
PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI MEDIATOR PADA BIODELIGNIFIKASI MENGGUNAKAN ENZIM KASAR LIGNIN PEROKSIDASE

Arief Widjaja, Ferry, Musmariadi
Laboratorium Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia,
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Kampus Sukolilo Surabaya 60111
Telp. 031-5946240, Fax. 031-5999282, E-mail : jtk-its@idola.net.id

Naskah diterima 21 Mei 2004, dinilai 23 Mei 2004, dan disetujui 8 Nopember 2004

Abstrak

Industri pulp dan kertas di dunia menghadapi tekanan yang semakin keras dari organisasi peduli lingkungan yang berkaitan dengan proses penghilangan lignin yang mencemari lingkungan. Pada umumnya proses penghilangan lignin dilakukan dengan menggunakan senyawa kimia yang menghasilkan limbah yang berbahaya bagi lingkungan. Proses delignifikasi menggunakan cara biologi (biobleaching atau biopulping), antara lain dengan menggunakan enzim lignin peroksidase, tanpa atau sedikit menggunakan bahan kimia berbahaya merupakan proses yang ramah lingkungan sehingga memberikan alternatif yang menjanjikan. Pada percobaan ini telah dilakukan proses biodelignifikasi menggunakan enzim kasar yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih. Enzim Lignin Peroksidase (LiP) yang diproduksi jamur pelapuk putih ini membutuhkan mediator sebagai kofaktor bagi kerja enzim secara *in vitro*. Mediator yang dipakai adalah veratryl alcohol (VA) dan H_2O_2 , dimana konsentrasinya digunakan sebagai variabel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan menggunakan enzim kasar dari jamur pelapuk putih *Phanerochaete chrysosporium*, dicapai degradasi lignin tertinggi untuk substrat bagas sebesar 28,7% pada perbandingan mediator 40 mM VA: 40 mM H_2O_2 , sedangkan tanpa penambahan mediator degradasi lignin hanya sebesar 10,8%. Dengan perbandingan mediator yang sama, untuk substrat pulp, dicapai degradasi lignin sebesar 28,2%, sedangkan tanpa penambahan mediator hanya didapatkan degradasi lignin sebesar 9,5%.

Kata Kunci : Lignin Peroksidase, Biopulping, Biobleaching, Pulp, Mediator

Abstract

Pulp and paper industries all over the world are facing an ever increasing pressure from environmentally concern organization due to lignin delignification using chemicals that is harmful for the environment. Lignin degradation process using biological treatment such as using enzyme lignin peroxidase is very promising since it is a benign process using minimum or even no hazardous chemicals. Biodelignification process has been performed using crude enzymes secreted from White Rot Fungi. The enzymes are Lignin Peroxide (LiP), in which these enzymes need the addition of mediator as cofactor in order for the enzymes to work *in vitro*. The mediators used for LiP are veratryl alcohol (VA) and H_2O_2 in which their concentration was varied. It was shown from the experiments that by using these crude enzymes, 28,7% of lignin degradation on baggase were achieved using VA: H_2O_2 ratio of 40/40 mM, and without mediators lignin degradation was only 10,8%. Using the same ratio of mediators, 28,2% of lignin degradation on pulp was achieved, and without mediators lignin degradation on pulp were just 9,5%.

Key Words : Lignin Peroxidase, Biopulping, Biobleaching, Pulp, Mediator

I. Pendahuluan

Kegiatan utama dalam industri pulp dan kertas adalah proses penghilangan lignin (delignifikasi) dengan bahan-bahan kimia antara lain NaOH, Na₂S, Sulfit, dan Bisulfit yang diikuti dengan proses pemutihan kertas (*bleaching*) yaitu proses penghilangan sisa lignin dengan bahan-bahan kimia sebagai oksidator antara lain klorin, kalsium hipoklorit, klorin dioksida, dan peroksida. Pemakaian bahan-bahan kimia dan energi yang cukup besar pada industri pulp dan kertas masih sulit dihindari untuk menghasilkan produk kertas yang baik. Penggunaan bahan kimia khususnya klorin dalam proses penghilangan lignin menghasilkan buangan yang sangat berbahaya bagi lingkungan. Berkaitan dengan hal ini, industri pulp dan kertas di dunia menghadapi tekanan yang semakin besar dari organisasi peduli lingkungan untuk menggunakan proses yang ramah lingkungan.

Banyak peneliti mengupayakan alternatif baru sebagai pengganti proses delignifikasi menggunakan senyawa klorin. Salah satu proses yang sangat menjanjikan yaitu penerapan bioteknologi dengan memanfaatkan jamur pelapuk putih yang dapat mendegradasi lignin (Leatham dkk, 1990; Kirk dan Chang, 1990; Valli, 1997). Meskipun biodelignifikasi menggunakan jamur pelapuk putih merupakan proses yang ramah lingkungan, hemat energi serta menghasilkan produk pulp dan kertas dengan kualitas yang baik, akan tetapi dibandingkan dengan proses kimia atau mekanis, proses ini sangat lambat. Hal ini mengakibatkan aplikasi proses ini dalam skala industri masih sangat jarang dilakukan.

Isolasi enzim yang berperan dalam proses degradasi lignin yang dilakukan oleh jamur pelapuk putih kemudian mengaplikasikan proses degradasi lignin ini secara *in vitro* diharapkan mampu mempercepat proses biodelignifikasi ini. Jamur pelapuk putih menghasilkan enzim peroksidase yang mampu mendegradasi lignin (Shimada, 1987; Tien dan Kirk, 1988; Nakamura dan Sawada, 1997). Dalam metabolismenya, jamur pelapuk putih ini memproduksi suatu zat dengan berat molekul rendah yang merupakan kofaktor atau mediator bagi kerja enzim. Mediator ini bersama-sama dengan enzim lignin peroksidase akan berfungsi aktif dalam pendegradasian lignin. Pada biodelignifikasi menggunakan jamur pelapuk putih atau biodelignifikasi secara *in vivo*, mediator ini tidak perlu ditambahkan ke dalam sistem karena mediator ini secara otomatis diproduksi oleh jamur. Tetapi jika degradasi lignin dilakukan bukan oleh jamur pelapuk putih tetapi oleh enzim

lignin peroksidase yang dihasilkan dari jamur ini (biodelignifikasi secara *in vitro*), maka mediator ini harus ditambahkan kedalam sistem reaksi. Mediator yang dibutuhkan oleh enzim lignin peroksidase adalah veratryl alkohol (VA) dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Penelitian terdahulu yang telah dilakukan menggunakan enzim peroksidase (Shimada, 1987; Tien dan Kirk, 1988; Nakamura dan Sawada, 1997) belum melakukan optimasi jumlah mediator yang harus ditambahkan. Seberapa besar jumlah mediator yang ditambahkan akan mempengaruhi seberapa besar proses delignifikasi berjalan kurang optimal, sebaliknya terlalu banyak mediator juga bisa menghambat proses reaksi yang terjadi karena jumlah yang terlalu banyak akan menjadikan mediator ini sebagai inhibitor bagi proses reaksi.

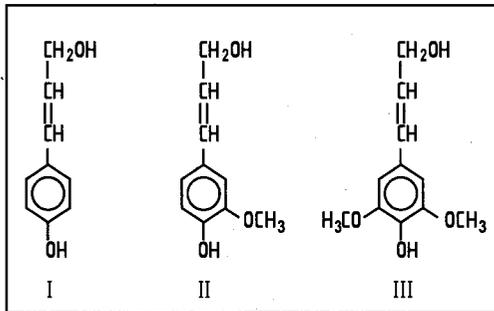
Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui seberapa besar pengaruh penambahan mediator yaitu veratryl alkohol (VA) dan H₂O₂ terhadap kinerja enzim pada degradasi lignin ini serta mencari ratio mediator terbaik yang menghasilkan degradasi lignin terbaik. Dari hasil penelitian ini diharapkan proses delignifikasi yang ramah lingkungan ini bisa dilakukan dengan lebih optimal.

2. Fundamental

Delignifikasi merupakan penghilangan lignin dari kayu tanpa mengikutsertakan polisakarida, sedangkan *bleaching* yang bertujuan untuk menghilangkan sisa lignin yang masih terdapat dalam pulp. Pada umumnya proses *bleaching* kraft pulp menggunakan bahan kimia klorin dan turunan klorin, dimana dari unit ini akan dihasilkan limbah cair yang mengandung *chlorinated organic compounds* yang diketahui sangat berbahaya terhadap lingkungan. Dalam pengembangan teknologi *bleaching* juga telah ditemukan beberapa metoda *bleaching* yang lebih aman terhadap lingkungan, antara lain teknologi *bleaching* dengan konsep ECF (*elementally chlorine free*) dan TCF (*total chlorine free*) serta penerapan *biobleaching*. Pada konsep ECF unsur khlor masih boleh digunakan, tetapi tidak dalam bentuk Cl₂ melainkan dalam bentuk senyawa lain misalnya ClO₂ sedangkan pada konsep TCF sama sekali tidak digunakan unsur khlor dan sebagai pengganti khlor biasanya digunakan oksigen atau ozon.

Alternatif metode delignifikasi lainnya adalah memanfaatkan kinerja mikroba yang disebut biodelignifikasi. Mikroba yang biasanya digunakan adalah jamur pelapuk putih antara lain *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Phellinuspinii*, *Phlebia tremellosus*. Jamur ini menghasilkan enzim-enzim utama

pendegradasi lignin. Secara teoritis teknologi ini sangat aman terhadap lingkungan karena tidak menggunakan bahan-bahan kimia. Enzim-enzim ini akan menggantikan peran bahan-bahan kimia pada proses delignifikasi dan *bleaching* pada proses yang telah disebutkan sebelumnya.



Gambar 1. Unit Pembentukan Lignin P-Koumaril alkohol (I), Koniferil alkohol (II), Sinapil alkohol (III)

Selulosa, lignin dan hemiselulosa merupakan komponen makromolekul penyusun kayu. Struktur molekul lignin sangat berbeda dibandingkan dengan polisakarida (selulosa dan hemiselulosa) karena terdiri dari sistem aromatik yang tersusun atas unit-unit fenilpropana. Dalam kayu lunak kandungan lignin lebih banyak bila dibandingkan dalam kayu keras dan juga terdapat beberapa perbedaan struktur lignin dalam kayu lunak dan dalam kayu keras. P-hidroksisinasil alkohol dalam bentuk P-koumaril alkohol (I), koniferil alkohol (II) dan sinapil alkohol (III) merupakan senyawa induk primer (Gambar 1) dan merupakan unit pembentuk semua lignin (Fengel dan Wegener, 1984). Dalam lignin, komponen fenilpropana teranyam sebagai jala oleh ikatan C - C atau eter dalam berbagai bentuk. Ikatan-ikatan ini resisten terhadap pengaruh enzim.

Dalam tumbuhan-tumbuhan, lignin merupakan produk akhir metabolisme. Dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa, lignin dipecah amat lambat oleh jamur dan bakteri (Schlegel dan Hans G, 1984). Lignin merupakan zat amorf dimana berat molekulnya sulit untuk ditetapkan karena lignin merupakan bahan *polydisperse*. Struktur kimia dari lignin juga sulit untuk ditetapkan, namun beberapa pola ikatan telah digambarkan dalam lignin kayu lunak (Hatakka, 2001).

Dari hasil studi mikrobiologi lignin hingga saat ini, tidak diketahui secara pasti mekanisme degradasi lignin dalam kayu oleh mikroorganisme seperti jamur pelapuk putih. Degradasi lignin oleh jamur pelapuk putih telah dipelajari secara intensif selama 30 tahun terakhir,

yang berhubungan dengan aplikasi bioteknik seperti dalam *biopulping* dan *biobleaching* pada industri pulp. (Hatakka, 2001). Namun pada awal hasil studi mengarahkan para peneliti untuk mengambil suatu keputusan sementara bahwa setidaknya ada tiga model reaksi degradasi yang beroperasi dalam dekomposisi dari makromolekul lignin oleh Jamur pelapuk putih (Kirk dan Chang, 1980). Tiga model reaksi tersebut adalah oksidasi pemutusan ranting samping antara α dan β karbon mengarahkan untuk pembentukan dari asam aromatic, pemutusan dari ikatan β -aryl ether dan modifikasi dari struktur rantai samping, serta degradasi dari aromatik nuclei melalui pembukaan cincin oksidatif. Jamur pelapuk putih menyerang kayu terutama pada ligninnya. Dilihat dari macam kegiatannya, enzim-enzim ini terikat di permukaan hifa, dengan cara demikian memungkinkan terjadinya kontak dengan lignin pada dinding sel. *Phanerochaete chrysosporium* memproduksi enzim ekstraseluler heme peroksida yang digunakan untuk mendegradasi lignin.

Lignin peroksidase merupakan enzim peroksidase yang unik yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih. Dengan penambahan veratryl alcohol sebagai kosubstrat, veratryl alcohol ini akan dioksidasi oleh peroksidase menjadi suatu kation radikal yang kemudian mendegradasi lignin. Enzim ini dapat mengoksidasi lignin fenolik maupun lignin non fenolik (Wariishi, 1998).

Siklus katalitik lignin peroksidase adalah sama dengan peroksidase yang lain dimana enzim *ferric* pertama dioksidasi oleh H_2O_2 untuk menghasilkan komponen I. Selanjutnya komponen I direduksi oleh 1 elektron donasi oleh molekul substrat, membentuk komponen II dan radikal bebas. Siklus katalitik disempurnakan oleh 1 elektron reduksi komponen II oleh molekul substrat 2. Dengan tidak adanya substrat pereduksi, enzim akan mengalami reaksi seri dengan H_2O_2 membentuk komponen III, *oxyperoksidase*. Inkubasi enzim dengan H_2O_2 tanpa substrat pereduksi seperti veratryl alcohol dapat menyebabkan enzim mengalami *irreversible inactivation*. Veratryl alcohol secara normal diproduksi oleh kultur ligninolitik *Phanerochaete chrysosporium* yang berfungsi untuk melindungi enzim dari inaktivasi oleh H_2O_2 (Koduri dan Tien, 1995).

Pada umumnya mediator mempunyai berat molekul yang rendah. Dalam proses delignifikasi diperkirakan mediator ini menjadi suatu radikal yang diaktifkan oleh enzim dimana kemudian bereaksi dengan lignin. Banyak senyawa dan

radikal dengan masa molekul rendah yang telah dianjurkan sebagai faktor bergerak yang akan menembus kayu dan mulai untuk melakukan pengurangan lignin. Diantaranya adalah, veratryl, alkohol, oxalat, malate, fumarate, dan 3-hydroxyanthranilic acid yang diproduksi sebagai hasil metabolisme jamur dan sekresinya memungkinkan jamur untuk membentuk koloni dan mendegradasi kayu lebih efektif dibandingkan organisme lain.

Veratryl alkohol dan oxalate merupakan hasil metabolisme sekunder dari *Phanerochaete chrysosporium* dan jamur pelapuk putih lain. Pembentuk termasuk didalamnya lignin peroksidase sebagai substrat, dan selanjutnya peran manganese peroksidase sebagai perubah Mn^{2+} menjadi Mn^{3+} (Leonowicz, 1999).

Nakamura dan Sawada (1996) dari hasil penelitiannya memperoleh lignin peroksidase dari *Phanerochaete chrysosporium* dengan menggunakan busa polyurethane sebagai carrier dari miselium jamur amobil. Dengan penambahan 0,05 % Tween 80, 1 mM Veratryl alkohol dan 1 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, maka aktifitas lignin peroksidase meningkat 3 kali lebih besar jika dibandingkan tanpa penambahan bahan-bahan tersebut. Produksi tersebut dihasilkan pada suhu 30 - 37°C dan waktu inkubasi diatas 3 hari.

Camarero dan Sarkar (1999) menyimpulkan bahwa LiP dan MnP dari *Phanerochaete chrysosporium* dipertimbangkan sebagai dua model yang mewakili semua peroksidase ligninolitik. Enzim peroksidase mampu untuk membentuk dua reaksi oksidasi dengan LiP yang mengoksidasi substrat aromatik nonfenolik, dan MnP mengoksidasi Mn^{2+} menjadi Mn^{3+} secara langsung.

Have R, dkk, (1999) menjelaskan bahwa lignin peroksidase adalah enzim ekstraselular penting yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih, dimana enzim ini berperan penting dalam degradasi lignin. Lignin peroksidase berfungsi bersama dengan kofaktor veratryl alkohol (VA) yang melindungi enzim dari inaktivasi oleh H_2O_2 berlebih, namun juga berperan sebagai mediator redoks selama oksidasi molekul lain yang dapat dioksidasi dan memiliki potensial ionisasi rendah.

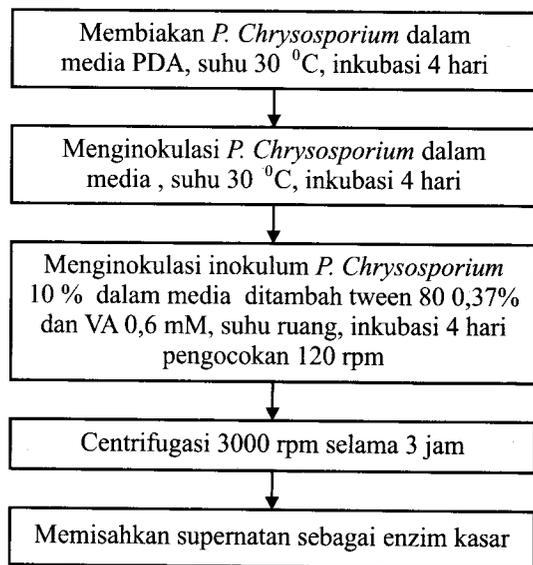
3. Metodologi

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Phanerochaete chrysosporium* yang dapat diperoleh di jurusan Teknik Kimia FTI ITS, ditanam dalam media PDA sebagai stock kultur selama 4 hari masa inkubasi, kemudian dipindahkan ke dalam media liquid yang spesifik, yaitu media dengan kadar nitrogen terbatas seperti diberikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Media yang Digunakan

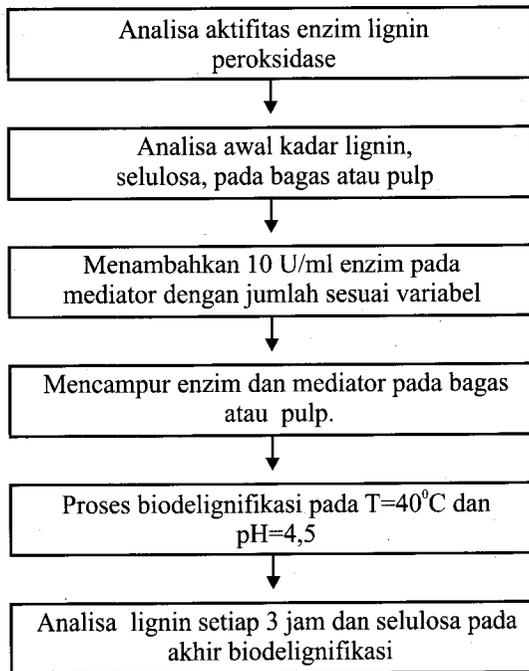
Komponen	Jumlah (per liter)
thiamin	10 mg
glukosa	10 gr
ammonium tartrat $(NH_4)_2C_4H_4O_6$	0,2 gr
sodium 2,2 dimetilsuksinat	20 gr
KH_2PO_4	20 gr
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ($CaSO_4$)	1 gr
$MgSO_4$	3 gr
$MnSO_4$	0,5 gr
NaCl	1 gr
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 gr
$CoCl_2$	0,1 gr
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 gr
$CuSO_4$	10 mg
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	10 mg
$Na_2M(O_4 \cdot 2H_2O)$	10 mg

Pembiakan dilakukan dengan pengocokan dan di dalamnya diberikan butiran bola kaca kecil, dan diinkubasikan selama 4 hari dalam kondisi suhu ruang, dan kemudian disentrifugasikan dengan kecepatan putar 5000 rpm, untuk memisahkan enzim dan biomasanya. Skema kerja produksi enzim kasar diberikan dalam Gambar 2, sedangkan skema kerja proses biodelignifikasi diberikan dalam Gambar 3. Proses biodelignifikasi dilakukan terhadap dua macam bahan yaitu bagas dan plup. Kedua bahan ini diambil dari PT. Pabrik Kertas Leces Probolinggo dan tidak dilakukan *pretreatment* sebelumnya.



Gambar 2. Skema Kerja Produksi Enzim Kasar

Enzim yang dianalisa adalah enzim Lignin Peroksidase (LiP), yang merupakan hasil metabolisme sekunder dari jamur *P. chrysosporium*. Enzim kasar ini diperoleh dengan cara memisahkan supernatan dari biomassa dengan menggunakan unit sentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 jam. Supernatan kemudian direaksikan dengan larutan VA 10 mM. Enzim LiP dapat mengoksidasi VA sehingga dapat diketahui aktifitasnya dengan cara menghitung jumlah VA yang berubah menjadi produk. Analisa aktifitas enzim lignin peroksidase dilakukan dengan menentukan konsentrasi veratryl alkohol yang teroksidasi dalam satu satuan waktu, dengan spektrofotometer pada $\lambda = 310$ nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah μmol veratryl alkohol yang teroksidasi per menit. Analisa lignin dan selulosa menggunakan prosedur sesuai dengan ASTM standard (1981a, 1981b).



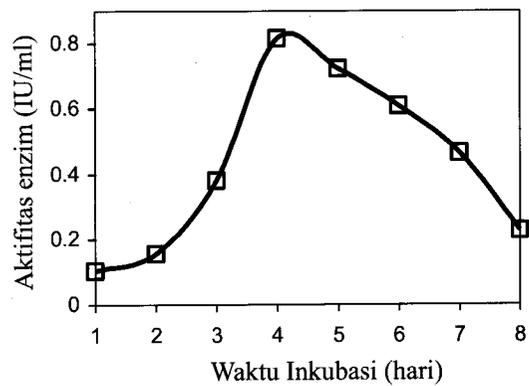
Gambar 3. Skema Kerja Proses Biodelignifikasi pada Bagas dan Plup

4. Hasil dan Pembahasan

Pembahasan ini terbagi atas 3 hal penting, yaitu produksi enzim, penentuan kondisi optimum, dan percobaan utama.

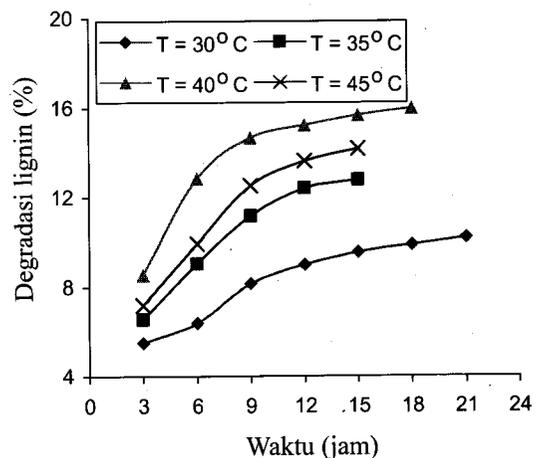
Dari Gambar 4 tampak bahwa aktifitas enzim LiP naik seiring dengan pertumbuhan massa sel jamur. Aktifitas tertinggi dicapai pada hari ke-4, yaitu sebesar 0,81 U/ml. Selanjutnya enzim mengalami penurunan yang disebabkan

karena pertumbuhan jamur yang mulai menurun, dan adanya kematian sel. Hal ini merupakan sampah, yang menghambat kerja metabolisme jamur. Terjadinya kenaikan aktifitas enzim yang cukup signifikan, tidak terlepas dari pengaruh adanya suplemen Tween 80. Suplemen Tween 80 ini adalah sebagai senyawa aktif permukaan yang berfungsi menurunkan tegangan permukaan sel, sehingga sel dapat mengeluarkan hasil metabolismenya yang berupa enzim LiP.



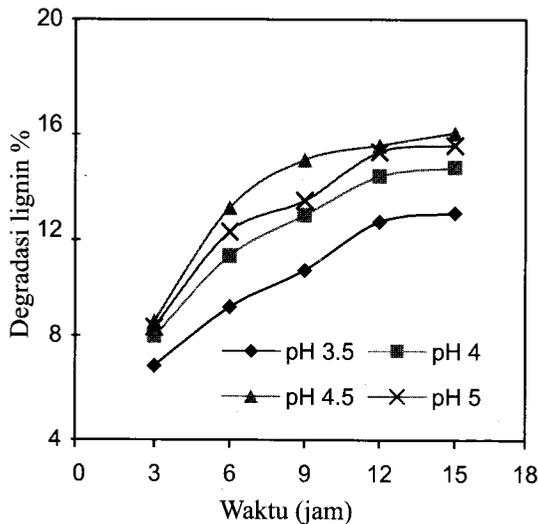
Gambar 4. Hubungan Aktifitas Enzim LiP terhadap Waktu Inkubasi

Dari Gambar 5 didapatkan degradasi lignin paling tinggi pada suhu 40°C sebesar 15,9%. Diatas suhu 40°C degradasi lignin turun, hal ini menunjukkan bahwa kemampuan enzim untuk mengubah substrat makin kecil karena enzim sebagai protein terdenaturasi. Suhu optimum 40°C digunakan untuk menentukan pH optimum dengan berbagai variasi pH.



Gambar 5. Hubungan % Degradasi Lignin oleh Enzim Kasar *P. chrysosporium* pada Berbagai Suhu terhadap Waktu Biodelignifikasi

Dari Gambar 6, pada pengukuran aktifitas enzim pada berbagai nilai pH, terlihat bahwa enzim kasar *P. chrysosporium* mempunyai kemampuan mendegradasi lignin terbesar pada pH 4,5 yaitu 15,6% pada waktu biodelignifikasi 15 jam.

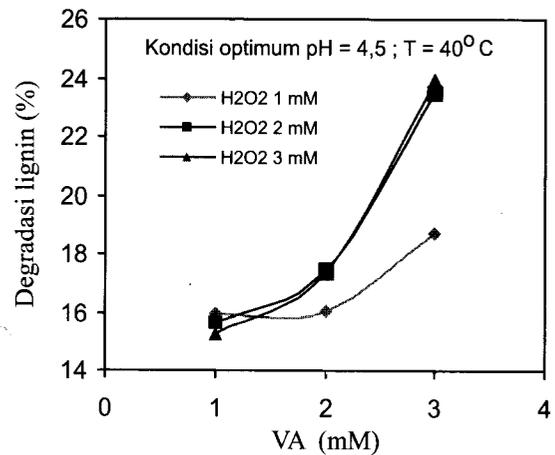


Gambar 6. Hubungan % Degradasi Lignin oleh Enzim Kasar *P. chrysosporium* terhadap Waktu pada berbagai pH

VA merupakan mediator yang dihasilkan sebagai akibat metabolisme jamur dan pengeluaran VA memungkinkan jamur untuk membentuk koloni dan mendegradasi kayu lebih efektif dari pada organisme lain (Leonowics dan Matuszewka, 1999). VA merupakan hasil metabolisme sekunder dari *P. chrysosporium* dan jamur pelapuk putih lainnya, pembentukannya melibatkan katalis lignin peroksidase sebagai substrat. Reaksi antara lignin peroksidase dengan VA mengakibatkan terbentuknya suatu kation radikal pusat yang berubah menjadi veratryldehyde atau sejumlah quinone (de Jong dkk., 1994). Dengan kehadiran turunan-turunan lignin, radikal kation dikomplekskan menjadi enzim dan bertindak sebagai mediator redoks dalam transformasi reaksi. Walaupun begitu karena VA mempunyai waktu paruh yang sangat pendek, fungsinya sebagai mediator yang berdifusi secara independen sangat diragukan (Schick Zapanta and Tien, 1997) Oleh karena itu diperlukan penambahan VA sebagai mediator karena VA diharapkan mampu memacu LiP dalam mengoksidasi lignin.

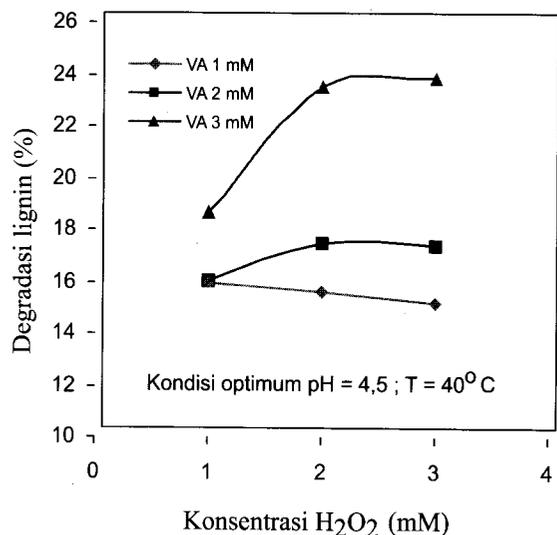
Dari Gambar 7 terlihat bahwa perbandingan VA dan H_2O_2 yang setara akan menghasilkan degradasi yang tinggi. Dari percobaan terlihat perbandingan maksimal yang setara antara VA dan H_2O_2 3:3 akan menghasilkan

degradasi lignin yang besar yaitu 23,90 % selama biodelignifikasi 12 jam. Hal ini sesuai dengan Shimada (1997) yang menyatakan bahwa VA berfungsi memproteksi enzim dari H_2O_2 yang menyebabkan inaktivasi dan juga berlaku sebagai substrat enzim. VA sebagai mediator oleh Pelczar (1986) dinyatakan sebagai koenzim yang mampu mengaktifkan kerja enzim.



Gambar 7. Hubungan % Degradasi Lignin oleh *P. chrysosporium* terhadap Konsentrasi VA

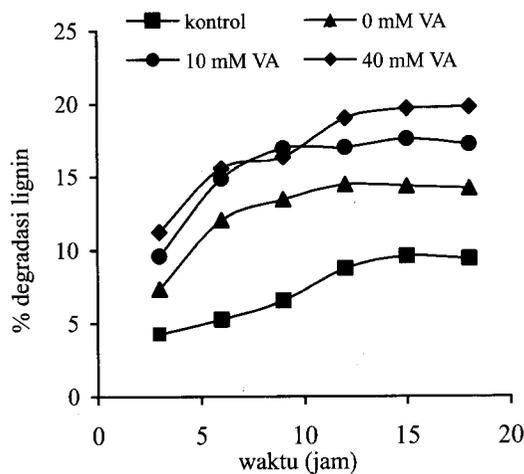
Dari Gambar 8 terlihat bahwa pada VA 1 mM dengan H_2O_2 lebih dari 1 mM maka akan terjadi inaktivasi enzim sehingga degradasi ligninnya turun yang diakibatkan adanya kelebihan H_2O_2 .



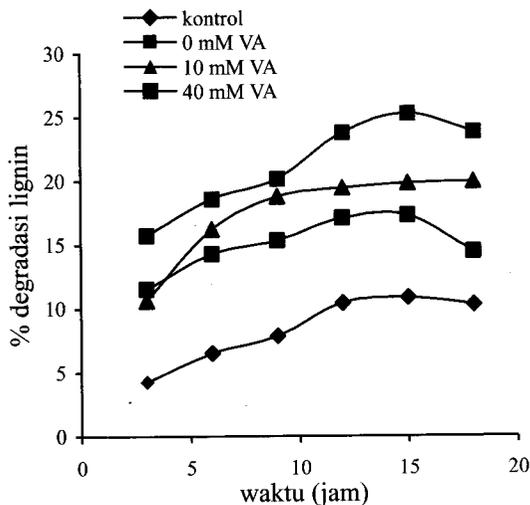
Gambar 8. Hubungan % Degradasi Lignin oleh *P. chrysosporium* terhadap H_2O_2

Hal ini sesuai dengan penelitian Koduri dan Tien (1995) yang menyatakan bahwa kelebihan H_2O_2 terhadap VA akan menyebabkan kerja enzim terhambat. Selanjutnya juga dinyatakan bahwa dengan tidak adanya substrat pereduksi seperti VA, maka H_2O_2 akan berubah menjadi peroksidase yang menyebabkan enzim menjadi inaktif.

Untuk konsentrasi mediator yang tinggi, hubungan % degradasi lignin terhadap waktu biodelignifikasi pada berbagai konsentrasi VA ditunjukkan pada Gambar 9 dan 10.



Gambar 9. Hubungan % Degradasi Lignin Pulp terhadap Waktu Biodelignifikasi H₂O₂ 10 mM

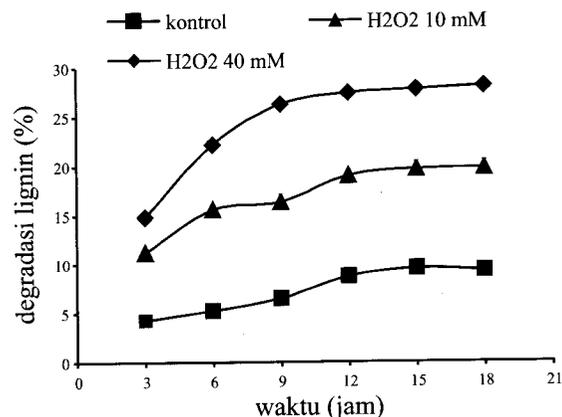


Gambar 10. Hubungan % Degradasi Lignin Bagas terhadap Waktu Biodelignifikasi H₂O₂ 10 mM

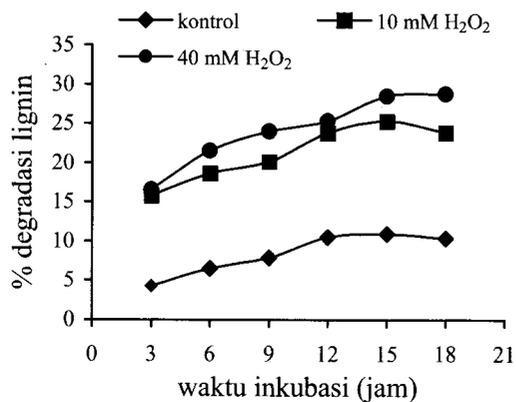
Dari Gambar 9 dan 10 di atas tampak bahwa degradasi lignin pulp terbesar dicapai oleh enzim kasar dengan penambahan mediator VA dengan

konsentrasi 40mM sebesar 19,8%. Sedangkan untuk bagas dicapai dengan penambahan VA dengan konsentrasi 40 mM pada waktu biodelignifikasi 15 jam, yaitu sebesar 25,2%. Sebagai kontrol, enzim kasar tidak diberi tambahan mediator, sehingga tampak bahwa degradasi lignin cukup signifikan. Hal ini terbukti bahwa VA sebagai mediator dapat meningkatkan aktifitas enzim dalam mengoksidasi lignin. Untuk pulp pada konsentrasi VA 10 mM, pada 6 jam pertama waktu inkubasi terjadi degradasi lignin yang lebih besar daripada konsentrasi VA 40 mM namun untuk waktu selanjutnya aktifitas enzim tidak sebesar 40 mM. Hal ini membuktikan bahwa pada konsentrasi H₂O₂ dan VA yang sama dapat mengoptimalkan kerja enzim.

H₂O₂ merupakan hasil metabolisme dari jamur pelapuk putih yang dapat mendegradasi lignin. Selain itu juga H₂O₂ berfungsi sebagai mediator yang dapat merangsang kerja enzim. Pada penelitian ini, didapatkan data-data % degradasi lignin pada konsentrasi VA tetap sebesar 40 mM. Hubungan % degradasi terhadap waktu inkubasi ditampilkan pada gambar 11 dan 12. Dari gambar ini tampak bahwa % degradasi lignin terbesar dicapai pada konsentrasi VA/H₂O₂ sebesar 40/40 (mM), yaitu untuk pulp mencapai 28,2% dan bagas sebesar 28,7% pada waktu inkubasi 18 jam. Pada 3 jam pertama tampak bahwa % degradasi lignin antara konsentrasi VA 10 mM dan 40 mM hampir sama, namun pada akhir biodelignifikasi perbedaannya cukup besar. Hal ini membuktikan bahwa enzim LiP memerlukan waktu adaptasi dengan mediator dalam mendegradasi lignin. Adanya kelebihan VA tidak menyebabkan inaktivasi enzim LiP bahkan dapat melindungi enzim dari inaktivasi akibat kelebihan H₂O₂.



Gambar 11. Hubungan % Degradasi Lignin Pulp terhadap Waktu Biodelignifikasi VA 40 mM



Gambar 12. Hubungan % Degradasi Lignin Pulp terhadap Waktu Biodelignifikasi VA 40 mM

Tabel 2 dan 3 menunjukkan degradasi selulosa yang terjadi pada peristiwa delignifikasi oleh enzim kasar lignin peroksidase dari *P. chrysosporium* ini. Tampak dari tabel ini bahwa selulosa juga terdegradasi oleh enzim kasar ini yang menunjukkan bahwa di dalam campuran enzim ini juga terdapat enzim lain selain ligninolytic enzyme yaitu enzim yang mendegradasi selulosa. Karena selulosa dibutuhkan di dalam proses pulping dalam industri pulp dan kertas, keberadaan enzim ini seharusnya dihindari. Dari data Tabel 2 dan 3 degradasi selulosa yang terjadi masih cukup kecil dibandingkan dengan degradasi lignin yang terjadi yaitu sekitar 10%.

Tabel 2. Data Perhitungan Degradasi Selulosa Pulp pada Biodelignifikasi oleh Enzim dari *P. chrysosporium*

VA / H ₂ O ₂	degradasi selulosa (%)
0/0	9,62
0/10	11,16
10/10	10,68
40/10	10,83
40/40	9,93

Tabel 3. Data Perhitungan Degradasi Selulosa Bagas pada Biodelignifikasi oleh Enzim dari *P. Chrysosporium*

VA / H ₂ O ₂	degradasi selulosa (%)
0/0	8,24
0/10	9,67
10/10	8,49
40/10	8,31
40/40	9,37

5. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini didapatkan beberapa kesimpulan antara lain enzim lignin peroksidase dihasilkan dari jamur *P. chrysosporium* dengan aktifitas 0,8 IU/ml dengan kondisi temperatur dan pH optimum enzim yang dihasilkan masing-masing adalah 40°C dan pH 4,5, prosentasi degradasi lignin tertinggi untuk bagas dicapai pada perbandingan mediator 40/40 (mM), yaitu sebesar 28,7% sedangkan tanpa penambahan mediator hanya sebesar 10,8% sedangkan untuk pulp prosentase degradasi lignin tertinggi dicapai pada perbandingan mediator 40/40 (mM), yaitu sebesar 28,2% sedangkan tanpa penambahan mediator mencapai 9,5%. Semakin besar perbandingan mediator VA/H₂O₂ maka % degradasi lignin juga semakin tinggi namun mengingat harga VA dan H₂O₂ mahal maka dapat digunakan perbandingan mediator sebesar 10/10 (mM) karena selisih degradasi hanya 10,9% untuk pulp dan 8,7% untuk bagas.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada QUE Project Jurusan Teknik Kimia, ITS yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Annual Book of ASTM standards part 22: wood, adhesives D 1103-60, 1981 a.
- [2] Annual Book of ASTM standards part 22: wood, adhesives D 1106-56, 1981ba.
- [3] Bratasida, Liana (1982), "Substrat Jamur Pelapuk pada Penyimpanan Kayu Bahan baku Pulp", Berita Selulosa, Juni - Vol XVIII No. 2, Balai Besar Selulosa Bandung, halaman 33 - 34.
- [4] Burdsall JR Harold H (1998), "Environmental Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry", edisi I, John Wiley & Sons Inc, New York, halaman 259 - 260.
- [5] Camerero, S., Sarkar, S: Description of Versatile Peroxide Involved in the Natural Degradation of Lignin that has both manganese Peroxide and Lignin Peroxide Substrate Interaction Sites, J. Biol. Chem., 274, 1999.
- [6] Fengel, D dan Wegener G (1984), "Kayu, Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi", Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, halaman 30 - 34, 155 - 176.
- [7] Hattaka, A., "Biopolimers", Vol. 1, Ch 5, University of Helsinki, Finlandia, 2001.
- [8] Kirk, T.K. & H.M. Chang, "Biotechnology in pulp and Paper Manufacture", Butterworth-Heinemann, USA 1990.

- [9] Koduri, RS., Tien M. (1995), " *Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase*", Biological Chemistry Journals.
- [10] Leatham, G.F., G.C. Myers dan T.H. Wegner," Biomechanical Pulping of Aspen Chips : Paper strength and Optical Properties Resulting from Different Fungal Treatments", Tappi Jurnal 1990.
- [11] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, Wasilewska, MW., Cho, NS., Hofrichter and Rogalski, J., " *Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi*", Departemen of Biochemistry, Maria Curie-Sklodowska University, Polandia, 1999.
- [12] Nakamura, Y, and T. Sawada; "Lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* Immobilized on Polyurethane Foam," *J.Chem. Eng. Japan.*,30, 1-6 (1997).
- [13] Rimko ten Have, Robert G. De Thouars, Henk J, Swarts and Jim A. Field: Veratryl Alcohol Mediated oxidation of isoeugenyl acetate by lignin peroxidase, *Eur. J. Biochem.* 265, 1008-1014 (1999).
- [14] Schlegel, Hans G (1994), " *Mikrobiologi Umum*", Edisi VI, Gajah Mada University Press, Yogyakarta, halaman 484-487.
- [15] Shimada, M. (1987),: Regiospecific oxygenations during ring cleavage of secondary metabolite, 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by lignin peroxidase," *FEBS Letters*, Vol 221, No 2, page 327-331.
- [16] Tien, M. And T.K. Kirk; " *Lignin Peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*," *Meth. Enzymol.*, 161, 238-244 (1988).
- [17] Valli, K., Barry, J., Brock, Dinesh, K., Joshi dan Michael, "Degradation of 2,4-Dinitrotoluene by The Lignin Degrading Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*", *J. Applied and Enviromental Microbiology*, (1992)
- [18] Wariishi, Hiroyuki, dkk (1998), " *Direct Interaction of Lignin and Lignin Peroksidase from Phanerochaete chrysosporium*", *PNAS*.