

Isolasi Bakteri Mananolitik dan Karakterisasi Mananasenya

Isolation of Mananolitic Bacteria and Characterization of Its Mannanase

Anja Meryandini*, Rizky Anggreandari, Nisa Rachmania

Departemen Biologi, FMIPA IPB Gedung Fapet Lt 5 Wing 1 Kampus Darmaga Institut Pertanian Bogor
E-mail: ameryandini@yahoo.com*Penulis untuk korespondensi

Abstract

Isolate RA05 has the highest mannanolytic index and mannanase activity which isolated from copra soil waste from Pasaman, West Sumatra. The best growth condition that produces best mannanase activity of isolate RA05 was achieved from 500 ml flask containing 100 ml medium with 100 rpm agitation. Isolate RA05 showed its mannanase activity in medium containing Locust Bean Gum and coconut meal but not in medium containing *kolang kaling*. This mannanase had the highest activity on medium containing 2% of coconut meal with optimum condition temperatur 80°C and pH 2.5. Adding of 5 mM MnCl₂ on the crude enzym increased the activity near 300%. Other kation (Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ dan Co²⁺) did not display great effect on the activity.

Key words: optimasi, karakterisasi, mananase

Diterima: 20 Maret 2007, disetujui: 27 Februari 2008

Pendahuluan

Peningkatan hasil pertanian diikuti pula oleh meningkatnya limbah hasil pertanian yang bila tidak ditangani akan menimbulkan masalah lingkungan. Komponen limbah pertanian umumnya adalah selulosa dan hemiselulosa (xilan dan manan). Salah satu produk pertanian adalah kelapa dengan limbahnya berupa bungkil kelapa. Komponen utama bungkil kelapa adalah manan yang dapat dihidrolisis oleh mananase.

Mananase adalah enzim pengurai manan dan galaktomanan menjadi manosa dan galaktosa. Enzim ini memotong secara acak rantai utama manan dan hetero β -D-manan menjadi gula terlarut yaitu manodekstrin dan manosa (Johnson, 1990). Mananase dapat dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme. Untuk dapat menghidrolisis (hetero) manan, fungi dan bakteri harus menghasilkan sedikitnya 3 jenis enzim yaitu satu mananase (EC 3.2.1.78), satu β -manosidase (EC 3.2.1.25)

dan satu α -galaktosidase (EC 3.2.1.22) (Hilge *et al.*, 1998).

Enzim mannanase dapat dimanfaatkan oleh industri *pulp* dan kertas untuk proses pemutihan sehingga mengurangi pemakaian bahan kimiawi (Johnson, 1990) maupun dalam industri pakan ternak untuk meningkatkan nilai gizi bahan pakan kaya manan seperti bungkil kelapa. Kadar manan yang tinggi pada bungkil kelapa akan melindungi molekul protein sehingga menurunkan nilai ketercernaan protein. Daya cerna protein optimum dapat dicapai bila kandungan manannya diuraikan terlebih dahulu (Purwadaria *et al.*, 1994).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri penghasil mananase dari sampel tanah limbah kopra kabupaten Pasaman Sumatra Barat. Mananase dari isolat terpilih akan dikarakterisasi yang meliputi kondisi pertumbuhan, pH optimum, suhu optimum, penguraian pada substrat berupa galaktomanan, bungkil kelapa, pengaruh kation terhadap aktivitas mananase dan stabilitas enzim.

Metode Penelitian

Isolasi bakteri penghasil mananase

Isolasi bakteri dilakukan dengan melarutkan 1 gram sampel tanah ke dalam 20 ml medium isolasi (0.3% gum locust bean, 0.075% pepton, 0.05% ekstrak khamir, dan campuran mineral menurut Mandels & Sternberg (1976) yaitu 0.14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03% $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.03% CaCl_2 , 0.0005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00016% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.00014% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% CoCl_2), diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator berpenggoyang selama 48 jam kemudian disebar pada medium padat dengan komposisi yang sama.

Pengukuran aktivitas mananase

Uji kualitatif mananase dilakukan dengan mengukur Indeks Mananolitik (IM). IM merupakan nisbah antara diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni. Untuk memperjelas zona bening, larutan Congo Red 0.1% dituang ke atas koloni, didiamkan 15 menit kemudian dicuci dengan larutan NaCl 2 M.

Uji kuantitatif dilakukan dengan menguji aktivitas ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim dipisahkan dari massa sel dengan sentrifugasi pada kecepatan 8400 g selama 15 menit pada suhu 4°C . Aktivitas mananase diukur pada suhu 40°C selama 30 menit dengan metode Dinitrosalisilic Acid (DNS) berdasarkan Purwadaria et al., (1994). Gula pereduksi yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Satu nkat aktivitas mananase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 nmol manosa dalam 1 menit. Kadar protein diukur mengikuti metode Bradford (1976). Aktivitas spesifik mananase ditentukan berdasar kadar protein.

Pengaruh kondisi pertumbuhan

Isolat yang terpilih ditumbuhkan dalam 2 kondisi yang berbeda selama 48 jam. Kondisi A adalah kondisi pertumbuhan pada 100 ml medium manan dalam erlenmeyer 500 ml dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Kondisi B adalah kondisi pertumbuhan pada 200 ml

medium dalam erlenmeyer 500 ml dengan kecepatan agitasi 80 rpm. Pertumbuhan isolat dilakukan dengan mengukur turbiditas sel pada panjang gelombang 620 nm dan aktivitas mananase.

Kondisi pertumbuhan terbaik digunakan untuk optimasi medium. Aktivitas mananase diukur pada medium manan yang mengandung 0,5% Locust Bean Gum atau 0,5% bungkil kelapa atau 0,5% kolang kaling. Aktivitas mananase juga diukur pada berbagai konsentrasi bungkil kelapa (0,5; 1 dan 2%).

Karakterisasi enzim mananase

Ekstrak kasar enzim diujikan pada berbagai pH (2,50-8,50) dengan selang 0,5 unit. Larutan penyangga yang digunakan adalah bufer sitrat fosfat (pH 2,50-5,50) dan bufer fosfat (pH 6,00-8,50) dan pada suhu 30 – 90°C dengan selang 10°C .

Enam jenis kation (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} dan Co^{2+}) yang berasal dari garam CaCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , MgCl_2 , FeSO_4 dan CoCl_2 ditambahkan secara terpisah dengan konsentrasi akhir masing-masing sebesar 1 mM dan 5 mM. Penambahan beberapa jenis kation divalen dilakukan untuk mengetahui pengaruh kation divalen terhadap aktivitas enzim protease yang diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit.

Stabilitas mananase pada suhu dan pH optimum dilakukan dengan menginkubasi ekstrak kasar enzim tanpa substrat selama 5 jam. Aktivitas mananase diuji setiap 1 jam.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri penghasil mananase

Tabel 1 memperlihatkan lima isolat bakteri penghasil mananase yang berhasil diisolasi dari tanah tempat pembuangan limbah kopra di Kabupaten Pasaman Sumatera Barat.

Pengaruh kondisi pertumbuhan

Pertumbuhan isolat RA05 pada kondisi A lebih tinggi daripada kondisi B (Gambar 1). Isolat RA05 pada kondisi A mencapai fase stasioner pada jam ke 16 dan memasuki fase kematian pada jam ke 24, sedangkan pada kondisi B isolat RA05 mencapai fase stasioner

pada jam ke 32 dan memasuki fase kematian pada jam ke 40. Pertumbuhan suatu bakteri dipengaruhi oleh aerasi dan jumlah nutrisi. Kelarutan oksigen dalam air yang rendah dan penggantian oksigen melalui difusi yang berjalan lambat merupakan faktor penghambat bagi bakteri yang hidup secara aerob (Madigan *et al.*, 2006). Volume larutan yang meningkat juga akan menurunkan transfer dan absorpsi oksigen per unit volume medium (Wang *et al.*, 1979). Agitasi merupakan salah satu cara mempercepat penggantian oksigen dalam medium. Adanya aerasi yang baik akan menyebabkan pertumbuhan yang cepat dari

bakteri aerob sehingga mempercepat datangnya fase stasioner pada pertumbuhan dengan sistim tertutup (*batch culture*). Aktivitas mananase diperlihatkan pada Gambar 2. Enzim ekstraseluler sering dikeluarkan pada fase pertumbuhan stasioner. Kondisi A kemudian digunakan sebagai kondisi pertumbuhan pada uji selanjutnya.

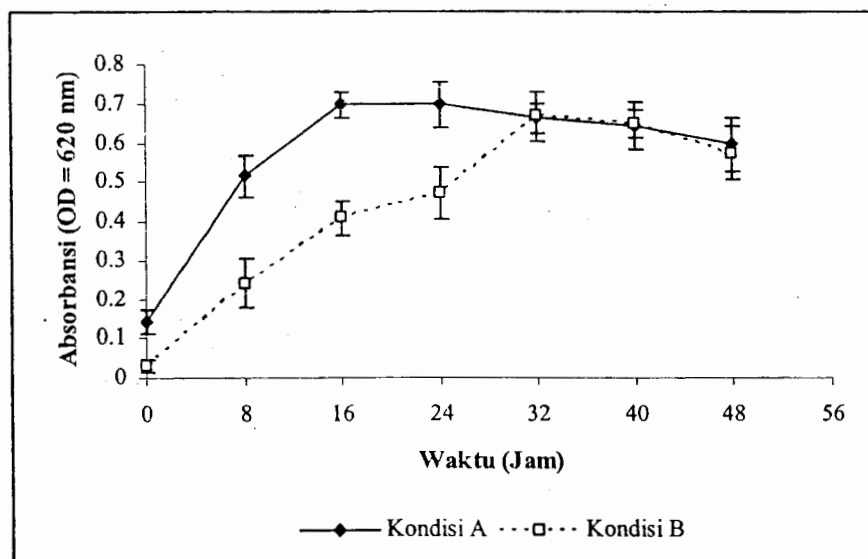
Aktivitas spesifik mananase isolat RA05 pada medium 0,5% bungkil kelapa lebih tinggi 3 nkat/mg daripada aktivitasnya pada medium 0,5% *Locust Bean Gum* (Tabel 2). Mananase isolat RA05 tidak menunjukkan aktivitas pada medium 0,5% kolong kaling.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri penghasil mananase asal tanah tempat pembuangan limbah kopra Kabupaten Pasaman Sumatera Barat

Isolat	Indeks mananolitik	Akt. mananase (nkat/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Akt. Spesifik(nkat/mg)
RA01	0,25	0,74	0,35	2,11
RA02	0,50	1,86	0,37	5,03
RA03	0,25	0,38	0,36	1,06
RA04	0,60	2,58	0,41	6,29
RA05	0,75	2,58	0,32	8,06

Tabel 2. Aktivitas mananase isolat RA05 pada beberapa medium

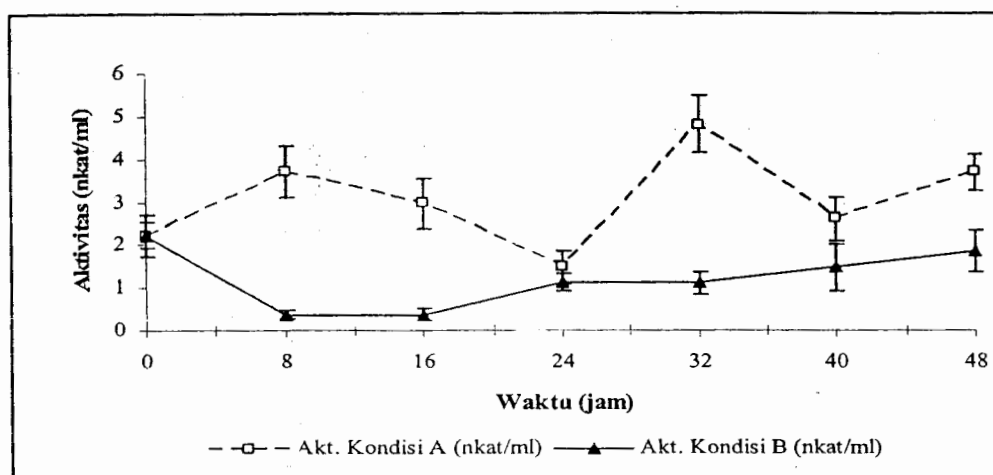
	0,5% <i>Locust Bean Gum</i>	0,5% bungkil kelapa	0,5% kolong kaling
Akt. Mananase (nkat/ml)	2,96 ± 0,7	9,60 ± 1	0
Kadar protein (µg/ml)	29 ± 1,1	91 ± 2	0
Akt. Spesifik (nkat/mg)	102 ± 1,4	105 ± 1,7	0



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat RA05 pada suhu 37°C. Kondisi A kondisi pertumbuhan pada 100 ml medium manan dalam erlenmeyer 500 ml dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Kondisi B adalah kondisi pertumbuhan pada 200 ml medium dalam erlenmeyer 500 ml dengan kecepatan agitasi 80 rpm.

Hal serupa dilaporkan oleh Iriani et al., (1994) pada mananase dari *Eupenicillium javanicum* dan *Aspergillus niger*, namun Sumardi (2004) melaporkan bahwa *Geobacillus stearothermophilus* L-07 menunjukkan aktivitas mananase pada medium yang mengandung *Locust Bean Gum*, kolong kaling dan umbi suweg, namun tidak pada medium yang mengandung bungkil kelapa.

Aktivitas mananase isolat RA05 yang lebih tinggi pada medium yang mengandung bungkil kelapa juga dapat disebabkan viskositas medium 0,5% bungkil kelapa lebih rendah daripada *Locust Bean Gum*. Hal ini membuat oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri lebih baik sehingga akan meningkatkan produksi enzim.



Gambar 2. Kurva aktivitas mananase isolat RA05 pada suhu 40°C dan pH 7,2 pada kondisi pertumbuhan A dan B

Tabel 3. Aktivitas mananase isolat RA05 pada berbagai konsentrasi bungkil kelapa

Konsentrasi: bungkil kelapa (%)	Waktu (jam)	Aktivitas spesifik (nkat/mg)
0,5	0	90,2 ± 0,8
	8	31,8 ± 1,1
	16	105,5 ± 0,7
	24	71,3 ± 0,8
	32	37,5 ± 0,6
	40	60,8 ± 1,2
	48	74,9 ± 1,4
1	0	22,2 ± 0,8
	8	44,4 ± 1,7
	16	61,2 ± 0,4
	24	89,3 ± 1,7
	32	25,5 ± 1,1
	40	71,2 ± 1,8
	48	0
2	0	74,0 ± 1,8
	8	0
	16	48,1 ± 1,1
	24	17,0 ± 1,4
	32	107,1 ± 0,8
	40	63,4 ± 1,3
	48	29,9 ± 1,3

Menurut de Vries dan Visser (2001) kemampuan β -mananase dalam menghidrolisis senyawa galaktomanan tergantung dari jumlah substitusi galaktosa yang terdapat pada rantai samping senyawa galaktomanan. Adanya substitusi galaktosa akan menurunkan aktivitas β -mananase. Bungkil kelapa diketahui mengandung 61% galaktomanan dari 60% karbohidrat serat (Iriani *et al.*, 1994) dan *Locust Bean Gum* mengandung 88% galaktomanan (Belitz dan Grosch, 1987).

Isolat RA05 juga ditumbuhkan pada berbagai konsentrasi bungkil (0,5%, 1%, 2%) (Tabel 3). Aktivitas mananase tertinggi dicapai pada medium 2% bungkil kelapa pada jam ke 32 sebesar 107,1 nkat/mg. Hal ini berkaitan dengan nutrisi yang tersedia dalam medium terhadap pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan yang tinggi akan meningkatkan produksi enzim.

Pengujian pengaruh suhu dilakukan pada medium yang mengandung bungkil kelapa 2% dan dilakukan pada pH 7,2. Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa mananase bakteri ini memiliki aktivitas optimum pada suhu 80°C yaitu sebesar 80,4 nkat/mg, namun enzim ini juga memiliki aktivitas yang cukup tinggi pada suhu 60°C (75,4 nkat/mg) dan 90°C (59,4 nkat/mg).

Adanya beberapa puncak aktivitas pada pengaruh suhu dapat disebabkan oleh bentuk isozim dari enzim ini. Isozim merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi yang sama tetapi menunjukkan sifat fisika dan kimia protein yang berbeda seperti misalnya titik isoelektrik, pH optimum, afinitas substrat atau efek inhibitor (Hames *et al.*, 1997). Berdasarkan suhu aktivitas optimumnya, maka enzim ini tergolong enzim yang termofil walau bakterinya hidup secara mesofil. Umumnya enzim hidrolitik yang dimanfaatkan untuk industri kebanyakan hidup termofil (Atlas, 1997). Meskipun tidak menutup kemungkinan enzim yang mempunyai aktivitas dan stabil pada suhu tinggi juga dapat dieksplorasi dari bakteri mesofil. Enzim mananase termofil juga telah diisolasi dari *Thermotoga neapolitana* 5068 yang mempunyai suhu optimum pada 87°C (Duffaud *et al.*, 1997).

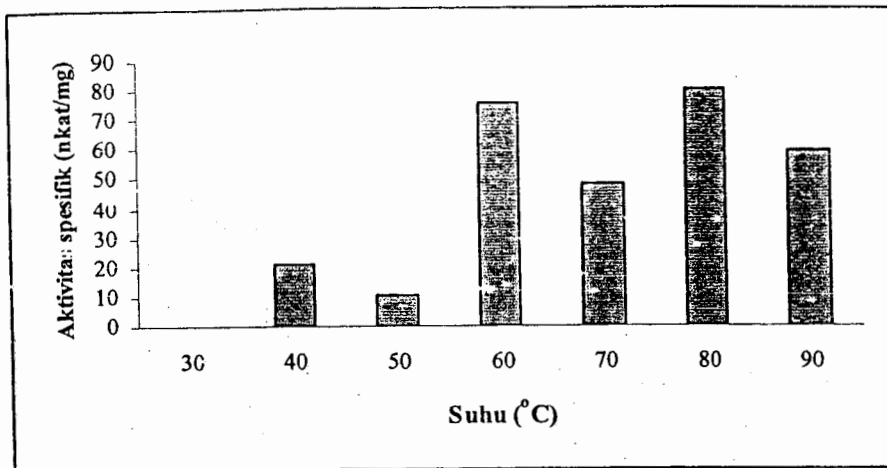
Pengaruh pH terhadap aktivitas mananase dilakukan pada medium produksi

yang mengandung bungkil kelapa 2% dan diinkubasi pada suhu optimum yaitu 80°C. Pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada pH 2,5 yaitu sebesar 314,6 nkat/mg. Enzim mananase isolat ini sangat asam. Enzim mananase yang aktif pada kondisi asam juga telah diisolasi dari *Aspergillus niger* NRRL yaitu 3,2 (Araujo dan Ward, 1990) dan *Sclerotium rolfsii* yang mempunyai pH optimum 2,9 – 3,3 (Gubitz *et al.*, 1996).

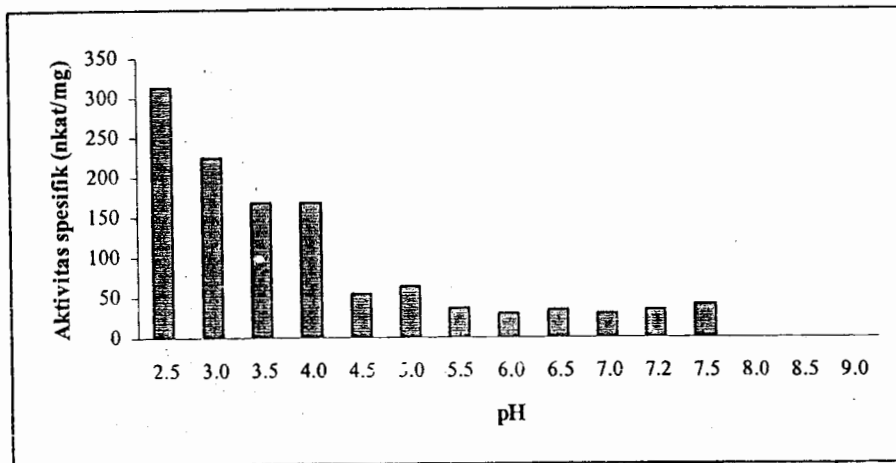
Penambahan beberapa jenis kation divalen dilakukan untuk mengetahui pengaruh kation divalen terhadap aktivitas mananase yang diinkubasi pada suhu dan pH optimum selama 30 menit. Selain itu juga dilakukan uji penambahan inhibitor Na₂EDTA (dinatrium etilen diamina tetraasetat) dengan konsentrasi akhir 1 mM dan 5 mM. Gambar 5 memperlihatkan pengaruh pemberian kation dan EDTA terhadap aktivitas mananase.

Penambahan beberapa kation divalen memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap aktivitas manase. Untuk meningkatkan aktivitasnya, enzim mananase isolat bakteri ini membutuhkan ion Mn²⁺ dan ion Fe²⁺. Penambahan ion Fe²⁺ sedikit meningkatkan aktifitas enzim, namun penambahan ion Mn²⁺ sebesar 5 mM meningkatkan aktivitas hingga hampir 300% (Gambar 5). Enzim mananase *Streptococcus ipomoea* CECT 3341 juga membutuhkan ion Mn²⁺ untuk meningkatkan aktivitasnya namun sangat dihambat oleh ion Ag⁺, Hg²⁺ dan Al³⁺ (Montiel *et al.*, 2002). Mananase isolat RA05 bukan merupakan suatu metaloenzim melainkan suatu enzim yang diaktifkan oleh logam karena penambahan EDTA dengan konsentrasi akhir 1 dan 5 mM hanya akan menurunkan aktivitas sebesar 16,5% dan 27,4%.

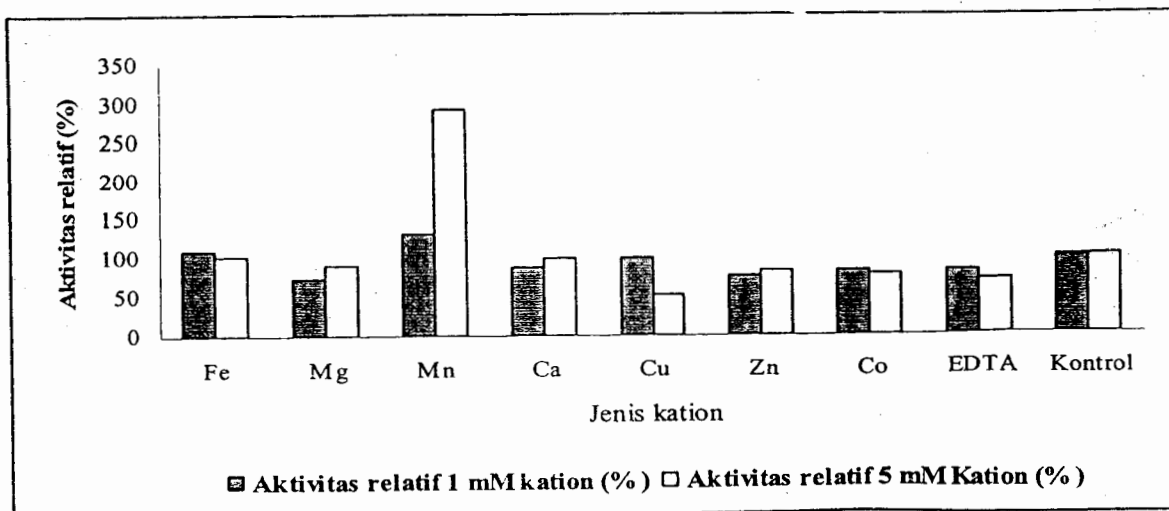
Mananase isolat RA05 stabil sampai 4 jam pada suhu 80°C dan pH 2,5 dengan dan tanpa penambahan kation Mn²⁺ dan kemudian mengalami penurunan pada jam ke 5 (Gambar 6). Menurut Suhartono (1989), stabilitas enzim dipengaruhi oleh kandungan jembatan disulfida dan tingkat interaksi hidrofobik pada molekulnya. Penurunan aktivitas enzim disebabkan oleh denaturasi enzim.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik mananase pada pH 7,2



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik mananase pada suhu 80°C



Gambar 5. Pengaruh beberapa kation divalen 1 mM, 5 mM dan EDTA terhadap aktivitas mananase yang diuji pada suhu 80°C dan pH 2,5

Kesimpulan

Kondisi pertumbuhan dan aktivitas terbaik isolat RA05 adalah dalam 100 ml medium dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Medium yang mengandung bungkil kelapa 2% lebih mampu menginduksi mananase isolat ini. Enzim mananase isolat ini memiliki aktivitas maksimum pada suhu 80°C, pH 2,5 membutuhkan ion Mn^{2+} sebesar 5 mM dan stabil selama 4 jam. Enzim ini tidak dapat mendegradasi kolang kaling.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar dengan kontrak nomor 63/P2IPT/DPPM/PID/III/2004 tahun 2004. Terima kasih kepada Dr. Tresnawati Purwadaria untuk diskusinya.

Daftar Pustaka

- Atlas, R.M. 1997. *Principles of Microbiology*. New York: WBC MC Graw Hill Company.
- Araujo, A. and Ward, O.P. 1990. Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi. *J. Industrial Microbiol.* 6: 171-178.
- Belitz, H.D. and Grosch, W. 1987. *Food Chemistry*. Springer Verlag.
- 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: 248-254.
- de Vries, R.P. and Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 497-522.
- Duffaud, G.D., McCutchen, C.M., Leduc, P., Parker, K.N. and Kelly, R.M. 1997. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neopolitana* 5068. *Appl. and Environmental Microbiol.* 63 (1): 169-177.
- Gubitz, G.M., Hayn, M., Sommerauer, M. and Steiner, W. 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: characterization and synergism of two endo β -mannanases and a β -mannosidase. *Bioresource Technol.* 58: 127-135.
- Hames, B.D., Hooper, N.M. and Houghton, J.D. 1997. *Instant Notes in Biochemistry*. Guildford: BIOS Scientific.
- Hilge, M., Gloor, S.M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T.D., Zimmermann, W., Winterhalter, K. and Piontek, K. 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable mannanase from *Thermomonospora fusca*-substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. Research article, Netherlands.
- Iriani, N., Purwadaria, T., Haryati, T. dan Darma, J. 1994. Produksi mananase beberapa isolat kapang mananolitik pada substrat bungkil kelapa. *Pross. Sem. Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi*; Cibinong. hlm 474-479.
- Johnson, K.G. 1990. Extracellular β -mannanases from hemicellulolytic fungi. *W. J. Microb. Biotechnol.* 6: 209-217.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed ke 10. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Mandels M., Sternberg D. 1976. Recent advances in cellulase technology. *Ferment Technol* 54:267-286.
- Montiel, M.D., Hernandez, M., Rodriguez, J., Arias, M.E. 2002. Evaluation of an endo- β -mannanase produced by *Streptomyces iponoea* CFCT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 67-72.
- Purwadaria, T., Haryati, T. and Darma, J. 1994. Isolasi dan seleksi kapang mesofilik penghasil mananase. *J. Ilmu dan Peternakan* 7: 26-29.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Sumardi. 2004. Isolasi, karakterisasi dan produksi β -mannanase ekstraseluler dari *Geobacillus stearothermophilus* L-07. *Disertasi*. Bogor: Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunhill, P., Humphrey, A.E. and Lilly, M.D. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. Kanada: John Wiley & Sons.