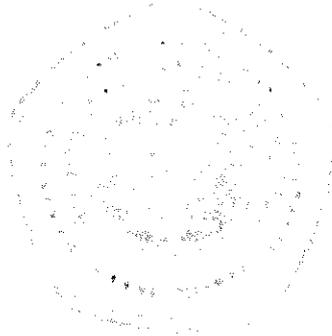




@Hak cipta milik IPB University

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM MANNANASE *Pycnoporus sanguinis*



Eulis Komyati



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

INSTITUT PERTANIAN BOGOR



RINGKASAN

EULIS KOMYATI. Optimasi Produksi Enzim Mananase *Pycnoporus sanguinis* (*Optimization Mannanase Production from Pycnoporus sanguinis*). Dibimbing oleh GAYUH RAHAYU dan TRESNAWATI PURWADARIA.

Enzim mananase merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh beberapa organisme diantaranya *Penicillium* spp dan *Streptomyces* sp. Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosida pada polimer manan. Mananase dapat digunakan sebagai enzim tambahan selain selulase dalam penguraian polisakarida kayu menjadi heksosa. Selain itu β - mananase juga merupakan enzim yang potensial untuk pengolahan bubur kertas.

Dari penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa *Pycnoporus. sanguinis* 24 dan 49, dapat memproduksi mananase pada media cair dengan 1% bungkil kelapa (BK) dalam masa inkubasi 10 hari. Dalam percobaan ini dicari suatu kondisi optimum (konsentrasi bungkil kelapa dan masa inkubasi) agar produksi enzim mananase dari *P. sanguinis* 24, 48 dan 49 maksimum. Konsentrasi BK yang digunakan adalah 1% dan 3%, dengan periode inkubasi 4, 6, 8, dan 10 hari. *Eupenicillium javanicum* digunakan sebagai pembanding.

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa konsentrasi BK yang optimum adalah 1%. Sedangkan masa inkubasi optimumnya bervariasi, delapan hari untuk *P. sanguinis* 24 dan sepuluh hari untuk *P. sanguinis* 48 dan 49. Nilai aktivitas enzim ketiga isolat tersebut pada kondisi optimumnya berbeda tidak nyata.

Kadar protein ekstraseluler tertinggi ditunjukkan oleh *P. sanguinis* 24 dan 49 yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi 3% BK berturut-turut dengan masa inkubasi delapan hari dan empat hari. Pada konsentrasi 1% BK, kadar protein ekstraseluler pada umumnya berbeda tidak nyata pada semua masa inkubasi kecuali *P. sanguinis* 24. Pada isolat ini, protein ekstraseluler maksimumnya diperoleh pada masa inkubasi 6 hari, kemudian menurun pada masa inkubasi selanjutnya.

Aktivitas spesifik tertinggi ditunjukkan oleh *E. javanicum* pada konsentrasi 3% BK dengan masa inkubasi 10 hari. Nilai aktivitas spesifik dari *E. javanicum* lebih tinggi dan berbeda sangat nyata dari nilai aktivitas spesifik *P. sanguinis*. Pada *P. sanguinis*, aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada konsentrasi 1% BK dengan masa inkubasi optimum bervariasi, delapan hari untuk *P. sanguinis* 24 dan sepuluh hari untuk *P. sanguinis* 48 dan 49.



SUMMARY

EULIS KOMYATI. Optimization of mannanases production from *Pycnoporus sanguinis*. Promoted; GAYUH RAHAYU dan TRESNAWATI PURWADARIA.

One amongst extracellular enzymes produced by microorganisms such as *Penicillium* spp and *Streptomyces* sp is mannanases. This enzyme hydrolyses glycosidic bonds in mannan. Mannanases can be used as a cellulases supplement in woods polysaccharides decomposition into hexose. Besides mannanases is also a potential enzyme in biopulping.

Investigation prior this research showed that *P. sanguinis* 24 and 49 were able to produce mannanase in broth media with 1% coconut meal (CM) in ten days incubation. The aim of this research is to investigate the optimal condition (in terms of CM concentration and incubation period) for mannanase production from *P. sanguinis* 24, 48, and 49. In this experiment, CM concentration of 1% and 3%, with 4, 6, 8, and 10 days incubation were applied. Whereas *Eupenicillium javanicum* is used as a control.

The result showed that the optimal concentration of CM is 1%. Wholst, the optimal incubation periods varied depending on the isolates, i.e. eight days for *P. sanguinis* 24 and ten days for *P. sanguinis* 48 and 49. The mannanase activity of these tree isolates in their optimal condition were not significantly difference ($P < 0,05$).

The highest concentration of protein extracellular in shown by *P. sanguinis* 24 and 49 that were grown on media with 3% CM with eight days and four days incubation period, respectively. In general, the concentrations of the protein of all but *P. sanguinis* 24 within all incubation periods were not significantly difference when the fungi were grown on 1% CM.

Maximum protein concentration was obtained in 6 days incubation. The highest spesific activity was shown by *E. javanicum* that was grown on 3% CM with ten days incubation. This specific activity was higher and significantly difference from that of *P. sanguinis*. For *P. sanguinis*, the highest spesific activity was obtained when the fungi were grown on 1% CM with incubation periods similar with those of mannanase activity.



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Penguatan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Penguatan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM MANANASE *PYCNOPORUS SANGUINIS*

EULIS KOMYATI

LAPORAN MASALAH KHUSUS

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar

Sarjana Sains

Pada

Jurusan Biologi

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

1998



@Hak cipta milik IPB University

Judul : OPTIMASI PRODUKSI ENZIM MANANASE *Pycnoporus sanguinis*
Nama : Eulis Komyati
NIM : G30.1895

Menyetujui,

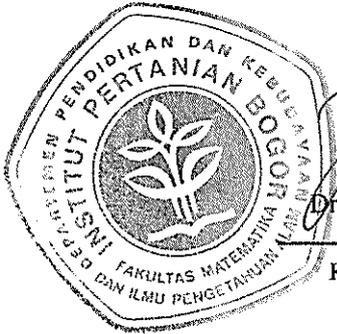
Dr. Ir. Gayuh Rahayu

Pembimbing I

Dr. M.B. Tresnawati Purwadaria

Pembimbing II

Mengetahui,



Dr. Ir. Muhammad Yusuf

Ketua Program Studi

Tanggal Lulus : 04 MAY 1998

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandung pada tanggal 14 Desember 1974 sebagai anak sulung dari empat bersaudara, anak dari pasangan Mamat Rahmat dan Rohaeti.

Tahun 1993 penulis lulus dari SMAN Baleendah, Bandung dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB. Pada tahun 1994 penulis memilih Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Selama mengikuti perkuliahan penulis menjadi asisten mata kuliah Biologi Dasar II pada tahun ajaran 1995/1996 dan Biologi Dasar I pada tahun ajaran 1996/1997.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah ini. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April 1997 dengan judul Optimasi produksi mananase *Pycnopus sanguinis*.

Terima kasih penulis ucapkan kepada berbagai pihak yang telah membantu dalam penyelesaian karya ilmiah ini, antara lain Dr. Ir. Gayuh Rahayu dan Dr. M.B. Tresnawati Purwadaria selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan saran. Disamping itu ucapan terima kasih juga disampaikan kepada staf dan karyawan laboratorium Mikologi, Mbak Retno, Mbak Alo, Mbak Eni, Mbak Yupi, Ari, Yeni, warga Bafak no 2 dan Basir no 25 juga kru Askom atas bantuan dan kerjasamanya. Serta kepada Bapak, Ibu dan seluruh keluarga atas do'a dan kasih sayangnya.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat.

Bogor, Mei 1998

Eulis Komyati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vi
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan.....	1
BAHAN DAN METODE.....	1
Waktu dan tempat.....	1
Bahan	2
Metode.....	2
1. Persiapan Inokulum.....	2
2. Produksi Enzim.....	2
3. Penetapan Aktivitas Enzim.....	2
4. Analisis Protein.....	2
Analisis Data.....	2
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	2
KESIMPULAN.....	5
DAFTAR PUSTAKA	5
LAMPIRAN	7

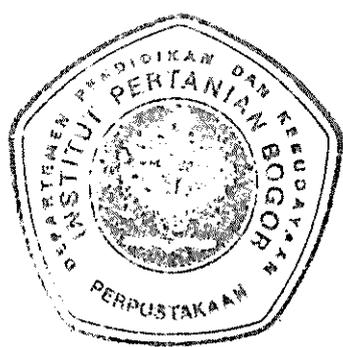
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Aktivitas mananase <i>P. sanguinis</i> dan <i>E. javanicum</i> pada media 1% dan 3% BK	3
2. Produksi protein ekstraselular <i>P. sanguinis</i> dan <i>E. javanicum</i> pada media 1% dan 3% BK	4

DAFTAR LAMPIRAN

1. Komposisi media dan pereaksi yang digunakan dalam penelitian	8
2. Analisis sidik ragam aktivitas mananase, kadar protein dan aktivitas spesifik pada media bungkil kelapa	9
3. Aktivitas mananase, kadar protein dan aktivitas spesifik <i>P. sanguinis</i> dan <i>E. javanicum</i> pada media yang mengandung BK 1% dan 3%	10
4. Aktivitas mananase, kadar protein dan aktivitas spesifik <i>P. sanguinis</i> 48 dan 49 pada media yang mengandung 1% bungkil kelapa dalam masa inkubasi 10 dan 12 hari	11



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PENDAHULUAN

Latar Belakang

Enzim mananase merupakan salah satu enzim ekstraselular yang dihasilkan oleh beberapa organisme, diantaranya *Penicillium* dan *Eupenicillium* (Purwadaria *et al.*, 1994). Selain itu ada beberapa spesies bakteri yang juga dapat memproduksi mananase seperti *Streptomyces* sp (Zamora *et al.*, 1989) dan *Bacillus* (Araujo & Ward, 1990b).

Komplek mananase terdiri dari endo- β -D-mananase (E.C.3.2.178), exo- β -D-mananase, β -D-manosidase dan exo- β -D-manan manobiohidrolase (E.C.3.2.1.100) (McCleary & Matheson), yang aktif memecah ikatan rantai homo dan hetero β -D-manan, pada manan, galaktomanan, glukomanan dan galaktoglukomanan (Johnson, 1990). Enzim ini termasuk golongan enzim hidrolase, yaitu bekerja dengan cara menghidrolisis ikatan glikosida pada polimer manan.

Mananase berpotensi sebagai enzim tambahan disamping selulase dalam penguraian polisakarida kayu menjadi heksosa (Araujo & Ward, 1990a). Selain itu β -Mananase merupakan enzim yang potensial untuk pengolahan bubur kertas, dalam industri kertas (Johnson, 1990). Mananase juga dapat digunakan untuk menghidrolisis manan pada biji kopi dalam industri kopi (Hashimoto & Fukumoto, 1969). Selain dalam bidang industri, mananase juga dapat digunakan untuk menguraikan senyawa manan dan galakto-manan yang melindungi molekul protein pada bungkil kelapa, yang menjadi kendala dalam pemanfaatan bungkil kelapa sebagai pakan ternak. Dengan adanya penguraian ini maka daya cerna protein dapat ditingkatkan (Purwadaria *et al.*, 1994).

Enzim mananase termasuk ke dalam kelompok enzim induktif, yang memerlukan suatu induser untuk memproduksinya. Produksi enzim pada kultur cair diinduksi oleh substrat yang mengandung manan seperti *gum locust bean* (Johnson 1990, Torrie *et al.*, 1990 dan Purwadaria *et al.*, 1994) atau bungkil kelapa (Zamora *et al.*, 1989 dan Iriani *et al.*, 1995). Konsentrasi substrat sangat berpengaruh terhadap produksi enzim. Aktivitas tertinggi dari *Streptomyces* sp yang ditumbuhkan pada bungkil kelapa 0,5-3,5% diperoleh ketika kapang itu ditumbuhkan pada konsentrasi dengan bungkil kelapa 3% (Zamora *et al.*, 1989). Purwadaria *et*

al. (1998) juga melaporkan bahwa *Eupenicillium javanicum* menunjukkan aktivitas mananase tertinggi pada media yang mengandung bungkil kelapa 3%.

Produksi enzim selain dipengaruhi oleh konsentrasi substrat juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Aktivitas mananase tertinggi dari *E. javanicum* pada bungkil kelapa 1% diperoleh pada masa inkubasi 3 hari, sedangkan untuk konsentrasi bungkil kelapa 3% diperoleh pada masa inkubasi 5 hari (Purwadaria *et al.*, 1998). Pada 3% bungkil kelapa aktivitas α -galaktosidase, β -mananase, dan β -manosidase yang diproduksi oleh *E. javanicum* pada masa inkubasi 5 hari lebih besar daripada masa inkubasi 4 dan 6 hari (Haryati *et al.*, 1997).

Dari penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa enzim mananase dapat dihasilkan oleh *P. sanguinis* no 24 dan 49 yang ditumbuhkan pada media bungkil kelapa 1% dengan waktu inkubasi 10 hari (Nurdiani, 1997). Namun waktu inkubasi dan konsentrasi substrat yang optimum untuk produksi mananase secara maksimum belum diketahui. Mengingat pentingnya peranan enzim ini dalam kegiatan industri seperti industri kertas, sedangkan enzim yang digunakan untuk kegiatan industri itu mempunyai persyaratan diantaranya harus dalam jumlah yang besar dan aktivitas yang tinggi (Lowe, 1992), maka perlu diketahui kemampuan maksimum isolat-isolat *P. sanguinis* untuk memproduksi mananase pada waktu inkubasi dan konsentrasi substrat yang optimum. Diharapkan mananase dapat diproduksi dalam jumlah yang maksimum sehingga isolat-isolat ini dapat dikembangkan sebagai produsen mananase.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mencari kondisi (konsentrasi substrat dan periode fermentasi) yang optimum untuk produksi enzim mananase dari *Pycnoporus sanguinis*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April sampai September 1997, bertempat di Laboratorium Mikologi IPB Bogor.

Bahan

Isolat cendawan yang diuji adalah *Pycnopus sanguinis* (no 24, 48, dan 49) koleksi Laboratorium Mikologi FMIPA IPB. Sedangkan *Eupenicillium javanicum* koleksi Balai Penelitian Ternak (Balitnak) Ciawi digunakan sebagai pembanding.

Metode

Persiapan Inokulum. Inokulum diperoleh dari hasil peremajaan biakan pada media agar Malt Ekstrak Pepton (MEP) pada suhu 30°C selama 7 hari.

Produksi Enzim. Inokulum (1 cm²) sebanyak 3 potong dari tepi koloni biakan ditumbuhkan dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 30 ml media mineral Steiner + ekstrak khamir (EK) 0,5% (Lampiran 1), yang dikombinasikan dengan bungkil kelapa sebagai sumber karbon dengan konsentrasi 1% dan 3%. Biakan tersebut diinkubasi selama 4, 6, 8 dan 10 hari di atas pengocok respirokakal 90 rpm (1 jam bergoyang 30 menit berhenti). Pada akhir masa inkubasi pertumbuhan cendawan dihen-tikan dengan penambahan Na-asida (20%) sebanyak 0.3 ml. Selanjutnya masa cendawan dipisahkan dari filtratnya dengan cara disen-trifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm. Filtrat dari kultur yang telah dipisahkan menjadi sumber enzim yang aktivitasnya akan ditetapkan.

Penetapan Aktivitas Enzim. Penetapan aktivitas mananase dilakukan berdasarkan metode Purwadaria *et al.* (1994). Filtrat sebanyak 1 ml diinkubasi pada penangas air dengan suhu 50°C selama 5 menit, sementara substrat berupa manan 0,5% (b/v) dalam larutan penyangga asetat (0,1 M, pH 5,8) telah diinkubasi pada suhu yang sama selama 15 menit. Setelah itu substrat sebanyak 1 ml ditambahkan pada 1 ml filtrat tersebut lalu divortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 3 ml DNS (Dinitro salisilat), kemudian campuran divortex dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Filtrat enzim dengan perlakuan yang sama tanpa inkubasi digunakan sebagai kontrol. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 575 nm. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 µmol manosa dalam 1 menit.

Analisis Protein. Pengukuran konsentrasi protein ditentukan menurut metode Bradford

(1976), yaitu berdasarkan pada pengikatan zat warna coomasie brilliant blue G-250 dengan protein dan serum albumin digunakan sebagai standar. Analisis protein dilakukan menurut konsentrasi protein yang diukur yaitu (1) analisis makro untuk mengukur protein pada kisaran 200-800 µg protein/ml. (2) analisis semimakro untuk mengukur protein pada kisaran 50-200 µg protein/ml. (3) analisis mikro untuk mengukur protein pada kisaran 10-80 µg protein/ml.

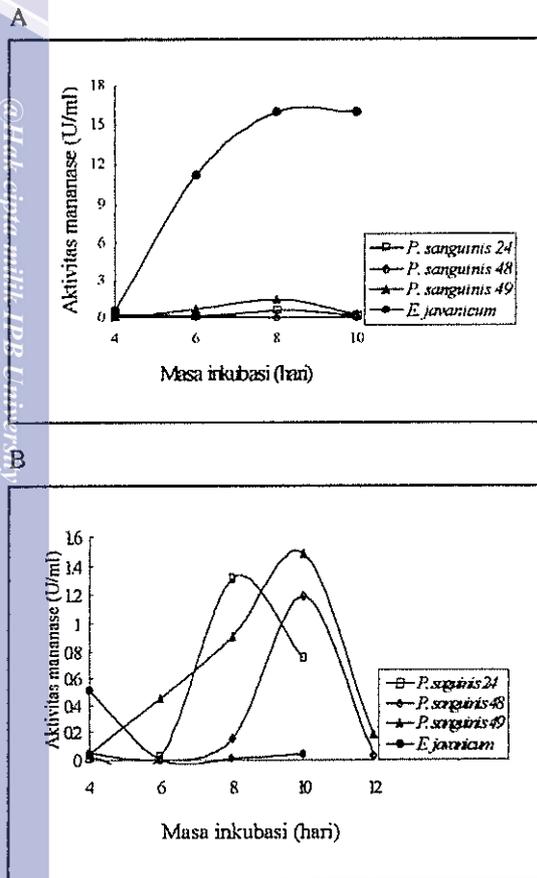
Untuk analisis makro, filtrat enzim sebanyak 0,1 ml dicampur dengan 5 ml pereaksi protein lalu divortex, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Untuk analisis semimakro digunakan 0,2 ml enzim dan untuk mikro digunakan sebanyak 0,5 ml enzim dan masing-masing ditambah dengan 5 ml pereaksi protein. Konsentrasi protein filtrat enzim tersebut ditentukan dari kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) sesuai dengan ukuran analisis yang dilakukan.

Analisis data

Analisis data dilakukan dua kali dengan menggunakan rancangan faktorial RAL (Rancangan Acak Lengkap), analisis yang pertama menggunakan 3 faktor (2x4x4), faktor pertama konsentrasi substrat (konsentrasi bungkil kelapa 1% dan 3%) faktor kedua jenis isolat (*P. sanguinis* 24, 48, 49 dan *E. javanicum*), faktor ketiga waktu inkubasi 4, 6, 8, 10, hari. Analisis kedua menggunakan 2 faktor, faktor pertama jenis isolat (*P. sanguinis* 48 dan 49) faktor kedua waktu inkubasi (10 dan 12 hari).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas mananase dari suatu cendawan dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan masa inkubasi (Lampiran 2). Begitu juga dengan kadar protein ekstraseluler dan aktivitas spesifik (Lampiran 2 dan 3). Ketiga faktor ini saling berinteraksi. Secara umum produksi mananase isolat-isolat *Pycnopus sanguinis* yang ditumbuhkan pada media dengan 3% (BK) lebih kecil daripada *Eupenicillium javanicum* (Gambar 1A). Tetapi pola produksi berubah ketika cendawan tersebut ditumbuhkan pada media dengan 1% BK. Pada kondisi ini produksi mananase isolat *P. sanguinis* lebih tinggi daripada *E. javanicum* pada periode inkubasi yang sama (Gambar 1B).



Gambar 1. Produksi mananase *P. sanguinis* dan *E. javanicum* pada : A. BK 3%
B. BK 1%

Tidak semua isolat menunjukkan peningkatan mananase selama masa inkubasi pada media dengan 3% BK. Peningkatan hanya terjadi pada *E. javanicum* dan *P. sanguinis* 49 (Gambar 1A). Sedangkan aktivitas mananase isolat *P. sanguinis* 24 dan 48 tidak berbeda nyata untuk semua masa inkubasi (Gambar 1A, Lampiran 5). Masa inkubasi optimum dari kedua cendawan yang pertama adalah delapan hari (Gambar 1A), tetapi aktivitas mananase keduanya sangat berbeda nyata (Lampiran 5). Produksi mananase dari *E. javanicum* 15,933U/ml, sepuluh kali lebih besar dari *P. sanguinis* 49 (1,455U/ml). Hasil ini mungkin berkaitan dengan pertumbuhannya. Secara visual, miselium *E. javanicum* lebih tebal dibandingkan miselium dari *P. sanguinis* 49. Ariwibowo (1996) menyatakan bahwa aktivitas enzim yang tinggi didukung oleh pertumbuhan koloni yang tinggi. Aktivitas mananase *E. javanicum* hasil penelitian ini lebih kecil

daripada laporan Purwadaria *et al.* (1998) yang menyatakan pada media 3% BK aktivitas mananase isolat ini sebesar 136,2 U/ml pada 5 hari inkubasi. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh berbedanya cara pengocokan. Pada percobaan yang dilakukan oleh Purwadaria *et al.* (1998) pengocokan dilakukan secara terus-menerus dengan kecepatan 150 rpm pada suhu konstan (30°C). Sedangkan pada percobaan ini pengocokan dilakukan tidak secara terus-menerus melainkan 1 jam bergoyang setengah jam berhenti, dengan kecepatan 90 rpm pada suhu kamar.

Secara umum aktivitas mananase *P. sanguinis* 24 dan 48 pada media dengan 3% BK kurang daripada 1% BK. Hal ini terjadi karena pada konsentrasi BK 3% aerasinya lebih rendah daripada 1% BK sehingga pertumbuhan kedua cendawan tersebut terhambat. Sedangkan oksigen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel (Pelczar *et al.*, 1986). Selain itu kepekatan suspensi merupakan faktor hambatan dalam homogenisasi suspensi (Purwadaria *et al.*, 1998).

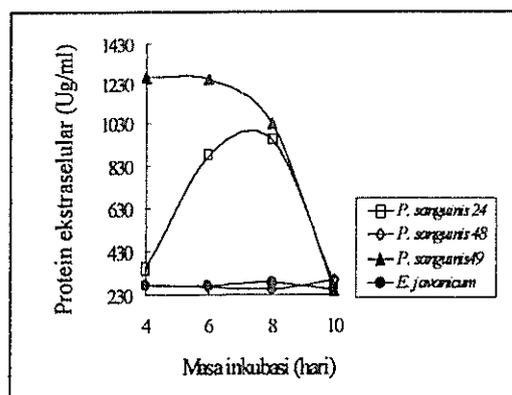
Semua isolat *P. sanguinis* yang ditumbuhkan pada media dengan 1% BK memproduksi mananase meskipun masa inkubasi optimumnya berbeda untuk tiap isolat yaitu 8 hari untuk *P. sanguinis* 24 sedangkan 10 hari untuk *P. sanguinis* 48 dan 49 (Gambar 1B). Meskipun demikian produksi mananase pada inkubasi optimum ketiga isolat tersebut tidak berbeda nyata (Lampiran 5). Pada sepuluh hari inkubasi, produksi mananase dari *P. sanguinis* 48 dan 49 masih meningkat, sehingga untuk mengetahui masa inkubasi optimumnya, masa inkubasi diperpanjang sampai 12 hari. Ternyata pada 12 hari inkubasi produksinya lebih rendah daripada 10 hari (Gambar 1, Lampiran 6). Nurdiani (1997), yang menggunakan media dengan 1% BK dan 1% EK dengan masa inkubasi 10 hari, melaporkan bahwa *P. sanguinis* 24 dan 49 dapat memproduksi mananase masing-masing sebesar 0,281 U/ml dan 0,422 U/ml. Produksi juga dilakukan pada kondisi kecepatan dan suhu lingkungan yang sama dengan percobaan ini. Pada percobaan ini dengan penggunaan EK yang lebih kecil (0,5 %) dalam masa inkubasi yang sama diperoleh aktivitas mananase yang lebih besar berturut-turut 0,754 U/ml dan 1,194 U/ml. Ternyata ketersediaan protein dan vitamin yang dikandung EK mempengaruhi produksi mananase.

Aktivitas mananase *E. javanicum* pada media dengan 1% BK pada masa inkubasi 4 hari sebesar 0,506 U/ml, kemudian maksimum dari *E. javanicum* pada media 1% BK memerlukan waktu yang lebih pendek daripada media 3% BK. Hasil ini sesuai dengan laporan Purwadaria *et al.* (1998), mengenai masa inkubasi optimum pada *E. javanicum* dengan 1% BK yaitu 3 hari, lebih cepat dicapai daripada 3% BK yaitu 5 hari. Hal ini diduga pada media dengan 1% BK, sumber karbon lebih cepat habis dibandingkan dengan 3% BK, sehingga fase stasioner dan fase kematian sel lebih cepat terjadi. Seperti halnya pada konsentrasi 3% BK, aktivitas mananase dari *E. javanicum* pada 1% BK hasil percobaan ini lebih rendah dibandingkan dari yang dilaporkan oleh Purwadaria *et al.* (1998). Purwadaria *et al.* (1998) menyatakan bahwa aktivitas mananase maksimum dari *E. javanicum* yang ditumbuhkan pada media dengan 1% BK dalam periode inkubasi 1-7 hari, diperoleh ketika masa inkubasi 3 hari (39,4 U/ml). Jumlah enzim yang diperoleh pada percobaan ini pun lebih kecil daripada yang dilaporkan oleh Iriani *et al.* (1995). Mereka menyatakan bahwa produksi mananase pada media dengan 1% BK dalam masa inkubasi 4 hari adalah sebesar 95,71 U/ml, walaupun EK dan pepton yang ditambahkan berturut-turut hanya 0,05% dan 0,75%. Hal ini diduga sebagai akibat berbedanya cara pengocokan. Metode pengocokan yang dilakukan oleh Iriani *et al.* (1995) sama dengan Purwadaria *et al.* (1998).

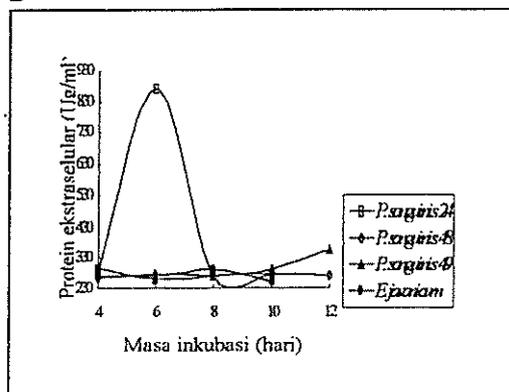
Produksi protein ekstraseluler dipengaruhi oleh jenis cendawan dan konsentrasi BK (Lampiran 3). Secara umum protein ekstraseluler semua cendawan berbeda tidak nyata pada berbagai masa inkubasi, kecuali pada *P. sanguinis* 24 dan 49 yang ditumbuhkan pada medium 3% BK (Gambar 2B) dan *P. sanguinis* 24 yang ditumbuhkan pada 1% BK dengan masa inkubasi 6 hari (Gambar 2A). Protein ekstraseluler tertinggi ditunjukkan oleh *P. sanguinis* 49 pada media 3% BK dalam masa inkubasi 4 hari (Gambar 2B). Produksinya tidak berbeda nyata ketika masa inkubasi diperpanjang sampai 6 hari. Kadar protein ekstraseluler dari *P. sanguinis* 24 pada kondisi media yang sama tertinggi pada masa inkubasi 8 hari, namun nilainya lebih rendah daripada *P. sanguinis* 49. Sedangkan kadar protein ekstraseluler dari *P. sanguinis* 48 dan *E. javanicum* dalam kondisi media dan masa inkubasi yang sama, lebih sedikit dari isolat lainnya (Gambar

2B). Protein ekstraseluler dari *E. javanicum* dalam masa inkubasi 4 hari diperoleh sebesar 271 $\mu\text{g/ml}$, jumlah ini lebih besar daripada yang dilaporkan oleh Purwadaria *et al.* (1998) yaitu 96 $\mu\text{g/ml}$. Namun proporsi protein ekstraseluler yang berupa enzim mananase pada penelitian ini lebih rendah dari laporan penelitian tersebut.

A



B



Gambar 2. Produksi protein ekstraseluler *P. sanguinis* dan *E. javanicum* pada media dengan A) BK 3% dan B) BK 1%

Produksi protein ekstraseluler dari isolat cendawan yang ditumbuhkan pada media dengan 1% BK umumnya berbeda tidak nyata selama periode inkubasi, kecuali pada *P. sanguinis* 24 (Gambar 2A). Protein ekstraseluler isolat ini sebesar 870 $\mu\text{g/ml}$ dalam masa inkubasi 6 hari dan nilainya berbeda tidak nyata dengan yang ditumbuhkan pada 3% BK dalam waktu inkubasi yang sama. Ketika masa inkubasi diperpanjang sampai dengan 10 hari, kadar protein ekstraseluler menurun menjadi 275 $\mu\text{g/ml}$. Nilai ini lebih besar dari yang dilaporkan oleh



Nurdiani (1997) yaitu 123,9 µg/ml pada inkubasi 10 hari.

Protein ekstraseluler tidak hanya merupakan hasil ekskresi dari cendawan, akan tetapi dapat berupa protein terlarut yang berasal dari bungkil kelapa. Menurut Takeshi *et al* (1984), bungkil kelapa mengandung 20% protein dan 60% karbohidrat dalam bentuk galaktomanan (61%), manan (26%) dan selulosa (13%). Namun protein terlarut akan menurun selama periode inkubasi karena mungkin protein ini akan digunakan untuk pertumbuhannya (Purwadaria *et al.* (1998). Selain itu sumber N juga mungkin berpengaruh terhadap nilai protein ekstraseluler. Menurut Nurdiani (1997) penambahan baktipepton atau ekstrak khamir sebagai sumber N pada media produksi enzim meningkatkan kadar protein ekstraseluler.

Aktivitas spesifik tertinggi ditunjukkan oleh *E. javanicum* yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi 3% BK dalam masa inkubasi 10 hari. Aktivitas spesifik semua isolat *P. sanguinis* lebih rendah daripada *E. javanicum*. Hal ini menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil proporsi protein yang berupa mananase. Meskipun demikian kadar protein ekstraseluler *P. sanguinis* lebih besar daripada *E. javanicum*. Terdapat kemungkinan protein ekstraseluler *P. sanguinis* bukan berupa mananase. Hasil penelitian ini juga menunjukkan selain aktivitas spesifik tertinggi, *E. javanicum* menunjukkan aktivitas mananase tertinggi pula. Oleh sebab itu, *P. sanguinis* kurang tepat jika hanya dikembangkan menjadi penghasil mananase.

KESIMPULAN

Konsentrasi substrat yang optimum untuk produksi mananase dari *Pycnoporus sanguinis* adalah 1% bungkil kelapa, dengan masa inkubasi optimum bervariasi, 8 hari untuk *P. sanguinis* 24 dan 10 hari untuk *P. sanguinis* 48 dan 49.

Aktivitas mananase dan aktivitas spesifik dari *P. sanguinis* lebih rendah daripada *E. javanicum*. Oleh sebab itu *P. sanguinis* kurang tepat jika hanya dikembangkan menjadi penghasil mananase.

DAFTAR PUSTAKA

- Araujo, P. & O. P. Ward.** 1990a. Extracellular mannanase and galactanase from selected fungi. *J. Ind. Microbiol.* 6 : 171-178.
- Araujo, A. & O.P. Ward.** 1990b. Hemicellulases of *Bacillus* species : Preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. *J. Appl. Bacteriol.* 68 : 253-261.
- Ariwibowo, T.** 1996. Aktivitas lignolitik dan selulolitik *Ganoderma* spp. serta uji ketergantungan aktivitas lignolitiknya terhadap selulosa. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA IPB, Bogor.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 209-217.
- Haryati, T., T. Purwadaria, J. Darma, & B. Tangendjaja.** 1995. Production of extracellular glycosidases by *Eupenicillium javanicum* and *Aspergillus niger* NRRL 337 on the coconut meal substrate. in Asril Darussamin, IP. Kompang, Sugiono Moeljopawiro. *Current Status of Agricultural Biotechnology in Indonesia.* Vol 3 : *Animal Husbandry and Mycrobies.* 517-522.
- Hashimoto, Y. & Fukumoto, J.** 1969. Studies on the enzyme treatment of coffee beans. Purification of mannanase of *Rhizopus niveus* and its action on coffee mannan. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 43. 317-322.
- Iriani, N., T. Purwadaria, T. Haryati & J. Darma.** 1995. Produksi mannanase beberapa isolat kapang mananolitik pada substrat bungkil kelapa, hlm. 474-480. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II, Bogor.
- Johnson, K. G.** 1990. Exocellular β -mannanase from hemicellulolytic fungi. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 6 : 209-21

Lowe, D. A. 1992. Fungal enzymes. Industrial Division. Bristol. Nyers squibb Company, New York. In Dllip K Arora, Richard G.E. , K.G. Mukerji. *Handbook of Applied Mycology*. Vol 4 : Fungal Biotechnology. New York.

McCleary, B. V. & N. K. Matheson. 1986. Enzymic analysis of polysaccharide structure. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 44 : 147-187.

Nurdiani, D. 1997. Penetapan aktivitas lignoselulolitik *Pycnoporus sanguinis* dan *Schizophyllum commune*. Skripsi. Jurusan Biologi. FMIPA. IPB. Bogor.

Pelczar, Michael J. dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan Ratna siri Hadioetomo *et al.* UI Press, Jakarta.

Puwadaria, T., T. Haryati & J. Darma. 1994. Isolasi dan seleksi kapang mesofilik penghasil mananase. *Ilmu dan Peternakan.* 7 : 27-29.

Purwadaria, T., T. Haryati & Budi Tangenjaya. 1998. Optimation of mannanase production on submerged culture of *Eupenicillium javanicum* and enzyme characterization. *In press.*

Takeshi, R.I., Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakam, A. Maekaw & T. Suzuki. 1984. Purification and properties of mannanases from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* 48 (9) : 2189-219

Torrie, J.P., D.J. Senior, & J. N. Saddler. 1990. Production of β -mannanase by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 34 : 303-307

Zamora, A.F., M.R. Calapardo, K.P. Rosario, E.S. Luis & I.F. Dalmaco. 1989. Improvement of copra meal quality for use in animal feeds. Proc. *FAO/UNDP Workshop on Biotechnology in Animal Production and Health in Asia and America Latin.* Pp : 312-320.



@Hak cipta milik IPB University

LAMPIRAN

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel Lampiran 1. Komposisi media dan pereaksi dalam 1 liter larutan yang digunakan dalam penelitian

Nama Pereaksi/media	Komposisi	
Extract Malt Peptone	Malt ekstrak	30 g
	Pepton	5 g
	Agar	15 g
Mineral Steiner	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.5% (b/v)
	KH ₂ PO ₄	0.13% (b/v)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05% (b/v)
	TE ₁ (unsur perunut 1)	0.10% (v/v)
	TE ₂ (unsur perunut 2)	0.10% (v/v)
Larutan TE ₁	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.10%
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.35%
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.20%
Larutan TE ₂	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.50%
	Tween	0.22% (v/v)
Pereaksi DNS	NaOH	10 g
	K-Na-tartrat	182 g
	DNS	10 g
	Fenol	2 g
	Na-Sulfit	0.5 g
Pereaksi Protein	Coomasie Brilliant Blue	100 mg
	Etanol	50 ml
	H ₃ PO ₄	100 ml

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Tabel Lampiran 2. Analisis sidik ragam aktivitas mananase pada media bungkil kelapa

Sumber	DF	JK	KT	F Value	Pr > F
Konsentrasi	1	145.85	145.85	1137.86**	0.0001
Isolat	3	451.77	150.59	1174.5**	0.0001
Inkubasi	3	528.15	176.05	1373.49**	0.0001
Konsentrasi*Isolat	3	82.36	27.12	211.58**	0.0001
Konsentrasi*Inkubasi	3	49.16	16.39	127.85**	0.0001
Isolat*Inkubasi	9	141.17	15.69	122.38**	0.0001
Konsentrasi*Isolat*Inkubasi	9	200.01	22.22	173.38**	0.0001

Keterangan : ** = berbeda nyata pada taraf 0.05

Tabel lampiran 3. Analisis sidik ragam protein ekstraselular pada media bungkil kelapa

Sumber	Df	JK	KT	F value	Pr > F
Konsentrasi	1	1114350.51	111450.51	3185.47**	0.0001
Isolat	3	218994.28	729983.09	2086.72**	0.0001
Inkubasi	3	923164.61	307721.54	879.65**	0.0001
Konsentrasi*Isolat	3	1788525.78	596175.26	1704.22**	0.0001
Konsentrasi*Inkubasi	3	424062.95	141354.32	4044.07**	0.0001
Isolat*Inkubasi	9	1470249.09	163361.01	466.98**	0.0001
Konsentrasi*Isolat*Inkubasi	9	1126606.26	125178.47	357.83**	0.0001

Keterangan : ** = berbeda nyata pada taraf 0.05

Tabel lampiran 4. Analisis sidik ragam aktivitas spesifik pada media bungkil kelapa

Sumber	Df	JK	KT	F value	Pr>F
Konsentrasi	1	1779.66	1779.66	1370.16**	0.0001
Isolat	3	6317.77	2105.92	1621.34**	0.0001
Masa inkubasi	3	1066.49	355.49	273.69**	0.0001
Konsentrasi*Isolat	3	7369.59	2456.53	1891.28**	0.0001
Konsentrasi* inkubasi	3	568.62	189.54	145.93**	0.0001
Isolat*Inkubasi	9	1936.44	215.16	165.65**	0.0001
Konsentrasi*Isolat*inkubasi	9	2802.63	311.40	239.75**	0.0001

Keterangan : ** = berbeda nyata pad

Tabel lampiran 5. Aktivitas mananase, kadar protein dan aktivitas spesifik *P. sanguinis* dan *E. javanicum* pada media yang mengandung bungkil kelapa 1% dan 3%

Konsentrasi bungkil kelapa	Isolat	Masa Inkubasi (hari)	Aktivitas Enzim U/ml	Kadar protein µg/ml	Aktivitas spesifik U/mg protein
1%	<i>P. sanguinis</i> 24	4	0.022 ^g	290 ^{lg}	0.077 ^g
1%		6	0.022 ^g	870 ^d	0.025 ^g
1%		8	1.312 ^d	260 ^{lgh}	5.046 ^d
1%		10	0.754 ^{lg}	275 ^{lgh}	2.742 ^{et}
1%	<i>P. sanguinis</i> 48	4	0.046 ^g	270 ^{lgh}	0.170 ^g
1%		6	0.002 ^g	267 ^{lgh}	0.007 ^g
1%		8	0.154 ^g	273 ^{lgh}	0.564 ^{lg}
1%		10	1.194 ^{de}	278 ^{lgh}	4.295 ^{ed}
1%	<i>P. sanguinis</i> 49	4	0.036 ^g	297 ^l	0.121 ^g
1%		6	0.45 ^{lg}	259 ^{gh}	1.737 ^{lg}
1%		8	0.911 ^{def}	273 ^{lgh}	3.337 ^{ed}
1%		10	1.492 ^d	291 ^{lg}	5.127 ^d
1%	<i>E. javanicum</i>	4	0.506 ^g	271 ^{lgh}	1.867 ^{lg}
1%		6	0.004 ^g	273 ^{lgh}	0.015 ^g
1%		8	0.009 ^g	290 ^{lg}	0.031 ^g
1%		10	0.042 ^g	250 ^h	0.168 ^g
3%	<i>P. sanguinis</i> 24	4	0.082 ^g	352 ^e	0.233 ^g
3%		6	0.072 ^g	877 ^d	0.082 ^g
3%		8	0.556 ^{etg}	953 ^c	0.583 ^{lg}
3%		10	0.139 ^g	283 ^{lgh}	0.491 ^g
3%	<i>P. sanguinis</i> 48	4	0.317 ^{lg}	280 ^{lgh}	1.132 ^{lg}
3%		6	0.142 ^g	270 ^{lgh}	0.526 ^g
3%		8	0.018 ^g	258 ^{gh}	0.070 ^g
3%		10	0.031 ^g	302 ^l	0.103 ^g
3%	<i>P. sanguinis</i> 49	4	0.057 ^g	1264 ^a	0.045 ^g
3%		6	0.688 ^{lg}	1251 ^a	0.550 ^{lg}
3%		8	1.455 ^d	1034 ^b	1.407 ^{lg}
3%		10	0.233 ^g	250 ^h	0.932 ^{lg}
3%	<i>E. javanicum</i>	4	0.516 ^{lg}	271 ^{lgh}	1.904 ^{fg}
3%		6	11.181 ^c	273 ^{lgh}	40.956 ^c
3%		8	15.934 ^a	290 ^{lg}	54.945 ^b
3%		10	15.298 ^b	250 ^h	61.140 ^a

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Hasil aktivitas enzim

Tabel lampiran 6 Aktivitas enzim mananase yang diproduksi oleh *P. sanguinis* 48 dan 49 dengan masa inkubasi 10 dan 12 hari

Konsentrasi BK	Isolat	Masa inkubasi	Aktivitas enzim U/ml	Kadar protein $\mu\text{g/ml}$	Aktivitas spesifik U/mg protein
1%	<i>P. sanguinis</i> 48	10	1.194 ^a	278 ^b	4.295 ^a
1%	<i>P. sanguinis</i> 48	12	0.032 ^b	273 ^b	0.116 ^b
1%	<i>P. sanguinis</i> 49	10	1.492 ^a	291 ^b	5.127 ^a
1%	<i>P. sanguinis</i> 49	12	0.188 ^b	357 ^a	0.540 ^b

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.