0 ml, setelah itu diukur pada  $\lambda$  371,5 nm.

Untuk memperoleh konsentrasi sampel maka serapan larutan sampel dikonversikan pada kurva baku xilosa sehingga didapat konsentrasi sampel. Kontrol didapat dengan metode sama tetapi penambahan supernatan dilakukan setelah terlebih dahulu dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Serapan larutan kontrol kemudian dikonversikan pada kurva baku xilosa sehingga diperoleh konsentrasi kontrol.

Aktivitas xilanase didapatkan berdasarkan mikromol xilosa yang dihasilkan permenit dan dapat dihitung dengan rumus:

Aktivitas enzim (U/ml) =

$$\frac{\{ [S] - [K] \} \times 1000 \times \text{Faktor pengencer}}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM Xilosa}}$$

Keterangan :

[ S ]: konsentrasi sampel, [ K ]: konsentrasi kontrol, faktor pengenceran untuk bakteri: 200, waktu inkubasi: 10 menit, bobot molekul xilosa: 150,13, U: unit.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi bakteri endofitik secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram menunjukkan bahwa dari 10 isolat bakteri endofitik, 5 di antaranya termasuk Gram positif dan 5 lainnya termasuk Gram negatif. Enam isolat bakteri endofitik mempunyai bentuk sel basil sedangkan empat bakteri endofitik lainnya mempunyai bentuk sel kokus (Tabel 1).

Secara umum medium fermentasi untuk memproduksi metabolit sekunder mengandung sumber

**Tabel 1. Isolat bakteri endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. dan ciri-ciri morfologi**

No	Kode Isolat	Ciri - ciri Morfologi			
		Bentuk Koloni	Warna Koloni	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram
1	2-1-11	Bulat tepi bergelombang	Putih	Basil	Negatif
2	2-1-15	Bulat tepi bergerigi	Putih	Basil	Negatif
3	2-1-20	Bulat tepi bergelombang	Putih susu	Kokus	Positif
4	2-2-8	Bulat tepi bergelombang	Putih susu	Kokus	Positif
5	2-2-17	Bulat tepi bergelombang	Putih susu	Basil	Negatif
6	2-3-1	Bulat tepi bergelombang	Putih susu	Kokus	Positif
7	2-3-2	Bulat tepi bergerigi	Putih susu	Kokus	Negatif
8	2-3-6	Bulat tepi bergerigi	Putih	Basil	Negatif
9	2-3-13	Bulat tepi bergelombang	Putih susu	Basil	Positif
10	2-3-14	Bulat tepi bergerigi	Putih susu	Basil	Positif

karbon kompleks dan sumber nitrogen kompleks. Medium yang kompleks merupakan faktor yang mempengaruhi mikroba dalam menghasilkan metabolit sekunder<sup>(10)</sup>. Pada penelitian ini medium fermentasi yang digunakan adalah F4 karena mengandung SBM (*Soya Bean Meal*), gliserol, dan CSL (*Corn Steep Liquor*) sebagai sumber karbon kompleks. Isolat bakteri endofitik yang ditumbuhkan pada medium F4 mampu menghasilkan enzim sebagai metabolit sekunder. Dari hasil fermentasi dengan medium F4 terbukti enzim yang dihasilkan adalah enzim xilanase. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya aktivitas enzim xilanase setelah ditambah substratnya yaitu xilan yang menghasilkan xilosa.

Enzim dapat diproduksi dengan cara meng-ekstraksi jaringan tanaman atau hewan dan

mikroorganisme. Keuntungan memproduksi enzim dari mikroba antara lain adalah biaya produksi lebih rendah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, serta mudah dikontrol<sup>(11)</sup>.

Enzim yang berasal dari mikroba dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu enzim ekstraselular dan enzim intraselular. Proses ekstraksi enzim intraselular memerlukan proses pendahuluan yaitu proses pengeluaran enzim dari dalam sel<sup>(2)</sup>. Pada penelitian ini digunakan *glass bead* untuk memecah enzim dari dalam sel. Proses pemecahan terjadi dengan membenturkan *glass bead* dengan sel sehingga dinding sel pecah dan menghasilkan sitoplasma yang diduga mengandung enzim xilanase.

Pengukuran aktivitas enzim xilanase, diinkubasi pada suhu 48°C dilakukan untuk mempercepat reaksi enzimatik antara enzim xilanase dengan substrat xilan supaya reaksi dapat berlangsung dengan sempurna. Sedangkan dipanaskan pada suhu 100°C untuk menginaktifkan enzim sehingga reaksi enzimatik praktis terhenti.

Hasil uji aktivitas enzim xilanase mikroba endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. dalam menghasilkan enzim xilanase secara kolorimetri diperoleh data bahwa untuk enzim intraselular dari 10 isolat bakteri yang diuji ternyata hanya 2 isolat yang mampu menghidrolisis substrat xilan, yaitu isolat 2.3.1 dan 2.3.6. Aktivitas tertinggi sebesar 1,6653 U/ml pada isolat 2.3.1 dan aktivitas terendah sebesar 0,3997 U/ml pada isolat 2.3.6. Empat enzim ekstraselular pada isolat 2.1.15, 2.3.1, 2.3.6, dan 2.3.13 dari 10 isolat bakteri endofitik yang diuji dapat menghidrolisis substrat xilan. Nilai aktivitas tertinggi terdapat pada enzim yang dihasilkan isolat 2.3.1 yaitu sebesar 2,7976 U/ml dan terendah terdapat pada enzim isolat 2.3.13 sebesar 0,5329 U/

**Tabel 2. Aktivitas enzim xilanase ekstraselular dan intraselular dari isolat bakteri endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr.**

No.	Kode Isolat	Nilai Aktivitas (U/ml)	
		Ekstraselular	Intraselular
1.	2.1.11	0	0
2.	2.1.15	1,3988	0
3.	2.1.20	0	0
4.	2.2.8	0	0
5.	2.2.17	0	0
6.	2.3.1	2,7976	1,6653
7.	2.3.2	0	0
8.	2.3.6	1,5320	0,3997
9.	2.3.13	0,5329	0
10.	2.3.14	0	0

ml (Tabel 2).

Isolat 2.3.1 dan 2.3.6 menghasilkan enzim ekstraselular dan intraselular. Aktivitas enzim ekstraselular pada kedua isolat ini lebih besar dibandingkan aktivitas enzim intraselular. Hal ini dikarenakan enzim pada ekstraselular sudah hampir diekskresikan semua ke sitoplasma sedangkan pada enzim intraselular masih berada di dalam membran sel sehingga untuk mendapatkannya diperlukan proses pemecahan sel. Pada proses pemecahan itu, kemungkinan tidak semua sel pecah sehingga mengakibatkan jumlah enzim yang dikeluarkan lebih sedikit. Hal ini dapat dilihat dari nilai aktivitas intraselular yang kecil daripada enzim ekstraselular<sup>(2)</sup>. Pada isolat 2.1.15 dan 2.3.13 hanya dihasilkan enzim ekstraselular. Hal ini dikarenakan enzim pada kedua isolat ini sudah diekskresikan semua melalui dinding sel sehingga tidak ada lagi enzim di dalam membran.

Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr., baik berupa enzim ekstraselular maupun intraselular diperoleh hasil yang kecil. Kemungkinan hal tersebut disebabkan oleh pH, substrat, suhu, nutrisi, lingkungan dan medium fermentasi yang kurang sesuai untuk menghasilkan enzim. Medium fermentasi cair yang digunakan pada penelitian adalah F4. Medium tersebut kurang maksimal dalam menghasilkan enzim xilanase karena F4 tidak mengandung xilan sedangkan medium fermentasi sebaiknya mengandung xilan sebagai *inducer*. Produksi enzim dengan aktivitas yang tinggi memerlukan kondisi pertumbuhan yang sesuai dengan faktor-faktor yang mempengaruhi kehidupan mikroba tersebut. Ketidaksesuaian parameter fermentasi dengan kondisi pertumbuhan bakteri yang digunakan akan menyebabkan kurang aktifnya bakteri tersebut dalam memproduksi enzim.

#### SIMPULAN

Sepuluh isolat bakteri endofitik yang dapat menghasilkan enzim xilanase hanya 4 isolat. Isolat endofitik yang dapat menghasilkan aktivitas enzim xilanase ekstraselular dan intraselular adalah isolat 2.3.1 dan 2.3.6, sedangkan isolat yang hanya menghasilkan aktivitas ekstraselular yaitu isolat 2.1.15 dan 2.3.13. Aktivitas enzim xilanase ekstraselular lebih besar daripada aktivitas enzim xilanase intraselular.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Yatim W. Enzim. diambil dari situs: <http://www.kompas.com/0009/01.htm>. diakses 1 Desember, 2004.
2. Darwis AA, Sukarna E. Isolasi, Purifikasi dan karakterisasi enzim. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Bioteknologi IPB; 1990.hal.1-3.
3. Poernomo AT, Purwanto DA. Karakteristik enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059. diambil dari situs: <http://www.ff.unair.ac.id/artikel/-6k/atp-bacillus.htm>. diakses 1 Desember, 2004.
4. Wahyudi P. Teknik skrining terhadap mikroba endofitik penghasil antibiotik baru. dalam Prosiding Temu Ilmiah Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia Seminar Nasional II Kimia dalam Pembangunan Jaringan Kimia Indonesia. 5-6 Mei 1998. Yogyakarta; 1998.hal.316-25.
5. Landecker EM. Fundamental of the fungi. 4<sup>th</sup> ed. United States of America: Prentice Hall International Inc;1996.p.501-4.
6. Wahyudi P. Skrining mikroba endofitik penghasil enzim pemecah mannan, xilan dan inulin. Jakarta: Sub Direktorat Bioteknologi Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan Deputi Bidang Pengkajian Ilmu Dasar dan Terapan BPP Teknologi; 1997.
7. Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxin*. 1992;1:185-96.
8. Tomita F. Screening of useful strains. in: International post university course in microbiology. Japan: Japanese National Commission for UNESCO. 1985;p.233.
9. NCCLS Methode for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. *NCCLS*. 1990;10(8):1-31.
10. Cell disrupter selection. diambil dari situs: <http://www.biospec.com/Lab%20Cell%20Disrupters%20Review.htm>. diakses 11 Mei, 2005.