

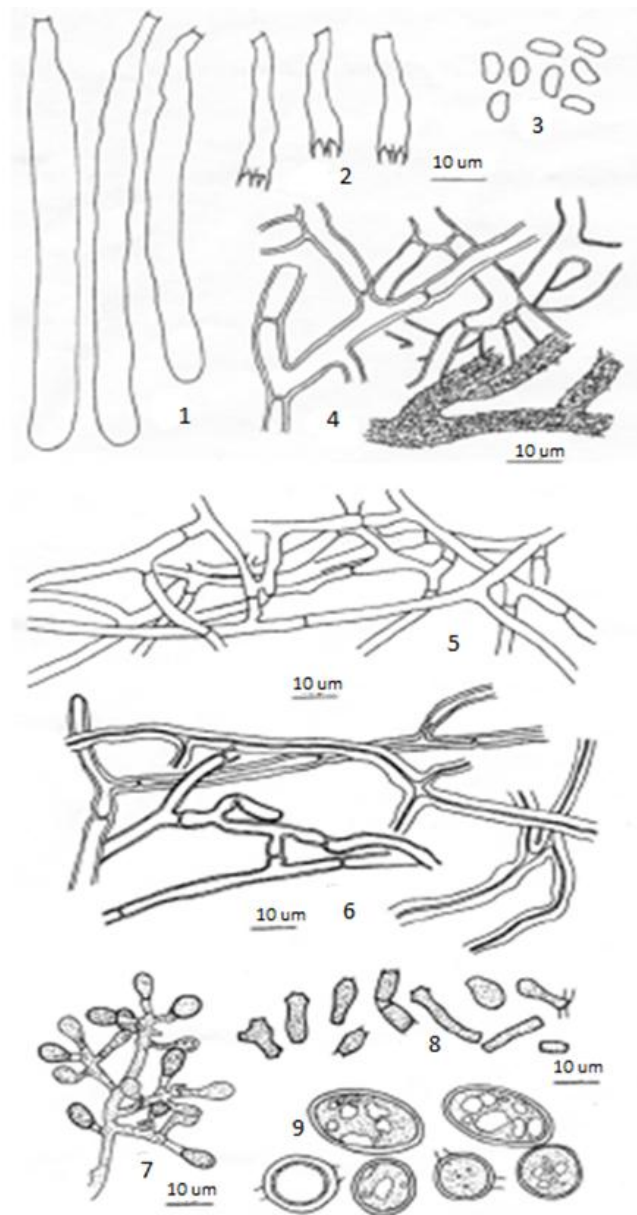
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan mengenai *Phanerochaete chrysosporium*

*Phanerochaete chrysosporium* merupakan kelompok *Basidiomycetes* berfilamen. Hal ini berarti bahwa *P. chrysosporium* adalah kapang yang memiliki spora meiosis eksternal berupa basidium. Kenyataannya, *P. chrysosporium* tidak pernah membentuk badan buah untuk bereproduksi, tetapi hanya tampak berupa kerak yang sangat datar dan menyebar (Gold and Cheng, 1978). Burdsall & Eslyn (1974) mempresentasikan kapang tersebut sebagai Genus *Phanerochaete* yang memiliki sebuah *chrysosporium* dalam keadaan imperfek yang konspesifik dengan *Chrysosporium pruinosum*, *Chrysosporium lignorum*, *Sporotrichum pruinosum* dan *Sporotrichum pulverulentum*.

Kapang *P. chrysosporium* diketahui mampu mendegradasi lignin menjadi karbon dioksida (CO<sub>2</sub>), air (H<sub>2</sub>O) dan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kapang ini disebut pelapuk kayu putih karena menyebabkan kayu menjadi lapuk dan warnanya memudar. Kayu merupakan lignoselulosa yang tersusun dari lignin, hemiselulosa dan selulosa. Kapang *P. chrysosporium* mendegradasi lignin yang berwarna coklat dan meninggalkan bagian selulosa yang berwarna putih (Chia, 2008; Ntwampe dkk., 2010). Jenis kapang ini selain menghasilkan laju degradasi lignin yang tinggi, juga diketahui mudah tumbuh dalam media cair serta cepat bersporulasi pada matriks pengemban saat diimobilisasi (Ntwampe dkk., 2010; Zeng dkk., 2013; Coconi-Linares dkk., 2014).

Burdsal & Eslyn (1974 dalam Fraser 2000) menyatakan *P. chrysosporium* Burds., *sp. nov.* memiliki karakter fenotipik yaitu memiliki miselia septat, perkembangbiakan miselia dapat dilakukan secara aseksual melalui spora maupun secara seksual melalui basidiospora. Basidiocarp atau badan buahnya menyebar bebas dan tidak beraturan. Bentuk basidiocarp panjang, lebar, silindris, memiliki sistidia yang halus dan tidak memiliki penghubung (Gambar 1.1). Hifa subicular (Gambar 1.4) cenderung mengarah ke substrat dan membentuk semacam kerak yang keras dengan kristal lebar di dekat subhimeniumnya, terkadang di sekitar substrat tampak bentuk semacam khlamidospora dengan dinding sel yang tipis berbentuk oval hingga bola. Kapang tersebut memiliki subhimenium yang berdinding sel tipis dan penggumpalan hifa. Himenium terdiri dari sistidia (Gambar 1.1) dan basidia (Gambar 1.2). Basidia pada fase seksual berukuran 3x9 µm, berbentuk seperti telur, dinding sel tipis (Gambar 1.3). Hifa arial berdiameter 2-4 µm, berdinding sel tipis, memiliki septat, umumnya bercabang tetapi tidak memiliki penghubung (Gambar 1.5) dan terkadang berkerak di sepanjang hifa. Percabangan hifa berkembang menjadi



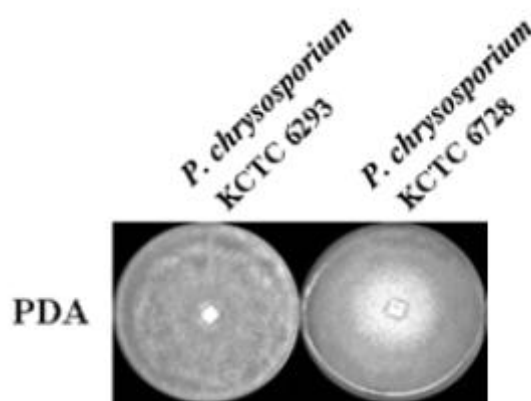
(Sumber: Reproduksi dari Burdsall and Eslyn, 1974 dalam Fraser, 2000)

Gambar 1. Representasi skematik observasi mikroskop morfologi *Phanerochaete chrysosporium*: (1) sistidia, (2) basidia, (3) basidiospora, (4) hifa subicular, (5) hifa aerial, (6) hifa submerged, (7) aleuriospora dan konidiospora, (8) arthrospora, (9) khlamidospora

konidiospora yang kurang sempurna. Hifa *submerge* berdiameter 3.5-6 µm, memiliki dinding sel tebal, hifa berseptat, bercabang di sekitar *right angles* (Gambar 1.6). Saat perkembangbiakan aseksual menghasilkan konidia yang hanya terdapat pada hifa arial, *aleuriospores* terletak pada percabangan di ujung konidiospora, berbentuk oval hingga bulat panjang dan berukuran 3x10 µm (Gambar 1.7). Arthrospora terkadang berupa *aleuriospores* bersifat *arthritic, retrogressive*, ukuran konidia bervariasi, terbentuk dari fragmentasi hifa (Gambar 1.8). Pada kondisi tidak menguntungkan, hifa vegetatif

membentuk khlamidospora, berukuran besar (lebih dari 60  $\mu\text{m}$ ) berada di ujung atau pada percabangan, spora *resting* berbentuk bulat atau serupa buah pir dengan dinding sel tebal (Gambar 1.9).

Lim dkk. (2007) menyatakan bahwa *P. chrysosporium* dalam media PDA membentuk kumpulan miselium yang sangat tipis, menempel, menyebar, dan membentuk permukaan berbutir setelah batas terluarnya mencapai tepi Cawan Petri (Gambar 2). Miselia berupa hialin dan bercabang. Pada kultur *P. chrysosporium* KCTC6293 dan KCTC6728 teramati tiga jenis konidia yaitu aleuriospora, arthrospora, dan khlamydospora (Burdsall dan Eslyn; 1974).



(Sumber: Lim dkk., 2007)

Gambar 2. Morfologi *P. chrysosporium* KCTC6293 dan KCTC6728 yang ditumbuhkan pada media PDA suhu 24 °C selama dua hari

Tidak banyak strain dari *Phanerochaete chrysosporium* yang ditemukan. Beberapa strain yang diisolasi tidak memiliki keragaman sifat yang besar. Kapang *P. chrysosporium* BKMF-1767 (ATCC 247245) dan *P. chrysosporium* ME-446 (ATCC 34541) adalah dua strain yang paling banyak dipublikasi dan memiliki data-data yang cukup rinci, sedangkan strain lainnya belum banyak dipublikasi. Keduanya memiliki banyak kesamaan secara fenotip. Kapang *P. chrysosporium* BKMF-1767 diketahui dapat tumbuh dalam media dengan sumber karbon glukosa, jerami, selulosa, lignin, dan Poli R-478 sedangkan *P. chrysosporium* ME-446 diketahui dapat tumbuh dalam media dengan sumber karbon glukosa, gliserol, dan Poli R-478. Keduanya tumbuh pada pH 3,5 dan 4,5, positif pada uji syringaldazine, guaiacol, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat) (ABTS), rhemazol brilliant biru R (RBBR), mampu mendekolorisasi Poli R-478 dan metilen biru, serta memproduksi peroksidase dalam media dengan kadar nitrogen yang rendah. Perbedaan *P. chrysosporium* BKMF-1767 dan *P. chrysosporium* ME-446 yang agak mencolok terletak pada data genetiknya yaitu *P. chrysosporium* BKMF-1767 memiliki 10 kromosom dengan total genom berukuran 29 Mb, sedangkan *P. chrysosporium* ME-446

memiliki 11 kromosom dengan total genom 32 Mb (Tonon & Odier, 1988; Dhawale & Kessler, 1993; De Koker dkk. 1998; Gill & Arora, 2003).

## **2.2 Identifikasi *Phanerochaete chrysosporium***

Identifikasi adalah membandingkan suatu isolat dengan taksa yang sudah ada untuk menetapkan identitasnya. Beberapa manfaat identifikasi antara lain adalah mengetahui keanekaragaman spesies di alam, mempelajari hubungan kekerabatan, membantu diagnosis medis, serta mendeteksi kontaminan.

Sebagian besar spesies kapang dideskripsikan secara konvensional berdasarkan morfologi, uji fisiologis dan biokimia. Karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi kapang adalah penampakan makroskopis koloni dan mikroskopis. Karakter makroskopis kapang yang umumnya diamati adalah warna, profil, serta tepi koloni pada medium padat dan keberadaan endapan, pelikel, cincin, dan pulau-pulau pada medium cair. Karakter mikroskopis kapang yang umumnya diamati adalah bentuk sel, kisaran ukuran sel, tipe pertunasan, keberadaan miselium palsu atau sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual. Uji fisiologis dan biokimiawi yang digunakan untuk identifikasi kapang antara lain kemampuan memfermentasi berbagai jenis gula, kemampuan mengasimilasi berbagai jenis karbon dan nitrogen, kebutuhan akan vitamin, pertumbuhan pada suhu tertentu, ketahanan terhadap antibiotik sikloheksimida, uji urease, dan uji diazonium *blue* B. Identifikasi konvensional kapang berdasarkan morfologi, fisiologis maupun biokimiawi memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Ediningsari, 2008).

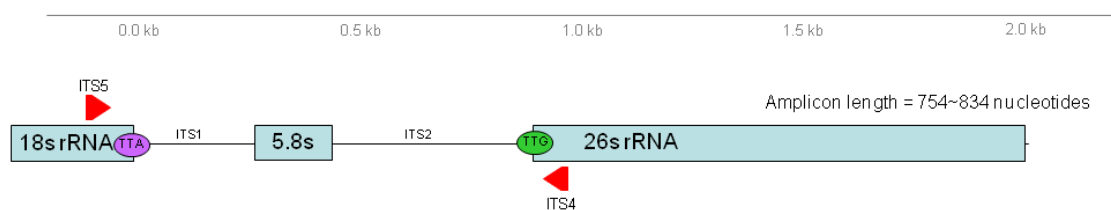
Teknik molekular saat ini telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi suatu spesies. Pengembangan metode PCR dan analisis sekuen DNA turut mendukung penggunaan teknik molekular dalam identifikasi kapang. Schoch dkk. (2012) menyatakan terdapat enam daerah sekuen DNA yang dapat digunakan untuk identifikasi kapang yaitu daerah yang mengkode sub unit 1 sitokrom C oksidase mitokondria; tiga sub unit RNA polimerase masing-masing *large subunit* (LSU) RNA polimerase, *second large subunit* (sLSU) RNA polimerase dan *minichromosom maintenance protein; internal transcribed space* (ITS); dan *large subunit* (LSU) ribosom. Sekuen pada sub unit 1 sitokrom C oksidase mitokondria telah digunakan untuk identifikasi pada binatang, tetapi sulit diamplifikasi pada kapang, memiliki sekuen intron yang sangat panjang, dan kurang variasi sehingga tidak dikembangkan untuk identifikasi kapang. Identifikasi menggunakan sekuen gen pengkode tiga sub unit rRNA walaupun memiliki tingkat ketepatan lebih tinggi dibandingkan sekuen lainnya tetapi tingkat keberhasilan amplifikasi PCR dan sekuensing hasil PCR yang rendah menyebabkan urutan ini tidak direkomendasikan untuk identifikasi

kapang. Identifikasi berbagai jenis kapang menggunakan sekuen ITS diketahui menghasilkan tingkat keberhasilan yang paling tinggi karena urutan ITS mampu membedakan dengan jelas perbedaan antar spesies pada kapang. Daerah LSU merupakan penanda filogenetik yang populer digunakan untuk identifikasi kapang, berhasil dengan baik membedakan anggota kelompok *Ascomycetes*, tetapi tingkat ketelitiannya masih lebih rendah daripada daerah ITS.

Daerah ITS dapat mengalami perubahan atau mutasi sehingga di antara satu spesies dengan spesies lain dapat berbeda dan bervariasi. Cooke & Duncan (1997) menyatakan daerah ITS dari rDNA telah terbukti bermanfaat untuk membedakan taksa kapang pada tingkat spesies hingga tingkat genus. Daerah rDNA tersebut telah dikaji secara molekular terhadap spesies *Phytophthora* oleh beberapa peneliti dengan teknik PCR untuk membedakan spesies serta menyusun filogeni (Umayah & Purwantara, 2006; Mansfield & Kang, 2016). Daerah ITS juga diketahui menjadi marker spesifik untuk identifikasi tanaman *Zanthoxylum piperitum* (Yan-Lin dkk., 2010).

Identifikasi kapang secara molekular khususnya menggunakan sekuen daerah ITS terdiri dari beberapa tahap, yaitu: (1) isolasi DNA, (2) pengukuran kualitas dan kuantitas DNA, (3) amplifikasi daerah ITS dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer ITS4 dan ITS5 seperti ditunjukkan pada Gambar 3, (4) visualisasi hasil amplifikasi daerah ITS, (5) sekuensing urutan DNA hasil amplifikasi, (6) analisis filogenetik data sekuen untuk memperoleh identitas isolat. Analisis filogenetik dilakukan pada data sekuen berupa elektroferogram (grafik yang menunjukkan nukleotida yang terekam pada hasil sekuensing) atau teks *file* (urutan nukleotida hasil sekuensing). Urutan basa DNA pada hasil sekuensing dapat dilakukan editing secara manual dengan program bioedit. Basa yang dilambangkan dengan huruf N dalam data sekuen dapat diubah dengan basa-basa lain (A, T, G atau C) berdasarkan hasil yang terlihat pada elektroferogram. Data sekuen berupa teks *file* dapat digunakan untuk mencari identitas suatu isolat dengan cara mencari homologi sekuen spesies terdekatnya pada data sekuen dalam pangkalan data. Selain itu, data sekuen juga dapat digunakan untuk mengevaluasi hubungan kekerabatan berdasarkan rekonstruksi pohon filogeni. Pencarian homologi sekuen dapat menggunakan program BLAST atau program MEGA 5. Data sekuen untuk proses pencarian homologi sekuen melalui pangkalan data terlebih dahulu diubah ke dalam format FASTA, yaitu format teks *file* yang dapat dikenali oleh program BLAST. Salah satu alamat situs pangkalan data sekuen DNA yang dapat diakses untuk pencarian homologi sekuen dengan program BLAST adalah <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Ediningsari, 2008; Mansfield & Kang, 2016).

## Internal transcribed spacer (ITS)



### PCR Amplification Conditions & Primers

Forward: ITS5	GGA AGT AAAAGT CGT AAC AAG G	Position -54~-32 from ITS1 region
Reverse: ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Position +39~+59 of 26s rRNA
Sequencing primers: same as ITS5 and ITS4		

White et al., (1990) *In* PCR Protocols: a guide to methods and applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds): 315-322. Academic Press, Inc., New York .)

(Sumber Mansfield & Kang, 2016)

Gambar 3. Letak sekuen *internal transcribe spacer* (ITS) di rDNA dan posisi primer ITS4-ITS5 yang mengamplifikasi sekuen ITS

### 2.3 Peran dan Karakteristik Peroksidase *Phanerochaete chrysosporium* dalam Metabolisme Degradasi Lignin

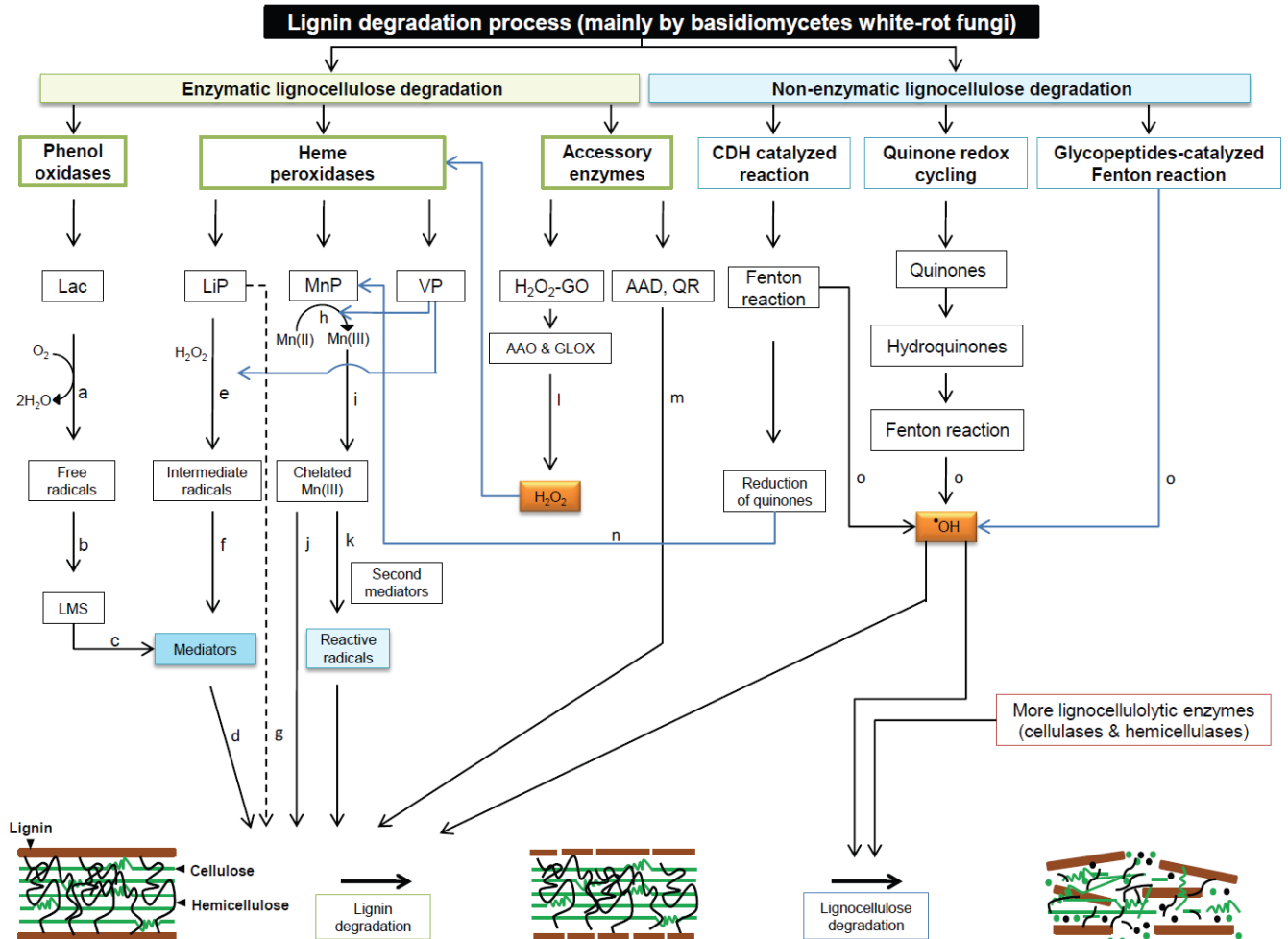
*Phanerochaete chrysosporium* adalah kapang pelapuk kayu putih yang sering dijadikan organisme model untuk mempelajari metabolisme lignin. Kapang *P. chrysosporium* diketahui mendegradasi lignin dan berbagai polutan aromatik selama berlangsungnya metabolisme sekunder pada fase stationer. Peroksidase dan sistem enzim oksidase penghasil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekstraselular yang dihasilkan oleh organisme tersebut merupakan enzim utama yang terlibat dalam metabolisme degradasi lignin, disintesis sebagai respon terbatasnya kadar nitrogen, karbon dan sulfur (Li dkk., 1995, Xiaoyan dkk., 2007; Wang dkk., 2008; Georgieva, 2009; Ntwampe dkk., 2010; Zeng dkk., 2013; Coconi-Linares dkk., 2014). Walaupun demikian, dilaporkan pula pada medium tertentu *P. chrysosporium* juga menghasilkan lakase dalam jumlah sangat sedikit (Srinivasan dkk., 1995).

Dua jenis peroksidase ekstraselular yang terdeteksi pada kultur *P. chrysosporium* adalah lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP). Peningkatan masing-masing enzim tersebut sebanding dengan penurunan kadar lignin, senyawa model lignin dan berbagai polutan aromatik dalam kultur pertumbuhan. Kedua jenis peroksidase tersebut bereaksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mengkatalisis oksidasi substrat yang berbeda. Enzim LiP langsung mengkatalisis oksidasi substrat nonfenolik menjadi kation radikal, sedangkan MnP mengkatalisis oksidasi Mn<sup>2+</sup> menjadi Mn<sup>3+</sup>. Kation radikal dan Mn<sup>3+</sup> yang terbentuk berdifusi dari pusat aktif enzim mengkatalisis pemutusan nonspesifik pada lignin. Produk degradasi lignin yang berukuran kecil dimetabolisme lebih lanjut menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Mekanisme degradasi ini dikenal sebagai mekanisme radikal bebas nonspesifik (Johjima dkk., 1999 dan Fraser, 2000).

Jalur metabolisme degradasi lignin oleh kapang pelapuk kayu putih khususnya *P. chrysosporium* melibatkan LiP, MnP dan lakase seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Pengamatan dengan mikroskop elektron pada fase awal degradasi kayu menunjukkan bahwa ukuran ketiga enzim tersebut terlalu besar untuk dapat menembus mikropori dinding sel kayu. Hal ini mengindikasikan bahwa degradasi lignin pada kayu tidak terjadi karena aktivitas enzim tersebut secara langsung, diduga senyawa oksidator reaktif yang *diffusible* dan berberat molekul rendah telah menginisiasi perubahan pada struktur lignin sebelum enzim tersebut menyerang. Lakase merupakan enzim oksidoreduktase yang mengandung empat atom Cu pada pusat aktifnya, menggunakan oksigen untuk mengoksidasi berbagai senyawa aromatik dan non aromatik membentuk senyawa radikal bebas (Gambar 4a) yang kemudian berfungsi sebagai substrat intermediet untuk enzim lakase-mediator sistem (LMS) (Gambar 4b). Aktivitas LMS menghasilkan mediator (Gambar 4c) yang dapat meninggalkan pusat aktif enzim (*diffusible*) dan dapat bereaksi dengan berbagai substrat yang memiliki potensial redoks tinggi, sehingga tercipta jalur degradasi lignin nonenzimatis (Gambar 4d). Enzim LiP merupakan glikoprotein yang mengandung heme dengan potensial redoks 1,4 volt yang mengkatalisis depolimerisasi oksidatif berbagai senyawa penyusun lignin nonfenolik dan fenolik. Aktivitas tersebut melibatkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan menghasilkan intermediet radikal (Gambar 4e) yang terlibat pada reaksi nonenzimatis seperti polimerisasi dan kopling radikal, pemutusan rantai samping, demetilasi, penambahan dan penataan ulang intramolekul (Gambar 4f). Enzim LiP juga dapat terlibat langsung pada oksidasi substrat aromatik nonfenol karena memiliki nilai potensial redoks yang tinggi (Gambar 4g).

Struktur kristal LiP menunjukkan bahwa gugus heme yang penting untuk aktivitas enzim terkubur di bagian dalam protein dan memiliki akses dengan medium melalui suatu saluran. Saluran ini tidak dapat dilalui oleh polimer lignin yang berukuran besar untuk mencapai gugus heme pada pusat aktif enzim melainkan hanya molekul yang berukuran kecil yang dapat masuk ke pusat aktif tersebut. Enzim MnP mengkatalisis peroksida bergantung pada oksidasi Mn(II) sebagai reduktor menjadi Mn(III) (Gambar 4h), kemudian Mn(III) lepas dari permukaan enzim membentuk kompleks dengan oksalat atau khelator lainnya (Gambar 4i). Komplek khelat-Mn(III) berperan sebagai molekul reaktif mediator redoks (reduktor) berberat molekul rendah *diffusible* yang mengoksidasi substrat fenolik termasuk senyawa-senyawa fenol sederhana, amina, pewarna, substruktur fenolik lignin dan dimer fenolik. Potensial oksidasi khelat-Mn(III) hanya mampu untuk mengoksidasi struktur fenolik lignin. Oksidasi substrat nonfenolik oleh Mn(III) dapat dilakukan jika Mn(III) mengubah mediator kedua menjadi senyawa radikal reaktif (Gambar 5k). Asam

organik seperti oksalat dan malonat adalah senyawa utama sebagai mediator kedua. Pada kondisi tidak tersedia  $H_2O_2$  yang cukup maka senyawa radikal reaktif tersebut digunakan oleh MnP sebagai sumber peroksida yang meningkatkan efisiensi degradasi lignin oleh kapang (Dashtban dkk., 2010).



Lac: laccase, LMS: laccase-mediator system, LiP: lignin peroxidase, MnP: manganese peroxidase, VP: versatile peroxidase,  $H_2O_2$ -GO:  $H_2O_2$ -generating oxidases, AAO: aryl-alcohol oxidase, GLOX: glyoxal oxidase,  $H_2O_2$ : hydrogen peroxide AAD: aryl-alcohol dehydrogenases, QR: quinone reductases and  $\cdot OH$ : free hydroxyl radicals.

(Sumber: Dashtban dkk., 2010)

Gambar 4. Skema degradasi lignin pada kapang pelapuk putih *Basidiomycetes*

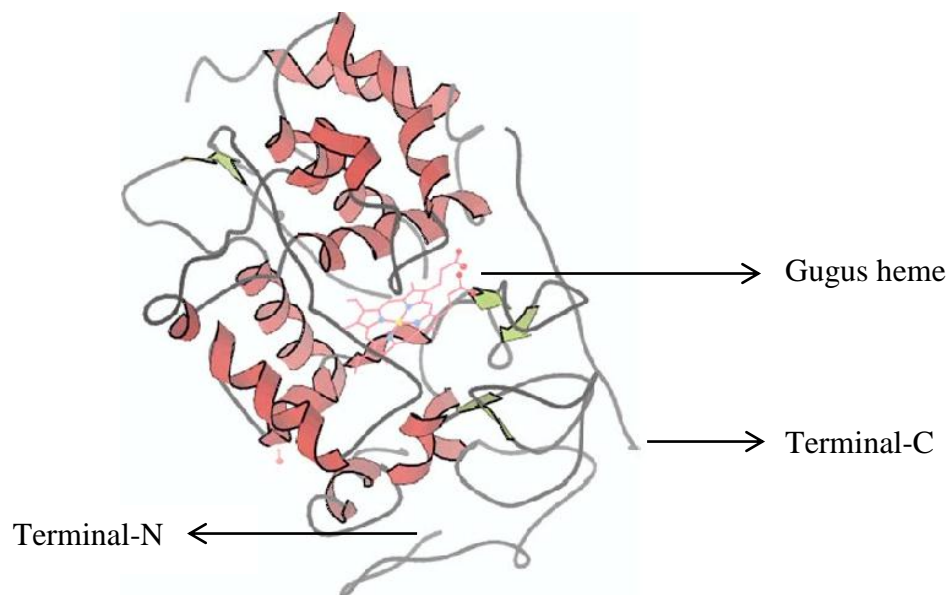
Berdasarkan mekanisme yang diuraikan menunjukkan masing-masing enzim memiliki karakteristik dan peran berbeda dalam jalur metabolisme lignin. Enzim MnP terlibat langsung pada fase awal degradasi lignin, kemudian produk yang terbentuk didegradasi lebih lanjut oleh enzim lainnya (LiP dan laccase). Hal ini menjelaskan fakta bahwa hampir semua kapang pelapuk putih menghasilkan MnP, tetapi banyak kapang pelapuk putih yang tidak menghasilkan LiP (Wessenberg dkk., 2003).



## 2.4 Tinjauan tentang Lignin Peroxidase *Phanerochaete chrysosporium*

### 2.4.1 Struktur Lignin peroksidase

Lignin peroxidase (LiP, ligninase, diarylpropane peroxidase; EC 1.11.1.14) adalah enzim oksidatif pertama yang ditemukan pada *P. chrysosporium* (Tien & Kirk, 1984). Enzim LiP merupakan glikoprotein monomerik ekstraselular yang memiliki gugus heme protoforfirin pada pusat aktifnya. Enzim tersebut memiliki massa molekul antara 36 hingga 46 kDa (Shah & Nerud, 2002; Wang dkk, 2008; Wong 2009; Zeng dkk., 2013; Coconi-Linares dkk., 2014). Struktur kristal enzim LiP berbentuk globular dengan ukuran 50 x 40 x 40 Å, terdiri dari domain terminal-C (proksimal) dan terminal-N (distal), delapan mayor dan delapan minor  $\alpha$ -heliks dan sedikit struktur  $\beta$  di domain proksimal, gugus heme terikat pada celah antara domain, tetapi dapat diakses oleh pelarut melalui dua saluran kecil di sekitar heme (Gambar 5).

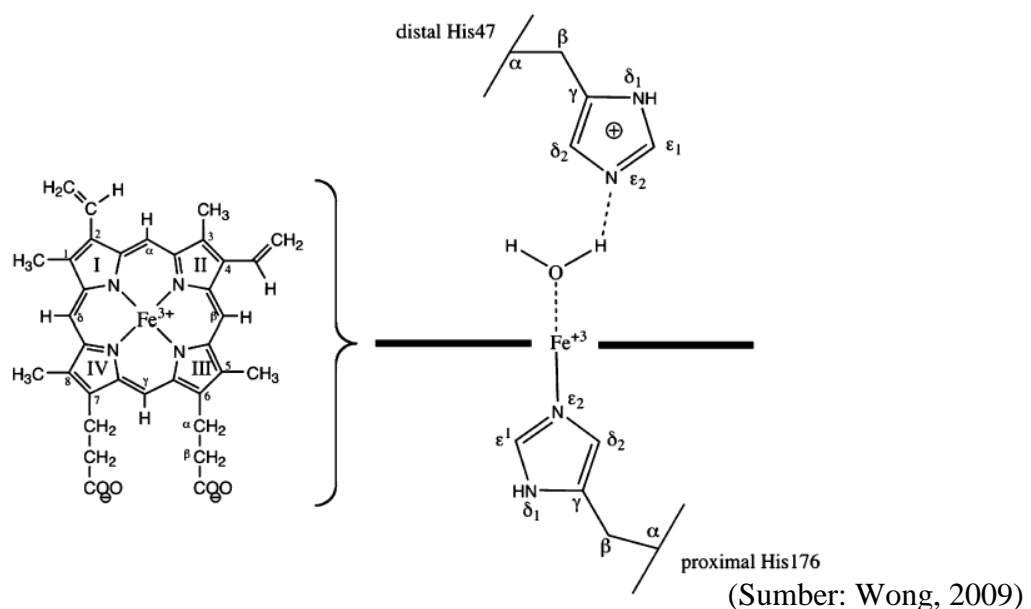


(Sumber: Wong, 2009)

Gambar 5. Struktur tiga dimensi Lignin peroksidase *P. chrysosporium*. Warna merah menunjukkan urutan residu asam amino yang membentuk  $\alpha$ -heliks dan hijau membentuk struktur  $\beta$

Beberapa bagian yang penting dari struktur enzim LiP adalah adanya delapan residu sistein yang membentuk empat ikatan disulfida, dua sisi pengikatan kalsium untuk mempertahankan topologi pusat aktif, Asn257 mengalami N-glikosilasi, Ser334 dan Thr320 mengalami O-glikosilasi yang membentuk klaster di daerah proksimal yang diduga untuk melindungi bagian terminal-C dari proteolisis. Gugus heme pada LiP membentuk pentakoordinat dengan His176 di daerah proksimal sebagai ligan kelima, dan dihubungkan dengan His47 di daerah distal melalui ikatan hidrogen dengan molekul air (Gambar 6). Sisi pengikatan substrat pada LiP berada di sisi distal heme berupa suatu saluran yang masuk ke

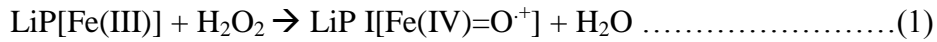
bagian dalam protein, Arg43 berfungsi menstabilkan muatan negatif yang terjadi saat pemutusan ikatan peroksida dan untuk menstabilkan ferril oksigen pada LiP I dan His47 membentuk ikatan hidrogen dengan Asn82 bertindak sebagai akseptor proton untuk berikatan dengan substrat peroksida. His 176 membentuk ikatan koordinat dengan gugus heme dan membentuk ikatan hidrogen dengan Asp235 yang menstabilkan intermediet Fe(IV)-O dalam LiP I, dan triad Asp-His-Fe bersifat lestari pada peroksidase tumbuhan (Wong, 2009). Adanya ikatan hidrogen antara Asp 235 dan His47 dengan ion Fe gugus heme pada triad Asp-His-Fe mengakibatkan enzim LiP memiliki nilai potensial reduksi yang sangat negatif (Shah & Nerud, 2002).



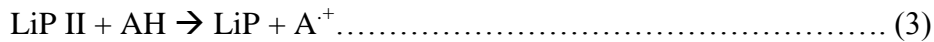
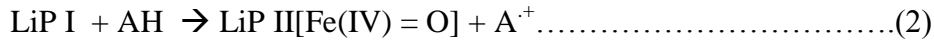
Gambar 6. Lingkungan heme-Fe dalam pusat aktif Lignin peroksidase

#### 2.4.2 Mekanisme katalitik Lignin peroksidase

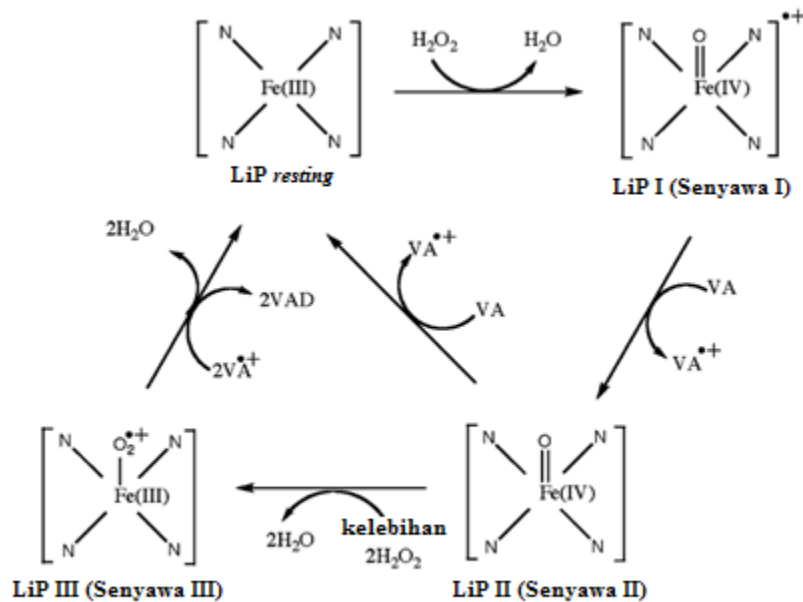
Mekanisme katalitik enzim LiP terdiri dari dua tahap umum yang analog dengan siklus katalitik peroksidase lainnya seperti *horseradish* peroksidase. Uraian mengenai tahap katalitik lignin peroksidase diilustrasikan pada Gambar 7. Tahap pertama, Fe(III) pada enzim natif mengalami oksidasi  $2e^-$  menghasilkan intermediet enzim LiP I yang berada dalam bentuk kation radikal  $[\text{Fe(IV)=O}^+, \text{LiP I}]$  dan substrat peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mengalami pemutusan ikatan O-O, atau diringkas pada persamaan reaksi 1.



Tahap selanjutnya terjadi reduksi 1 e<sup>-</sup> dari LiP I sebanyak dua kali secara berurutan oleh substrat donor elektron menjadi enzim natif kembali. Reduksi 1 e<sup>-</sup> pertama oleh substrat reduktor seperti veratril aldehid (VA) menghasilkan LiP II [Fe(IV)=O, LiPII] dan kation radikal VA (VA<sup>•+</sup>). Reduksi 1e<sup>-</sup> kedua mengembalikan enzim ke keadaan Fe(III). Enzim LiP I dalam keadaan tertentu dapat kembali menjadi enzim natif dengan langsung mengalami reduksi 2e<sup>-</sup> sesuai persamaan reaksi 2 dan 3.



Kelebihan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan berkurangnya jumlah substrat reduktor pada pH 3,0 dapat menyebabkan LiP II bereaksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membentuk enzim dalam bentuk inaktif yang disebut LiP III (Gambar 7). Heme pada LiP III berupa kompleks besi superokso. Enzim LiP III selanjutnya dapat dikonversi menjadi enzim natif melalui autooksidasi spontan atau oksidasi dengan kation radikal VA melalui pemindahan superoksida (Shah & Nerud, 2002; Wong, 2009; Sharma dkk., 2011).



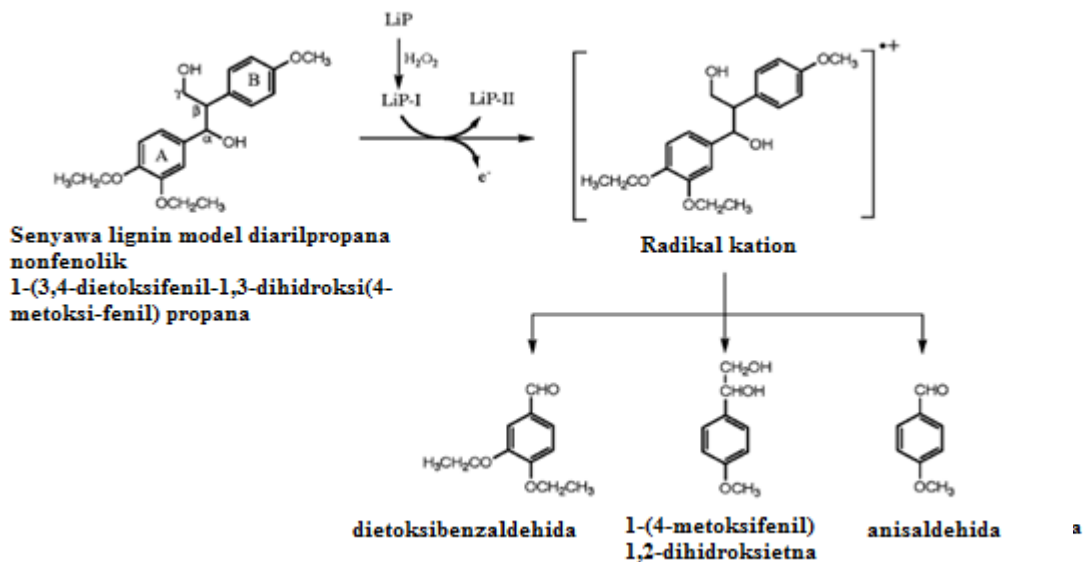
(Sumber: Wong, 2009)

Gambar 7. Siklus katalitik Lignin peroksidase

Enzim LiP mampu mengoksidasi berbagai senyawa fenolik (guaiacol, vanilil alkohol, katekol, asam siringik dan asetosiringon) dengan kecepatan katalitik yang lebih tinggi daripada substrat nonfenolik. Pada saat reduksi LiP I menjadi LiP II, substrat fenolik diubah menjadi fenolik radikal. Keberadaan oksigen menyebabkan radikal fenolik mengalami pemutusan ikatan pada struktur cincin, atau mengalami reaksi *coupling* atau

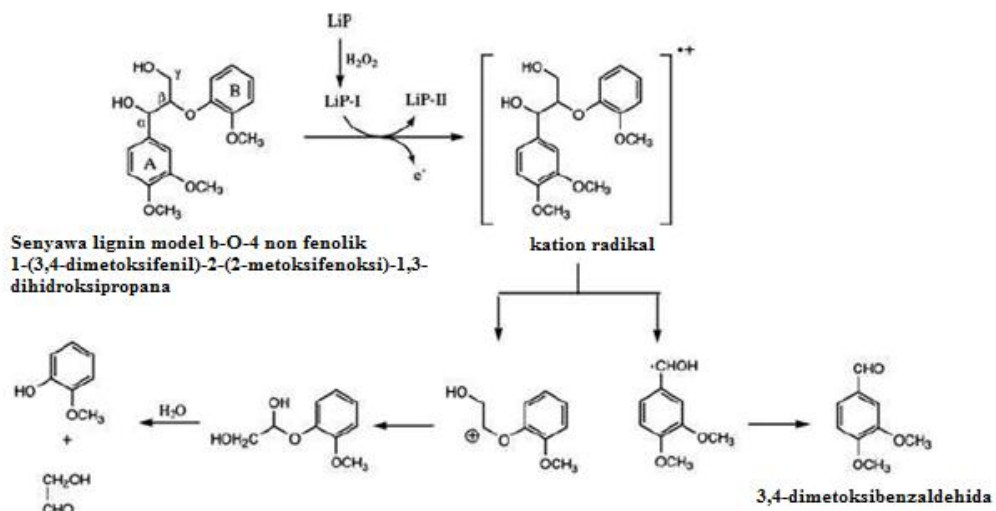
polimerisasi. Reaktivitas senyawa fenolik dengan LiP I lebih tinggi daripada dengan LiP II. Konstanta kecepatan reaksi akan menurun jika ukuran substrat meningkat (Wong, 2009).

Oksidasi senyawa nonfenolik diarilpropana dan senyawa  $\beta$ -O-4 pada model lignin melibatkan pembentukan kation radikal melalui  $1 e^-$  oksidasi, diikuti pemutusan ikatan rantai samping, demetilasi, penambahan intramolekul, dan penataan ulang (Gambar 8 dan 9). Oksidasi pada cincin A mendorong pemutusan  $C\alpha$ - $C\beta$  sebagai jalur utama. Pada mekanisme ini hanya pembentukan kation radikal yang dikatalisis LiP, sedangkan urutan reaksi berikutnya tidak dikatalisis enzim. Degradasi kation radikal bergantung pada karakter substituen pada cincin aromatisnya. Gugus pendonor elektron seperti gugus alkoksi pada cincin aromatik menyukai pembentukan dan stabilisasi aril kation radikal (Wong, 2009).



(Sumber: Wong, 2009)

Gambar 8. Oksidasi diarilpropana model dimer lignin oleh Lignin peroksidase



(Sumber: Wong, 2009)

Gambar 9. Oksidasi model senyawa lignin nonfenolik  $\beta$ -O-4 oleh Lignin peroksidase

Oksidasi veratril alkohol (VA) oleh LiP I dan LiP II menghasilkan intermediet radikal veratril alkohol ( $VA^+$ ). Selanjutnya VA dapat memasuki beberapa jalur oksidasi, diantaranya pada pH 6,0 mengikuti jalur yang mirip dengan pemutusan dimer  $\beta$ -O-4, kation radikal yang terbentuk pada reduksi pertama oleh LiP I, membentuk kompleks dengan LiP II yang aktif mengkatalisis molekul VA kedua membentuk aldehida. Kation radikal yang terbentuk pada tahap reduksi, mengalami deprotonasi pada C $\alpha$  membentuk veratril aldehid. Reaksi ini umum terjadi pada radikal kation alkilaromatik. Pada kondisi aerob, terjadi penambahan jalur oksidatif yang melibatkan aktivasi oleh oksigen memicu terjadinya pembentukan quinon dan pemutusan cincin aromatik. Mekanisme diinisiasi oleh serangan O $_2$  terhadap kation radikal VA membentuk intermediet kation radikal peroksida ( $VAOO^+$ ), kemudian bereaksi dengan H $_2$ O sebagai nukleofil (Wong, 2009).

#### **2.4.3 Karakteristik Lignin peroksidase**

Enzim LiP memiliki karakter yang unik dibandingkan peroksidase lainnya, yaitu kemampuan katalitiknya pada pH asam (pH sekitar 3), sensitif terhadap H $_2$ O $_2$ , dan kemampuannya mengoksidasi substrat berpotensi reduksi yang tinggi. Bentuk LiP I memiliki nilai potensial reduksi yang tinggi ( $E^{\circ} \sim 1,2$  V pada pH 3,0) sehingga dapat mengkatalisis oksidasi substrat yang memiliki nilai potensial reduksi tinggi. Enzim LiP dapat mengoksidasi monomer, dimer dan trimer lignin, dan aromatik non fenolik dan senyawa poliaromatik seperti benzoprena (Shah & Nerud, 2002; Wong, 2009).

Zeng dkk. (2013) menunjukkan bahwa enzim LiP murni dari ekstrak kasar enzim LiP yang dihasilkan oleh *P. chrysosporium* BKMF-1767 pada sistem kultur amobil memiliki karakteristik berat molekul 36 kDa; pH optimum 3,0; stabil pada pH 3,0 yang ditunjukkan dengan aktivitas enzim LiP pada pH 3,0 setelah diinkubasi 24 jam pada suhu 25 °C sebesar 95 % ; suhu optimum 30 °C; memiliki stabilitas thermal setelah 24 jam inkubasi pada suhu 35 dan 40 °C, tetapi pada suhu 50 °C aktivitas enzim LiP 55 % dan pada suhu 65 °C hanya 38 %. Beberapa ion logam memengaruhi aktivitas enzim LiP yaitu meningkat dengan adanya ion Ca $^{2+}$ , Na $^+$  dan Co $^{2+}$ , dihambat oleh kehadiran ion K $^+$ , Hg $^+$ , Fe $^{2+}$  dan Mg $^{2+}$ , sedangkan ion Mn $^{2+}$  tidak memengaruhi aktivitas enzim LiP, ion Cu $^{2+}$  dan Zn $^{2+}$  pada konsentrasi 5 mM dan 10 mM meningkatkan aktivitas tetapi pada konsentrasi tinggi (30 mM) menghambat aktivitas enzim LiP.

#### **2.4.4 Isoenzim Lignin peroksidase**

Kirk dkk. (1986) menyatakan ada enam isoenzim LiP berbeda dari *P. chrysosporium* yang mengoksidasi VA dan Glumoff dkk. (1990) menyatakan ada lima isoenzim LiP dari *P. chrysosporium* BKMF-1767, sedangkan Martinez dkk. (2004) menyatakan berdasarkan

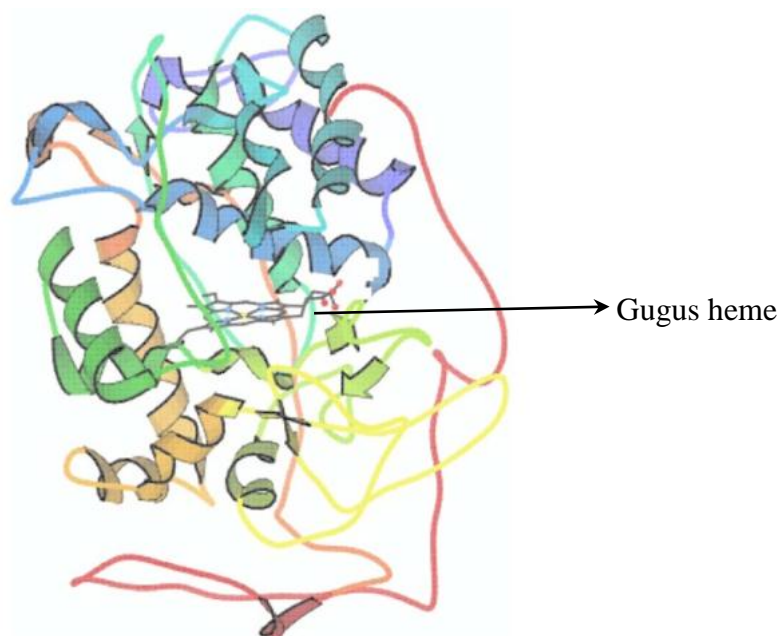
urutan sekuen genom *P. chrysosporium* RP78 terdapat 10 gen *lip* yang berbeda. Masing-masing isoenzim diketahui memiliki titik isoelektrik, massa molekul, kandungan karbohidrat, karakteristik spektroskopi, spesifisitas dan stabilitas yang berbeda, diduga dikode oleh enzim yang berbeda. Organisasi dan jumlah gen yang mengkode isoenzim LiP belum diketahui dengan jelas karena banyaknya variasi allele, ketidakkonsistenan nomenklatur dan adanya berbagai strain dari *P. chrysosporium*, diantaranya BKM-F1767, OCG101, ME446 dan RP78.

Gen *lip* dijumpai dalam kluster-kluster yang terpisah dan masing-masing diduga memiliki regulasi masing-masing. Informasi mengenai mekanisme regulasi gen *lip* masih sangat terbatas. Ekspresi isoenzim berbeda diketahui bergantung pada kondisi kultur pertumbuhan (Glumoff dkk., 1990). Produksi LiP diinduksi oleh keterbatasan nutrisi pada tingkat transkripsi gen (Tien & Tu, 1987 dalam Fraser, 2000).

## 2.5 Tinjauan tentang Mangan peroksidase *Phanerochaete chrysosporium*

### 2.5.1 Struktur Mangan peroksidase

Mangan peroksidase (EC 1.11.1.13, Mn(II): hidrogen peroksida oksidoreduktase, MnP) mengkatalisis reaksi  $2 \text{Mn(II)} + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{Mn(III)} + 2 \text{H}_2\text{O}$ . Enzim MnP dari *P. chrysosporium* adalah glikoprotein yang berukuran 46 kDa dan memiliki pI sekitar 4,5, memiliki gugus prostetik berupa protofirin, 2 sisi pengikatan ion Ca, 2 sisi pengikatan N-asetilglukosamin dan sisi pengikatan untuk ion  $\text{Mn}^{2+}$  (Sundaramoorthy dkk., 1994; Cullen & Kersten, 1996 dan Matsubara dkk., 1996).



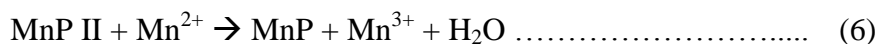
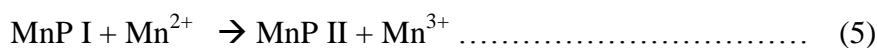
(Sumber: Wong, 2009)

Gambar 10. Struktur tiga dimensi Mangan peroksidase

Keseluruhan struktur enzim MnP dari *P. chrysosporium* serupa dengan enzim LiP, terdiri dari dua domain dengan posisi heme di antara dua domain seperti *sandwich* (Gambar 10). Molekul proteinnya terdiri dari sepuluh mayor heliks dan satu minor heliks, memiliki ikatan disulfida lebih banyak daripada enzim LiP yaitu sebanyak lima ikatan, tambahan ikatan berfungsi untuk membentuk sisi pengikatan Mn(II) dan mendorong terminal C menjauhi bagian utama protein. Asam amino His 46 distal membentuk ikatan hidrogen dengan Asn 80 untuk menjamin N dapat menerima proton dari peroksida melalui mekanisme katalisis asam-basa. Ikatan hidrogen dibentuk antara His 173 proksimal dan rantai samping Asp 242 meningkatkan karakter anion ligan dan menstabilkan oksiferri pada bentuk MnP I. Ion  $Mn^{2+}$  terletak pada sisi pengikatan kation pada permukaan protein dan membentuk ikatan koordinasi dengan oksigen pada karboksilat Glu 35, Glu 39 dan Asp 179, oksigen propionat heme dan dua oksigen molekul air. Sisi pengikatan tersebut memiliki fleksibilitas yang tinggi untuk mengikat berbagai ion logam. Dua ion kalsium membentuk struktur heptakoordinat, satu terikat kuat di sisi proksimal heme dan satunya di sisi distal heme, yang berperan untuk stabilitas termal pusat aktif enzim (Wong, 2009).

### 2.5.2 Mekanisme katalitik Mangan peroksidase

Mangan peroksidase bersifat unik karena dapat menggunakan Mn(II) sebagai substrat reduktor. Enzim MnP mengoksidasi Mn(II) menjadi Mn(III), selanjutnya Mn(III) mengoksidasi senyawa model fenolik lignin, berbagai monomerik fenol termasuk pewarna, seperti persamaan reaksi 4-7 (Wong, 2009).



Enzim MnP mengoksidasi  $Mn^{2+}$  menjadi  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$  membentuk kompleks dengan asam organik dikarboksilat seperti malonat, laktat dan oksalat. Kompleks khelat antara  $Mn^{3+}$  dengan asam organik tersebut akan memfasilitasi disosiasi  $Mn^{3+}$  dari enzim MnP dan menstabilkan  $Mn^{3+}$  dalam larutan dengan potensial redoks yang cukup tinggi sehingga mampu bertindak sebagai mediator redoks (reduktor) yang mengoksidasi senyawa model lignin, lignin fenolik, thiol dan amina serta mereduksi kemampuannya mengoksidasi  $H_2O_2$ . Asam organik ini memiliki konstanta pengikatan yang rendah terhadap  $Mn^{2+}$ , sehingga enzim MnP dapat kontak dengan  $Mn^{2+}$  bebas (Wariishi dkk., 1992 dan Sundaramoorthy dkk., 1994).

### 2.5.3 Karakteristik Mangan peroksidase

Urek & Pazarlioglu (2004) menyatakan bahwa aktivitas enzim MnP murni yang diisolasi dari *P. chrysosporium* dan diamobil dalam *foam* polistyrene tidak dipengaruhi oleh adanya nitrilotriasetat, iodoasetamida dan PMSF, sedangkan natrium azida ( $\text{NaN}_3$ ), asam askorbat,  $\beta$ -merkapoetanol dan ditionitritol (DTT) langsung menyebabkan enzim MnP kehilangan total aktivitasnya. Hal ini mengindikasikan bahwa residu sistein (Cys) merupakan residu yang penting, sedangkan residu serin tidak penting untuk aktivitas enzim MnP. Aktivitas enzim MnP meningkat dengan penambahan asam organik tartrat, oksalat dan maleat, sedangkan asam sitrat dan asetat malah menurunkan aktivitas MnP. Penambahan ion logam seperti  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan  $\text{Fe}^{2+}$  relatif tidak memengaruhi aktivitas enzim MnP kecuali  $\text{Ni}^{2+}$ . Enzim MnP tersebut stabil disimpan dalam bufer Na-tartrat pH 4,5 pada suhu 4 °C selama seminggu dan aktivitasnya menurun sebesar 10 % jika disimpan pada suhu -20 °C selama tiga bulan.

Zeng dkk. (2013) menunjukkan bahwa enzim MnP murni dari ekstrak kasar enzim MnP yang dihasilkan oleh *P. chrysosporium* BKMF-1767 pada sistem kultur amobil memiliki karakteristik berat molekul 45 kDa; pH optimum 4,5; stabil pada pH 3,5 hingga 4,5 dengan aktivitas enzim MnP setelah diinkubasi 24 jam pada suhu 25 °C sebesar 95 % hingga 98 %; suhu optimum 30 °C; memiliki stabilitas thermal setelah 24 jam inkubasi pada suhu 35 dan 40 °C, tetapi pada suhu 50 °C aktivitas enzim MnP sebesar 55 % dan pada suhu 65 °C hanya 8 %. Beberapa ion logam memengaruhi aktivitas enzim MnP, meningkat dengan adanya ion  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ , dihambat oleh kehadiran ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  dan  $\text{Hg}^{2+}$ , kehadiran ion  $\text{Co}^{2+}$  pada konsentrasi rendah meningkatkan, tetapi pada konsentrasi tinggi menghambat aktivitas enzim MnP, sedangkan ion  $\text{K}^+$  tidak memengaruhi aktivitas enzim MnP pada konsentrasi rendah, tetapi meningkatkan aktivitas enzim MnP pada konsentrasi tinggi.

#### **2.5.4 Isoenzim Mangan peroksidase**

Kirk dkk. (1986) menyatakan terdapat beberapa isoenzim MnP yaitu H3, H4, H5 and H9. Isoenzim MnP memiliki ukuran molekul yang hampir sama tetapi komposisi asam amino dan sekuen pada ujung terminal N berbeda. Hal ini mengindikasikan masing-masing dikode oleh gen yang berbeda. Sekuen genom *P. chrysosporium* RP78 mengidentifikasi lima gen *mnp*, termasuk dua sekuen baru (Martinez dkk., 2004). Regulasi produksi enzim MnP di level transkripsi diatur oleh komposisi medium. Produksi enzim MnP diinduksi oleh keterbatasan nutrien dalam medium. Dalam kondisi sumber N terbatas, induksi transkripsi dipengaruhi oleh  $\text{Mn}^{2+}$  dan *heat shock* (Brown dkk., 1993). Ekspresi gen *mnp* bergantung pada keberadaan  $\text{Mn}^{2+}$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Li dkk. (1995) menunjukkan bahwa konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang optimum untuk menginduksi ekspresi gen *mnp* dalam kondisi



nitrogen terbatas sebesar 1,0 mM, berkurang pada konsentrasi 1,5 mM dan tidak menginduksi pada konsentrasi 2,0 mM. Induksi oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jauh lebih efektif jika dilakukan dalam kultur yang mengandung Mn<sup>2+</sup> dibandingkan dalam kultur yang tidak mengandung Mn<sup>2+</sup>.

## **2.6 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Produksi Peroksidase oleh *Phanerochaete chrysosporium***

Peningkatan produksi enzim dari kultur mikroba dapat dilakukan melalui seleksi strain, modifikasi genetik, optimasi formula medium produksi dan kondisi pertumbuhan. Optimasi formula medium (jumlah dan jenis komponen, pembatasan nutrisi serta penghilangan inducer yang berpotensi toksik) dan pengaturan kondisi pertumbuhan lebih murah daripada melakukan modifikasi genetik. Sistem kultur produksi metabolit yang efisien untuk produksi enzim pada skala besar adalah sistem kultur *batch* atau *submerge fermentation* (Jing & Jinghua, 2012).

Kedua peroksidase (LiP dan MnP) dihasilkan oleh *P. chrysosporium* pada kondisi idiofase (fase stasioner). Pada fase tersebut nutrisi berupa sumber C, N dan S terbatas (Gold & Alic, 1993). Produksi peroksidase dilakukan dengan menggunakan media sintetik yang komposisi dasarnya dikembangkan oleh Kirk dkk.(1978) dengan pH media 4,5 (Ferara dkk., 2002; Ryu dkk., 2003; Rigas & Dritsa, 2006; Lee, 2007; Urek & Pazarlioglu, 2007; Xiaoyan dkk., 2007; Wang dkk., 2008; Zeng dkk., 2013; Acevedo dkk., 2011; Li dkk., 2011; Coconi-Linares dkk., 2014). Berbagai riset melakukan modifikasi komposisi media dan kondisi pertumbuhan untuk meningkatkan produksi MnP dan LiP, diantaranya dengan mengatur sumber karbon, suplemen, kondisi pertumbuhan, preparasi inokulum spora dan teknik kultur yang digunakan.

### **2.6.1 Sumber karbon dan nitrogen**

Sumber karbon untuk produksi ligninase yang terbaik adalah glukosa (Ntwampe dkk., 2010). Konsentrasi glukosa optimum untuk menghasilkan peroksidase yang tinggi selama fase stasioner oleh *P. chrysosporium* ATCC 20696 sebesar 10 g/L (Wang dkk., 2008). Hal ini sejalan dengan penelitian lainnya (Kirk dkk., 1978; Pease dkk., 1989; Dey dkk., 1991; Bonnarme dkk., 1991; Urek & Pazarlioglu, 2007).

Jenis sumber nitrogen tidak memengaruhi kecepatan degradasi lignin. Penggunaan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asam kasamino (Difco) maupun NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + L-asparagin sebagai sumber N dalam kultur *P. chrysosporium* memberi hasil yang sama pada banyaknya lignin yang terdegradasi, tetapi jumlah sumber N yang digunakan sangat berpengaruh pada kecepatan konsumsi glukosa, pertumbuhan dan degradasi lignin (Kirk dkk., 1978). Kecepatan degradasi lignin sebanding dengan produksi ligninase, maka jumlah sumber N yang

digunakan memengaruhi produksi ligninase. Produksi ligninase yaitu LiP dan MnP optimum menggunakan ammonium tartrat sebesar 8 g/L (Dey dkk., 1991), diamonium tartrat sebesar 2,2 mM (Georgieva, 2009),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebesar 22 mM (Urek & Pazarlioglu, 2007), ammonium tartrat sebesar 0,11 g/L (Wang dkk., 2008).

Produksi peroksidase diatur oleh kadar karbon dan nitrogen di tingkat transkripsi (Gold and Alic, 1993). Ekspresi isoenzim LiP berbeda dipengaruhi oleh kondisi kultur. Isoenzim H2 tinggi dalam kultur dengan jumlah sumber C terbatas, isoenzim H1 dan H2 juga tinggi dalam kultur dengan jumlah sumber N berlebih, tetapi isoenzim H2 rendah, H6 dan H8 tinggi dalam kultur dengan jumlah sumber N terbatas (Fraser, 2000).

## 2.6.2 Suplemen

Ion  $\text{Mn}^{2+}$  dalam media produksi MnP berperan sebagai: (1) kofaktor esensial untuk aktivitas protein MnP dan (2) mengaktifasi transkripsi gen *mnp*. Ion  $\text{Mn}^{2+}$  dilaporkan memengaruhi sintesis peroksidase dari *P. chrysosporium* hanya jika media produksi yang digunakan mengandung nitrogen terbatas (Li dkk., 1995). Dari ketiga gen *mnp* yang mengkode enzim MnP, hanya ekspresi gen *mnp3* yang tidak diatur oleh konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$ , sedangkan *mnp1* dan *mnp2* diinduksi dengan adanya  $\text{Mn}^{2+}$  (Janse dkk., 1998). Ion  $\text{Mn}^{2+}$  memberi pengaruh yang berbeda terhadap sintesis enzim LiP. Sintesis enzim LiP akan menurun sedangkan sintesis enzim MnP meningkat dengan penambahan  $\text{Mn}^{2+}$ . Enzim LiP disintesis jika kadar  $\text{Mn}^{2+}$  rendah (1,6 - 0,3 mg/L), sedangkan enzim MnP disintesis jika  $\text{Mn}^{2+}$  tinggi (40-199 mg/L) (Bonnarme dkk., 1991). Wang dkk. (2008) melaporkan aktivitas enzim MnP meningkat dengan signifikan pada pemberian  $\text{Mn}^{2+}$  antara 0,1-5,0 mg/L, lebih dari 5,0 mg/L aktivitas enzim MnP meningkat perlahan hingga 9 mg/L, pada kultur tanpa  $\text{Mn}^{2+}$  tidak ada enzim MnP yang dihasilkan. Tidak demikian halnya dengan sintesis enzim LiP. Aktivitas enzim LiP sudah terukur pada kultur tanpa  $\text{Mn}^{2+}$ , aktivitasnya meningkat perlahan hingga 7 mg/L, dan menurun perlahan pada 9 mg/L. Pada penelitian ini belum menunjukkan konsentrasi optimum  $\text{Mn}^{2+}$  untuk produksi enzim MnP. Konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$  optimum untuk produksi enzim MnP berbeda pada beberapa penelitian: 180  $\mu\text{M}$  (Li dkk., 1995), 235  $\mu\text{M}$  (Palma dkk. 2000), dan 174  $\mu\text{M}$  (Urek & Pazarlioglu, 2007). Urek & Pazarlioglu (2007) melaporkan pada tiga konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$  yang diuji yaitu 100, 174 dan 354  $\mu\text{M}$ , aktivitas enzim MnP tertinggi dihasilkan pada konsentrasi 174  $\mu\text{M}$ , aktivitas MnP sedang pada konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  dan terendah pada  $\text{Mn}^{2+}$  354  $\mu\text{M}$ . Hasil ini menarik untuk dicermati karena pada konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$  yang sangat tinggi ternyata menghasilkan aktivitas MnP yang terendah. Belum ada laporan yang menjelaskan fenomena ini.

Penggunaan surfaktan seperti Tween 80, Tween 20, polioksietilena oleat dan 3-[(3-kholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanasulfat, dan pluronik F68 dalam media pertumbuhan *P. chrysosporium* dilaporkan meningkatkan produksi enzim LiP dan enzim MnP (Ntwampe dkk., 2010 dan Li dkk., 2011). Urek & Pazarlioglu (2007) menyatakan bahwa aktivitas enzim MnP meningkat dengan penambahan Tween 80 hingga 0,05 %, tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi terjadi penurunan aktivitasnya. Sayangnya pada artikel tersebut tidak dicantumkan kondisi pertumbuhan dilakukan dengan atau tanpa penggojogan. Wang dkk. (2008) melaporkan aktivitas enzim MnP dan enzim LiP pada penambahan Tween 80 dengan konsentrasi 0,5 g/L meningkat hingga empat kali lipat dibanding tanpa Tween 80, kemudian cenderung menurun pada konsentrasi lebih dari 0,5 g/L. Tween 80 banyak digunakan pada media produksi enzim MnP dari *P. chrysosporium*. Penggunaan Tween-80 hingga konsentrasi 0,05 % dilaporkan tidak menghambat pertumbuhan *P. chrysosporium*. Wang dkk. (2008) menyatakan berat kering miselium tidak terpengaruh pada konsentrasi Tween 80 yang rendah tetapi menunjukkan penurunan pada penambahan 0,5 g/L. Tergitol NP-10 dan Triton X-100 dilaporkan menghambat pertumbuhan *P. chrysosporium* antara 75-95 % pada dosis pemakaian yang sama dengan Tween 80 (Ntwampe dkk., 2010).

Secara umum ada beberapa pendapat mengenai peran surfaktan dalam kultur pertumbuhan kapang. Surfaktan mampu melindungi sel dari pengaruh tegangan permukaan yang diperkirakan dengan salah satu di antara mekanis berikut yaitu surfaktan menurunkan viskositas permukaan, stabilitas busa dan memodifikasi hidrofobitas permukaan sel sehingga mampu menekan jumlah sel yang melekat pada gelembung, surfaktan mengelilingi membran sel sehingga meningkatkan kekuatan sel atau karena surfaktan mampu menurunkan tegangan antarmuka dari sel dan cairan media sehingga transpor nutrisi menjadi lebih baik. Surfaktan khususnya Tween 80 dapat meningkatkan bioavailabilitas senyawa yang kurang larut. Enzim ekstraselular diproduksi pada ujung hifa jamur, enzim ekstraselular yang dihasilkan umumnya sedikit bermuatan dalam keadaan aktif sehingga diduga terjebak pada biomassa *P. chrysosporium* yang juga dihasilkan selama pertumbuhan. Surfaktan menyebabkan perubahan pada struktur membran dan mendorong lepasnya enzim tersebut dari hifa. Surfaktan menstimulasi pertumbuhan spora kapang (Ntwampe dkk., 2010 dan Li dkk., 2011). Pengaruh surfaktan (Tween 20, 40, 60, 80 dan *cholamidopropil dimetilamonio propanesulfat* (CHAPS)) pada produksi enzim LiP adalah mencegah terjadinya inaktivitas enzim LiP karena penggojogan (Venkatadri & Irvine, 1990), sedangkan pada MnP belum ada studi yang lebih jelas. Hasil penelitian Xiaoyan dkk. (2007) menunjukkan kultur *P. chrysosporium* yang tidak mengandung

Tween 80 dengan penggojogan 160 putaran/menit menghasilkan aktivitas enzim MnP selalu lebih tinggi dari enzim LiP.

Veratril alkohol (3,4-dimetoksibenzil alkohol) adalah salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh metabolisme *P. Chrysosporium*. Veratril alkohol ditambahkan sebagai suplemen dalam kultur *P. chrysosporium* untuk meningkatkan aktivitas ligninase dengan cara melindungi ligninase terhadap inaktivasi oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan dalam kultur kapang (Tonon & Odier, 1988). Aktivitas enzim ligninase meningkat setelah penambahan veratril alkohol dalam kultur produksi. Aktivitas LiP dan MnP sangat rendah pada kultur yang tidak ditambahkan veratril alkohol. Aktivitas LiP dan MnP meningkat drastis pada penambahan veratril alkohol 0,03 mg/L dan maksimal pada 0,3 mg/L, selanjutnya aktivitas LiP dan MnP menurun pada konsentrasi lebih dari 0,3 mg/L, diduga veratril alkohol berlebih menginhibisi kedua enzim tersebut (Li dkk., 2011).

Inhibitor protease adalah senyawa yang menghambat aktivitas protease. Protease adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis protein. Protease dihasilkan oleh semua organisme termasuk *P. chrysosporium* dalam kultur pertumbuhannya. Dey dkk. (1991) menyatakan bahwa dalam kultur pertumbuhan *P. chrysosporium*, protease tidak dihasilkan selama fase lag dan eksponensial melainkan mulai dihasilkan setelah produksi ligninase (enzim MnP dan enzim LiP) mencapai optimum (awal fase stationer). Sintesis protease terus meningkat sedangkan ligninase menurun, dan ketika kemudian aktivitas protease menurun ternyata sintesis ligninase meningkat kembali. Hal ini mengindikasikan bahwa penurunan produksi ligninase diduga karena aktivitas protease. Penambahan inhibitor protease berupa PMSF dan EDTA sesaat setelah produksi ligninase tertinggi dilaporkan efektif mempertahankan aktivitas ligninase. Hasil studi ini dapat dipertimbangkan untuk optimasi produksi MnP. Senyawa PMSF diduga akan lebih efektif menjaga stabilitas MnP dari degradasi protease dibandingkan dengan EDTA. Senyawa EDTA menghambat aktivitas protease jenis metaloprotease karena kemampuannya membentuk khelat dengan ion logam yang diperlukan untuk aktivitas protease tersebut. Enzim MnP juga termasuk jenis metaloenzim karena aktivitasnya bergantung pada adanya ion Mn<sup>2+</sup>. Jika EDTA digunakan sebagai inhibitor protease maka kemungkinan EDTA juga akan berikatan dengan ion Mn<sup>2+</sup> sehingga aktivitas MnP dapat terhambat. Penambahan PMSF untuk mencegah degradasi MnP dapat diberikan pada saat sintesis MnP tertinggi tetapi dapat juga ditambahkan setelah diperoleh ekstrak kasar enzim (Dey dkk.,1991).

### **2.6.3 Suhu dan suplai oksigen selama produksi peroksidase oleh *P. chrysosporium***

Beberapa penelitian melaporkan suhu optimum yang berbeda untuk produksi enzim MnP dan enzim LiP dari *P. chrysosporium* BKMF 1767. Gill & Arora (2003) menyatakan

suhu optimum produksi enzim MnP dari *P. chrysosporium* strain BKMF 1767 adalah 30 °C, yang juga digunakan pada penelitian lainnya (Wang dkk., 2008; Georgieva, 2009 dan Li dkk., 2011). Urek & Pazarlioglu (2007) menyatakan bahwa produksi enzim MnP dari *P. chrysosporium* BKMF 1767 optimum pada suhu 37 °C. Kondisi ini juga dilaporkan digunakan pada penelitian lainnya (Venkatadri & Irvine, 1990; Bonnarme dkk., 1991; Dey dkk., 1991 dan Xiaoyan dkk., 2007). Beberapa studi menunjukkan suhu optimum untuk produksi LiP dalam kultur cair antara 37 °C dan 40 °C (Kirk dkk., 1986, Leisola dkk., 1985). Asther dkk. (1988 dalam Fraser, 2000) menyatakan bahwa pertumbuhan miselium *P. chrysosporium* INA-12 pada fase eksponensial optimum pada suhu 37 °C dan produksi LiP optimum pada suhu 30 °C. Hatakka & Uusi-Rauva (1983 dalam Fraser, 2000) mengamati bahwa kemampuan *P. chrysosporium* mendegradasi kayu yang mengandung lignin lebih tinggi pada suhu 28 °C daripada 39 °C. Aktivitas enzim LiP meningkat seiring dengan penurunan penambahan biomassa dan menurun dalam kondisi jumlah biomassa aktif yang tinggi.

Kapang *P. chrysosporium* bersifat aerob obligat yang memerlukan oksigen untuk pertumbuhan dan perkembangannya, tetapi kelarutan oksigen di dalam air sangat rendah hanya 8 mg/L pada suhu 20 °C, sehingga penggojogan atau agitasi diperlukan untuk meningkatkan jumlah oksigen terlarut dalam media produksi (Pavko, 2011). Walaupun demikian, pada penggojogan berlebih akan menimbulkan busa yang menghambat pertumbuhan. Penelitian yang komprehensif mengenai pengaruh penggojogan terhadap produksi MnP belum pernah dilaporkan. Hasil penelitian Xiong dkk. (2007) dan Wang dkk. (2008) menunjukkan bahwa penggojogan memengaruhi sintesis MnP, tetapi tidak secara langsung menginaktivasi MnP seperti halnya pada LiP.

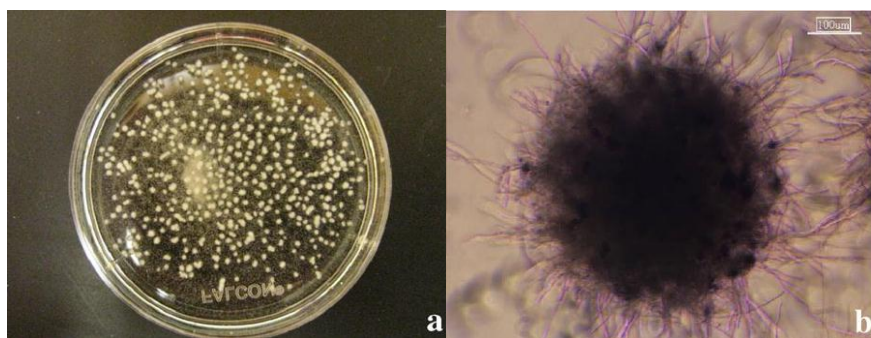
#### **2.6.4 Preparasi inokulum *Phanerochaete chrysosporium***

Kapang *P. chrysosporium* termasuk kapang berfilamen. Kapang berfilamen akan menghasilkan berbagai morfologi yang berbeda-beda dalam kultur cair, mulai dari bentuk miselia yang menyebar seperti pohon hingga jalinan miselia yang padat dan disebut pelet. Bentuk morfologi memengaruhi reologi (kekentalan) kultur fermentasi dan kinerja bioreaktor. Morfologi dalam bentuk pelet menghasilkan kultur Newtonian (kekentalan yang seragam), sering disebut *pseudoplastic filamentous broth*, memiliki kecepatan transfer massa yang lebih baik dibandingkan dengan kultur yang pekat. Sayangnya, autolisis dapat terjadi pada bagian dalam pelet karena keterbatasan oksigen mengakibatkan metabolisme sebagian besar massa kapang menjadi tidak aktif. Dilaporkan bahwa pembentukan pelet penting untuk produksi enzim dari kapang berfilamen seperti produksi poligalakturonidase dan  $\alpha$ -galaktosidase. Semakin kompak pelet semakin besar sintesis

poligalakturonidase, bahkan diduga terjadinya autolisis akan menghasilkan aktivator untuk memicu biosintesis metabolit sekunder (Papagianni & Moo-Young, 2002).

Morfologi kultur yang muncul ditentukan tidak hanya oleh genotipe dari strain, tetapi juga kondisi inokulum dan fisika-kimia kultur produksi. Kualitas inokulum adalah faktor penting dalam menentukan produk hasil fermentasi oleh kapang berfilamen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pelet akan terbentuk pada inokulum dengan konsentrasi kurang dari  $10^8$  spora per mililiter, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi menghasilkan pertumbuhan filamen yang menyebar. Studi pada *Penicillium chrysogenum* menunjukkan bahwa kultur produksi dari inokulum dengan konsentrasi  $10^3$  spora per mililiter menghasilkan pelet lebih besar tetapi jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dari inokulum  $10^4$  spora per mililiter (Papagianni & Moo-Young, 2002).

Preparasi inokulum untuk produksi peroksidase dari *P. chrysosporium* dijelaskan oleh Li dkk. (2011) dengan cara *P. chrysosporium* dikultur ke media *Potato Dextro Agar* (PDA), ditumbuhkan pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama tujuh hari hingga terbentuk spora. Spora dicuci dari medium agar dengan air steril, akan diperoleh suspensi spora sekitar  $1 \times 10^9$  spora/mL. Untuk menghasilkan inokulum berupa pelet maka satu mililiter suspensi spora diinokulasikan dalam 150 mL *Potato Dextro Broth* (PDB) yang mengandung 5 g/L  $\text{CaCO}_3$ , ditumbuhkan pada  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dengan penggojogan 170 rpm. Morfologi kapang dalam stater inokulum tersebut ditunjukkan pada Gambar 11.



Sumber: Li dkk. (2011)

Gambar 11. Morfologi pelet dalam inokulum *P. chrysosporium*. Morfologi makroskopis (a) dan morfologi mikroskopis dengan nilai Bar=100  $\mu\text{m}$  (b)

## 2.7 Dekolorisasi Pewarna Tekstil oleh *Phanerochaete chrysosporium*

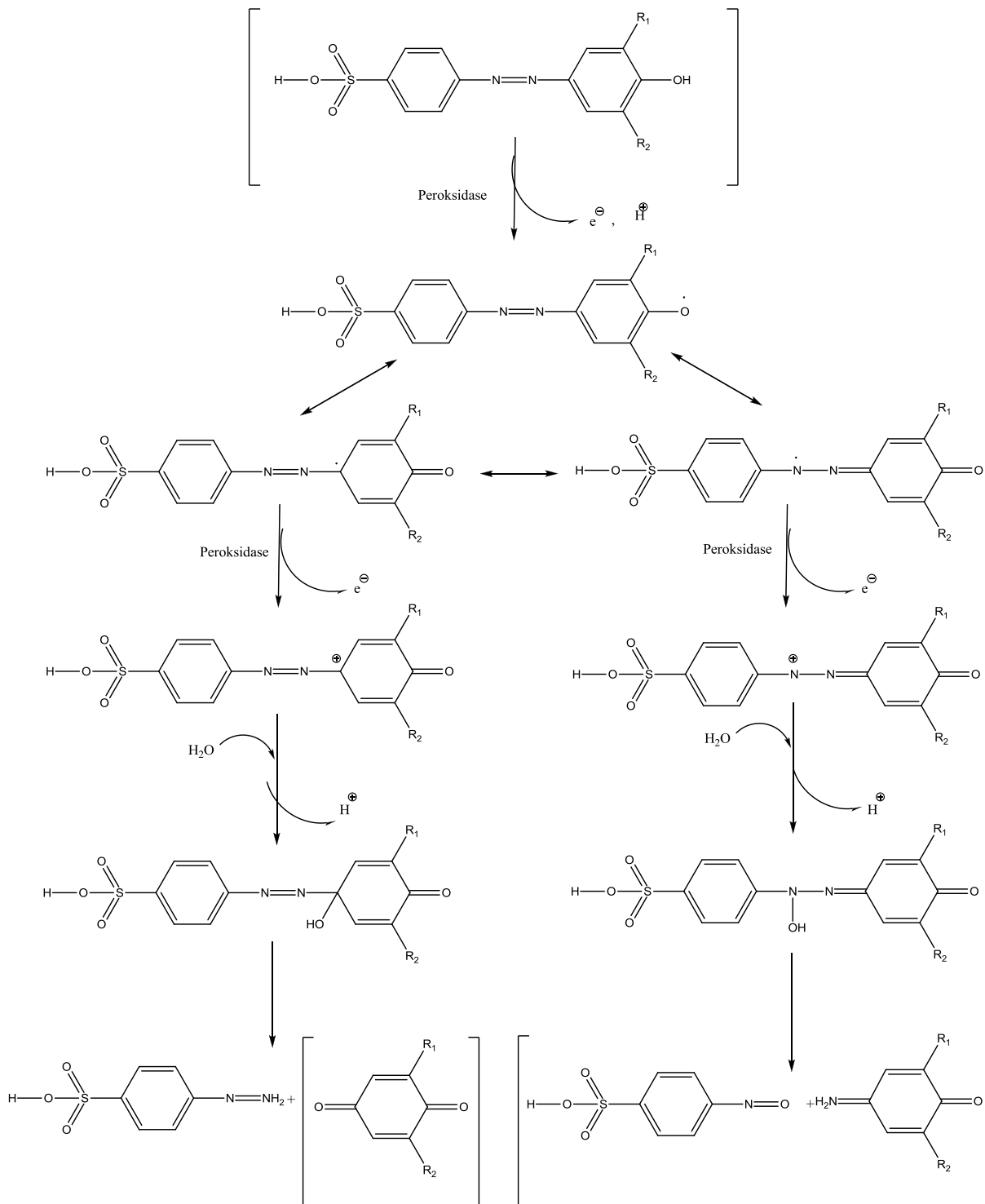
Dekolorisasi pewarna tekstil dapat dilakukan secara mikrobiologis menggunakan kultur mikroba tertentu yang menghasilkan sistem enzim yang mampu mendegradasi dan melakukan mineralisasi pewarna tekstil pada kondisi lingkungan tertentu (Chacko & Subramaniam, 2011). Dalam dekade terakhir, penggunaan kapang pelapuk kayu putih

dipandang lebih efektif menghilangkan pewarna tekstil secara mikrobiologis. Kapang pelapuk kayu putih diketahui dapat mendegradasi lignin dalam kayu hingga terurai menjadi air dan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>). Lignin adalah senyawa poliaromatik yang sangat sulit untuk didegradasi. Berdasarkan hal tersebut juga telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa kapang pelapuk kayu putih mampu mendegradasi senyawa aromatik lainnya termasuk pewarna tekstil. *Phanerochaete chrysosporium* adalah salah satu kapang kelompok pelapuk kayu putih yang menghasilkan berbagai isoform oksidase dan peroksidase ekstraselular yang terlibat dalam degradasi lignin dari substrat lignoselulosa alamiahnya (Sato dkk., 2007), dapat mendegradasi berbagai jenis pewarna tekstil diantaranya indigo, metilen biru, *acid* coklat 4, kristal violet dan *maxilon red* (Ghasemzadeh dkk., 2011). Kapang ini dapat mendegradasi molekul pewarna tekstil menggunakan perangkat metabolisme untuk mendegradasi lignin. Efektivitas penurunan intensitas warna dengan kultur *P. chrysosporium* dipengaruhi oleh struktur dan kekompleksan pewarna. Ghasemi dkk. (2010) menunjukkan perbedaan kemampuan kultur *P. chrysosporium* dalam mendegradasi *reactive orange 16*, *reactive black 5*, *direct violet 51*, *acid red 88*, *acid red 114*, *basic orange II* dan *bismarck brown R*. Lebih dari 99 % *acid red 88*, reaktif *black 5* dan reaktif *orange 16* terdegradasi setelah 24 jam, *acid red 114* dan *direct violet 55* mengalami penurunan intensitas warna hingga 90 % setelah lima hari, *bismarck brown* hanya terabsorpsi, sedangkan *orange II* tidak mengalami penurunan intensitas warna sama sekali.

## **2.8 Dekolorisasi Pewarna Tekstil oleh Peroksidase *Phanerochaete chrysosporium***

Kedua peroksidase yang dihasilkan *P. chrysosporium* masing-masing menunjukkan kemampuan mendegradasi pewarna tekstil. Shah & Nerud (2002) melaporkan beberapa penelitian yang menyatakan bahwa enzim LiP mendekolorisasi pewarna pada kultur *P. chrysosporium* dalam suasana asam (pH 3.5-5). Bentuk LiP I mengoksidasi pewarna azo dan berubah menjadi bentuk LiP II, selanjutnya bentuk LiP II dioksidasi kembali oleh veratril aldehyd. Podgomik dkk. (1999) menyatakan bahwa ekstrak kasar yang mengandung enzim LiP dari kultur *P. chrysosporium* mampu mendegradasi berbagai pewarna tekstil. Ekstrak kasar enzim *Pleurotus sajor-caju* yang mengandung mangan peroksidase dan lakase mampu menghilangkan 200 mg/L metilen biru dan *maxilon blue* secara sempurna setelah 12 jam (Abo-State dkk., 2011). Mangan peroksidase murni dari *Irpex lacteus* dengan adanya Mn<sup>2+</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mampu menghilangkan beberapa pewarna tekstil yaitu *bromofenol blue*, *metil orange*, *poly R-478*, *rhemazol brilliant biru R (RBBR)* dan metilen biru (Shin dkk., 2005).

Jalur metabolisme degradasi pewarna oleh peroksidase kapang dipostulatkan sebagaimana tercantum pada Gambar 12. Peroksidase mengoksidasi gugus fenolik pada struktur pewarna menjadi senyawa radikal. Oksidasi selanjutnya oleh peroksidase memicu hidrolisis ikatan di sekitar gugus azo. Pemutusan ikatan kovalen dapat terjadi secara simetris maupun asimetris di sekitar gugus azo tersebut. Menurut mekanisme ini senyawa amina aromatik bukan merupakan produk dominan hasil degradasi oleh peroksidase. Produk yang terdeteksi dengan LC-MS adalah yang diberi tanda kurung (Chacko & Subramaniam, 2011).





(Sumber: Chacko and Subramaniam, 2011)

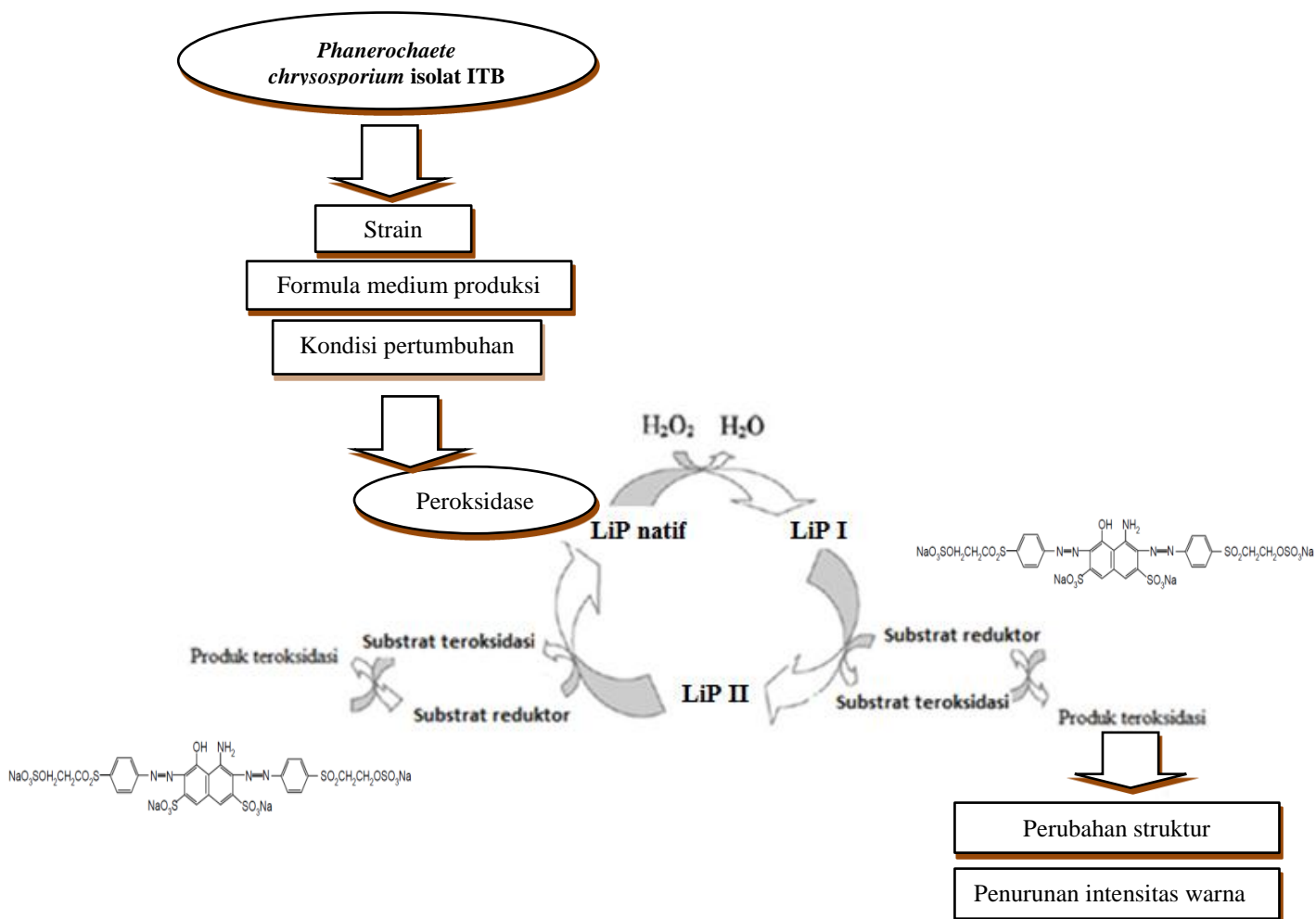
Gambar 12. Mekanisme pemutusan ikatan pewarna azo sulfonat secara simetris dan asimetris oleh peroksidase *P. chrysosporium* dan *S. chromofuscus*

## 2.9 Kerangka Konsep Penelitian

Reaktif *black 5* dikenal juga sebagai *rhemazol black* merupakan pewarna tekstil golongan diazo berukuran besar dengan rumus molekul  $C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{19}S_6$  dan berat molekul 991,82, banyak digunakan untuk pewarnaan katun, wool dan nilon. Struktur reaktif *black 5* sangat sulit terdegradasi karena di sekitar gugus kromofornya terikat beberapa cincin aromatik. Struktur ini memiliki kemiripan dengan struktur lignin yang juga merupakan makromolekul poliaromatik. Kultur *P. chrysosporium* diketahui dapat mendegradasi pewarna tersebut karena kemampuannya menghasilkan lignin peroksidase dan mangan peroksidase. Kedua enzim tersebut adalah enzim utama yang terlibat dalam metabolisme degradasi lignin.

Pemanfaatan peroksidase yang dihasilkan oleh *P. chrysosporium* isolat ITB untuk dekolorisasi reaktif *black 5* secara enzimatik belum pernah dilakukan. Produksi peroksidase oleh *P. chrysosporium* umumnya sangat sedikit dan dipengaruhi oleh jenis strain, formula medium produksi dan kondisi pertumbuhan yang digunakan. Optimasi produksi peroksidase oleh *P. chrysosporium* isolat ITB perlu dikaji untuk mendapatkan jumlah peroksidase yang optimum. Jenis strain memengaruhi profil (jenis dan jumlah) peroksidase yang dihasilkan. Hingga saat ini belum ada informasi yang mengkaji kekerabatan *P. chrysosporium* isolat ITB dengan strain *P. chrysosporium* lainnya, sehingga profil peroksidasinya juga belum diketahui dengan pasti. Sumber karbon dan nitrogen serta beberapa suplemen memiliki pengaruh yang berbeda pada produksi lignin peroksidase dan mangan peroksidase, sedangkan kondisi pertumbuhan optimum untuk produksi peroksidase dipengaruhi oleh jenis strain. Enzim LiP yang pada penelitian ini dikembangkan sebagai enzim pendegradasi pewarna, diduga mengoksidasi gugus fenolik pada struktur pewarna menjadi senyawa radikal yang memicu hidrolisis ikatan kovalen di sekitar gugus azo. Menurut mekanisme ini senyawa amina aromatik bukan merupakan produk dominan hasil degradasi oleh peroksidase, sehingga produk dekolorisasi tidak bersifat toksik. Kemampuan dan mekanisme lignin peroksidase dari *P. chrysosporium* isolat ITB untuk dekolorisasi reaktif *black 5* dipengaruhi oleh karakteristik enzim LiP, konsentrasi  $H_2O_2$ , pH, waktu dan konsentrasi pewarna yang digunakan. Proses dekolorisasi

diamati melalui terjadinya penurunan intensitas warna pada panjang gelombang maksimal reaktif *black 5*. Pemutusan ikatan kovalen di sekitar gugus kromofor pada reaktif *black 5* akan mengubah strukturnya sehingga absorbansi pada panjang gelombang maksimalnya yaitu 600 nm akan berkurang dibandingkan sebelum dekolorisasi. Perubahan struktur reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolorisasi dapat diketahui melalui beberapa cara diantaranya perubahan nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimalnya pada daerah sinar tampak, perubahan pada spectrum ultra violet (UV) dan lebih lanjut dapat ditentukan struktur hasil degradasinya dengan spektroskopi massa. Kerangka konsep penelitian ini diilustrasikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Kerangka konsep penelitian