**PROFIL LIGNIN PEROKSIDASE DAN MANGAN PEROKSIDASE DARI**

***Phanerochaetea chrysosporium* ISOLAT ITB**

**Evi Susanti1,2, Tri Ardiati3 Suhardjono3, Aulani’am4**

**,**

1Doctoral Program of Biology Department, Brawijaya University, Malang, Indonesia

2Department of Chemistry, The State University of Malang, Indonesia esusan[ti.kim@gmail.com](mailto:kim@gmail.com)

3Department of Biology, Brawijaya University, Malang, Indonesia

4Department of Chemistry, Brawijaya University, Malang, Indonesia

***Abstract :*** Lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) are enzymes involved in the degradation of lignin in the white wood-rot fungus especially from *Phanerochaete chrysoporium*. Some research suggests that both of enzymes can degrade textile dyes. Production of these enzymes strongly influenced by the growth conditions and the type strains used. *P. chrysoporium* ITB isolate have been identified based on ITS4 and ITS5 sequence, indicating that these isolate have similarities as 99,6% with *P. chrysosporium* BKMF-176. *P. chrysosporium* BKMF-176 is known to produce MnP and LiP with high activity. The aims of this study were determine LiP and MnP profiles of *P. chrysosporium* ITB isolate in a medium that is specific to the peroxidase production. MnP and LiP activity generated in the production medium containing sources of N with a variation of 0, 10, 20, 30 and 40 mM at different conditions, namely: (a) without Tween-80 with shaking at 150 rpm, (b) was added Tween-80 with shaking at 150 rpm and (c) is added Tween-80 without shaking determined using a spectrophotometer. The results showed that the LiP activity is much higher than MnP activity in all treatment conditions were studied. This indicates that Phanerochaetea chrysosporium ITB isolates potential as the source of LiP. High LiP activity generated in the media without Tween-

80 with shaking at 150 rpm was 13.67 Unit/mL.

***Keywords:*** *lignin, mangan, peroksidase, Phanerochaetea, chrysosporium, ITB*

**1. PENDAHULUAN**

Limbah cair industri tekstil memiliki karakteristik bervolume besar dengan kadar pewarna yang tinggi dan sulit didegradasi. Volume limbah cair yang dihasilkan dari industri tekstil diperkirakan minimal sebanyak satu ton air per meter bahan tekstil (China Science & Technology Forum, 2005). Kandungan pewarna yang terdapat dalam limbah tersebut antara 10-200 mg/L (O'Neill dkk., 2000). Struktur molekul pewarna sulit terdegradasi karena sengaja didesain agar tahan terhadap kelembaban, cahaya, air dan beberapa senyawa kimia seperti oksidator serta degradasi oleh mikroba (Wesenberg dkk., 2003), sehingga sangat berpotensi untuk terakumulasi dalam jangka waktu yang lama. Sebagai contoh Weber & Stickney (1993) melaporkan bahwa waktu paruh *reaktif blue*

*19* pada suhu 25 oC dan pH 7,0 adalah 46 tahun.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa

mangan peroksidase (MnP) dan lignin peroksidase (LiP) mampu mendegradasi pewarna tekstil (Wesenberg dkk., 2003; Shin dkk., 2005; Urek & Pazarlioglu, 2007 dan

Chacko & Subramaniam, 2011). Peroksidase tersebut diduga mendegradasi pewarna azo melalui oksidasi gugus fenol yang terdapat pada pewarna azo membentuk senyawa radikal, oksidasi lebih lanjut memicu terjadinya hidrolisis disekitar gugus azo. Melalui mekanisme tersebut tidak dihasilkan senyawa amina aromatik sebagai produk utamanya (Chacko & Subramaniam, 2011). Maka, diduga produk hasil degradasi pewarna secara enzimatis oleh peroksidase tidak bersifat toksik. Sayangnya, enzim ini masih sangat mahal karena masih terbatasnya pengetahuan tentang produksinya. Kondisi ini diperparah dengan kurangnya data akademik mengenai karakteristik degradasinya, toksisitas dan struktur produk hasil degradasi. Akibatnya, aplikasi metoda ini cenderung hanya sebatas suatu wacana ilmiah saja.

*Phanerochaete chrysosporium* meng- hasilkan MnP, LiP dan sistem enzim oksidase penghasil H2O2 sebagai protein ekstraselular utamanya pada kondisi terbatasnya kadar nitrogen, karbon dan sulfur (Li dkk., 1995). Tetapi, Wang *et al.* (2008) menyatakan bahwa produksi enzim ligninolitik (MnP dan LiP)

pada *P. chrysosporium* sangat dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan dan strain yang digunakan. Laboratorium Mikrobiologi ITB memiliki koleksi isolat *P. chrysosporium* sejak tahun 1999. Isolat tersebut telah banyak digunakan untuk berbagai penelitian. Walaupun demikian profil LiP dan MnP dari isolat tersebut belum diteliti. Pada penelitian ini akan diperoleh profil LiP dan MnP isolat tersebut. Berdasarkan informasi ini dapat dikembangkan formula atau metoda untuk memproduksi LiP dan MnP secara mandiri. Dengan demikian tujuan jangka panjang untuk mendorong aplikasi pengolahan limbah tekstil yang ramah lingkungan sehingga membantu pemerintah memecahkan permasalahan mengenai dampak negatif dari limbah industri tekstil dapat tercapai.

**2. METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris yang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang. **Preparasi suspensi spora:**

*P. chrysosporium* diremajakan dalam

medium agar miring PDA selama 14 hari. Spora yang dihasilkan pada satu agar miring

diekstrak menggunakan empat mililiter

Tween-80 0,02 % steril dengan bantuan jarum ose, dibiarkan selama 5 menit, ditampung

dalam wadah steril, divorteks selama 10

menit, dibiarkan selama 30 menit, dikocok sebentar kemudian disaring menggunakan *glasswool* steril. Filtrat yang diperoleh adalah suspensi spora yang homogen dengan viabilitas ditas 90%.

**Produksi Peroksidase (MnP dan LiP)**

Komposisi media produksi merujuk Tien

(1978), terdiri dari: medium basal 1X, larutan glukosa 10 %, trace elemen 1X, tiamin-HCl

mg/L dan bufer asetat pH 4,5, dan amonium sulfat sebagai sumber N. Komposisi stok medium basal 10X : 20g KH2PO4, 5 g MgSO4.7H2O dan 1g CaCl2 per liter dan *trace element* 10X: 3g MgSO4.7H2O,1g NaCl, 0,1 g FeSO4.7H2O, 0,1g CoCl2, 0,1g ZnSO4.7H2O,

0,1g CuSO4.5H2O, 10 mg AlK(SO4)2.12H2O

dan 1,5g nitriloasetat per liter.

Pada penelitian ini profil LiP dan MnP

yang dihasilkan diamati pada tiga perlakuan kondisi yaitu: (a) pertumbuhan tanpa Tween-

80 dengan penggojogan 150 rpm, (b)

pertumbuhan dengan 0,5% Tween-80 dan

penggojogan 150 rpm dan (c) pertumbuhan dengan 0,5% Tween-80 tanpa penggojongan. Masing-masing perlakuan menggunakan sumber N dengan variasi 0,10, 20, 30 dan 40 mM.

Produksi peroksidase dilakukan dengan cara: suspensi spora ditambahkan ke dalam

masing-masing Erlenmeyer 100 mL yang berisi 20 mL media produksi sehingga diperoleh jumlah spora awal 1 x 106 spora/mL, diinkubasi pada suhu 30 oC Pada hari ke 2,4,6,8 dan 10 masing-masing diisolasi ekstrak kasar enzimnya. Isolasi dilakukan dengan cara media pertumbuhan disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4oC. Filtrat hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar enzim. Filtrat diukur aktivitas LiP dan MnP.

**Pengukuran aktivitas enzim:**

Penentuan aktivitas MnP merujuk

Bholay *et al.* (2012), berdasarkan kemampuan

MnP mengoksidasi fenol red secara tidak langsung. Pengurangan jumlah fenol red diamati pada panjang gelombang 610 nm. Sebanyak 250 µL Na-suksinat 200 mM, 250

µL asam laktat 200 mM, 100 µL MnSO4 1 mM, 100 µL fenol red 1 mM, 100 µL albumin

1% dan 50 µL aquaDM dimasukkan dalam

mikrotube 2 mL (campuran A), ditambah 100

µL larutan enzim (0,1 mg enzim), ditambah

50 µL H2O2 5 mM, dikocok, reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µL NaOH 4M. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 610 nm. Interval waktu pengukuran 0 dan 5 menit. Sebagai kontrol dilakukan reaksi yang sama dengan komposisi pereaksi yang sama dengan campuran A tetapi tanpa penambahan H2O2 5 mM, sehingga akuades yang ditambahkan 100 µL

berdasarkan selisih aktivitas A dikurang aktivitas B. Aktivitas enzim (U/mL)

= , dengan:

maks = absorptivitas molar fenol red

(22.000M-1cm-1)

d = tebal kuvet (cm) Vtotal = 1 mL

Venzim = 0,1 mL

T = 5 menit

Satu unit MnP sebanding dengan 1 µmol produk yang dihasilkan per menit

Penentuan aktivitas LiP merujuk Tien

& Kirk (1988), berdasarkan kemampuan LiP

mengoksidasi veratril alkohol menjadi veratril aldehida. Veratril alkohol tidak menyerap pada 310 nm, sedangkan veratril aldehida menyerap kuat dengan nilai koefisien ekstinsik molar sebesar 9300 M-1 cm-1. Sebanyak 800 µL veratril alkohol 10 mM,

1000 µL asam tatrat 0,2 M dan 1780 µL aquaDM dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 100 µL larutan enzim. Diukur serapannya pada panjang gelombang 310 nm dengan interval waktu 0 dan 5 menit (X), ditambah 320 µL H2O2 5 mM, diukur absorbansi larutan pada 310 nm dengan interval waktu 0 dan 5 menit (Y). Aktivitas enzim MnP dihitung berdasarkan selisih aktivitas Y dikurang aktivitas X. Aktivitas

enzim (U/mL) = , dengan:

maks = absorptivitas molar veratril alkohol

(9300 M-1cm-1)

d = tebal kuvet (cm) Vtotal = 4 mL

Venzim= 0,1 mL

t = 5 menit

Satu unit LiP sebanding dengan 1 µmol produk yang dihasilkan per menit

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Media yang digunakan spesifik menginduksi produksi LiP dan MnP (Gioegieva, 2009 ; Wang, 2008 ; Dey, 1991 ; Bonnarme,1990 ; Kirk, 1978), dan kadar N yang optimum ada dalam rentang tertentu (Wang, 2011; Urek, 2007; Kirk, 1978 ). Hasil percobaan ini mengindikasikan bahwa kedua peroksidase diproduksi dengan jumlah yang berbeda dalam media produksi tersebut dan kadar N yang digunakan dalam media produksi mempengaruhi tingkat produksi LiP dan MnP dari strain tersebut.

Tabel 1. Aktivitas MnP dan LiP dengan Kondisi Tanpa Tween-

80 dan Penggojogan 150 rpm pada Berbagai Variasi Jumlah N.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Peubah | Kadar  N | Waktu Pertumbuhan (Minggu ke-) | | | | |
| 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| MnP | N0 | - | - | - | 0,182 | - |
| N10 | - | - | 0,091 | 0,091 | - |
| N20 | - | - | - | 0,000 | 0,091 |
| N30 | - | - | - | - | - |
| N40 | - | - | - | - | - |
| LiP | N0 | - | - | 0,860 | 1,720 | 4,301 |
| N10 | - | - | - | 6,882 | - |
| N20 | 3,441 | - | - | 6,882 | - |
| N30 | - | 2,581 | 3,441 | 13,673 | - |
| N40 | - | - | 2,581 | 2,581 | - |

Tabel 1 menunjukkan bahwa dalam media produksi tanpa Tween-80 dengan penggojogan 150 rpm didapati produksi LiP jauh lebih tinggi daripada MnP pada semua variasi jumlah N yang diuji. Aktivitas MnP yang terukur sangat rendah bahkan bisa dikatakan aktivitasnya tidak signifikan, sedangkan aktivitas LiP secara kuantitatif sangat signifikan. Berdasarkan Tabel 1 dapat ditarik kesimpulan dalam media tanpa Tween-

80 dengan penggojogan 150 rpm akan menghasilkan LiP optimum pada jumlah N

sebesar 30 mM.

Tabel 2. Aktivitas MnP dan LiP dengan Kondisi Menggunakan Tween-80 dengan Penggojogan 150 rpm pada berbagai Variasi Jumlah N.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Peubah | Kadar N | Waktu Pertumbuhan (Minggu ke-) | | | | |
| 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| MnP | N0 | - | - | - | - | 0,273 |
| N10 | - | 0,182 | - | - | 0,000 |
| N20 | - | 0,091 | - | - | 0,454 |
| N30 | - | - | 1,091 | 0,545 | 0,000 |
| N40 | - | - | - | - | - |
| LiP | N0 | - | - | - | - | - |
| N10 | - | - | - | - | - |
| N20 | - | - | - | - | - |
| N30 | - | 8,602 | - | - | 0,000 |
| N40 | - | - | - | - | 0,000 |

Tabel 2 menunjukkan dalam media yang menggunakan Tween-80 dengan penggojogan

150 rpm didapati produksi MnP lebih baik

daripada LiP. Aktivitas MnP sedikit lebih tinggi daripada kondisi sebelumnya sedangkan aktivitas LiP menurun. Walaupun demikian aktivitas MnP yang dihasilkan tetap rendah. Tabel 2 menunjukkan bahwa dalam media yang menggunakan Tween-80 dengan penggojogan 150 rpm aktivitas MnP dan LiP optimum pada jumlah N sebesar 30 mM.

Tabel 3. Aktivitas MnP dan LiP dengan kondisi Tween-80

Tanpa Penggojogan Pada Berbagai Variasi Jumlah N.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Peubah | Kadar  N | Waktu Pertumbuhan (Minggu ke-) | | | | |
| 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| MnP | N0 | - | 0,545 | - | 0,000 | 0,273 |
| N10 | 0,091 | 0,455 | 0,545 | 0,091 | - |
| N20 | 0,000 | - | - | 0,273 | 0,818 |
| **N30** | **0,091** | **2,091** | **0,909** | **0,273** | **0,000** |
| N40 | - | - | 0,182 | - | - |
| LiP | N0 | - | - | 4,301 | - | - |
| N10 | - | - | - | 1,270 | - |
| N20 | - | 2,581 | - | - | - |
| **N30** | **-** | **-** | **-** | **-** | **1,270** |
| N40 | - | - | - | - | 0,860 |

Tabel 3 menunjukkan dalam media menggunakan Tween-80 tanpa penggojogan didapati MnP dapat diproduksi dengan aktivitas lebih tinggi dibandingkan kondisi sebelumnya tetapi konsisten bahwa

aktivitasnya tetap lebih rendah dari pada aktivitas LiP yang dihasilkan.

Hasil ini mengindiksikan bahwa *P. chrysosporium* isolat ITB menghasilkan LiP

yang jauh lebih tinggi dibandingkan MnP. Diduga ini merupakan karakter profil LiP dan MnP dari isolat tersebut. Wang *et al.* (2008)

menunjukkan bahwa produksi enzim ligninolitik (MnP dan LiP) sangat dipengaruhi

oleh kondisi pertumbuhan dan strain yang digunakan (lihat Tabel 4).

Tabel 4.8. Produksi Enzim Ligninolitik dari *P. chrysosporium*

Chacko, J. T. & K. Subramaniam. 2011.

Enzymatic degradation of azo dyes-a review. *International Journal of*

*Environmental Science*, 1(6):1250-1260.

China Science & Technology Forum. 2005.

**Countermeasures and problems facing the 21st century textile industry**. China Science & Technology Forum.

Dey, A., T.K. Maiti, N.Saha, R. Banerjee & Bhattacharyya. 1991. Extracellular

protease and amylase activities in

ligninase-producing liquid culture of

*Phanerochaete chrysosporium*. *Process*

Organisme Tipe kultur Aktivitas enzim

tertinggi (U/L)

LiP MnP

Waktu

pertumbu han

Referensi

*Biochemistry*. 26:325-329

*P. chrysosoporium*

*P. chrysosoporium*

ME-446

*P. chrysosoporium*

(ATCC 20696)

*P. chrysosoporium*

Optimum Penggojogan < 2 240 7 Xiong, 2008

Penggojogan 475 610 3 Kapich,

2004

Penggojogan 541 88,5 8 Wang, 2008

Stationer - 60 5 Pazarlioglu,

Georgieva, N. 2009. Ligninolytic enzymes

produced by Phanerochaete chrysosporium

1038 and biotransformation of lignin,

*Biotechnology & Biotechnology. EQ. 23*. Li, D., M. Alic., J.A. Brown & M.H. Gold.

(ATCC 24725)

2005

1995. Regulation of manganese peroxidase

*P. chrysosoporium*

(ATCC 34541)

Stationer 77 101 21 Novotny,

2004

gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress and molecular oxygen,

Tampak bahwa *P. chrysosporium* ATCC

24725 konsisten memiliki profil LiP jauh lebih rendah daripada MnP. Penelitian ini sejalan dengan pendapat Wang, 2008. Pada kondisi pertumbuhan yang berbeda relatif aktivitas LiP jauh lebih tinggi daripada MnP. Berdasarkan fakta pada percobaan di atas, strain ini lebih menguntungkan dijadikan sumber enzim LiP karena aktivitasnya selalu terukur secara kuantitatif pada berbagai kondisi pertumbuhan. Rendahnya aktivitas MnP yang dihasilkan menguntungan akan mempermudah tahap pemurnian untuk memperoleh LiP.

**4. KESIMPULAN**

*Phanerochaetea chrysosporium* Isolat ITB potensial menjadi sumber enzim LiP karena pada semua kondisi produksi yang diuji aktivitas LiP yang dihasilkan jauh lebih tinggi daripada MnP. Aktivitas LiP tertinggi dihasilkan pada kondisi tanpa Tween-80 dengan pengojogan 150 rpm dan sumber N sebesar 30 mM sebesar 13,67 Unit/mL.

**5. REFERENSI**

Bonnarme, P., J. Perez & T. W. Jeffries.1991.

**Regulation of ligninase production in white-rot fungi**, ACS symposium series

460. American Chemical Society. Washington DC.

*Applied and Environmetal Microbiology*,

61(1):341-345

O’Neill, C. A. Lopez. S. Esteves. F.R.

Hawkes. D. L. Hawkes & S. Wilcox.

2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment systemoperating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology Biotechnology.* 53:249-254.

Shin, K., Young H. Kim. & J. Lim. 2005.

Purification and characterization of manganese peroxidase of The white-rot

fungus *Irpex laceus. The Journal of*

*Microbiology.* 43( 6):503-509

Tien, M & Kirk, T.K. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. dalam Wood, Willis A., Kellogg, Scott T. (eds). **Methods in enzymology-Biomass, part b, lignin, pectin, and chitin**. Vol. 161, San Diego, CA: Academic Press, Inc. hal 238-249.

Urek, R. O. & N. K. Pazarlioglu. 2007.

Enhanced production of manganese peroxide by *Phanerochaetea*

*chrysosporium*. *Brazilian Archives of*

*Biology and Technology*. 50(6):913-920

Wang, P., X. Hu, S. Cook, M.Begonia, Lee, S.Ken & H.Hwang. 2008. Effect of culture condition on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC

20696) and separation of its lignin

peroxidase. *World Journal Microbiology*

*Biotechnology*. 24: 2205-2212

Weber E.J. & Stickney V.C. 1993. Hydrolysis kinetics of reactive blue 19-vinyl

sulfone. *Water Res*. 27:63-67

Wesenberg, D. Irine K. & Spiros N. A. 2003.

White-rot fungi and their enzyme for

treatment of industrial dye effluents,

*Biotechnology Advances*, 22: 161-187.