

DETEKSI ENZIM *CELLOBIOSE DEHYDROGENASE* (CDH) DARI FUNGI *Trametes versicolor*

Desriani¹, Syamsul Falah², Maria Bintang², Dwi Endah Kusumawati², Wiwit Amrinola¹,
Neneng Hasanah¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Cibinong, 16911

²Departemen Biokimia, FMIPA IPB Dramaga Bogor, 16680

E-mail : gerodes@yahoo.com

ABSTRAK

Trametes versicolor merupakan salah satu fungi pendegradasi kayu dari golongan white rot fungi yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraseluler, yaitu cellobiose dehydrogenase (CDH). Enzim CDH memiliki dua domain, yaitu domain flavin dan domain heme yang dihubungkan oleh 25 asam amino yang kaya akan serin dan treonin. Penelitian ini bertujuan mendeteksi CDH yang dihasilkan oleh *T. versicolor* baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Deteksi CDH dilakukan melalui empat tahap, yaitu: uji kualitatif enzim ekstraseluler, produksi CDH pada media cair, pengukuran aktivitas CDH menggunakan DCIP sebagai akseptor elektron dan selobiosa sebagai substrat, serta analisis bobot molekul CDH dengan elektroforesis SDS-Page. Hasil penelitian menunjukkan terbentuknya zona bening disekitar fungi setelah perlakuan congo red dan NaCl yang mengindikasikan bahwa *T. versicolor* menghasilkan enzim ekstraseluler. Produksi CDH dilakukan dengan menumbuhkan fungi di media YPD dan media minimal guna menginduksi produksi CDH. Pengukuran aktivitas enzim CDH belum berhasil dilakukan dan berdasarkan hasil SDS-PAGE, sebagian besar enzim CDH dari *T. versicolor* dihasilkan dalam bentuk domain flavin.

Kata kunci : Cellobiose dehydrogenase, SDS-Page, *Trametes versicolor*

PENDAHULUAN

Proses degradasi kayu melibatkan berbagai jenis mikroba, salah satunya adalah fungi. Fungi pendegradasi kayu terdiri atas tiga kelompok, yaitu *white rot fungi*, *soft rot*, dan *brown rot fungi*. Salah satu organisme pendekomposer kayu dari kelompok *white rot fungi* adalah *Trametes versicolor*. Kemampuan *T. versicolor* dalam mendegradasi lignin disebabkan oleh enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh fungi tersebut (Hatakka 1994).

Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *T. versicolor*. Enzim ini terdiri atas dua domain, yaitu: domain flavin pada C-terminal dan domain heme tipe sitokrom b pada N-terminal yang dihubungkan oleh suatu linker yang sensitif terhadap protease dan kaya akan asam amino serin dan treonin. Domain heme berfungsi mentransfer elektron dari domain flavin ke akseptor elektron eksternal. Enzim CDH mengkatalisis reaksi oksidasi dari selobiosa (Glc- β -1,4-Glc) dan ikatan- β -1,4 dari disakarida atau oligosakarida pada posisi C-1 menjadi bentuk lakton (Hallberg *et al.*, 2002). Enzim CDH yang dihasilkan oleh *T. versicolor* memiliki bobot molekul sekitar 79324 Da untuk bentuk kompleks sedangkan domain flavinnya memiliki bobot molekul sekitar 58393 Da (Dumonceaux *et al.*, 1998), pl sebesar 4.2, pH optimum 5 dengan temperatur optimum sebesar 50 °C (Roy *et al.*, 1996).

Enzim CDH yang diproduksi oleh *T. versicolor* diketahui efektif mendegradasi senyawa kompleks (selulosa, hemiselulosa, dan lignin) yang banyak terdapat pada tanaman (Eriksson *et al.*, 1990). Secara *in vivo*, fungsi enzim ini tidak terlalu jelas, namun CDH terlibat dalam proses degradasi dua biopolimer, yaitu selulosa dan lignin. CDH dapat mereduksi Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ dengan bantuan H₂O₂, menghasilkan hidroksi radikal yang sangat reaktif menyerang lignin dan selulosa (Henrikson *et al.*, 1995).

Enzim CDH banyak diaplikasikan dalam bidang pangan, kesehatan, dan tujuan industri. Enzim ini dapat diaplikasikan di biosensor yang dapat digunakan untuk mendeteksi pangan berlaktosa. Hal ini sangat membantu bagi penderita *lactose intolerance*. Enzim CDH juga dapat diaplikasikan pada proses *bleaching pulp* di industri pembuatan kertas (Henriksson *et al.* 2000). Selain



itu, enzim CDH juga telah dimanfaatkan sebagai campuran dalam persiapan pakan ternak karena kemampuannya dalam mendegradasi selulosa dan lignin melalui mekanisme Fenton (Desriani *et al.*, 2012).

Mengingat manfaat dari enzim CDH yang dihasilkan oleh fungi tersebut, maka penelitian ini bertujuan mendeteksi enzim ekstraseluler khususnya CDH yang dihasilkan oleh *T. versicolor* baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Kondisi media yang sesuai akan mendukung pertumbuhan fungi dan menginduksi pembentukan enzim CDH.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus 2012 di Laboratorium untuk Aplikasi Kesehatan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong dengan tahapan penelitian sebagai berikut:

Peremajaan dan Pemeliharaan Kultur *T. versicolor*. Stok kultur *T. versicolor* (NBRC 4937) diremajakan ke cawan petri berisi media PDA dan agar miring PDA lalu diinkubasi pada suhu ruang.

Uji Kualitatif Enzim Ekstraseluler. Kultur *T. versicolor* ditumbuhkan pada media CMC lalu diinkubasi pada suhu 37 °C. Komposisi media CMC yaitu: CMC bubuk, *yeast extract*, glukosa, MgSO₄·7H₂O, KNO₃, K₂HPO₄, FeSO₄·7H₂O, CaCl₂. Setelah dua hari, larutan *congo red* 0.1% dituang ke cawan petri lalu didiamkan selama 30 menit. Setelah itu, dibilas dengan NaCl 2% selama 15 menit dan diulang sebanyak tiga kali. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya degradasi substrat oleh enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *T. versicolor*.

Produksi Enzim CDH dari *Trametes versicolor* (Desriani *et al.* 2012). Kultur pada PDA dipindahkan ke media YPD cair (1% *yeast extract*, 2% tripton, dan 2 % glukosa) dan *dishaker* pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah itu, kultur di media YPD dipindahkan ke media minimal kemudian *dishaker* kembali pada suhu ruang hingga hari pengambilan sampel untuk pengukuran aktivitas enzim CDH.

Pengukuran Aktivitas Enzim CDH. Supernatan kultur *T. versicolor* dipisahkan dari pelet sel dengan sentrifugasi 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan amonium sulfat 80%. Aktivitas enzim CDH diukur menggunakan 2,6-dikloriodofenol (DCIP) dalam buffer asetat 0.1 M pH 5.05 lalu ditambahkan 1% selobiosa sebagai substrat. Setelah itu, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm.

Analisis elektroforesis SDS-Page

Sebanyak 40 µL sampel yang berupa larutan enzim ditambahkan dengan 40 µL *loading dye* 2x, kemudian dihomogenkan dan dididihkan selama 10 menit. Setelah itu, dibiarkan dingin pada suhu ruang. Sebanyak 10 µL sampel dimasukkan ke dalam masing-masing sumur. Setelah itu, alat dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 200 volt. Proses pemisahan berlangsung selama 25 menit. Proses pewarnaan gel dilakukan menggunakan *Coomassie Blue*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Peremajaan dan Pemeliharaan Kultur *T. versicolor*

Pemeliharaan kultur *T. versicolor* pertama kali dilakukan pada media PDA sebagai media umum pertumbuhan fungi. Kultur dari stok diremajakan ke cawan petri dan agar miring pada tabung reaksi yang berisi media PDA. Berdasarkan hasil pengamatan, miselium *T. versicolor* berwarna putih (Gambar 1), dan pengukuran diameter hifa sebagai parameter pertumbuhan fungi dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Pengamatan diameter hifa *T. versicolor* pada media PDA (cm)

Tempat Tumbuh	Hari ke-						
	2	3	4	5	6	7	8
Cawan petri 1	2.2	3.7	5.3	7.2	7.5	8.5	9
Cawan petri 2	2.6	4.2	6	7	8	8.7	9



Tabung reaksi 1	2.2	3.6	4.5	6.9	7.6	*	*
Tabung reaksi 2	2	3.7	4.9	6.6	8.1	*	*
Tabung reaksi 3	1.8	3.2	4	6.4	6.5	7	7.7

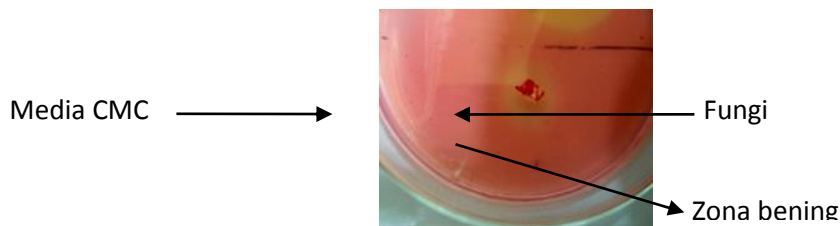
Keterangan : (*) artinya kultur dipindahkan ke media YPD



Gambar 1. Pemeliharaan kultur pada media PDA

2. Uji Kualitatif Enzim Ekstraseluler

Salah satu cara untuk mendeteksi adanya enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh suatu organisme tertentu yaitu menggunakan media CMC. Media CMC bertindak sebagai media selektif untuk pertumbuhan fungi selulolitik. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa selulosa yang terdapat di dalam media dapat didegradasi oleh enzim menjadi senyawa yang sederhana yaitu selobiosa lalu disederhanakan menjadi dua molekul glukosa yang dapat diserap oleh sel (Perez *et al.*, 2002).



Gambar 2. Terbentuknya zona bening disekitar fungi

Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas selulolitik oleh enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *T. versicolor* ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening pada medium (Gambar 2). Zona bening yang terbentuk divisualisasikan dengan cara menuang larutan *congo red* 0.1% dan dibiarkan selama 30 menit. Menurut Teather dan Wood (1982), *congo red* memiliki interaksi yang kuat dengan polisakarida yang memiliki ikatan β -1,4 (dalam hal ini selulosa) sehingga apabila selulosa yang terdapat pada media telah terdegradasi, maka daerah tersebut tidak akan terwarnai oleh *congo red* dan akhirnya membentuk zona bening. Larutan NaCl 2% berfungsi mengurangi kepekatan warna *congo red* pada media sehingga zona bening yang terbentuk akan lebih jelas. Selain itu, larutan NaCl 2% akan menghentikan aktivitas enzim selulolitik dalam mendegradasi substrat (Teather dan Wood, 1982).

3. Produksi Enzim CDH dari *T. versicolor*

Produksi enzim CDH dilakukan pada media cair. Mula-mula kultur pada agar miring PDA dipindahkan ke media kaya YPD yang bertujuan memperbanyak biomassa selnya. Hasil pemeliharaan kultur pada media cair yaitu berupa gumpalan bulat yang ukurannya bervariasi (Gambar 3). Setelah tiga hari, kultur kembali dipindahkan ke media minimal yang mengandung selulosa yang bertindak sebagai inducer bagi pembentukan enzim CDH. Perubahan warna media dari putih kekuningan hingga menjadi kuning transparan (Gambar 4) menandakan fungsi *T. versicolor* yang aktif memanfaatkan substrat. Selain itu, warna kuning pada media juga disebabkan oleh adanya domain flavin, sehingga kedua hal tersebut dapat menjadi indikasi terbentuknya enzim CDH.



Gambar 3. Pemeliharaan kultur pada media YPD



Hari ke-1

Hari ke-2

Hari ke-3

Hari ke-4

Hari ke-



Hari ke-6



Hari ke-7

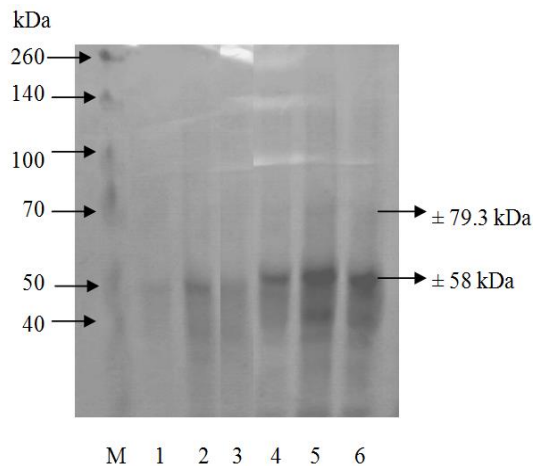
Gambar 4. Pemeliharaan kultur pada media minimal

4. Pengukuran Aktivitas Enzim CDH

Pengukuran aktivitas enzim CDH dilakukan berdasarkan reaksi oksidasi selobiosa sebagai substrat dan reduksi DCIP (Watermark dan Eriksson 1975), kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 525 nm. Pengukuran aktivitas enzim CDH pada hari pertama hingga hari kesebelas belum menunjukkan adanya aktivitas. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya enzim *laccase* yang mereoksidasi kembali akseptor elektron bagi CDH, yaitu DCIP yang tereduksi (Baminger *et al.*, 1999) sehingga menyebabkan aktivitas CDH menjadi tersembunyi atau tidak terukur (Roy dan Archibald, 1994). Serangkaian percobaan dengan menambahkan 10 μ M sodium azida maupun 4 mM NaF sebagai inhibitor spesifik bagi enzim *laccase* (Baminger *et al.*, 1999) juga telah dilakukan, namun aktivitas enzim CDH masih belum terdeteksi.

5. Analisis Elektroforesis SDS-PAGE

Analisis enzim CDH selanjutnya dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE. Berdasarkan hasil SDS-PAGE, enzim CDH yang diperoleh dari *T. versicolor* dihasilkan dalam bentuk kompleks dengan bobot molekul sekitar 79.3 kDa dan domain flavin dengan bobot molekul sekitar 58 kDa (Gambar 8).



Gambar 8. Hasil elektroforegram enzim CDH yang diisolasi dari *T.versicolor*; (M) adalah marker, (1) sampel hari ke-4, (2) sampel hari ke-5, (3) sampel hari ke-6, (4) sampel hari ke-7, (5) sampel hari ke-10, dan (6) sampel hari ke-11.

Akan tetapi, sebagian besar enzim CDH dihasilkan dalam bentuk domain flavin. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya aktivitas protease yang dapat memotong daerah linker pada struktur CDH sehingga bentuk kompleks enzim terdegradasi dan menyisakan domain flavin saja. Selain itu, domain heme dari enzim tersebut tidak terikat secara kovalen sehingga mudah terdegradasi oleh protease (Habu *et al.*, 1993).

KESIMPULAN DAN SARAN

Enzim *cellobiose dehydrogenase* (CDH) yang diperoleh dari fungi *T. versicolor* berhasil dideteksi secara kualitatif di dalam media CMC dan diproduksi di dalam media YPD dan minimal. Pengukuran aktivitas enzim CDH belum berhasil dilakukan dan berdasarkan hasil SDS-PAGE, sebagian besar enzim CDH dari *T. versicolor* dihasilkan dalam bentuk domain flavin. Perlu dilakukan optimasi metode pengukuran aktivitas enzim CDH dari *wild type fungi T. versicolor* dalam berbagai kondisi.

DAFTAR PUSTAKA

- Barninger U, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D. 1999. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase in the presence of laccase. *J. Microbiol Meth* 35:253-259.
- Desriani *et al.* 2012. Isolation and screening of fungi producing cellobiose dehydrogenase: "Enzymes for Animal Feed Preparation Based on Enzymatic Process". *IJBPS* 3 (1):576-580.
- Dumonceaux *et al.* 1998. Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene* 210:211-219.
- Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P. 1990. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Berlin: Springer Verlag.
- Habu NM, Samejima M, Dean JFD, Eriksson KE. 1993. Release of the FAD domain from cellobiose oxidase by protease from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 327:161:164.
- Hallberg BM, Henriksson G, Pettersson G, Divne C. 2002. Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *Journal Molecular Biology* 315:421-434.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol* 13:125-135.
- Henriksson G, Ander P, Petersson B, Petersson G. 1995. Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as wood-degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan and lignin synthetic. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 42:792-796.



- Henriksson G, Johansson G, Pettersson G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology* 78: 93-113.
- Perez J, Dorado JM, Rubia T, Martinez J. 2002. Biodegradation and biochemical treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: an overview. *Int Microbiol* 5:53-63.
- Roy BP, Archibald F. 1994. An indirect free radical-based assay for the enzyme cellobiose:quinone oxidoreductase. *Anal. Biochem* 216:291–298.
- Teather RM, Wood PJ. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43:777-780

DISKUSI

Penanya 1 : Agus Muji Santoso

Pertanyaan :

Bagaimana cara mendapatkan enzim ekstraseluler CDH? Bagaimana mengatasi hasil negatif saat pengukuran dan mendapatkan enzim untuk dilihat pola proteinnya?

Jawaban :

Enzim ekstraseluler CDH dikeluarkan oleh *I. versicolor* ke media guna mendegradasi substrat yang ada untuk keperluan hidupnya. Pada penelitian ini digunakan media minimal guna menginduksi dihasilkannya enzim ekstraseluler CDH.

Untuk mengatasi hasil negatif saat pengukuran adalah menggunakan inhibitor laccase yaitu 4mM NaF atau 10mikro M sodium azida, namun aktivitas enzim masih belum terukur.

