

AKTIVITAS CMC-ase KHAMIR *Candida* sp. YANG DIISOLASIDARITANAH KEBUN BIOLOGI WAMENA, PAPUA

[CMC-ase Activity of Yeast *Candida* sp., Isolated from Soil of
Wamena Biological Gardens, Papua]

Atit Kanti,  Made Sudiana dan HJD Latupapua

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi - LIPI
Jl. Juanda 18 Bogor 16122, Telp. 0251-324006. Fax: 0251-325854.
E-mail: atitkanti@yahoo.com

ABSTRACT

Cellulolytic *Candida* sp. was isolated from Wamena, Papua. The strain was able to grow in media with carboxymethyl cellulose as a sole carbon source implying that the isolate produced 1-3 oc endo-gluconase. To study the effect of glucose and osmotic pressure on 0.1% glucose and 0.1% NaCl were augmented to CMC-contained media. Glucose augmentation affects cellulolytic activity of culture, probably due to higher biomass production in media. NaCl addition appear not to affect cellulolytic ability. Profile of pH also varied depend on the cultivation media. Maximum growth rate was achieved when glucose was added which was implying that glucose stimulate cell growth.

Kata kunci/Keywords: Selulolitik/Cellulolytic, *Candida*, CMC-ase, Khamir/Yeast, Kebun Biologi WamenaAVamena Biological Gardens.

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini banyak penelitian ditujukan kepada pengungkapan keragaman flora, fauna dan mikroba Indonesia Bagian Timur, terutama daerah Papua. Daerah Timur Indonesia diyakini memiliki keragaman hayati (biodiversitas) yang tinggi. Peranan mikroba dalam degradasi senyawa organik banyak mendapat perhatian. Namun pengamatan terhadap mikroba dari golongan khamir belum banyak diungkapkan. Jenis *Candida* misalnya, diketahui sebagai khamir yang memiliki daya selulolitik (Kurtzman 2000). Artinya bahwa *Candida* yang habitatnya di tanah tentu memiliki peran sebagai dekomposer. Secara taksonomi, *Candida* merupakan salah satu grup khamir yang paling besar yang meliputi hampir 1/3 dari seluruh jumlah khamir yang sudah dapat diidentifikasi (Nakase *et al*, 1998). Anggota dari kelompok ini banyak dilaporkan mempunyai penyebaran jenis yang cukup luas, meliputi ekosistem tanah, perairan, tumbuhan dan serangga. Beberapa diantaranya telah diteliti dan dikembangkan untuk keperluan industri pakan ternak, pengolahan limbah dan agen bioremediasi (Kurtzman, 2000).

Beberapa penelitian terbaru melaporkan ditemukannya beberapa jenis baru dari kelompok ini

yang mempunyai peranan dalam siklus biogeokimia khususnya kemampuan dalam mendegradasi selulosa (Nakase *et al*, 1994 dan Kurtzman, 2000). Informasi mengenai keragaman *Candida* dan potensinya, khususnya jenis-jenis *Candida* yang diisolasi dari kawasan Timur Indonesia belum dilaporkan. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengungkapkan keanekaragaman khamir yang berasal dari kawasan Kebun Biologi Wamena, mempelajari karakteristik selulolitik khamir yang diisolasi dari tanah serta mengetahui peranan ekologi dan potensi khamir dalam menghasilkan CMCase.

Penelitian bertujuan untuk pemahaman ekologi mikroba, selain itu juga ditujukan untuk mencari mikroba potensial guna keperluan industri fermentasi.

METODA

Isolasi Khamir

Khamir yang berasal dari tanah diisolasi dengan menggunakan teknik pengkayaan media yang dilakukan melalui 3 tahap. *Tahap awal:* media yang digunakan pada tahap ini adalah media *Cytophaga* dengan komposisi sebagai berikut: (NH₄)₂SO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,1%, MnSO₄ 0,1%, glukosa 0,1%, yeast extract 0,1%, CMC 1% dan FeCl₃ 0,1% (pH 6,8).

Sebanyak 10 g sampel tanah dimasukkan ke dalam 100 ml media *Cytophaga* dan di-shaker selama 3 hari pada suhu 30°C. Tahap kedua: media yang digunakan pada tahap ini adalah, media yeast nitrogen base (YNB) dengan komposisi sebagai berikut YNB tanpa asam amino dan ammonium sulfat 0,17%, ammonium sulfat 0,5% dan glukosa 10% (pH 6,8). Sebanyak 10 ml sampel dari tahap awal dimasukkan ke dalam medium YNB dan di-shaker selama 3 hari pada suhu 30°C. Tahap ketiga: pada tahap ini metode dan media yang digunakan sama dengan yang dilakukan pada tahap kedua, namun pada tahap ini kandungan glukosa yang digunakan sebesar 20%. Isolasi dilakukan dengan cara plate count methods, dengan ulangan sebanyak 3 kali dan menggunakan media *Cytophaga*. Kultivasi dari isolat dilakukan pada suhu 30°C selama 3 hari.

Pemurnian

Khamir yang telah didapat dimurnikan pada media yeast malt extract agar (pH 6,5), diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam. Koloni yang terpisah dengan baik dipilih dan ditanam kembali pada media yang sama sebanyak dua kali ulangan. Setelah berumur 2 hari, koloni yang didapat diamati dengan menggunakan mikroskop untuk pengamatan morfologi. Isolat yang telah murni disimpan pada media YM agar miring atau disimpan di 10% glycerol pada suhu -80°C (Kirshop Land Doyle, 1991).

Identifikasi Khamir

Khamir diidentifikasi, berdasarkan pada beberapa karakter yang meliputi: reproduksi vegetatif, karakter seksual, karakter fisiologi dan biokimia.

Morfologi Sel Vegetatif dan Karakter Reproduksi vegetatif dianalisa berdasarkan Hawksworth et al, (1995).

Karakter Fisiologi dan Biokimia dianalisis berdasarkan Kurtzman and Jack, (1998) dan Barnett et al (2000).

Aktivitas Enzim CMC-ase (exo-1,4-(3-glucanase), pH dan Biomassa.

Sebanyak satu ose penuh khamir umur 48 jam, diinokulasikan ke dalam 5 ml media *Cytophaga* dan di-shaker selama 3 hari pada suhu 30°C. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam 100 ml media *Cytophaga*, *Cytophaga* + 0,1% (w/v) glukosa, dan

Cytophaga + 0,1% (w/v) glukosa + 0,1% (w/v) NaCl lalu di-shake. Sebanyak 10 ml cairan hasil fermentasi diambil setiap 24 jam untuk analisis pH, biomassa dan aktivitas enzim.

Untuk aktivitas enzim selulase, diambil sebanyak 4 ml sampel lalu disentrifusa pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm, selama 20 menit. Sebanyak 1 ml supernatan ditambah 1 ml substrat (CMC 1%) dan 1 ml DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 7 menit kemudian didinginkan pada air mengalir. Setelah itu sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV - Vis (Thermo Spectronic Type Genesys 20), pada panjang gelombang 540 nm sebagai gula reduksi awal (go). Untuk gula reduksi akhir (gt) perlakuan sama dengan gula reduksi awal, namun pada gula reduksi akhir ini penambahan 1 ml DNS dilakukan setelah sampel dan substrat diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Standar gula yang digunakan adalah glukosa, blanko digunakan akuades. Sisa sampel yang diambil (sebanyak 6 ml) digunakan untuk pengukuran pH sampel dengan menggunakan pH-meter (Horiba) dan biomassa dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Satu unit aktivitas CMCase adalah jumlah μmol glukosa yang dihasilkan satu ml enzim endoglukanase tiap menit.

Unit = μmol produk/ml enzim/menit. Aktifitas enzim diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{(\text{Gt}-\text{G}^{\circ}) \text{ mg/l} \times \text{Volume larutan} \times 10^3 \mu\text{mol}}{\text{BM glukosa} \times \text{volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan: Gt: glukosa + CMC

Go: glukosa tanpa CMC

HASIL

Karakterisasi Khamir

Tiga isolat khamir berhasil diisolasi dari tanah hitam, tanah yang didominasi tumbuhan Wiep (*Grevillea* papuana) di Kebun Biologi Wamena, Papua. Ketiga isolat tersebut diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi dengan metoda Kurtzman dan Jack(1998) dan Barnett et al (2000). Isolat-isolat tersebut mempunyai beberapa sifat karakteristik yang menggolongkannya ke dalam kelompok *Ascomycetous*

imperfect khamir. Beberapa karakter umum yang menjadi ciri spesifik dari kelompok ini adalah memberikan reaksi negatif terhadap tes Diazonium Blue, tes urea dan tes Dnase. Isolat tersebut tidak dapat melakukan perkembangbiakan secara seksual dan hanya berkembangbiak dengan cara membentuk tunas, hal ini diperkuat dengan tidak dibentuknya askospora selama siklus hidupnya.

Sifat karakteristik fisiologi dari isolat tersebut adalah dapat memfermentasikan glukosa; sebaliknya isolat-isolat tersebut tidak dapat melakukan fermentasi dengan galaktosa sebagai sumber karbon. Isolat ini mampu menggunakan dengan baik beberapa sumber karbon untuk proses asimilasinya. Sumber-sumber karbon tersebut antara lain glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa dan L- arabinosa. Sedangkan isolat tersebut menunjukkan reaksi negatif untuk asimilasi sumber karbon yang diujikan seperti laktosa, inulin, starch, D-xylosa, D-arabinosa, glicerol, eritritol, asam citrat, methanol dan ethanol (Tabel 1). Galaktosa dapat diasimilasi oleh *Candida* sp. akan tetapi senyawa galaktosa tidak difermentasi. Hal tersebut dimungkinkan oleh karena energi yang diperoleh dari proses oksidasi galaktosa lebih tinggi dibandingkan dengan reduksinya oleh NADPH pada proses fermentasi. Isolat tersebut tidak pula menghasilkan enzim beta-galaktosidase yang diperlukan untuk terjadinya reduksi galaktosa (Linden *et al*, 1992). Karena ketiga isolat tersebut mempunyai karakter morfologi dan fisiologi yang sama, serta diidentifikasi pada tingkat marga yang sama, maka satu isolat khamir yang diisolasi dari jenis tanah yang didominasi tumbuhan *Wiep* dipilih untuk dipelajari lebih lanjut karakteristik aktivitas selulolitiknya.

Pada semua media, terjadi pertumbuhan biomassa sel yang cepat pada awal inkubasi (Gambar 1). Penambahan glukosa memacu pertumbuhan sel pada awal inkubasi seperti ditunjukkan oleh kenaikan rapat optis yang lebih cepat pada perlakuan penambahan glukosa.

Penambahan NaCl tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan sel.

Aktivitas CMC-ase

Aktivitas enzim CMC-ase terpacu oleh glukosa yang terbatas pada media (Gambar 2). Fenomena tersebut terjadi pada awal kultivasi.

lâbel 1. Fisiologi karakteristik *Candida* sp. asal Kebun Biologi Wamena

Uji	+/-
DBB	-
Urea	-
Dnase	-
Fermentasi	
glukosa	+
galaktosa	-
Assimilasi	
glukosa	+
galaktosa	+
L-sorbosa	-
sukrosa	+
maltosa	+
celobiosa	+
laktosa	-
melibiosa	+
rafinosa	+
melezitosa	+
inulin	-
pati	-
D-xilosa	-
L-arabinosa	+
D-arabinosa	-
D-ribosa	-
L-rhamnosa	+
eritritol	-
ribitol	+
dulsitol	+
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
methil glukoside	+
2-ketoglukonocid	+
asam succinat	+
D-glukuronik	+
arbutin	-
xilitol	+
asam citrat	-
nitrat	-
nitrit	-
L-lysine	+
cadaverin	+
glucosamin	+

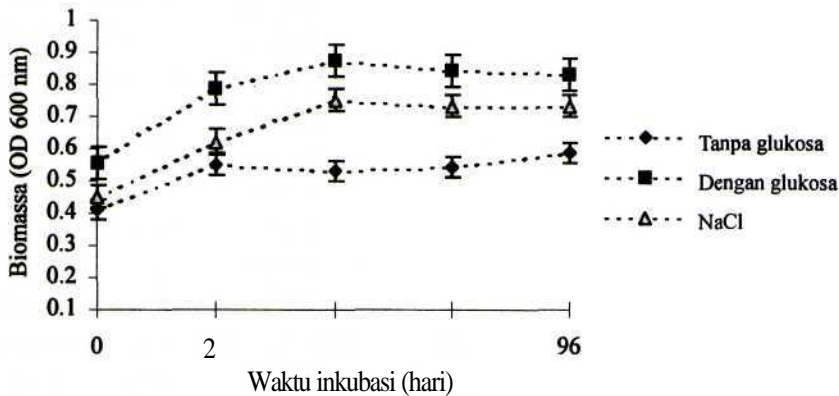
DBB: Diazonium Blue salt B

Pertumbuhan sel yang cepat mengakibatkan keperluan nutrisi meningkat. Peningkatan kebutuhan nutrisi menjadi stimulan positif terhadap sel untuk mengeluarkan enzim CMC-ase yang menghidrolisa CMC. Keberadaan CMC didalam media merupakan induktor aktivitas enzim CMC-ase. Penambahan 0,1 % NaCl tidak menyebabkan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim. Profil aktivitas enzim CMC-ase juga dipengaruhi oleh biomassa (Gambar 1 dan 2). Aktivitas yang meningkat selama inkubasi lebih tinggi pada perlakuan tanpa penambahan glukosa, glukosa dan NaCl mungkin disebabkan oleh biomassa yang lebih tinggi.

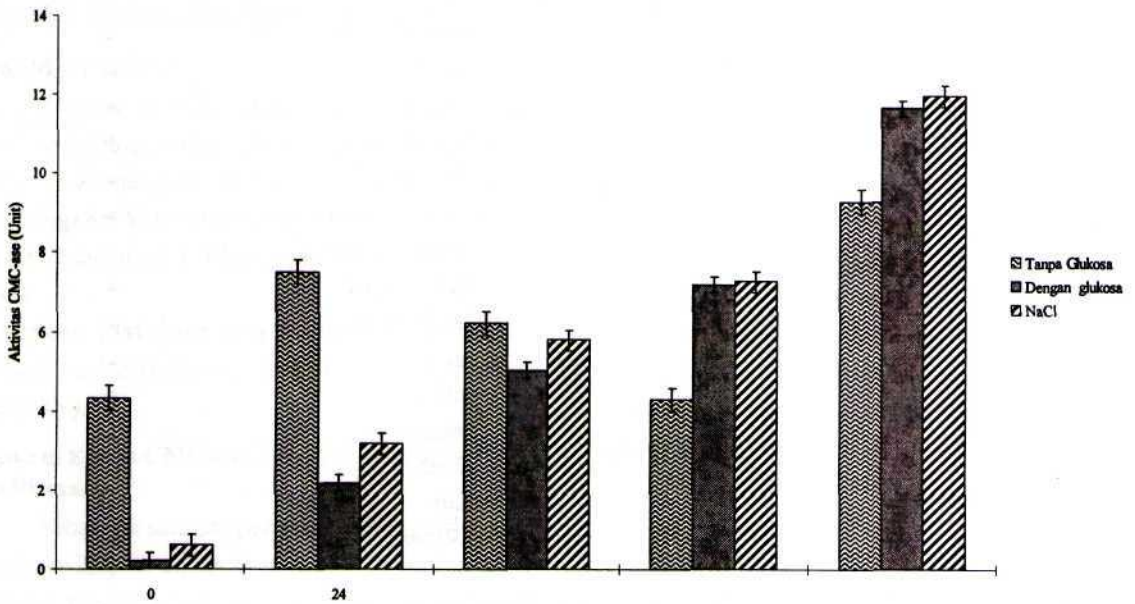
Profil pH

Nilai pH diketahui merupakan salah satu faktor utama yang berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir dan pembentukan enzim. Khamir dapat tumbuh dengan baik pada rentang pH 3-8 (Cook, 1958; Lanchance et al., 1998).

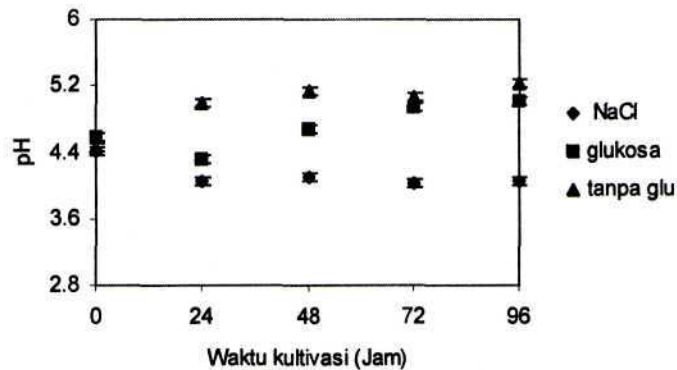
Profil pH pada media tergantung kepada komposisi media. Keadaan pH pada media tanpa glukosa cenderung meningkat, sedangkan pada media dengan penambahan NaCl cenderung mengalami penurunan (Gambar 3).



Gambar 1. Profil pertumbuhan biomassa kultur *Candida* sp. yang ditumbuhkan pada media dengan glukosa, penambahan glukosa dan tanpa glukosa.



Gambar 2. Aktivitas CMC-ase pada kultur *Candida* sp yang ditumbuhkan pada media dengan glukosa, penambahan glukosa dan tanpa glukosa



Gambar 3. Profile pH pada kultur *Candida* yang ditumbuhkan pada media dengan glukosa, penambahan glukosa dan tanpa glukosa

PEMBAHASAN

Tanah merupakan salah satu ekosistem yang paling kompleks yang mengandung mikroba dari berbagai jenis dan kelompok serta organisma tingkat tinggi. Dalam mikroba saprofit khamir merupakan salah satu kelompok mikroba yang umum ditemukan di tanah. Di alam khamir terutama banyak ditemukan pada material dengan kandungan bahan organik tinggi. Tanah yang mengandung bahan organik tinggi, di dalamnya terdapat unsur hara makro dan mikro yang dibutuhkan oleh khamir. Isolat *Candida* yang diisolasi dari tanah kawasan Kebun Biologi Wamena memiliki kemampuan menghidrolisa CMC, artinya bahwa *Candida* mampu memproduksi enzim CMC ase (exo 1,4 glukonase). Glukosa yang berasal dari media dan hasil hidrolisa CMC oleh enzim endo 1,4 glukonase digunakan untuk pertumbuhan biomassa. Biomassa yang terbentuk memerlukan sumber karbon sederhana seperti mono dan disakarida. Kebutuhan nutrisi ini menstimulasi sel khamir menghasilkan enzim yang dapat menghidrolisis CMC. Enzim ini memang banyak ditemukan pada bakteri dan kapang (Deng and Tabatabai, 1994).

Khamir memegang peranan penting dalam hidrolisis senyawa polisakarida (selulosa) yang berada di dalam tanah. Keberadaan khamir di dalam tanah telah dilaporkan oleh Spencer (1997) dan Kurtzman (2000) yang menyatakan bahwa khamir dari marga *Debaryomyces*, *Candida* dan *Cryptococcus* sangat umum ditemukan dalam ekosistem tanah. Walaupun khamir bukan satu satunya jasad renik tanah yang mampu merombak selulosa, namun keberadaan khamir

dalam tanah akan membantu proses perombakan senyawa polisakarida kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana.

Mekanisma dan kecepatan perombakan selulosa (CMC) oleh khamir dipengaruhi oleh jenis khamir (faktor genetik) dan faktor lingkungan seperti pH, keberadaan senyawa organik dengan berat molekul rendah seperti glukosa serta jumlah biomassa (Gambar 1, 2 dan 3) (Hatano *et al*, 1991). Ketiga parameter tersebut memberikan gambaran bahwa pH, biomassa dan molekul sederhana memegang peran penting terhadap produksi enzim selulase (1,3 (3 glucanase).

Mekanisma yang menyebabkan kenaikan dan penurunan pH media dikontrol oleh mekanisme metabolisme sel yang kompleks. Sumber nitrogen dan karbon yang tersedia dalam media juga berpengaruh terhadap perubahan pH selama fermentasi.

Penambahan glukosa memacu glikolisis, yang akhirnya mempercepat proses siklus kreb dan mengakselerasi metabolisme sintesa protein dan metabolit yang lain yang diperlukan untuk sintesis enzim dan biomassa. Glukosa juga memacu proses respirasi aerobik yang menghasilkan CO₂ dan air. Selanjutnya CO₂ yang dihasilkan akan menurunkan pH. Penurunan pH dan akselerasi siklus kreb dan sintesa protein menyebabkan aktivitas CMC ase meningkat (William *et al*, 2003).

Penambahan sodium klorida menyebabkan meningkatnya tekanan osmosis media, yang menyebabkan perubahan pada aktivitas transport nutrisi ke dalam sel. Penambahan NaCl dalam jumlah

kecil tidak menyebabkan perubahan yang signifikan pada proses transport sel, dan kegiatan metabolisme yang lain. Hal tersebut dimungkinkan oleh mekanisme pengaturan regulasi osmotik yang dimiliki oleh sel *Candida* sp. (Ray et al, 1992). Penambahan NaCl kedalam media juga tidak memberikan pengaruh fisiologis yang signifikan terhadap pertumbuhan dan aktivitas enzim endo-1,4-p-glucanase. Hal tersebut mungkin mengindikasikan *Candida* sp. dapat tumbuh dan aktif pada rentang tekanan osmosis yang besar. Kemampuan *Candida* sp. menghasilkan exo-1,4-P-glucanase menunjukkan perannya di alam membantu proses dekomposisi bahan material organik.

KESIMPULAN

Penambahan 0,1% glukosa ke dalam media mampu memacu pertumbuhan biomassa sel *Candida* sp. Keberadaan *Candida* dalam tanah akan mampu mempercepat mineralisasi senyawa selulosa di dalam tanah. Khamir ini juga mampu tumbuh dan menghasilkan enzim CMCase pada tekanan osmotik yang tinggi. Oleh karena itu pada kondisi yang kritis seperti perubahan tekanan osmosis khamir ini masih tetap berperan dalam proses dekomposisi senyawa organik di dalam tanah.

DAFTAR PUSTAKA

Barnett JA, Payne RW and Yarrow D. 2000. *Yeasts Characteristics and Identification*. Cambridge University Press. United Kingdom. Him 1-81.

Cook AH. 1958. *The Chemistry and Biology of Yeast*. Academic. Him 368.

Deng SP and Tabatabai MA. 1994. Cellulase Activity of Soils. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1347-1354.

Hatano T, Mutsuko K and Sakuzo F. 1991. Purification and Characterization of a Carboxymethyl-cellulose Degrading Enzyme Secreted by a

Yeast strain Newly isolated from Soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 313 - 317.

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC and Pegler DN. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th Edn. CAB International, Wallingford, UK. Hlm 616.

Kirshop BE and Doyle A. 1991. *Maintenance of Microorganism and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods*. Academic. Him 262.

Kurtzman CP. 2000. Three new ascomycetous yeasts from insect-associated arboreal habitats. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 50-58.

Kurtzman CP and Jack WF. 1998. *The Yeast A Taxonomic Study*. Elsevier. New York. Him 77-102.

Lanchance A and Starmer WT. 1998. *Yeasts and Ecology*. Him 275-300.

Linden T, Peetre J and Hahn-Hagerdal. 1992. Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 (58), 1661-1669.

Nakase T, Motofumi S, Masako T and Sakuzo F. 1998. A Taxonomic Study on Cellulolytic Yeasts and Yeast-like Microorganisms isolated in Japan I. Ascomycetous Yeast Genera *Candida* and *Williopsis*, and a yeast-like Genus *Prototheca*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 40, 519 - 531.

Ray MK, Devi KU, Kumar GS and Shivaji S.I 1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6), 1918-1923.

Spencer JFT. 1997. *Yeast in natural and Artificial Habitats*. Springer - Verlag, Berlin Heidelberg. Hlm 347.

William HE, Zhang Y, Samaha H, Lucy S and Dudley Le. 2003. Transformation of Fatty Acids Catalyzed by Cytochrome P450 Monooxygenase Enzymes of *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10), 5992-5999.