

Optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim ligninolitik *Omphalina* sp. dan *Pleurotus ostreatus* pada fermentasi padat

*Optimization of growth and ligninolytic enzymes activity of *Omphalina* sp.
and *Pleurotus ostreatus* using solid state fermentation*

Happy WIDIASTUTI, SISWANTO & SUHARYANTO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor, 16151, Indonesia

Summary

*Solid wastes of bagasse and empty fruit bunch (EFB) respectively from sugarcane and palm oil mill in Indonesia are abundant. Now days, up to now these solid wastes have not yet been optimally utilized so that the added value is still very low and even cause an environmental problem. Research on bioconversion of bagasse and EFB with two culture of white-rot fungi (WRF) i.e., *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus* to produce ligninolytic enzymes was conducted to provide added value to this lignocellulosic waste. Production of extra cellular enzymes from WRF was not only determined by the type of isolate but also the culture condition. This research was aimed to determine the optimum culture condition of solid state fermentation in producing ligninolytic enzymes at laboratory scale. In this research, WRF was examined for ligninolytic producing enzymes (laccase, lignin peroxidase / LiP and Mn-peroxidase / MnP), using media consisting of bagasse and EFB separately as main substrate with supplementation of rice bran, Cu^{2+} with or without rice bran. The observation was based on their growth and ligninolytic enzyme activities. Characteristics of optimum pH of LiP, MnP and laccase activity were also determined. The results showed that addition of supplement was not able to increase the Cu^{2+} growth of mycelia especially in the first and second months but in*

*the third month the addition of supplement enhanced the mycelia growth. The growth of mycelia on the addition of Cu^{2+} with or without rice bran significantly lower compared to the controls both of *Omphalina* sp. and *P. ostreatus* in bagasse and EFB. The optimum pH of laccase, MnP, and LiP activities was five both for *Omphalina* sp. and *P. ostreatus* at EFB and bagasse. *Omphalina* sp. was better than *P. ostreatus* in producing laccase on bagasse and EFB without any supplementations. The highest laccase activity showed by *P. ostreatus* with bagasse and EFB media treated with Cu and Cu + rice bran. Supplementation with Cu^{2+} was more effective in increasing laccase activity than rice bran. Activities of Li-P on bagasse and EFB for the two WRF cultures were significantly influenced by supplementation of both of rice bran and Cu^{2+} . Li-P activity on EFB was slightly higher than that on bagasse. Mn-P activity was not influenced by rice bran, Cu^{2+} or the combination of both. However, these enzymes activities on EFB were higher compared to bagasse especially for *P. ostreatus*. Supplementation of Cu was enhance the activity of laccase and LiP both of *P. ostreatus* and *Omphalina* sp in bagasse and EFB though inhibited the growth of those fungi especially in the initial growth.*

[Key words: Lignocellulosic waste, ligninolytic enzymes, solid-state fermentation, empty-fruit bunch, bagasse]

Ringkasan

Limbah padat bagas tebu dan tandan kosong kelapa sawit (TKKS) masing-masing dari proses pengolahan gula tebu dan minyak sawit di Indonesia jumlahnya melimpah dan sampai saat ini belum mendapat penanganan yang efektif sehingga nilai tambahnya masih sangat rendah dan bahkan mengganggu lingkungan. Penelitian biokonversi limbah padat bagas tebu dan TKKS menggunakan dua isolat fungi pelapuk putih (FPP) yaitu *Omphalina* sp. dan *Pleurotus ostreatus* untuk produksi enzim ligninolitik dilakukan untuk meningkatkan nilai tambah limbah lignoselulosa tersebut. Penelitian ini, menguji aktivitas enzim ekstraseluler dari FPP antara lain lakase, lignin peroksidase (LiP), dan Mn-peroksidase (MnP) dari dua spesies FPP yaitu *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus*. Penelitian bertujuan menetapkan kondisi optimum media fermentasi untuk produksi enzim ligninolitik dari bagas tebu dan TKKS sebagai substrat dan karakterisasi pH optimum enzim ligninolitik dari dua FPP yaitu *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus*. Pengamatan dilakukan berdasarkan laju pertumbuhan dan aktivitas enzim ligninolitik. Enzim lakase, MnP, dan LiP diekstraksi dan dikarakterisasi pH optimum aktivitasnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplemen menghambat pertumbuhan miselia pada satu dan dua bulan pertama inkubasi, namun laju pertumbuhan miselium khususnya pada perlakuan pemberian Cu^{2+} dan Cu^{2+} + dedak meningkat tajam pada bulan ketiga setelah inkubasi. Pertumbuhan miselium *Omphalina* sp dan *P. ostreatus* pada medium yang ditambah Cu^{2+} dan Cu^{2+} +dedak lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Pada inkubasi tiga bulan, aktivitas optimum lakase, MnP dan LiP diperoleh pada pH 5, baik untuk *Omphalina* sp. maupun *P. ostreatus* yang diekstrak dari bahan lignoselulosa bagas tebu dan TKKS. Aktivitas lakase dari *Omphalina* sp. lebih tinggi daripada *P. ostreatus* pada substrat TKKS dan bagas tebu tanpa suplementasi. Pemberian suplemen berupa Cu^{2+} dan dedak atau kombinasinya meningkatkan aktivitas lakase baik pada bagas tebu maupun pada TKKS. Aktivitas lakase

tertinggi ditunjukkan oleh isolat *P. ostreatus* pada medium bagas tebu dan TKKS pada perlakuan pemberian Cu^{2+} dengan atau tanpa dedak. Aktivitas lakase nampaknya lebih dipengaruhi oleh penambahan Cu^{2+} dibandingkan dengan pemberian dedak. Aktivitas LiP baik pada bagas tebu maupun TKKS untuk kedua FPP yang diuji pada perlakuan penambahan dedak dan Cu nyata lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas LiP yang diekstrak dari medium tanpa penambahan suplemen. Aktivitas LiP pada TKKS lebih tinggi dibandingkan dengan pada bagas tebu khususnya untuk *P. ostreatus*. Sedangkan aktivitas MnP tidak dipengaruhi penambahan dedak dan Cu^{2+} demikian pula kombinasi keduanya. Aktivitas MnP yang diekstrak dari TKKS lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas MnP yang diekstrak dari bagas tebu khususnya untuk *P. ostreatus*. Penambahan Cu^{2+} meningkatkan aktivitas lakase dan LiP *P. ostreatus* dan *Omphalina* sp yang ditumbuhkan pada bagas dan TKKS walaupun ion logam ini menghambat pertumbuhan kedua JPP ini khususnya pada awal pertumbuhan.

Pendahuluan

Luas areal perkebunan kelapa sawit di Indonesia pada tahun 2006 diperkirakan mencapai 6 juta Ha (Witjaksana, 2006). Proses produksi crude palm oil (CPO) akan menghasilkan limbah padat tandan kosong kelapa sawit (TKKS) sekitar 10 juta ton/tahun, yang hingga sekarang belum dimanfaatkan secara optimal sehingga belum diperoleh nilai tambah ekonomis yang tinggi. Tandan kosong kelapa sawit terdiri dari tiga komponen utama, yaitu lignin, selulosa dan hemiselulosa. Hasil analisis menunjukkan bahwa kandungan lignin TKKS cukup tinggi yaitu 40,86%. Tingginya lignin pada TKKS di satu sisi menghambat dekomposisi di lapang tetapi di sisi lain dapat membuka peluang untuk menggunakan limbah TKKS ini sebagai substrat

fungi pelapuk putih (FPP) penghasil enzim ligninolitik. Isolasi dan seleksi untuk mendapatkan fungi pelapuk putih unggul telah dilakukan dari lingkungan pabrik kelapa sawit (Suharyanto & Siswanto, 2003).

Penggunaan enzim ligninolitik sangat beragam misalnya untuk *pulping* dan *bleaching* dalam industri pulp dan kertas, remediasi daerah bekas tambang, penjernihan air (*water clean up*), dan biodeguming serat rami (Jeffries & Vikarii, 1996), biosensor untuk senyawa fenol dan oksigen, reaksi katoda dalam sel biofuel (Bulter *et al.*, 2003), dan degradasi hidrokarbon aromatik polisiklik (Baldrian *et al.*, 2000). Menurut Maeda *et al.* (2001) tidak semua FPP menghasilkan ketiga jenis enzim ligninolitik. *Phanerochaete chrysosporium* dilaporkan mampu menghasilkan enzim lignin peroksidase dan mangan peroksidase (Matsubara *et al.*, 1996; Jimenez-Tobon *et al.*, 1997) untuk dekolonisasi pewarna tekstil (Darah & Ibrahim, 1998; Sani & Banerjee, 1999), *Phanerochaete flavido-alba* menghasilkan lakase (Perez *et al.*, 1996), *Bjerkandera* sp. menghasilkan lignin peroksidase dan mangan peroksidase (Have *et al.*, 1998), *Trametes versicolor* menghasilkan lakase (Collins *et al.*, 1998). *Ganoderma applanatum* menghasilkan mangan peroksidase dan dilaporkan mendegradasi lignin lebih efisien daripada *Pleurotus ostreatus* (Maeda *et al.*, 2001; Sarkar *et al.*, 1997). *Ganoderma applanatum* dikenal sebagai patogen penyakit penting pada tanaman perkebunan dan kehutanan, sehingga pemanfaatan fungi ini untuk degradasi lignin berisiko menimbulkan penyakit pada tanaman. Cohen *et al.* (2002) mengemukakan bahwa *P. ostreatus* menghasilkan enzim ekstraseluler oksidatif yaitu MnP, veratril peroksidase yang

merupakan hibrida MnP dan LiP serta lakase.

Rolle (1998) mengemukakan bahwa fermentasi substrat padat (*solid-state fermentation*) untuk produksi enzim memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan fermentasi terbenam (*submerged fermentation*) karena tidak perlu energi untuk aerasi, penyiapan medium dan pengendalian proses lebih sederhana, serta peralatan produksi lebih sederhana sehingga sesuai untuk industri skala kecil hingga menengah. Dedak padi dikenal kaya akan protein, karbohidrat, dan lemak, sumber vitamin B1, B2, B3, biotin, asam pantotenat, dan besi, sehingga sesuai untuk medium fermentasi dalam produksi protease asam (Ikasari & Mitchell, 1994) dan selulase kapang (Sudaryati & Sastraatmadja, 1993). Sedangkan ion Cu²⁺ merupakan sumber logam kofaktor yang menginduksi dan dapat meningkatkan transkripsi gen lakase (Palmieri *et al.*, 1997). Penelitian bertujuan menetapkan kondisi optimum medium fermentasi untuk produksi enzim ligninolitik dari bagas tebu dan TKKS sebagai substrat dan karakterisasi pH optimum enzim ligninolitik dari dua FPP yaitu *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus*.

Bahan dan Metode

Bagas tebu diperoleh dari pabrik gula PT. Rajawali Nusantara, Subang sedangkan TKKS diperoleh dari Pabrik Kelapa Sawit, Kertajaya, PTPN VIII, Banten. Percobaan dilakukan pada *bag log* berisi 500 g medium berupa bagas tebu atau TKKS. Selanjutnya *bag log* yang telah berisi TKKS atau bagas tebu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm² selama satu jam.

Perbanyakan inokulum FPP

Omphalina sp. dan *P. ostreatus* diremajakan pada medium PDA dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5-7 hari. Biakan FPP yang telah tumbuh merata pada medium PDA diinokulasikan dengan medium biji jiwawut (kadar air 50-60%) dalam botol selai (100 g) steril dan diinkubasi selama dua minggu pada suhu ruang. Biakan FPP dalam medium biji jiwawut tersebut digunakan sebagai inokulum.

Penyiapan medium fermentasi

Sebelum digunakan dalam penelitian, bagas tebu dan TKKS dianalisis lignin metode Klakson (SNI 14-0492-1989), sedangkan selulosa dan hemiselulosa berdasarkan SNI 14-044-1989. Empat jenis medium diuji dalam penelitian ini yaitu kontrol (bagas tebu atau TKKS), bagas tebu atau TKKS dengan penambahan dedak (15%, b/b), CuSO_4 (150 μM) (Palmieri *et al.*, 1997), dan kombinasi keduanya. Setiap perlakuan diulang tiga kali sehingga terdapat 24 *bag log* masing-masing untuk bagas tebu dan TKKS.

Tandan kosong kelapa sawit (500 g) yang sudah dipotong-potong ditambah dengan dedak (15%) dan air (500 mL) dan diaduk sampai merata. Campuran TKKS dan dedak dimasukkan ke dalam plastik tahan panas kemudian ditutup dengan pipa PVC dan sumbat kapas dan diikat dengan karet gelang. Penambahan CuSO_4 dilakukan dengan merendam TKKS dengan larutan CuSO_4 150 μM . Hal yang sama juga dilakukan pada perlakuan kombinasi penambahan dedak dan CuSO_4 . Medium selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm^2 selama satu jam. Setelah dingin *bag log* diinokulasi dengan 20 g

inokulum FPP dalam medium jiwawut dan diinkubasi pada suhu ruang (25-28°C) selama tiga bulan. Setiap medium diuji untuk dua jenis FPP yaitu *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus*. Hal yang sama juga dilakukan pada penggunaan bagas tebu sebagai medium tumbuh.

Ekstraksi dan analisis aktivitas enzim

Ekstraksi enzim dari kultur FPP umur tiga bulan dilakukan dengan bufer fosfat 0,2 M pH 7 dengan perbandingan bufer : kultur FPP 1:2 (v/b) dan digerus dalam mortar sampai benar-benar halus. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan rotor 11 mm selama 10 menit pada suhu 0-4 °C. Supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan dari endapannya dan dimasukkan ke dalam tabung mikro, jika supernatan yang diperoleh masih keruh, maka dilakukan sentrifugasi ulang dengan kecepatan, waktu, dan kondisi yang sama, hingga diperoleh supernatan yang benar-benar bersih tanpa kotoran. Enzim kasar yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi pH optimum aktivitasnya dengan mereaksikan enzim kasar dengan substrat enzim yang sesuai dalam larutan bufer fosfat pH 5, 6, dan 7.

Analisis aktivitas enzim lakase dilakukan dengan metode Perez & Jeffries (1992). Satu unit aktivitas lakase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi 1 nmol senyawa ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) per menit pada suhu 37°C. Lignin peroksidase dianalisis berdasarkan metode yang dikembangkan Tien & Kirk (1984). Satu unit LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengoksidasi 1 nmol substrat guaiaikol per

menit. Mangan peroksidase (Hatakka, 1994) merupakan selisih aktivitas enzim dengan penambahan $MnSO_4$ dan pengurangan $MnSO_4$. Satu unit MnP didefinisikan sebanding dengan 1 nmol produk yang dihasilkan per menit.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan miselia FPP

Pengamatan morfologi miselia di medium juwawut menunjukkan bahwa *Omphalina* sp. tumbuh lebih cepat diban-

dingkan dengan *P. ostreatus*. Selain itu, struktur miselia *Omphalina* sp. lebih kompak dibandingkan dengan struktur miselia *P. ostreatus*. Pengamatan pertumbuhan miselia pada bulan kesatu pada medium fermentasi menunjukkan bahwa pemberian Cu^{2+} dengan atau tanpa dedak sangat menghambat pertumbuhan miselia, namun pada bulan ketiga terjadi laju peningkatan pertumbuhan miselia yang lebih besar dibandingkan dengan pertumbuhan miselia pada perlakuan pemberian dedak atau kontrol (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa diperlukan waktu

Tabel 1. Pertumbuhan miselium FPP *Omphalina* sp dan *P. ostreatus* pada medium bagas tebu dan TKKS dengan penambahan suplemen dedak dan Cu^{2+} dan kombinasinya selama 1-3 bulan inkubasi.

Table 1. Growth of *Omphalina* sp and *P. ostreatus* mycelia on bagasse and EFB media with supplementation of rice bran, Cu^{2+} , and its combination for 1-3 month incubation.

Limbah lignoselulosa <i>Lignocellulosic waste</i>	FPP <i>WRF</i>	Suplemen <i>Supplement</i>	Pertumbuhan miselium (cm) diukur dari permukaan atas <i>bag log</i> bulan ke 1-3 <i>Mycelia growth (cm) measured from top surface of bag log from 1-3 month</i>		
			1	2	3
Bagas tebu <i>Bagasse</i>	<i>Omphalina</i> sp.	Kontrol/ <i>Control</i>	4,3	11,0	15,0 *a
		Dedak/ <i>Rice bran</i>	6,3	12,3	15,0 a
		$CuSO_4$	2,7	6,7	14,0 b
		Dedak/ <i>Rice bran</i> + $CuSO_4$	4,0	7,7	14,7 b
		Kontrol/ <i>Control</i>	4,0	11,3	15,0 a
	<i>P. ostreatus</i>	Dedak/ <i>Rice bran</i>	4,0	11,3	14,3 a
		$CuSO_4$	3,3	9,0	13,3 b
		Dedak/ <i>Rice bran</i> + $CuSO_4$	2,7	8,0	14,3 b
		Kontrol/ <i>Control</i>	5,7	12,3	14,7 a
		Dedak/ <i>Rice bran</i>	7,7	13,3	14,7 a
TKKS <i>EFB</i>	<i>Omphalina</i> sp.	$CuSO_4$	3,7	6,3	12,0 b
		Dedak/ <i>Rice bran</i> + $CuSO_4$	5,3	8,7	14,0 b
		Kontrol/ <i>Control</i>	6,3	12,3	15,0 a
		Dedak/ <i>Rice bran</i>	4,3	13,0	14,7 a
		$CuSO_4$	3,3	7,3	13,3 b
	<i>P. ostreatus</i>	Dedak/ <i>Rice bran</i> + $CuSO_4$	2,3	8,3	14,3 b

Keterangan : * Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kelompok menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji beda nyata Duncan ($P < 0,05$).

Note : * The numbers followed with the same letter on one group showed insignificantly different with Duncan's test ($P < 0,05$).

adaptasi bagi *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus* terhadap pemberian suplemen khususnya berupa CuSO_4 .

Tabel 1 menunjukkan bahwa setelah inkubasi tiga bulan pertumbuhan FPP bervariasi pada jenis suplemen yang berbeda. Pada medium bagas tebu, pertumbuhan miselia *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus* nyata lebih lambat dengan pemberian suplemen berupa Cu^{2+} maupun dedak dan Cu^{2+} dibandingkan dengan pemberian dedak dan kontrol. Nampaknya Cu^{2+} berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan miselia. Kecenderungan yang sama juga dijumpai pada pertumbuhan miselia *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus* di TKKS.

Pertumbuhan miselia *Omphalina* sp. pada bagas tebu relative lebih cepat dibandingkan dengan pada TKKS. Perbedaan kecepatan tumbuh miselia FPP ini menunjukkan adanya kespesifikan FPP tersebut terhadap substrat medium. Perbedaan komposisi kimia antara bagas tebu dan TKKS diduga mempengaruhi kecepatan tumbuh miselia *Omphalina* sp. Hasil analisis lignin dan selulosa, serta hemiselulosa TKKS berturut-turut ialah 27,52%, 51,4% dan 1,92%, sedangkan bagas tebu mengandung lignin, selulosa, dan hemiselulosa berturut-turut ialah 36,28%, 45,7% dan 8,59%. Sedangkan kecepatan tumbuh miselia *P. ostreatus* pada limbah lignoselulosa bagas dan TKKS tidak menunjukkan perbedaan.

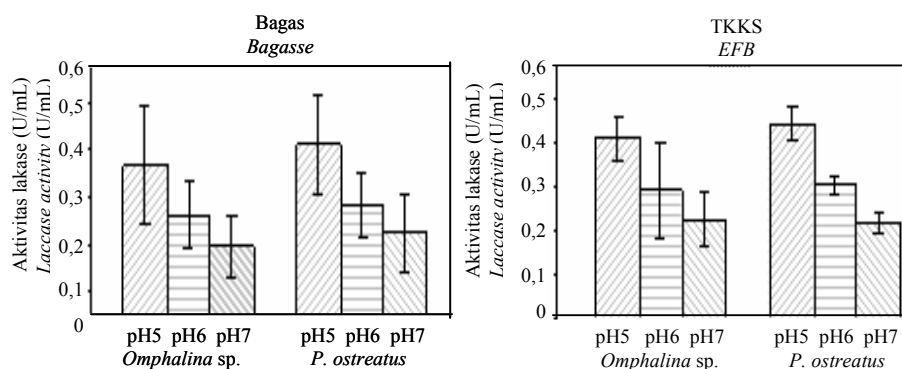
Optimasi komposisi medium untuk produksi lakase

Lakase yang dihasilkan kedua FPP aktif pada pH 5-7, baik pada medium bagas tebu maupun TKKS. Aktivitas lakase dari *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus*

optimum pada pH 5 baik yang diekstrak dari bagas tebu maupun yang diekstrak dari TKKS (Gambar 1). Menurut Thurston (1994) lakase merupakan enzim yang tidak terlalu spesifik karena dapat mengkatalisis oksidasi beberapa jenis senyawa. Aktivitas lakase *Trametes trogii* adalah pada pH 3,4 walaupun sangat stabil pada pH 4,4 (Levin *et al.*, 2002). Nampaknya pH optimum yang diperoleh dalam penelitian ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan pH optimum *T. trogii*. Walaupun demikian aktivitas lakase pada pH di bawah lima belum diuji dalam penelitian ini. Enzim lakase tidak spesifik dalam mekanisme pembebasan senyawa radikal sehingga dapat mengkatalisis degradasi lignin dan sangat diuntungkan pada senyawa yang mempunyai potensial redoks tinggi (430 – 780 mv) (Cavallazzi *et al.*, 2004).

Lakase dari fungi isolat liar mempunyai aktivitas tertinggi pada pH 4,5 pada medium ABTS sedangkan mutannya mempunyai kisaran pH optimum pada pH 3-6. Pada galur liar, aktivitas enzimnya turun pada pH 3-6 walaupun penurunan aktivitas pada pH 4,5 tidak nyata (Munoz *et al.*, 1997). Lakase yang diekstrak dari *Marasmius quercophilus* mempunyai pH optimum 4,5 pada suhu 75^oC (Thurston, 1994). Substrat buatan seperti ABTS dapat berfungsi sebagai mediator dalam reaksi oksidasi senyawa non-fenolik yang tidak dapat dioksidasi oleh lakase itu sendiri. Pemberian suplemen pada substrat utama bagas maupun TKKS tidak mempengaruhi pH optimum aktivitas enzim baik pada *Omphalina* sp. maupun *P. ostreatus*.

Omphalina sp. lebih unggul daripada *P. ostreatus* dalam menghasilkan lakase pada medium bagas tebu dan TKKS tanpa penambahan suplemen (Gambar 2). Pada



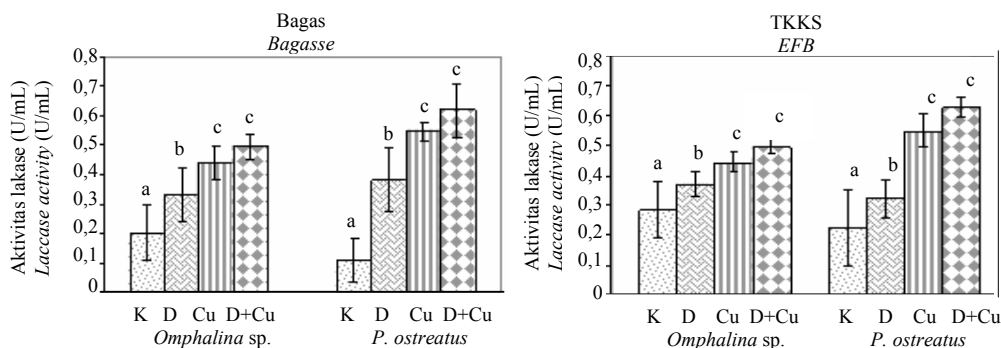
Gambar 1. Aktivitas lakase *Omphalina sp.* dan *P. ostreatus* yang tumbuh pada medium bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah inkubasi tiga bulan, yang diekstraksi pada berbagai pH. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi.

Figure 1. Laccase activity of *Omphalina sp.* and *P. ostreatus* grown for three months in bagasse (left) and EFB (right), extracted in selected pH. The vertical bar showed standard deviation.

medium tanpa penambahan suplemen *Omphalina sp.* menghasilkan aktivitas lakase sekitar 0,2 dan 0,3 U/mL sedangkan aktivitas lakase dari *P. ostreatus* ialah sekitar 0,1 dan 0,2 U/mL masing-masing pada bagas tebu dan TKKS. Pemberian suplemen berupa dedak dapat secara nyata meningkatkan aktivitas lakase dan aktivitas lakase dapat lebih ditingkatkan dengan pemberian Cu^{2+} atau kombinasi Cu^{2+} dan dedak (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa suplemen berpengaruh terhadap aktivitas lakase. Dedak merupakan sumber vitamin terutama vitamin B kompleks yang umum digunakan dalam budidaya jamur tiram. Vitamin B kompleks sangat diperlukan dalam pembentukan miselium dan tubuh buah jamur. Dedak merupakan substrat alami yang dapat mendukung miselium *Rhizopus oligosporus* menjadi tebal dan kompak (Ikasari & Mitchell, 1994). Selain itu, dedak juga merupakan sumber vitamin B1 yang diperlukan dalam reaksi enzim

khususnya sebagai koenzim. Lakase (p-difenol oksidase E.C 1.10. 32) juga dikenal sebagai enzim *multi coper* yang mengandung Cu^{2+} dan mampu mengkatalisis abstraksi satu elektron dari substrat organik dan anorganik seiring reduksi empat elektron dari oksigen menjadi air (Eggert *et al.*, 1996). Enzim ini merupakan glikoprotein yang mengandung 2-4 atom Cu^{2+} per molekul. Walaupun demikian nampaknya tidak terdapat pengaruh yang sinergi antara dedak dengan Cu^{2+} dalam menginduksi aktivitas lakase baik pada *Omphalina sp.* maupun *P. ostreatus* yang ditumbuhkan di bagas tebu. Kecenderungan yang sama juga dijumpai pada pengaruh suplemen dedak dan CuSO_4 terhadap aktivitas lakase pada medium TKKS (Gambar 2).

Lakase tertinggi yang diperoleh dalam penelitian ini ialah berkisar 0,6 U/mL yaitu yang dihasilkan oleh *P. ostreatus*. Hasil ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas lakase



Gambar 2. Pengaruh penambahan dedak dan CuSO_4 atau kombinasi keduanya terhadap aktivitas lakase *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus* pada bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah tiga bulan masa inkubasi yang diuji pada pH 5. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi. Bar dengan huruf sama menunjukkan tidak beda nyata menurut uji Duncan ($P < 0,05$).

Figure 2. Effect of addition of rice bran and CuSO_4 or both on laccase activity of *Omphalina* sp. and *P. ostreatus* in bagasse (left) and EFB (right) incubated for three months assessed on pH 5. The vertical bar showed standard deviation. Bar with the same letter showed insignificantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

P. ostreatus yang telah dilaporkan oleh Palmieri *et al.* (2000) yaitu sebesar 30 U/mL. Perbedaan yang tinggi ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan galur isolat serta medium tumbuh. Aktivitas lakase *P. ostreatus* pada TKKS dengan penambahan dedak dan CuSO_4 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas lakase *P. ostreatus* pada bagas tebu. Perbedaan komponen senyawa karbon khususnya perbedaan kandungan lignin kemungkinan dapat menyebabkan perbedaan aktivitas lakase *P. ostreatus* pada kedua limbah lignoselulosa tersebut.

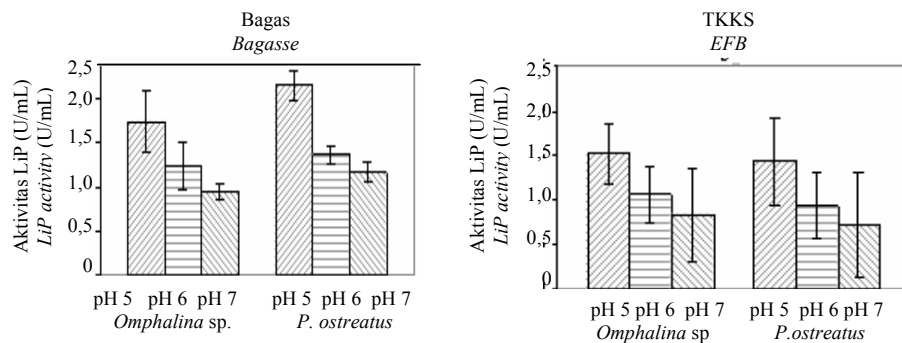
Optimasi komposisi medium untuk produksi LiP

Aktivitas enzim LiP pada bagas tebu dan TKKS optimum pada pH 5 (Gambar 3). Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Tien & Kirk (1998) pada *P. pulmonarius* yang menyebutkan bahwa pH optimum LiP

adalah tiga. Namun demikian aktivitas enzim LiP pada pH 3 belum diuji dalam penelitian ini.

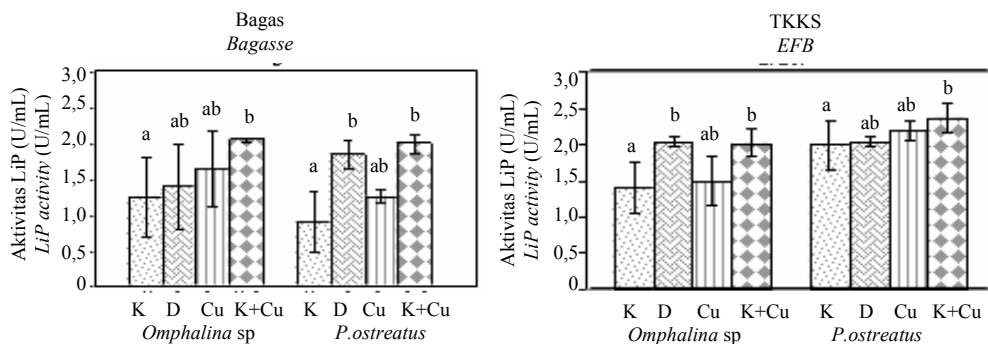
Pada bagas tebu, dedak hanya berpengaruh terhadap aktivitas LiP dari *P. ostreatus* sedangkan aktivitas LiP dari *Omphalina* sp. tidak dipengaruhi penambahan dedak. Walaupun demikian penambahan dedak dan Cu^{2+} secara bersamaan menghasilkan aktivitas LiP nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 4). Kulit serealia merupakan substrat alami lignoselulosa yang dapat mendukung produksi enzim lakase JPP *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 dan MnP pada *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 (Pickard *et al.*, 1999). Kapich *et al.*, 2005 melaporkan bahwa lignoselulosa dapat meningkatkan produksi MnP dan LiP oleh JPP *P. chrysosporium*. Selain itu, kemungkinan dedak bukan sebagai sumber N tetapi tampaknya lebih sebagai sumber vitamin B yang dapat berperan sebagai

Optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim ligninolitik dari *Omphalina sp.* dan...



Gambar 3. Aktivitas LiP *Omphalina sp.* dan *P. ostreatus* yang tumbuh pada medium bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah inkubasi tiga bulan, yang diekstraksi pada berbagai pH. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi.

Figure 3. LiP activity of *Omphalina sp.* and *P. ostreatus* grown for three months in bagasse (left) and EFB (right), extracted in selected pH. The vertical bar showed standard deviation.



Gambar 4. Pengaruh penambahan dedak dan CuSO atau kombinasi keduanya terhadap aktivitas LiP *Omphalina sp.* dan *P. ostreatus* pada bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah tiga bulan masa inkubasi yang diuji pada pH 5. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi. Bar dengan huruf sama menunjukkan tidak beda nyata menurut uji Duncan ($P < 0,05$).

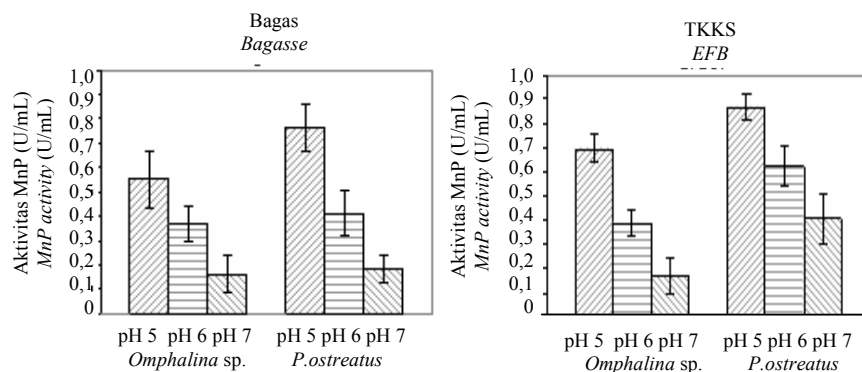
Figure 4. Effect of addition of rice bran and CuSO or both on LiP activity of *Omphalina sp.* and *P. ostreatus* in bagasse (left) and EFB (right) incubated for three months assessed on pH 5. The vertical bar showed standard deviation. Bar with the same letter showed insignificantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

pemacu pertumbuhan (Coyne, 1999). Pada TKKS, pemberian dedak meningkatkan aktivitas LiP *Omphalina* sp. sedangkan pemberian Cu^{2+} tidak berpengaruh secara nyata terhadap aktivitas LiP (Gambar 4). Pada *P. ostreatus* baik pemberian dedak maupun Cu^{2+} tidak berpengaruh terhadap aktivitas LiP.

Optimasi komposisi medium untuk produksi MnP

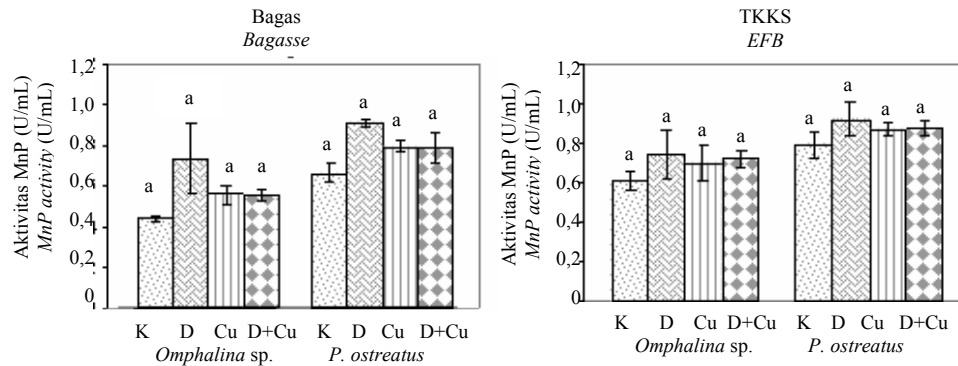
Mangan peroksidase (MnP; 1.11.1.13) mengkatalisis oksidasi lignin dan senyawa fenol melalui perantara Mn. Analisis aktivitas enzim pada medium bagas tebu menunjukkan bahwa aktivitas MnP tertinggi dicapai pada pH 5 baik untuk *Omphalina* sp. maupun *P. ostreatus* yang diekstrak dari bagas tebu dan TKKS

(Gambar 5). Dari hasil analisis ditunjukkan bahwa pengaruh penambahan dedak atau CuSO_4 atau kombinasi keduanya meningkatkan aktivitas enzim MnP. Walaupun demikian, pemberian dedak lebih berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas enzim MnP khususnya pada bagas tebu. Aktivitas enzim MnP pada substrat yang diberi dedak, Cu^{2+} maupun kombinasi keduanya tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Hasil analisis mengindikasikan bahwa tidak terdapat sinergisme antara dedak dan CuSO_4 dalam mempengaruhi aktivitas MnP baik pada *Omphalina* sp. maupun *P. ostreatus*. Selain itu, secara umum ditunjukkan bahwa aktivitas MnP *P. ostreatus* lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas MnP *Omphalina* sp. (Gambar 6).



Gambar 5. Aktivitas MnP *Omphalina* sp. dan *P. ostreatus* yang tumbuh pada medium bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah inkubasi tiga bulan, yang diekstraksi pada berbagai pH. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi.

Figure 5. MnP activity of *Omphalina* sp. and *P. ostreatus* grown for three months in bagasse (left) and EFB (right), extracted in selected pH. The vertical bar showed standard deviation.



Gambar 6. Pengaruh penambahan dedak dan CuSO_4 atau kombinasi keduanya terhadap aktivitas MnP *Omphalina sp.* dan *P. ostreatus* pada bagas tebu (kiri) dan TKKS (kanan) setelah tiga bulan masa inkubasi yang diuji pada pH 5. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi. Bar dengan huruf sama menunjukkan tidak beda nyata menurut uji Duncan ($P < 0,05$).

Figure 6. Effect of addition of rice bran and CuSO_4 or both on MniP activity of *Omphalina sp.* and *P. ostreatus* in bagasse (left) and EFB (right) incubated for three months assessed on pH 5. The vertical bar showed standard deviation. Bar with the same letter showed insignificantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

Kesimpulan

Pertumbuhan miselium FPP tidak berkorelasi dengan aktivitas enzim ligninolitik. Pemberian suplemen berupa Cu^{2+} dengan atau tanpa dedak menyebabkan pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan dengan kontrol, namun pemberian suplemen ini meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik lakase dan LiP dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas optimum enzim ligninolitik yang diekstrak dari bagas tebu dan TKKS ialah pada pH 5, baik yang berasal dari *Omphalina sp.* maupun *P. ostreatus*. *Omphalina sp.* menghasilkan aktivitas lakase yang lebih tinggi daripada *P. ostreatus* pada bagas tebu dan TKKS tanpa penambahan suplemen. Sedangkan *P. ostreatus* meng-

hasilkan aktivitas lakase yang lebih tinggi daripada *Omphalina sp.* pada medium dengan penambahan dedak dan CuSO_4 baik pada bagas tebu maupun TKKS. Penambahan suplemen berupa dedak, Cu^{2+} atau kombinasi keduanya tidak berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas MnP *Omphalina sp.* dan *P. ostreatus*.

Daftar Pustaka

- Baldrian, P., C. Wiesche, J. Gabriel, F. Nerud, & F. Zadrazil (2000). Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2471-2478.

- Bulter, T., M. Alcalde, V. Sieber, P. Meinhold. (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 987-995.
- Cavallazzi, J.R.P., M.G.A. Oliveira., M.C.M. Kasuya (2004). Laccase Production by *Lepista sordida*. *Brazilian J. Microbiol.*, **35**, 261-263.
- Cohen, R., O. Yarden & Y. Hadar (2002). Lignocellulose affects Mn²⁺ regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3154-3158.
- Coyne, M. (1999). *Soil Microbiology: An Exploratory Approach*. USA, Delmar Publisher, 15p.
- Collins, P.J., A.D.W. Dobson & J.A. Field (1998). Reduction of the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1749-1755.
- Darah, I. & C.O. Ibrahim (1998). Decolourisation of waste water from local textile mills by cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Ann. Bogoriens*, **5**, 25-30.
- Eggert, C., U. Temp & K.E. Eriksson (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1151-1158.
- Hatakka, A. (1994). Lignin modifying enzyme from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol.Rev.*, **13**, 125-135.
- Have, R., S. Hartmans, P.J.M. Teunissen & J.A. Field (1998). Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *FEBS Letters*, **422**, 391-394.
- Ikasari, L. & D.A. Mitchell (1994). Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 171-175.
- Jeffries, T.W. & L. Viikari (1996). *Enzymes for Pulp and Paper Processing*. Washington American Chemical Society, 326p.
- Jimenez-Tobon, G.A., M. Penninck & R. Lejeune (1997). The relationship between pellet size and production of Mn (II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 537-542.
- Kapich A.N., Steffen K., Hofrichter M. & Hatakka A. (2005). A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. *J. Microbiol. Methods*, **61**, 261-271.
- Levin, I., F. Forchiassin & A.M. Ramos (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, **94**, 377-383.
- Maeda Y., S. Kajiwara & K. Ohtaguchi (2001). Manganese peroxidase gene of the perennial mushroom *Elfvigia applanata*: cloning and evaluation of its relationship with lignin degradation. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 103-109.
- Matsubara M., J. Suzuki, T. Deguchi, M. Miura & Y. Kitaoka (1996). Characterization of manganese peroxidase from the hyperlignolytic fungus IZU-154. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4066-4073.
- Muñoz, C., F. Guillén, A.T. Martínez & Martínez (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiol.*, **34**, 1-5.
- Palmieri, G. P. Giardina, C. Bianco, A. Sealoni, A. Capasso & G. Sannia (1997). A novel white laccase from

- Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.*, **272**(50), 31301-31307.
- Palmieri, G. P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella & G. Sannia (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 920-924.
- Perez J & Jeffries TN. (1992). Mineralization of ¹⁴CO₂ ringlabeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not manganese or laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1806-1812.
- Perez J., J. Martinez & T. de la Rubia (1996). Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4263-4267.
- Pickard M A, H Vandertol, R Roman & R vazquez-Duhalt. (1999). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Microbiol.*, **45**, 627-631.
- Rolle, R.S. (1998). Enzyme application for agro-processing in developing countries: An inventory of current and potential applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 614-619.
- Sani, R.K. & U.C. Banerjee (1999). Decolorization of acid green 20, a textile dye, by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a low cost medium. *Adv. in Environ. Res.*, **2**, 485-490.
- Sarkar S., A.T. Martinez & A.J. Martinez (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys Acta.*, **1339**, 23-30.
- Sudaryati, Y & D. D. Sastraatmadja (1993). Seleksi strain *Aspergillus* spp. untuk menghasilkan enzim selulase dalam media dedak. *J. Mikrobiol. Indonesia*, **2**(2), 30-32.
- Suharyanto & Siswanto (2003). Produksi enzim ligninolitik dari fungi pelapuk putih untuk biodegradasi dan biotransformasi tandan kosong kelapa sawit. *Laporan Akhir Tahun 2003*, APBN/ADB 1526-1NO. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, 65 p.
- Thurston. C.F. (1994). The structure and function of fungal laccase. *Microbiol.*, **140**, 19-26.
- Tien, M. & T.K. Kirk (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *In Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2280-2284.
- Tien, M., and T.K. Kirk (1998). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.*, **161**, 238-248.
- Witjaksana, D. 2006. Towards sustainable palm oil development in Indonesia. *In Proc. Int. Oil Palm Conf.* 19-23 June, Bali. Indonesia. p. 1-12