

Characterization of Cellobiose Dehydrogenase (CDH) Enzyme in *Trametes versicolor* strain TRAMS

Tri Haidar Munif¹, Marjori Bethania Rahmawan¹, Nurlita Abdulgani¹, Endry Nugroho Prasetyo^{1*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia;

Article History

Received : June 20th, 2025

Revised : June 27th, 2025

Accepted : June 30th, 2025

*Corresponding Author: **Endry**

Nugroho Prasetyo,

Departemen Biologi, Fakultas

Sains dan Analitika Data,

Institut Teknologi Sepuluh

Nopember, Surabaya,

Indonesia;

Email: endry@its.ac.id

Abstract: Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) is an enzyme classified under the oxidoreductase group. CDH has been widely utilized in various fields, including healthcare such as in wound dressing and in the energy sector for bioenergy production. To support these industrial applications, it is necessary to investigate the characteristics of CDH to enhance process efficiency. Therefore, this study aims to characterize CDH produced by the fungus *Trametes versicolor* strain TRAMS. The research involved constructing a CDH production curve followed by enzyme activity assays, protein content determination, isoelectric point (pI) analysis, and kinetic studies using Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots. The results showed that the enzyme exhibited an activity of 3.441 U/mL on the 8th day of production. The enzyme's specific activity reached 61.57 U/mg at the 80% ammonium sulfate fraction, with an isoelectric point at pH 4. Enzyme kinetics based on the Michaelis-Menten plot revealed a $V_{\max}$ of 6.7 $\mu\text{M}/\text{min}$ and a K_m of 3.35 μM , while the Lineweaver-Burk analysis indicated a $V_{\max}$ of 9.625 $\mu\text{M}/\text{min}$ and a K_m of 0.23 μM .

Keywords: Cellobiosa dehydrogenase, enzyme, *Trametes versicolor*.

Pendahuluan

Enzim *Cellobiose dehidrogenase* (CDH, EC 1.1.99.18) merupakan enzim yang masuk kedalam kelas oksidoreduktase (Zhong *et al.*, 2024). Kelas oksidoreduktase adalah kelas yang mampu melakukan katalisis reduksi atau oksidasi pada substrat (Greene, 2021). Katalisis reduksi CDH terjadi ketika enzim melakukan reaksi terhadap substratnya yang akan mereduksi substrat untuk menghasilkan 2 elektron bebas (Scheiblbrandner *et al.*, 2020). Sedangkan katalisis oksidasi terjadi ketika elektron bebas yang dihasilkan akan ditangkap oleh penerima elektron seperti O_2 menjadi H_2O_2 dan jika dalam reaksi terdapat senyawa radikal, senyawa radikal tersebut akan berubah menjadi stabil (Nyanhongo *et al.*, 2013).

CDH disekresikan secara ekstraseluler oleh jamur askomikota atau basidiomikota (Geiss *et al.*, 2021). Salah satu spesies jamur yang

mampu memproduksi CDH ialah *Trametes versicolor* (Scheiblbrandner *et al.*, 2020). Jamur mensekresikan CDH untuk mendegradasi biomassa tumbuhan berupa susunan disakarida ataupun oligosakarida menjadi bentuk yang lebih sederhana (Giorgianni *et al.*, 2024)

CDH dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti kesehatan dan industri. Bidang kesehatan, CDH dikombinasikan dengan hidrogel beserta zat bioaktif sebagai media penyembuhan luka kronis (Nyanhongo *et al.*, 2013). CDH akan berperan dalam penurunan radikal bebas berupa ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga luka kronis yang memiliki ROS tinggi menjadi rendah hingga menyamai tingkat ROS pada luka akut agar luka melewati fase inflamasi. Bidang energi, CDH mampu dimanfaatkan sebagai *pretreatment* limbah terutama batang kering kanola yang dimanfaatkan sebagai bahan produksi biofuel. Peran CDH dalam *pretreatment* tersebut untuk

mendegradasi selulosa pada batang kanola sehingga dapat menghasilkan biofuel yang lebih tinggi (Canam *et al.*, 2011).

Mendukung pemanfaatan CDH yang lebih efisien, diperlukan eksplorasi produksi CDH pada mikroorganisme yang ada. *T. versicolor* yang sudah dikenal memproduksi CDH belum banyak dieksplorasi keragamannya berdasarkan strain yang dimiliki. Oleh karena itu penelitian ini ditujukan untuk mengetahui karakterisasi enzim dari jamur *T. versicolor* strain TRAMS

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat

Penelitian ini berlangsung di bulan Maret 2025 sampai dengan April 2025 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Alat dan bahan

Alat penelitian antara lain *autoclave*, cawan petri, erlenmeyer, *centrifuge*, mikropipet, mikrotip, oven, *microtube*, spektrofotometer UV-Vis, *shaker incubator* dan bunsen. Bahan yang digunakan yaitu *Trametes versicolor* strain TRAMS, KCL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , *yeast extract*, NH_4Cl , glukosa, tisu, kertas whatman no.1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, asam molibdat, Reagen Bradford, Buffer asetat (pH 4, 4.5, 5, 6), Buffer fosfat (pH 7, 8), 2,6-Diklorofenolindofenol (DCIP), laktosa monohidrat (Merck), NaF, etanol 10%, *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan ammonium sulfat.

Subkultur *Trametes versicolor*

Isolat *Trametes versicolor* strain TRAMS didapatkan dari koleksi laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Subkultur isolat dilakukan dengan memotong kultur *Trametes versicolor* sebesar 1x1 ke cawan petri steril berisi PDA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

Produksi Selobiosa dehidrogenase

Produksi enzim selobiosa dehidrogenase dilakukan dengan memodifikasi metode dari Mahbubillah *et al.*, (2019). Modifikasi yang

dilakukan pada lama inkubasi kultur yang dilakukan yaitu dilakukan setiap 2 hari selama 14 hari dan setiap biomassa yang tersaring oleh kertas whatman no.1 akan dikeringkan serta ditimbang sebagai biomassa per-2 hari jamur.

Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim menggunakan metode pemurnian parsial dengan mencampurkan ammonium sulfat. Pemurnian enzim ditujukan untuk mendapatkan fraksi enzim 20%, 40%, 60%, 80%, dan 90%. Metode dilakukan seperti pada Duong-Ly & Gabelli, 2014.

Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim selobiosa dehidrogenase dilakukan dengan metode yang dimodifikasi dari Mahbubillah *et al.*, 2019. Modifikasi metode yang dilakukan terdapat jumlah enzim yang dicampurkan yaitu sebanyak 100 μL .

Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran kadar protein dari enzim yang diproduksi dilakukan seperti pada Mahbubillah *et al.*, 2019.

Penentuan Titik Isoelektrik

Penentuan titik isoelektrik dilakukan dengan menyiapkan 5 *microtube* yang telah berisi 500 μL buffer. Kadar pH difokuskan pada pH 4-8 (Felice *et al.*, 2021). Buffer yang digunakan terdiri dari buffer asetat (4,5,6) dan buffer phosphate (7 dan 8). Crude CDH dimasukkan ke dalam *microtube* sebanyak 100 μL dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi, *microtube* disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Endapan terbanyak pada dasar *microtube* akan dijadikan titik isoelektrik enzim.

Pengukuran aktivitas terhadap berbagai konsentrasi substrat

Pengukuran aktivitas enzim selobiosa dehidrogenase terhadap berbagai konsentrasi substrat dilakukan dengan memodifikasi metode seperti pada Mahbubillah *et al.*, (2019). Modifikasi dilakukan pada konsentrasi substrat yang digunakan dan volume enzim yang dicampurkan. Konsentrasi substrat yang dicampurkan diambil dari laktosa 300 mM dalam 100 mM buffer asetat. Jumlah laktosa yang

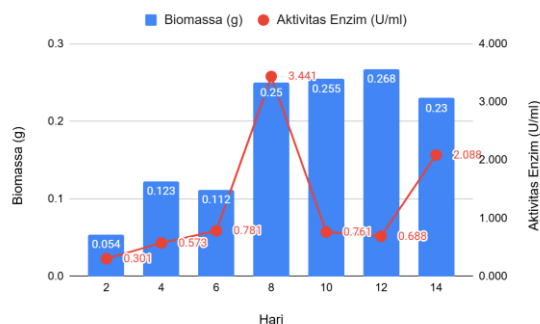
dicampurkan kedalam 1 ml reaksi sebesar 10, 20, 30, 50, 70, 100, dan 175 µl. Sedangkan volume enzim yang dicampurkan sebesar 100 µl.

Hasil dan Pembahasan

Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas CDH *Trametes versicolor* strain TRAMS

Kurva pertumbuhan dan aktivitas CDH pada *T. versicolor* strain TRAMS selama 14 hari membentuk 4 pola pertumbuhan (Gambar 1). Pola pertumbuhan jamur terbagi menjadi 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Purwantisari et al, 2025). Pada hari ke-2 hingga hari ke-6 biomassa jamur yang terbentuk tidak terlalu banyak. Pola pertumbuhan tersebut menunjukkan bahwa jamur dalam fase lag.

Memasuki hari ke-6 hingga ke-8, Jamur mengalami pertumbuhan kenaikan biomassa yang besar. Pada hari tersebut menunjukkan pola pertumbuhan eksponensial. Sedangkan pada hari ke-8 hingga ke-12, pertumbuhan biomassa yang dibentuk stabil. Stabilitasnya pertumbuhan biomassa jamur menunjukkan bahwa jamur berada dalam fase stasioner. Hari ke-14 biomassa jamur mengalami penurunan yang menandakan bahwa jamur memasuki fase kematian.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan aktivitas CDH *Trametes versicolor*

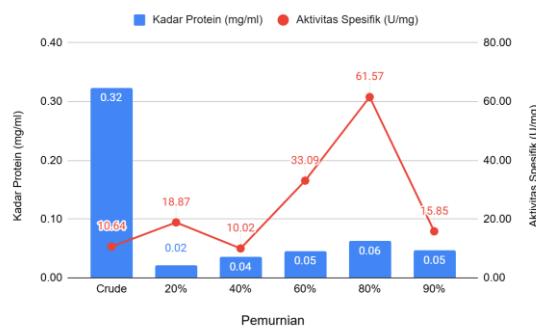
Aktivitas CDH yang terbentuk dari kurva pertumbuhan jamur *T. versicolor* strain TRAMS selama 14 hari. Puncak tertinggi ditunjukkan pada hari ke-8 dengan aktivitas sebesar 3.441 U/ml. Penelitian aktivitas CDH yang lain pada *Trametes versicolor* strain J57 juga menunjukkan hari yang hampir sama terhadap puncak aktivitas CDH yaitu pada hari ke-7 (Roy et al., 1996). Kemudian dibandingkan pada spesies lain seperti *Ceriporiopsis subvermispora* menunjukkan

puncak tertinggi aktivitas CDH ketika memasuki hari ke-16 (Harreither et al., 2009).

Pertumbuhan aktivitas CDH yang tinggi dihari ke-8 ditunjukkan pada pola pertumbuhan biomassa yang terbentuk. Pada fase lag, jamur cenderung memanfaatkan glukosa yang tersedia di medium produksi dan beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang baru (Putri et al., 2024). Jumlah glukosa yang sedikit membuat jamur mulai melakukan transisi untuk menggunakan substrat menjadi gula sederhana dengan melakukan sekresi CDH. Puncak sekresi CDH terjadi saat fase eksponensial dikarenakan jamur memerlukan glukosa sebanyak-banyaknya untuk memenuhi kebutuhan gula demi kelangsungan hidupnya. Memasuki fase stasioner, jamur mulai mengalami penurunan aktivitas CDH pada hari ke-8 hingga ke-12. Penurunan disebabkan oleh terpenuhinya nutrisi akibat sekresi enzim pada hari ke-8. Memasuki hari ke-14, Nutrisi yang tersedia dilingkungan telah habis sehingga jamur mencoba mendapatkan nutrisi tambahan dengan melakukan sekresi CDH.

Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik CDH *Trametes versicolor* strain TRAMS

Pemurnian CDH dilakukan untuk memisahkan CDH dengan protein pengotor. Pemurnian dilakukan hingga mendapatkan fraksi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 90%. Hasil pemurnian dilanjutkan dengan pengukuran kadar protein dan aktivitas spesifik. Hasil pemurnian dan aktivitas spesifik ditunjukkan pada Gambar 2.



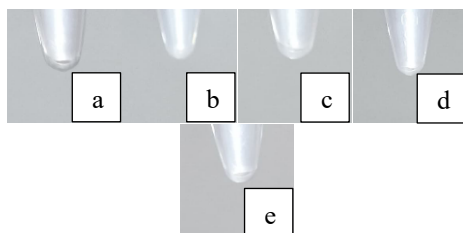
Gambar 2. Kadar protein dan aktivitas spesifik CDH *Trametes versicolor*

Berdasarkan Gambar 2. aktivitas spesifik tertinggi ditemukan pada fraksi 80% sebesar 61.57 U/mg. Pada Zhong et al, 2024 berhasil presipitasi CDH pada fraksi 80%. Sedangkan

penelitian lain, fraksi 90% dipresipitasi sebagai aktivitas tertinggi pada spesies *Schizophyllum commune* (Yadav & Nighojkar, 2024). Hal tersebut terjadi akibat adanya proses *salting out* saat pemberian ammonium sulfat. *Salting out* adalah proses ketika protein yang memiliki tingkat kelarutan sama mengalami penurunan kelarutannya akibat adanya pelarut dengan kekuatan ion tinggi, sehingga enzim terkonsentrasi dan mengendap (Jiang et al., 2024).

Titik Isoelektrik CDH *Trametes versicolor* strain TRAMS

Titik isoelektrik adalah ketika enzim tidak memiliki muatan akibat terjadinya keseimbangan antara muatan positif dan negatif pada gugus ionnya (Chen et al., 2019). Titik isoelektrik CDH jamur *T. versicolor* strain TRAMS menunjukkan pengendapan pada pH 4 (Gambar 4.) Titik isoelektrik yang terbentuk hampir sama seperti pada spesies *T. versicolor* strain 52J yang menunjukkan titik isoelektrik pada pH 4.2 - 6.4 (Roy et al., 1996). CDH diketahui terdapat disekitar pH 4 - 5 tergantung pada spesies yang memproduksinya. Spesies fungi lain seperti *Chaetomium* sp. Menghasilkan CDH dengan titik isoelektrik pada pH 5 (Karapetyan et al., 2006).

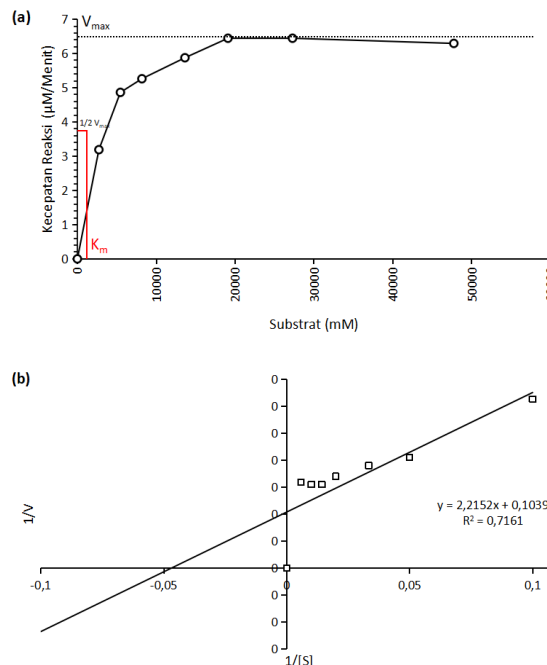


Gambar 3. Endapan titik isoelektrik pada pH (a) 4, (b) 5, (c) 6, (d) 7, dan (e) 8.

Kinetika CDH *Trametes versicolor* strain TRAMS

Pengujian kinetika enzim digunakan untuk mengetahui efektivitas CDH yang dihasilkan oleh jamur *T. versicolor* strain TRAMS. Kinetika enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yang dihasilkan terhadap variasi konsentrasi substrat kemudian diolah menjadi grafik Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk. Grafik Michaelis-Menten ialah grafik yang menggambarkan tingkat afinitas enzim terhadap substratnya dan grafik Lineweaver-Burk adalah grafik yang menggambarkan secara spesifik angka

V_{max} yang dimiliki oleh enzim (Johnson & Goody, 2011). Grafik Michaelis-menten dan Grafik Lineweaver-burk yang dihasilkan oleh CDH *T. versicolor* strain TRAMS dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Michaelis-Menten (a) dan Lineweaver-burk (b) pada aktivitas crude CDH *Trametes versicolor* strain TRAMS terhadap berbagai konsentrasi substrat

Aktivitas *crude* CDH pada konsentrasi substrat 2727 μM menunjukkan aktivitas sebesar 3.19 U/ml. Aktivitas enzim mengalami peningkatan menjadi 5,88 U/ml ketika konsentrasi substrat mencapai 13636 μM . Memasuki konsentrasi substrat 19090 μM dan seterusnya tidak mengalami peningkatan Gambar 4 (a). Grafik Michaelis-Menten menghasilkan nilai reaksi kecepatan maksimum (V_{max}) 6.7 $\mu\text{M}/\text{ment}$ dan K_m 3.335 μM . Gambar 4 (b) menunjukkan nilai reaksi kecepatan maksimum enzim dengan tepat. Gambar grafik Lineweaver-Burk bisa didapatkan persamaan $Y=ax+b$ yaitu $Y=2.2152x+0.1039$. Berdasarkan persamaan tersebut bisa didapatkan nilai V_{max} sebesar 9,625 $\mu\text{M}/\text{ment}$ dengan nilai K_m 0.23 μM .

Kesimpulan

Jamur *T. versicolor* strain TRAMS yang ditumbuhkan pada media produksi memiliki aktivitas tertinggi pada hari ke-8 sebesar 0.115 U/ml. Karakteristik CDH yang dihasilkan memiliki aktivitas spesifik pada fraksi 80% sebesar 2.05 U/mg dengan titik isoelektrik pada pH 4. Kinetika CDH yang diproduksi berdasarkan grafik Michaelis-Menten memiliki nilai $V_{\max}$ sebesar 0.22 $\mu\text{M}/\text{menit}$ dan nilai K_m sebesar 0.115 μM sedangkan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk nilai $V_{\max}$ yang dihasilkan sebesar 0.321 $\mu\text{M}/\text{menit}$ dan Nilai K_m sebesar 21.317 μM

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Biologi ITS karena telah memberikan izin untuk melakukan pengujian karakterisasi enzim di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi.

Referensi

- Canam, T., Town, J. R., Tsang, A., McAllister, T. A., & Dumonceaux, T. J. (2011). Biological pretreatment with a cellobiose dehydrogenase deficient strain of *Trametes versicolor* enhances the biofuel potential of canola straw. *Biosource Technology*, 102(21). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.045>
- Chen, Y., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao, F., Zhao, J., Zheng, Y., & Zhu, J. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. *Food Hydrocolloids*, 96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.025>
- Duong-Ly, K. C. & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in enzymology*, 541. 85-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Felice, A. K. G., Schuster, C., Kadek, A., Filandr, F., Laurent, C. V. F. P., Scheiblbrandner, S., Schwaiger, L., Schachinger, F., Kracher, D., Sygmond, C., Man, P., Halada, P., Oostenbrink, C., & Ludwig, R. (2021). Chimeric Cellobiose Dehydrogenases Reveal the Function of Cytochrome Domain Mobility for the Electron Transfer to Lytic Polysaccharide Monooxygenase. *ACS Publications*, 11(2). 517-532. DOI: <https://doi.org/10.1021%2Facscatal.0c05294>
- Geiss, A. F., Reichart, T. M. B., Pejker, B., Plattner, E., Herzog, P. L., Schulz, C., Ludwig, R., Felice, A. K. G., & Haltrich, D. (2021). Engineering the Turnover Stability of Cellobiose Dehydrogenases toward Long-term ioelectronic Applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(20). 7086-7100. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01165>
- Giorgianni, A., Zenone, A., Sützl, L., Csarman, F., & Ludwig, R. (2024). Exploring class III cellobiose dehydrogenase: sequence analysis and optimized recombinant expression. *Microbial Cell Factories*, 23(146). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02420-2>
- Greene, B. L. (2021). Progress and Opportunities in Photochemical Enzymology of Oxidoreductases. *ACS Catalysis*, 11(23). 14635-14650. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c04525>
- Jiang, Y., Tian, Q., Chen, C., Deng, Y., Hu, X., & Yi, Y. (2024). Impact of salting-in/out assisted extraction on rheological biological, and digestive, and proteomic properties of *Tenbrio molitor* larvae protein isolates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282(3). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137044>
- Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39). 8264-8269. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi201284u>
- Karapetyan, K. N., Fedorova, T. V., Vasil'chenko, L. G., Ludwig, R., Haltrich, D., & Rabinovich, M. L. (2006). Properties of neutral cellobiose dehydrogenase from ascomycete *Chaetomium* sp. INBI 2-26(-) and comparison with basidiomyceteous cellobiose dehydrogenases. *Journal of*

- Biotechnology*, 121(1). 34-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.024>
- Mahbubillah, M. A., Nurhayati, A. P. D., & Prasetyo, E. N. (2019). The effect of various substrate on production of cellobiose dehydrogenase enzyme by *Trametes versicolor*. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 546. DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/6/062014>
- Nyanhongo, G. S., Sygmund, C., Ludwig, R., Prasetyo, E. N., & Guebitz, G. M. (2013). An Antioxidant Regenerating system for continous quenching of free radicals in chronic wounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.013>
- Purwantisari, S., Nurbayani, F. A., Safina, M. F. I., & Choiriyah, M. (2025). Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* against *Aspergillus parasiticus* and *Mucor circinelloides* in corn plant (*Zea mays* L.). *Planta Tropika*, 13(1). <https://doi.org/10.18196/pt.v13i1.21507>
- Putri, S. R., Djamaan, A., & Agustien, A. (2025). Growth Curve and Antibacterial Activity Test of Endophytic Bacteria Isolates 1 (IBE1) from Labu Koteka (*Lagenaria siceraria*) Against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA. *Jurnal Biologi Tropis*, 25(2). 1262-1268. <http://doi.org/10.29303/jbt.v25i2.8506>
- Roy, B. P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A. A., & Archibald, F. S. (1996). Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12). 4417-4427. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4417-4427.1996>
- Scheiblbrandner, S., & Ludwig, R. (2020). Cellobiose dehydrogenase: Bioelectrochemical insights and applications. *Bioelectrochemistry*, 131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107345>
- Yadav, V., & Nighojkar, S. (2023). Cellobiose Dehydrogenase from *Schizophyllum commune* Bcc26414: Purification and Characterization. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 20(3). DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/3141>
- Zhong, Y., Guo, Z., Li, M., Jia, X., & Zeng, B. (2024). Expression of cellobiose dehydrogenase gene in *Aspergillus niger* C112 and its effect on lignocellulose degrading enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1330079>