

**SELEKSI JAMUR PELAPUK PUTIH HUTAN TROPIS INDONESIA
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM LAKASE (Lac) DAN MANGAN
PEROKSIDASE (MnP)
(*Selection of White Rot Fungi from Indonesian Tropical Forest as Laccase (Lac)
and Manganase Peroxidase (MnP) Producers*)**

Lisna Efiyanti¹ & Asep Hidayat²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan,
Jl. Gunung Batu No. 5 Bogor 16610. Telp. (0251) 8633378, Fax. (0251) 8633413

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan,
Jl. Gunung Batu No. 5 Bogor 16610. Telp. (0251) 8633334, Fax. (0251) 8638111.
E-mail : lisnaefiyanti@yahoo.co.id

Diterima 19 Januari 2017, Direvisi 12 Mei 2017, Disetujui 18 Agustus 2017

ABSTRACT

*White-rot fungus, Basidiomycetes is an unique group of microbes among the major decomposers of plant polymers or biomass. Their existences are under pressure due to Indonesian tropical forests degradation caused by forest fires, excessive exploitation, land conversion and biopiracy. Based on natural process of white rot fungi, it could be utilized for bioresources, i.e improvement of food quality and leading of new functionality (the food industry), delignification (pulp & paper), production of ethanol (biofuel), biosensors and bioremediation. This paper studies isolate, selection and evaluation of the potential extracellular enzymes laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP) from fungi grown in Indonesian tropical forest. A total of 178 samples of fungi fruit were collected from Indonesian tropical forest, including West Java, East Java and East Kalimantan Provinces, then they were isolated and selected on RBBR agar media for further analysis. The results showed that there were significant differences of 26 pure isolates, in term of its capacity to decolorize RBBR, and only six pure isolates (JB-7.1.1, BST-F16, Gr-W3.2A-C, TRK-1, TRK-2, and TRK-3) were able to oxidize RBBR more than 1 cm per day. Furthermore, two isolates were selected as their enzymes production was higher than another, those were JB-7.1.1 ($Lac = 526 \pm 142 \text{ UL}^{-1}$ and $MnP = 114 \pm 13 \text{ UL}^{-1}$), and TRK-2 ($Lac = 463 \pm 95 \text{ UL}^{-1}$ and $MnP = 98 \pm 8 \text{ UL}^{-1}$). Statistically, the activity of Lac produced by JB-7.1.1 was higher and not significantly different with the positive control, *Cerrena* sp. F0607. JB-7.1.1 and TRK-2 isolates were the potential fungi for producing Lac, which they could be applied easily for textile dyes decolorization as bioremediation.*

Keywords: White-rot fungi, enzyme, isolate, Lac, MnP

ABSTRAK

Jamur pelapuk putih Basidiomycetes adalah kelompok mikroba yang sangat unik. Secara alami mereka dapat mendekomposisi biomassa berlignoselulosa. Keberadaan hutan tropis Indonesia saat ini terus berkurang akibat kebakaran hutan, eksploitasi yang berlebihan, konversi lahan, dan *biopiracy*. Secara alami, jamur pelapuk putih berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai *bioresources*, yaitu untuk meningkatkan cita rasa, kualitas, dan fungsi makanan (industri makanan), delignifikasi (pulp dan kertas), produksi etanol (*biofuel*), biosensor, dan bioremediasi. Tulisan ini mempelajari isolasi, seleksi, dan analisa potensi enzim ekstraseluler lakase (Lac) dan mangan peroksidase (MnP) dari jamur yang tumbuh di beberapa lokasi hutan tropis Indonesia. Sebanyak 178 sampel jamur pelapuk putih yang berasal dari hutan tropis di Indonesia (Jawa Barat, Jawa Timur, dan Kalimantan Timur) telah diisolasi dan diseleksi pada media RBBR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 26 isolat murni yang berhasil diisolasi menunjukkan laju perubahan warna RBBR yang berbeda, dan enam isolat diantaranya (JB-7.1.1, BST-

F16, Gr-W3.2A-C, TRK-1, TRK-2, dan TRK-3) memiliki kemampuan untuk mengoksidasi RBBR dengan laju perubahan warna >1 cm per-hari. Hasil uji enzimatik pada spektrofotometer menunjukkan bahwa 2 buah isolat terpilih mampu memproduksi Lac dan MnP yang tinggi, JB-7.1.1 ($526 \pm 142 \text{ UL}^{-1}$ dan $114 \pm 13 \text{ UL}^{-1}$), dan TRK-2 ($463 \pm 95 \text{ UL}^{-1}$ dan $98 \pm 8 \text{ UL}^{-1}$). Level aktivitas Lac yang dihasilkan oleh isolat JB-7.1.1 lebih tinggi dan tidak berbeda secara signifikan dengan positif kontrol, *Cerrena* sp. F0607. Isolat JB-7.1.1 dan TRK-2 merupakan isolat potensial sebagai produser enzim Lac, dan yang paling sederhana dapat dimanfaatkan untuk dekomposisi zat pewarna pada bidang bioremediasi.

Kata kunci: Jamur pelapuk putih, enzim, isolat, *Lac*, *MnP*

I. PENDAHULUAN

Potensi mikroba hutan tropis Indonesia sangat besar dan unik, namun sayang potensi tersebut masih terabaikan atau bahkan terlupakan. Kondisi tersebut semakin diperparah pada saat hutan tropis Indonesia terus mendapat tekanan dari aktivitas yang merugikan, seperti: eksploitasi yang berlebihan dan tidak lestari, kebakaran hutan, konversi lahan, dan *biopiracy*. Mikroba secara alami memiliki fungsi yang sangat penting dalam proses dekomposisi. Jamur sebagai jasad renik bertanggung jawab mendekomposisi biomassa berlignoselulosa, terutama kelompok jamur pelapuk putih atau Basidiomycetes (Kirk & Farrell, 1987; Widiastuti & Panji, 2008). Untuk menjalankan fungsinya, mereka mengeluarkan kelompok enzim ekstraselular dalam jumlah yang banyak dan beragam, seperti: lakase (Lac, EC 1.10.3.2) dan manganese peroksidase (MnP, EC 1.11.1.13), lignin peroksidase, versatil peroksidase gliosil oksidase, dan hidrogen peroksidase (Hofrichter, Lundell, & Hatakka, 2001). Jamur pelapuk putih memiliki kemampuan untuk mendegradasi lignin dan menguraikannya secara sempurna menjadi H_2O dan CO_2 .

Enzim adalah molekul biologis berupa protein atau glikoprotein, memiliki paling tidak satu polipeptida (Karigar & Rao, 2011). Daerah aktif pada enzim terlibat langsung dan bertanggung jawab dalam proses katalisis. Lac dan MnP termasuk kategori enzim oksidoreduktase (EC 1) yang mengkatalisis terjadinya reaksi oksidasi dan atau reduksi (Karigar & Rao, 2011).

Lebih spesifik lagi, jamur pelapuk putih yang mampu mengeluarkan satu, dua atau lebih dari tiga tipe enzim perombak biomassa kayu adalah kelompok jamur lignolitik (jamur pelapuk kayu). Dalam proses pelapukan kayu, enzim Lac berperan menguraikan lignin sehingga jamur

mampu menjangkau sumber karbohidrat, yaitu selulosa dan hemiselulosa. Selain itu, enzim Lac juga memiliki kemampuan dalam mengoksidasi beberapa senyawa seperti *orto-* dan *para-diphenols*, *aminophenols*, *poliphenols*, *polyamines*, *aryl diamines*, dan beberapa ion anorganik dilibatkan untuk mereduksi dua molekul oksigen menjadi air (H_2O) (Siregar Cahyana, & Nathalia, 2012; Solomon, Sundaram, & Machonkin, 1996; Yaropolov, Skorobogatko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994).

Disamping enzim lac, enzim MnP sangat berperan dalam dekomposisi lignin. Namun, enzim MnP tidak terlalu berperan menguraikan senyawa selain phenol tetapi mampu mempercepat terjadinya proses depolimerisasi (Hofrichter et al., 2001; Wariishi, Valli, & Gold, 1991), i.e pemecahan ikatan rantai panjang pada lignin. Proses katalisis oleh enzim Lac terjadi ketika oksigen (O_2) tersedia, sementara katalisis oleh enzim MnP mempersyaratkan lebih, seperti harus tersedianya mangan (Mn) dan hidrogen peroksida (H_2O_2).

Enzim Lac dan MnP yang diperoleh melalui proses isolasi dan pemurnian berpotensi serta bermanfaat untuk beberapa industri. Enzim Lac mampu mengkonversi substrat yang lebih luas, banyak diaplikasikan untuk bidang industri, seperti industri makanan yaitu untuk meningkatkan cita rasa, kualitas, dan fungsi makanan (Kirk, Borchert, & Fuglsang, 2002; Minussi, Pastore, & Durán, 2002), menambah kandungan flavonoid, dan meningkatkan aktivitas antioksidan pada teh hijau (Siregar, et al., 2012); bioremediasi yaitu penguraian pewarna tekstil dan polutan lainnya (Hadibarata & Kristanti, 2012; Hadibarata et al., 2012); *biopulping* dan *biobleaching* (Isroi, 2011); delignifikasi yaitu meningkatkan derajat putih dan menurunkan bilangan kappa (Camarero et al., 2007; Pujirahayu & Marsoem, 2006; Bajpai & Bajpai, 1998), *biofuel* yaitu

meningkatkan produksi etanol (Larsson, Cassland, & Jönsson, 2001), dan biosensor yaitu membantu mendeteksi beberapa senyawa fenol, oksigen, dan azida (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Sementara itu, enzim *MnP* telah diaplikasikan lebih spesifik untuk kegiatan bioremediasi (Hidayat & Tachibana, 2012). Tentu saja potensi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai *bioresource* untuk mendukung pembangunan ekonomi menuju pembangunan lingkungan hijau. Namun demikian potensi yang besar tersebut akan sangat sulit terungkap bila langkah dan sikap strategis tidak ditindaklanjuti dan diperhatikan. Tulisan ini mempelajari proses isolasi dan seleksi jamur Basidiomycetes yang berasal dari beberapa hutan tropis di Indonesia yang berpotensi memproduksi enzim Lac dan MnP, sehingga kelak diharapkan dapat dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan bioteknologi dalam arti yang nyata, seperti untuk kepentingan delignifikasi.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tubuh buah jamur yang diperoleh dari beberapa tempat di Jawa Barat, Jawa Timur, dan Kalimantan Timur, media *Malt Extract* (ME), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *polypeptone*, agar, *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR), *Dimethyl Sulfo Oksida* (DMSO), glukosa, H_2O_2 , $NaNO_3$, *ammonium tartrate*, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, *thiamine*, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, H_3BO_3 , $(Na)_2MoO_4 \cdot H_2O$, $NaOH$, ekstrak ragi, glutaraldehida, etanol absolut, aquades, asam malonat, asam disodium malonat, 2,6 dimetoksi fenol, *syringaldazine*, dimetilformamida, asam asetat glasial, asam tartarat, natrium dihidroksi tartrat, *tween80* dan natrium asetat. Jamur *Cerrena* sp. F0607 (Accession No. JX908741) diperoleh dari Laboratorium Plant Chemistry, Ehime University, Jepang. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah tabung reaksi, cawan petri, labu Erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, kuvet, timbangan analitik, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, pH meter, mikro pipet dan *tips-nya*, *cooler box*, *filter*, *blender*, *centrifuge*, *waterbath*, dan *rotary shaker*.

B. Metode Penelitian

1. Isolasi jamur

Jamur diisolasi dengan cara meletakkan potongan kecil tubuh buah jamur (0,3 x 0,3 cm) pada bagian atas media *Malt Extract Agar* (MEA), glukosa (20 g L⁻¹), *malt extract* (20 g L⁻¹), *polypeptone* (1 g L⁻¹) dan agar (20 g L⁻¹), yang mengandung RBBR (100 mg L⁻¹) pada lapisan atasnya. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan pengecekan koloni miselia jamur yang tumbuh dilakukan setiap hari. Koloni miselia jamur yang memberikan respon positif merubah warna RBBR dari biru menjadi warna coklat tua, coklat muda atau tidak berwarna, disubkulturkan pada media PDA. Proses subkultur diulang beberapa kali sampai diperoleh isolat murni. Isolat-isolat murni kemudian disimpan dalam lemari pendingin (suhu 4°C) sebelum digunakan pada proses seleksi berikutnya.

2. Seleksi jamur pada media RBBR

Jamur yang telah diisolasi dan dimurnikan, selanjutnya diseleksi pada media MEA dengan penambahan lapisan RBBR (100 mg L⁻¹) di bagian atasnya. Isolat dipotong dengan ukuran kurang lebih 0,3 x 0,3 cm, kemudian potongan isolat tersebut diletakan di tengah permukaan media agar. Kultur jamur pada cawan petri kemudian disimpan pada ruang tertutup. Pengamatan dilakukan tiap hari selama tujuh hari, baik itu pertumbuhan jamur maupun perubahan warna RBBR yang terjadi. Penelitian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk setiap isolat murni. *Cerrena* sp. F0607 dipilih sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Pemilihan genus *Cerrena* sebagai kontrol positif didasarkan pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Desai dan Nityanand (2011), Hidayat dan Tachibana (2013), serta Verma, Raghukumar, Verma, Shouche, dan Naik (2010) yang menyatakan bahwa jamur tersebut memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim Lac dan MnP dengan aktivitas yang cukup tinggi. Metode isolasi seperti itu merupakan teknik isolasi yang cepat untuk memilih jamur pelapuk putih, dan jamur pembusuk kayu lainnya sekaligus mendeteksi keberadaan aktivitas enzim ligninolitik (Muslimah & Kuswytasari, 2013; Lonergan, Jones, & Mainwaring, 1993).

3. Analisis aktivitas enzim

Untuk mengkuantifikasi enzim Lac dan MnP yang dihasilkan, isolat murni terpilih selanjutnya ditumbuhkan pada media cair *Malt Extract* (ME), glukosa (20 g L⁻¹), *malt extract* (20 g L⁻¹), *polypeptone* (1 g L⁻¹). Media cair ME dengan pH 4,5 disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Tiga buah potongan isolat jamur (0,3 x 0,3 cm) yang tumbuh pada media agar dipindahkan pada 20 mL media cair ME di 100 mL labu Erlenmeyer. Kultur cair selanjutnya diinkubasi selama tujuh hari pada ruang tertutup dan setiap isolat murni diulang sebanyak tiga kali.

Kuantifikasi aktivitas enzim dievaluasi dengan bantuan spektrofotometer Shimadzu UV/Vis-1700. Pada akhir masa inkubasi kultur cair mikroba dipisahkan melalui penyaringan untuk memisahkan miselia jamur. Media cair yang telah terbebas dari miselia mengandung enzim kasar yang siap untuk diuji.

Aktivitas enzim MnP diukur dalam campuran 50 mM *malonic buffer*, 2,6 dimetoksi fenol dan 20 mM MnSO₄ pada panjang gelombang 470 nm untuk melihat peningkatan nilai absorpsi dari proses penguraian 2,6 dimetoksi fenol, berupa perubahan warna larutan menjadi kecoklatan (Wariishi, Valli, & Gold, 1992). Sementara aktivitas enzim Lac diukur melalui peningkatan nilai absorpsi pada panjang gelombang 525 nm yang disebabkan oleh proses terurainya *syringaldazine* dalam larutan *natrium asetat buffer* menjadi warna keunguan (Leonowicz & Grzywnowicz, 1981). Aktivitas enzim yang terukur dinyatakan sebagai sebuah international unit per liter (U L⁻¹), yang memiliki arti bahwa dalam satu unit aktivitas

enzim menggambarkan jumlah enzim yang diperlukan untuk mengoksidasi 1 µmol target senyawa dalam waktu satu menit.

C. Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk rerata dan standar deviasi. Analisa sidik ragam (ANOVA) dan uji beda dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS versi 11 (Landau & Everitt, 2004).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Jamur Pelapuk Putih (*Basidiomycetes*)

Isolasi jamur pelapuk putih yang berasal dari tiga lokasi di Indonesia (Tabel 1) dengan cara menyeleksi potongan tubuh buah jamur pada media agar yang mengandung RBBR. Kemampuan calon isolat dievaluasi dengan melihat perubahan warna (respon positif), dari warna biru menjadi warna coklat tua, muda atau tidak berwarna, karena terjadinya proses oksidasi dan pemecahan ikatan *antrakuinin* (Hadibarata et al., 2012).

Selain itu, metode ini juga sangat umum digunakan untuk mengisolasi dan menyeleksi jamur pengurai dalam merombak senyawa yang bersifat persisten, bioakumulatif, dan beracun, seperti *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAHs), *polychlorinated dibenzo-p-dioxins* (PCDD), dan *polychlorinated dibenzofurans* (PCDF) (Passarini, Rodrigues, da Silva, & Sette, 2011; Sato, Watanabe, Watanabe, Harazono, & Fukatsu, 2002). Pada proses isolasi ini ditemukan

Tabel 1. Pengambilan sampel isolat

Table 1. Isolate sampling

No.	Asal isolat (<i>Isolate origins</i>)	Jumlah isolat Murni (<i>Number of pure isolates</i>)	Jumlah isolat terseleksi (<i>Number of selected isolates</i>)
1.	Pulau Jawa (<i>Java Island</i>)	70	16
2.	Pulau Kalimantan (<i>Kalimantan Island</i>)	48	4
3.	INTROF-CC*	60	6
Total sampel yang digunakan (<i>Total isolates</i>)			26

Keterangan (*Remarks*): *) INTROF – CC = *Indonesian Tropical Forest – Culture Collection*

beberapa calon isolat yang memberikan respon positif yang berbeda, yaitu: cepat, sedang dan lambat. Isolat-isolat tersebut selanjutnya dipisahkan, diisolasi, dan di-sub-kultur beberapa kali sehingga diperoleh isolat murni.

B. Seleksi Isolat Murni pada Media RBBR

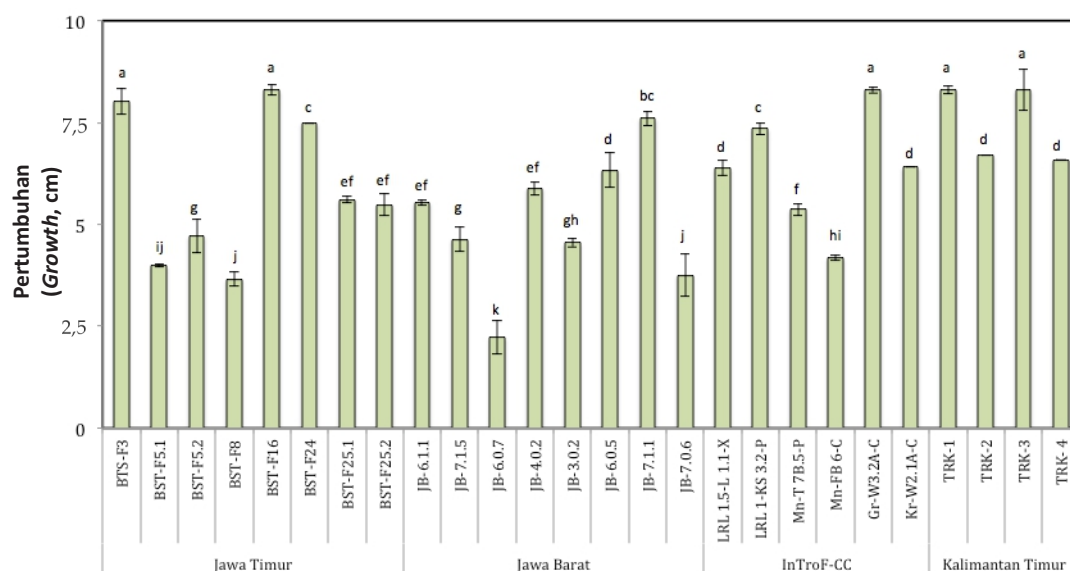
Pertumbuhan miselia dari 26 isolat pada media RBBR terlihat pada Gambar 1. Sebanyak enam isolat jamur menunjukkan pertumbuhan yang tergolong cepat dengan laju pertumbuhan lebih besar dari 1 cm per-hari. Isolat tersebut adalah JB-7.1.1 ($7,60 \pm 0,52$ cm), BST-F3 ($8,02 \pm 0,03$ cm), BST-F16 (8,3 cm), Gr-W3.2A-C (8,3 cm), TRK-1 (8,3 cm), dan TRK-3 (8,3 cm) yang diamati setelah tujuh hari masa inkubasi.

Pertumbuhan miselia yang cepat pada media RBBR dapat diabaikan bila isolat tersebut tidak mampu untuk melakukan perubahan warna RBBR. Warna biru RBBR berasal dari bagian kromofor dalam hal ini antrakuinon yang berfungsi sebagai antena penangkap panjang gelombang tertentu. Terjadinya pemecahan ikatan kuinon oleh enzim ligninolitik menjadikan warna RBBR berubah menjadi warna coklat tua,

muda atau tidak berwarna tergantung berapa banyak perubahan ikatan kuinon yang terjadi.

Terlihat pada Gambar 2, terdapat 21 isolat yang memberikan respon positif sementara sisanya memberikan respon yang negatif, yaitu isolat LRL 1.5-L 1.1-X, LRL 1-KS 3.2-P, Mn-T 7B.5-P, Mn-FB 6-C, dan Kr-W2.1A-C. Dari isolat yang memberikan respon positif, empat isolat menunjukkan laju perubahan warna yang sama dengan *Cerrena* sp. F0607, yaitu TRK-2 ($7,2 \pm 0,36$ cm), Gr-W3.2A-C ($7,4 \pm 1,31$ cm), JB-7.1.1 ($7,48 \pm 0,48$ cm) dan BTS-F16 ($7,55 \pm 1,3$ cm), sementara dua isolat lainnya memiliki laju perubahan warna yang lebih tinggi, yaitu TRK-3 ($8,25 \pm 0,09$ cm) dan TRK-1 (8,35 cm). Isolat yang mampu melakukan perubahan warna pada media RBBR mengindikasikan bahwa isolat tersebut memproduksi enzim ligninolitik (Lonergan, Jones, & Mainwaring, 1993), dan terkadang besarnya nilai perubahan warna berkorelasi positif dengan besarnya enzim yang dihasilkan.

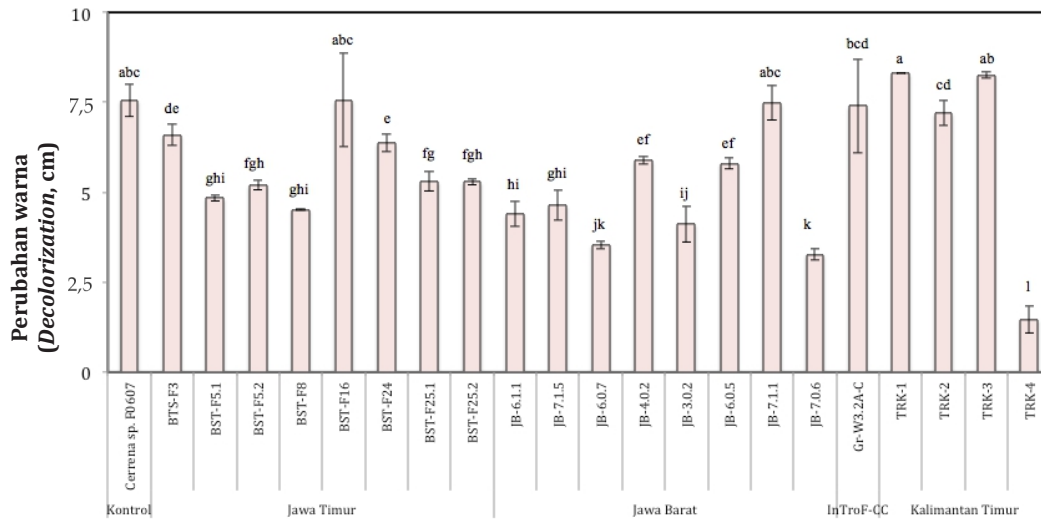
Isolat BTS-F3 tereliminasi karena meskipun laju pertumbuhan miselinya cepat tetapi laju perubahan warnanya lebih rendah ($6,58 \pm 0,29$ cm) dan berbeda secara signifikan dengan *Cerrena*



Keterangan (Remarks): Huruf kecil yang sama pada tiap bar menyatakan tidak berbeda signifikan secara statistik di antara yang lainnya ($p < 0,05$) (The same minor letter on each bar is not statistically different from each other ($p < 0.05$))

Gambar 1. Pertumbuhan 26 isolat jamur pada media MEA yang mengandung RBBR (mg L^{-1}) dilapiskan permukaan media setelah tujuh hari masa inkubasi

Figure. 1 Growth of 26 fungi isolates on MEA medium contained RBBR (mg L^{-1}) in top layer after seven days incubation time



Keterangan (Remarks): Huruf kecil yang sama pada tiap bar menyatakan tidak berbeda signifikan secara statistik di antara yang lainnya ($p < 0,05$) (The same minor letter on each bar is not statistically different from each other ($p < 0.05$))

Gambar 2. Perubahan warna RBBR 21 isolat jamur dan *Cerrena* sp. F0607 setelah tujuh hari masa inkubasi

Figure 2. RBBR decolorization by 21 fungi isolates and *Cerrena* sp. F0607 after seven days incubation time

sp. F0607. Berbeda dengan isolat BTS-F3, Isolat TKR-2 terpilih karena memiliki laju perubahan warna yang tidak berbeda secara signifikan dengan *Cerrena* sp. F0607. Jamur *Cerrena* sp. F0607 merupakan jamur yang memproduksi enzim Lac dengan jumlah yang tinggi dan digunakan untuk memproduksi enzim Lac secara masal (Hidayat & Tachibana, 2013).

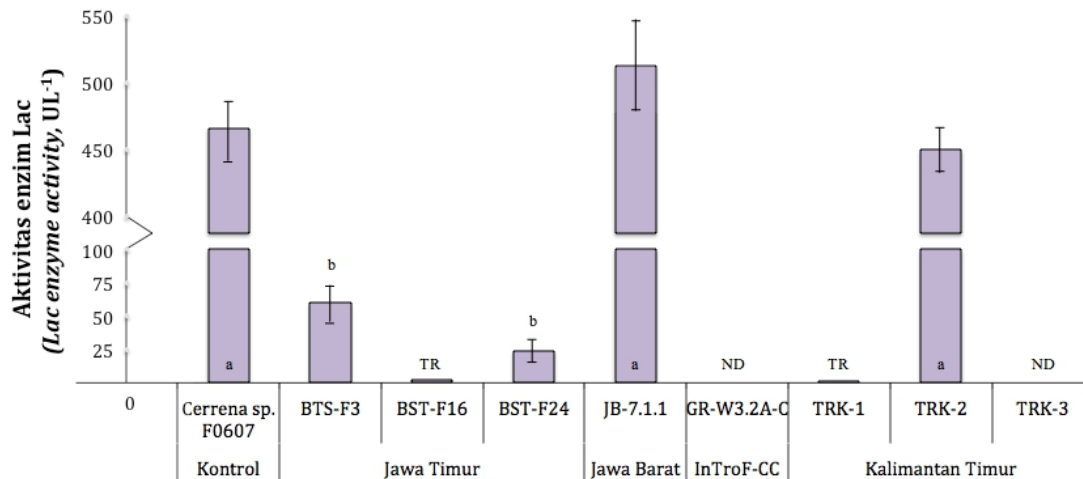
Nilai perubahan warna yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan indikator tentang kemungkinan adanya aktivitas enzim ligninolitik secara umum yang dimiliki oleh masing-masing isolat (Gold, Glenn, & Alic, 1988; (Glenn & Gold, 1983). Perlu pembuktian lebih lanjut melalui evaluasi enzimatik untuk mengkuantifikasi aktivitas enzim ligninolitik dari setiap isolat. Namun demikian nilai perubahan warna RBBR dapat dijadikan bahan acuan untuk menyeleksi isolat-isolat yang diprediksi mempunyai enzim ligninolitik, dengan langkah dan cara yang mudah, cepat, dan sederhana tanpa harus melakukan evaluasi enzimatik yang lebih rumit. Selain itu langkah seleksi ini dapat diperkaya dengan seleksi kuantitatif lanjutan melalui penambahan substrat spesifik pada media agar, seperti ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate] (Niku-Paavola, Karhunen, Salola, & Raunio, 1988), 2,6 dimetoksi penol (Wariishi et al., 1991).

C. Seleksi Produksi Enzim Lac dan MnP

Sebanyak delapan isolat yang menunjukkan laju perubahan warna RBBR (>6 cm, setelah tujuh hari inkubasi) dikulturkan kembali pada media cair MEA dan dievaluasi produksi enzim Lac dan MnP. Sebanyak lima dari delapan isolat terpilih mampu memproduksi enzim Lac dan atau MnP pada media cair tersebut seperti terlihat pada Gambar 3 dan 4. Kelima isolat itu adalah BST-F3, BST-F24, JB-7.1.1, GR.W3.2A-C, dan TRK-2.

Produksi enzim Lac tertinggi dihasilkan oleh isolat JB-7.1.1 ($526 \pm 142 \text{ UL}^{-1}$), diikuti oleh isolat TRK-2 ($463 \pm 95 \text{ UL}^{-1}$), seperti terlihat pada Gambar 3. Level produksi enzim Lac yang diproduksi oleh Isolat JB-7.1.1 dan TRK-2 secara statistik tidak berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan *Cerrena* sp. F0607 ($475 \pm 98 \text{ UL}^{-1}$). Hal ini menunjukkan bahwa isolat JB-7.1.1 dan TRK-2 memiliki potensi sebagai penghasil enzim Lac. Aktivitas enzim Lac dapat ditingkatkan melalui modifikasi medium seperti dengan penambahan nutrisi, agitasi, ko-faktor, dan mediator lainnya.

Penelitian yang dilakukan oleh Kachlishvili, Metreveli, dan Elisashvili, (2014) menyebutkan bahwa produksi Lac *Cerrena unicolor* CBS 117347 pada media padat (solid fermentation medium, SFM) sisa produksi etanol seperti dedak gandum, dapat mencapai $87,5 \text{ U mL}^{-1}$. Penambahan CuSO_4



Keterangan (Remarks): Huruf kecil yang sama pada tiap bar menyatakan tidak berbeda signifikan secara statistik di antara yang lainnya ($p < 0,05$), TR= rendah, ND= tidak terdeteksi. (The same minor letter on each bar is not statistically different from each other ($p < 0.05$), TR= traces, ND= not detected)

Gambar 3. Aktivitas enzim Lac dari delapan isolat pada media cair MEA setelah tujuh hari masa inkubasi

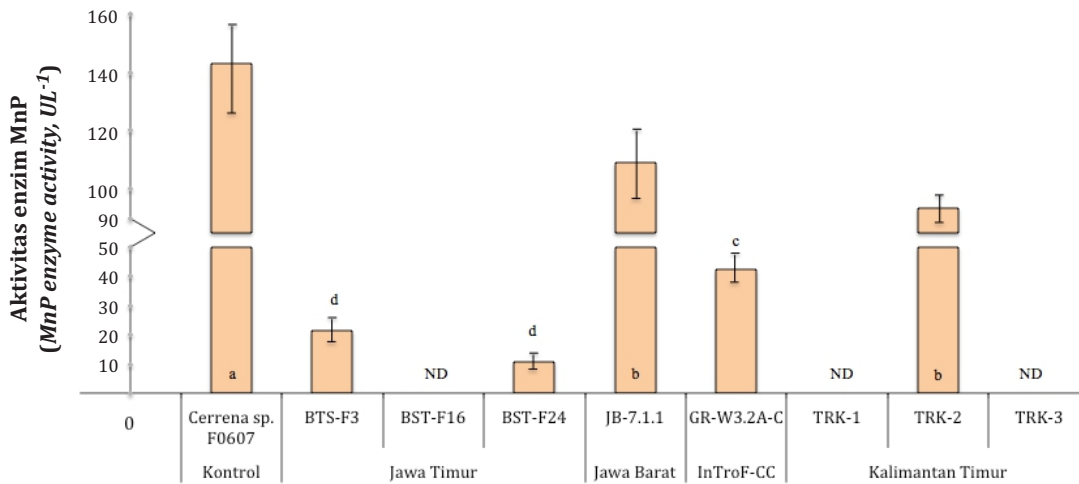
Figure 3. Enzyme Lac activity of eight isolates on MEA liquid medium after seven days incubation

memicu peningkatan 14 kali lipat aktivitas enzim Lac yang diproduksi oleh *Cerrena* sp. F0607 (Hidayat & Tachibana, 2013).

Produksi enzim MnP tertinggi dihasilkan oleh isolat JB-7.1.1 ($114 \pm 13 \text{ UL}^{-1}$), diikuti oleh isolat TRK-2 ($98 \pm 8 \text{ UL}^{-1}$) dan GR.W3.2A-C ($42 \pm 6 \text{ UL}^{-1}$), seperti terlihat pada Gambar 4. Namun level produksi enzim MnP yang diproduksi oleh isolat JB-7.1.1 dan TKR-2 lebih kecil dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan *Cerrena* sp. F0607 ($148 \pm 31 \text{ UL}^{-1}$). Sementara isolat GR.W3.2A-C hanya memproduksi enzim MnP dan tidak memproduksi enzim Lac. Berdasarkan hasil penelitian ini isolat JB-7.1.1 dan TKR-2 merupakan penghasil enzim Lac dan MnP potensial yang dapat digunakan untuk berbagai kepentingan bioteknologi.

Enzim merupakan suatu biokatalisator yang sangat efektif dalam mempercepat laju reaksi kimia (Koolman & Rohm, 2000). Kerja enzim biasanya sangat spesifik bergantung kepada tipe reaksi dan jenis reaktan. Pelczar dan Chan (1988) menggolongkan enzim dalam dua tipe utama yaitu enzim intraselular dan ekstraselular. Enzim intraselular berperan dalam mensintesis bahan-bahan selular dan menjalankan proses metabolisme untuk menyediakan energi bagi sel. Enzim ekstraselular disekresikan ke lingkungan tempat tumbuh dan berfungsi merombak sumber

nutrisi (substrat) yang memungkinkan nutrisi tersebut masuk ke dalam sel sebagai sumber karbon. Enzim Lac dan MnP termasuk enzim ekstraselular, sehingga penggunaan enzim ini dalam bidang bioteknologi sangat luas, mulai dari industri makanan, tekstil, delignifikasi, produksi etanol, biosensor, dan bioremediasi (Hadibarata et al., 2012; Karigar & Rao, 2011; Larsson et al., 2001; Majeau, Brar, & Tyagi, 2010; Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Enzim Lac dan MnP masuk dalam kategori enzim oksidoreduksi, namun dalam aplikasi bioteknologi enzim Lac lebih mudah tersedia dan mudah dimanipulasi (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Dalam proses delignifikasi (pembuatan bubur kertas dan bio-etanol), manipulasi tersebut penting dilakukan setelah pengembangan sistem *bio-bleaching* menunjukkan hasil yang kurang memuaskan. Melalui penambahan sedikit molekul yang mampu bertindak sebagai redok mediator maka enzim Lac dapat mengoksidasi struktur senyawa fenolik dan non-fenolik. Aplikasi proses delignifikasi berjalan dengan efektif, i.e enzim Lac dari *Trametes versicolor* dengan penambahan mediator yang memiliki gugus $>\text{N-OH}$ (Morozova, Shumakovich, Shleev, & Yaropolov, 2007). *American Forest and Paper Association* bekerjasama dengan *U.S. Department of Energy* memperkirakan bahwa inovasi yang akan terjadi



Keterangan (*Remarks*): Huruf kecil yang sama pada tiap bar menyatakan tidak berbeda signifikan secara statistik di antara yang lainnya ($p < 0,05$), TR= rendah, ND= tidak terdeteksi. (*The same minor letter on each bar is not statistically different from each other ($p < 0.05$), TR= traces, ND= not detected*)

Gambar 4. Aktivitas enzim MnP dari 8 isolat pada media cair MEA setelah tujuh hari masa inkubasi

Figure 4. Enzyme MnP activity of 8 isolates on MEA liquid medium after seven days incubation

di tahun 2020 adalah terintegrasi proses produksi dari material berlignoselulotik. Penelitian-penelitian untuk mendukung hal tersebut adalah eksplorasi sumber lignoselulotik baru, konversi hemiselulosa untuk bio-etanol dan sumber energi listrik terbarukan melalui bioteknologi aplikasi enzim Lac di setiap proses produksi terjadi (Cañas & Camarero, 2010). Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung inovasi dimaksud melalui aplikasi enzimatik.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Seleksi potensi jamur penghasil enzim Lac dan MnP yang berasal dari tiga lokasi hutan tropis di Indonesia diperoleh 26 isolat murni, enam diantaranya memiliki kemampuan untuk mengoksidasi RBBR. Produksi enzim Lac dan MnP tertinggi dihasilkan oleh isolat JB-7.1.1, diikuti TRK-2. Level produksi enzim Lac isolat JB-7.1.1 lebih besar dengan enzim Lac yang diproduksi oleh *Cerrena sp.* F0607, sehingga isolat JB-7.1.1 merupakan isolat potensial sebagai penghasil enzim Lac yang dapat digunakan untuk kepentingan bioteknologi, seperti proses delignifikasi.

B. Saran

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini membuka peluang pemanfaatan isolat JB-7.1.1 dan TRK-2 untuk bidang bioremediasi, khususnya untuk industri tekstil. Selanjutnya penelitian tentang identifikasi jenis (*scientific name*), peningkatan aktivitas dan isolasi enzim Lac dan MnP, proses delignifikasi, produksi etanol, dan aplikasi penggunaan lainnya perlu lebih jauh dan mendalam diteliti sehingga dapat mendukung inovasi produk turunan hasil hutan dimasa depan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan (P3H) karena Penelitian ini bersumber dari DIPA P3H. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Yuliana (G84100042), dan Tiara Dwicahyani (G84100053) mahasiswa magang dari Institut Pertanian Bogor, tim peneliti dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Hutan - P3H, Luciasih Agustini, M.Agr.Sc, Dr. Erdy Santoso, Dr. Maman Turjaman, Ir. Ragil SB Irianto, M.Sc, Aryanto, S. Hut., Najumlah, dan Ahmad Yani yang memberikan dukungan dan memfasilitasi setiap tahapan kegiatan penelitian sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai, P., & Bajpai, P.K. (1998). *Biotechnology in the pulp and paper industry* (Pira technology series). UK: Pira International.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á.T., Romero, J., Gutiérrez, A., & del Río, J.C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264-1271. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.016.
- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28(6), 694-705. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- Desai, S.S., & Nityanand, C. (2011). Microbial laccases and their applications: A review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(2), 98-124. doi:10.3923/ajbkr.2011.98.124.
- Glenn, J.K., & Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1741-1747.
- Gold, M.H., Glenn, J.K., & Alic, M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods in Enzymology*, 161, 74-78. doi:10.1016/0076-6879(88)61011-1
- Hadibarata, T., & Kristanti, R.A. (2012). Effect of environmental factors in the decolorization of remazol brilliant blue R by *Polyporus* sp. S133. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57(2), 1095-1098. doi:10.4067/S0717-97072012000200007.
- Hadibarata, T., Yusoff, A.R.M., Aris, A., Salmiati, Hidayat, T., & Kristanti, R.A. (2012). Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by laccase of a newly isolated *Armillaria* sp. F022. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(3), 1045-1054. doi:10.1007/s11270-011-0922-6.
- Hidayat, A., & Tachibana, S. (2012). Characterization of polylactic acid (PLA)/kenaf composite degradation by immobilized mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 71, 50-54. doi:10.1016/j.ibiod.2012.02.007.
- Hidayat, A., & Tachibana, S. (2013). Degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran by a new isolate of *Cerrena* sp. F0607. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, 51-55. doi:10.1016/j.ibiod.2012.11.004.
- Hofrichter, M., Lundell, T., & Hatakka, A. (2001). Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4588-4593. doi:10.1128/AEM.67.10.4588-4593.2001.
- Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M.N., Lundquist, K., & Taherzadeh, M.J. (2011). Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources*, 6, 5224-5259. doi: 10.15376/biores.6.4.5224-5259.
- Kachlishvili, E., Metreveli, E., & Elisashvili, V. (2014). Modulation of *Cerrena unicolor* laccase and manganese peroxidase production. *SpringerPlus*, 3, 463-470. doi: 10.1186/2193-1801-3-463.
- Karigar, C.S., & Rao, S.S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011 (Article ID 805187), 2011, 1-11. doi:10.4061/2011/805187.
- Kirk, T.K., & Farrell, R.L. (1987). Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2.
- Koolman, J., & Rohm, K.H. (2000). *Atlas berwarna dan teks biokimia*. Wanandi SI, penerjemah. Jakarta: Erlangga. (*Color atlas of biochemistry*).
- Landau, S., & Everitt, B. (2004). *A handbook of statistical analyses using SPSS*. USA: Chapman & Hall/CRC Press LLC.

- Larsson, S., Cassland, P., & Jönsson, L.J. (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1163-1170. doi:10.1128/AEM.67.3.1163-1170.2001.
- Leonowicz, A., & Grzywnowicz, K. (1981). Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(1), 55-58. doi:10.1016/0141-0229(81)90036-3.
- Lonergan, G.T., Jones, C.L., & Mainwaring, D.E. (1993). The effect of temperature and culture medium on the degradative activity of *Phanerochaete chrysosporium* evaluated using three qualitative screening methods. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 31(2), 107-114. doi:10.1016/0964-8305(93)90067-C.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., & Tyagi, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101(7), 2331-2350. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.087.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., & Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 13 (6-7), 205-216. doi:10.1016/S0924-2244(02)00155-3.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523-535. doi:10.1134/S00036838070-50055.
- Muslimah, S., & Kuswytasari, N.D. (2013). Potensi Basidiomycetes koleksi biologi ITS sebagai agen biodekolorisasi zat warna RBBR. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2 (1), 2337-3520.
- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., & Raunio, V. (1988). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *The Biochemical Journal*, 254(3), 877-883. doi:10.1042/bj2540877.
- Passarini, M.R.Z., Rodrigues, M.V.N., da Silva, M., & Sette, L.D. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2), 364-370. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.003.
- Pelczar, M.J., & Chan E.C.S. (1988). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Pujirahayu, N., & Marsoem, S.N. (2006). Efisiensi pemasakan bio-kraft pulp kayu sengon dengan jamur *Phanerochaete Chrysosporium*. *Agrosains*, 19, 202-203.
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- Sato, A., Watanabe, T., Watanabe, Y., Harazono, K., & Fukatsu, T. (2002). Screening for Basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 213-217. doi:10.1016/S0378-1097(02)00821-2.
- Siregar, T.M., Cahyana, A.H., & Nathalia. (2012). Pengaruh penambahan lakase dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap antioksidan teh hijau. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 23 (1), 23-28.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., & Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563-2606. doi:10.1021/cr950046o.
- Verma, A.K., Raghukumar, C., Verma, P., Shouche, Y.S., & Naik, C.G. (2010). Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation*, 21(2), 217-233. doi:10.1007/s10532-009-9295-6.
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M.H. (1991). In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(1), 269-275. doi:10.1016/0006-291X(91)90919-X.

- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M.H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695.
- Widiastuti, H., & Panji, T. (2008). Pola aktivitas enzim ligninolitik *Pleurotus ostreatus* pada limbah sludge pabrik kertas. *Menara Perkebunan*, 76(1), 47-60.
- Yaropolov, A. I., Skorobogat'ko, O.V., Vartanov, S.S., & Varfolomeyev, S.D. (1994). Laccase - properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49(3), 257-280. doi:10.1007/BF02783061