

Kapang Endofitik Tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr yang Berpotensi menghasilkan Enzim Xilanase

WIBOWO MANGUNWARDYO¹, SHIRLY KUMALA^{2*}, I.G.A. AYU WIRATHI²

¹Departemen Biologi FMIPA, Universitas Indonesia UI Depok

²Fakultas Farmasi Universitas Pancasila

Jl. Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640

Diterima 15 Januari 2006, Disetujui 9 Februari 2006

Abstract: Xylanase enzyme activity of endophytic fungi from *Brucea javanica* (L.) Merr has been done. Fruit, leave and stem of the plant collected from Bogor, Cianjur, and Tawangmangu which used in this study. To evaluate the enzyme activity the endophytic fungi isolate were inoculated on PDY medium and fermented at room temperature, shake at 150 rpm for 14 days. The supernatant were used to examine the extracellular enzyme and the biomass for intracellular enzyme. The DNS methods was used to test the enzyme activity. The results showed isolate 1.1.8; 1.2.17; 1.3.16 and 1.3.6 produced intra and extracellular xylanase enzyme. Isolate 1.1.6 produced only extracellular enzyme while isolate 1.2.2 did not produce both intra and extracellular enzyme.

Key words: *Brucea javanica* (L.) Merr., endophytic fungi, intracellular enzyme, extracellular enzyme, xylanase

PENDAHULUAN

Indonesia mempunyai hutan hujan tropis terbesar di dunia dan amat potensial sebagai sumber mikroba yang bermanfaat. Salah satunya keberadaan mikroorganisme endofitik pada tanaman. Mikroba endofitik adalah mikroba yang hidup dan berasosiasi di dalam jaringan tanaman. Endofit banyak ditemukan pada berbagai jaringan tanaman, dapat membantu tanaman untuk berkompetisi di alam dan jenisnya tidak hanya fungi, tetapi juga dapat merupakan jenis bakteri atau khamir⁽¹⁾.

Endofit mampu menghasilkan enzim yang penting untuk kolonisasi dalam jaringan tanaman. Hasil studi tentang penggunaan substrat menunjukkan bahwa endofit mampu menggunakan sebagian komponen sel tanaman. Selain menghasilkan enzim perombak oligosakarida, juga menghasilkan faktor pemacu tumbuh, hormon, antibiotik serta metabolit sekunder lain yang bermanfaat dalam bidang pertanian, farmasi maupun industri⁽²⁾.

Salah satu enzim yang dihasilkan mikroorganisme yang digunakan dalam industri adalah xilanase, umumnya digunakan dalam produksi kertas⁽²⁾. Keuntungan penggunaan xilanase adalah meminimalkan penguna-

an senyawa klorin sehingga dapat mengurangi terbentuknya limbah toksik selama proses pemutihan kertas dan dapat memberikan dampak yang baik terhadap kelestarian lingkungan⁽³⁾.

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalam sel. Berdasarkan tempat kerjanya ada dua tipe enzim yaitu enzim ekstraselular dan enzim intraselular⁽⁴⁾. Xilanase merupakan enzim yang berperan mengkatalisis hidrolisis xilan. Enzim ini terdiri dari tiga kelompok enzim yaitu b-xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase⁽⁵⁾.

Kekayaan jenis-jenis tanaman tropis sejauh ini masih belum dimanfaatkan secara maksimal, terutama potensi dari mikroba endofitik. Pengembangan potensi dan pemanfaatan mikroba endofitik dalam proses industri perlu digalakkan agar dapat membantu perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim xilanase kapang endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Isolat kapang tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr diperoleh dari Bogor, Cianjur dan Tawangmangu. Media tumbuh, yaitu: *Potato Dextrose Agar* (PDA). Media fermentasi cair, yaitu:

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

Potato Dextrose Yeast (PDY) dan Pereaksi untuk analisis produk hasil hidrolisis xilan, yaitu: Asam Dinitro Salisilat (DNS), *Yeast extract* (Oxoid), Kalsium karbonat, Xilosa (Fluka), Xilan (Sigma) dan Dapar fosfat pH 8,0.

METODE. Isolasi dan seleksi kapang endofitik. Isolasi dilakukan dengan metode sterilisasi permukaan dan tanam langsung^(6,7). Pengamatan morfologi kapang endofitik *Brucea javanica* (L.) Merr, dilakukan secara makroskopik berdasarkan kriteria: tepi koloni kapang dan warna koloni kapang.

Fermentasi isolat kapang endofitik dilakukan dengan metode goyang dalam medium fermentasi PDY, kemudian diuji aktivitasnya.

Fermentasi metode goyang. Isolat kapang endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr dalam medium PDA yang berumur 7 hari, diambil sebanyak 5 potong kapang dengan ukuran + 1x1 cm. Potongan kapang ini dimasukkan ke dalam 50,0 ml medium fermentasi cair PDY dalam Erlenmeyer 250 ml. Kemudian difermentasi dengan metode goyang menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 14 hari. Biomassa dan supernatan yang diperoleh dari hasil fermentasi digunakan untuk uji aktivitas⁽⁸⁾.

Pemecahan enzim (glass bead). Pekerjaan intraselular, biomasa yang dihasilkan dari fermentasi dipecah dengan menggunakan *glass bead*. Perbandingan volume *glass bead* dengan biomasa 50 - 90% kemudian dihomogenkan selama 30 menit dan disentri-fugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.

Uji aktivitas enzim xilanase. Dilakukan dengan menggunakan metode Asam Dinitro Salisilat (DNS). Penetapan panjang gelombang serapan maksimum xilosa. Larutan stok xilosa 1 mg/ml dipipet sebanyak 0,5 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan air suling hingga 50,0 ml dan diukur serapannya.

Pembuatan kurva baku xilosa. Untuk pembuatan kurva baku terlebih dahulu dibuat larutan stok xilosa 1mg/ml. Larutan stok xilosa 1mg/ml dibuat menjadi lima konsentrasi. Konsentrasi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Lalu ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS pada masing-masing konsentrasi, setelah itu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan air suling hingga 50,0 ml. Dan diukur serapannya pada panjang gelombang 371,5 nm (Gambar 1).

Uji aktivitas enzim xilanase. Sebanyak 0,5 ml supernatan enzim ditambah dengan 0,5 ml larutan xilan 1% (b/v) dan diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 1,0 ml untuk kapang. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Lalu ditambahkan air suling hingga 50,0 ml, dan diukur serapannya pada panjang gelombang 371,5 nm. Untuk memperoleh konsentrasi sampel maka serapan larutan sampel kemudian dikonversikan pada kurva baku xilosa sehingga didapat konsentrasi sampel. Sedangkan kontrol didapat dengan metode yang 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 1 mikromol xilosa yang dihasilkan permenit dan dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{([S] - [K]) \times 1000 \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM xilosa}}$$

Keterangan:

[S]	=	Konsentrasi sampel
[K]	=	Konsentrasi kontrol
Faktor Pengenceran	=	200 x
Waktu inkubasi	=	10 menit
BM xilosa	=	150,13

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

No.	Kode isolat	Diameter(cm) hari ke 7	Warna koloni kapang	Warna sebalik
1	1.1.8	7,78	Putih abu-abu, tepi bergelombang	Hijau abu-abu
2	1.1.6	7,78	Putih kehijauan, tepi bergelombang	Hijau abu-abu
3	1.2.17	4,11	Putih kecoklatan, tepi bergelombang	Putih kehijauan
4	1.3.16	4,54	Putih kekuningan, tepi bergelombang	Kuning kecoklatan
5	1.2.2	5,41	Putih abu abu, tepi rata	Kuning kehijauan
6	1.3.6	7,01	Putih kekuningan, tepi rata	Putih, kuning, hijau

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat kapang endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr dan ciri-ciri morfologi makroskopik dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil aktivitas enzim ekstraselular (supernatan) dan intraselular (biomassa) fermentasi goyang isolat kapang endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr terlihat pada Tabel 2.

Pertumbuhan isolat kapang endofitik membutuhkan waktu kurang lebih 5-7 hari pada suhu kamar (27-30°C). Selama penelitian ini pembiakan kapang endofitik menggunakan medium PDA. Pada pembiakan mikroba endofitik diperlukan zat hara untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan serta unsur-unsur mineral lainnya yang sesuai bagi mikroba endofitik. Kapang endofitik pada umumnya mempunyai sifat lambat tumbuh, akan tetapi lingkungan yang cocok akan mempercepat pertumbuhan kapang endofitik.

Medium fermentasi menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan dan bahan pembentuk sel. Senyawa-senyawa sumber karbon dan nitrogen merupakan komponen terpenting dalam medium fermentasi, karena sel-sel mikroba dan berbagai produk fermentasi sebagian besar terdiri dari unsur-unsur karbon dan nitrogen, selain itu juga mengandung garam-garam organik serta beberapa vitamin dan mineral⁽⁹⁾. Medium fermentasi cair yang digunakan dalam penelitian ini adalah PDY, medium PDY mengandung sumber karbon yang berasal dari kentang dan dekstrosa, serta ekstrak khamir sebagai sumber nitrogen.

Medium cair yang digunakan pada fermentasi mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan medium fermentasi padat yaitu komposisi dan konsentrasi medium dapat diatur dengan mudah, dapat memberikan kondisi optimum bagi pertumbuhan, dan pemakaian medium lebih efisien⁽¹⁰⁾. Fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah fermentasi goyang, dilakukan pada suhu kamar (27-30°C) selama

14 hari dengan kecepatan penggoyangan 150 rpm. Dari hasil fermentasi didapat supernatan (enzim ekstraselular) dan biomassa (enzim intraselular), dan masing-masing diuji aktivitasnya.

Pada pengukuran aktivitas enzim xilanase, inkubasi 48°C dilakukan untuk mempercepat reaksi enzimatik antara enzim xilanase dengan substrat xilan supaya reaksi berlangsung dengan sempurna. Sedangkan pada inkubasi 100°C untuk menginaktivkan enzim sehingga reaksi enzimatik berhenti.

Dari enam isolat kapang dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr diperoleh empat isolat yang memiliki aktivitas ekstraselular dan intraselular yaitu isolat kapang 1.1.8, 1.2.17, 1.3.16, dan 1.3.6. Satu isolat yang hanya memiliki aktivitas ekstraselular yaitu isolat 1.1.6. Satu isolat yang tidak memiliki aktivitas ekstraselular dan intraselular yaitu isolat 1.2.2. Nilai aktivitas tertinggi ekstraselular yaitu isolat 1.3.16, dengan nilai aktivitas 4,5294 U/ml. Nilai aktivitas tertinggi intraselular yaitu isolat 1.3.6, dengan nilai aktivitas 2,0649 U/ml.

Isolat 1.2.2 tidak menghasilkan enzim ekstraselular dan intraselular, karena tidak mempunyai sifat pembawa enzim xilanase. Isolat 1.1.8, 1.2.17, 1.3.16, 1.3.6, menghasilkan enzim ekstraselular dan intraselular. Kapang yang menghasilkan enzim xilanase: *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp.⁽¹¹⁾. Isolat 1.1.6 menghasilkan enzim ekstraselular, enzim sudah dikeluarkan semua sehingga tidak dihasilkan di intraselular. Aktivitas enzim xilanase dipengaruhi oleh beberapa faktor: pH, suhu, konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim⁽¹²⁾. Kondisi yang optimum untuk suatu proses fermentasi tergantung pada jenis mikroorganismenya. Pengendalian faktor-faktor fermentasi bertujuan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu organisme tertentu. Secara umum faktor fisik dan kimia utama yang mempengaruhi aktivitas suatu enzim yaitu suhu, pH dan kebutuhan oksigen⁽¹⁰⁾.

Medium fermentasi dengan menggunakan

Tabel 2. Hasil aktivitas enzim ekstraselular (supernatan) dan intraselular (biomassa) fermentasi goyang isolat kapang endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr

No	Kode Isolat	Nilai Aktivitas (U/ml)	
		Ekstraselular	Intraselular
1	1.1.8	4,0632	1,5986
2	1.1.6	2,9974	0
3	1.2.17	1,1324	0,4663
4	1.3.16	4,5294	1,1324
5	1.2.2	0	0
6	1.3.6	2,9308	2,0649

0 = tidak mempunyai aktivitas.

sumber karbon xilan sebagai inducer dapat meningkatkan produksi xilanase^(5,11). Pada penelitian Hapsari menggunakan medium fermentasi xilan untuk menghasilkan xilanase, hasil penelitian menunjukkan nilai aktivitas yang tinggi pada kapang B3-2 yaitu 41,2143 U/ml⁽¹³⁾. Sedangkan pada penelitian ini medium fermentasi yang digunakan adalah medium cair PDY yang tidak mengandung xilan sebagai inducer, sehingga ada kemungkinan diperoleh hasil aktivitas yang lebih kecil dibandingkan dengan menggunakan medium fermentasi xilan. Selain itu kemungkinan lainnya kapang yang terdapat pada penelitian Hapsari berbeda dengan kapang yang diperoleh pada penelitian ini, sehingga ada kemungkinan aktivitasnya juga berbeda.

SIMPULAN

Isolat kapang endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr yang menghasilkan enzim xilanase ekstraselular dan intraselular, adalah isolat 1.1.8, 1.2.17, 1.3.16, 1.3.6. Isolat kapang endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr yang hanya menghasilkan enzim xilanase ekstraselular, adalah isolat 1.1.6. Isolat kapang endofitik dari tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr yang tidak menghasilkan enzim ekstraselular dan intraselular, adalah isolat 1.2.2.

DAFTAR PUSTAKA

- diambil dari <http://www.menuaiberkahdarihutan/mikroba.htm>.
- Wahyudi P. Teknik skrining terhadap mikroba endofitik penghasil antibiotik baru. Prosiding Temu Ilmiah Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia, Yogyakarta: 1998.hal.316-25.
- Qureshy AF, Khan LA, Khana S. Expression of *Bacillus circulans Teri-42* xylanases gene in *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology. 2000;27: 227-33.
- Pelczar MJ, Chan ECS. Dasar-dasar Mikrobiologi. Alih bahasa Hadioetomo, Jakarta: UI-Press; 1986.hal.189-209.
- Rani DS, Nand K, Production of thermostable cellulase-free xilanase by *Clostridium absonum* CFR - 702. Process Biochemistry. 2000;(36): 355-362.
- Petrini O, Sieber, Thomas N, Toti L, Viret O., Ecology, Metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins. 1992;(1):185-196.
- Caroll CG. Fungal endophytes in stem and leaves from latent pathogen mutualistic symbiont. Ecology. 1988; 69:2-9.
- Kumala S, Utji R, Sudarmono P and Kardono LBS. Isolation of endophytic fungi from *Brucea javanica* L (Merr) and cytotoxic evaluation of their n-butanol extract from fermentation broth. Pak Journal of Biological Sciences. 2006; 9(5): 825-832.
- Rachman A. Pengantar teknologi fermentasi. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB; 1989. hal. 90-95.
- Rachman A. Teknologi fermentasi. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB; 1990. hal. 3, 4, 162, 163, 198-226.
- Baraznenok VA, Becker EG, Ankudimova NV, Okunev NN. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. Enzyme and Microbial Technology; 1999, 25:651-59.
- Judoamidjojo RM, Darwis AA, Said EG. Teknologi fermentasi. Bogor: PAU Bioteknologi IPB; 1992. hal. 37-51,111-13.
- Juniarti DH. Isolasi mikroba endofitik dari ranting tumbuhan trengguli (*Cassia fistula* L) dan aktivitasnya enzim xilanase [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 2004.