

## Optimasi produksi enzim ligninolitik dari medium limbah produksi *Pleurotus ostreatus* menggunakan metode respons permukaan

*Optimization of ligninolytic enzyme production from Pleurotus ostreatus medium waste production using surface response methodology*

Urip PERWITASARI<sup>1\*)</sup>, Firda DIMAWARNITA<sup>2)</sup> & Shanti RATNAKOMALA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Nanggewer Mekar, Cibinong, Bogor 16912, Indonesia

<sup>2)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128, Indonesia

Diterima tgl 25 Oktober 2017 / disetujui tgl 2 Februari 2018

### Abstract

*White rot fungi Pleurotus ostreatus has long been produced on a large scale for human consumption. This fungi is known to produce ligninolytic enzymes. The aim of this study was to utilize waste fungal medium from empty fruit bunch oil palm (EFBOP) for production of ligninolytic enzymes. Determination of the optimal conditions in this study used the design of statistical experiments Response Surface Method (RSM) with Design Expert® 10 software. Variables used in this research were EFBOP composition (0, 25, 50, 75, 100 %), part baglog (top, middle, bottom), and time of incubation (1, 2, and 3 month). The highest lignin peroxidase activity was 1.72 U/mL obtained on baglog composition with 50% EFBOP the top part of baglog after 2 months incubation. The highest manganese peroxidase activity was 23.00 U/mL obtained on baglog composition with 100% EFBOP at the bottom of baglog after 3 months incubation and the highest laccase activity was 0.14 U/mL on baglog composition with 100% EFBOP the top part of baglog after 1 month.*

[Keywords: *Pleurotus ostreatus*, ligninolytic enzyme, fungal medium waste, response surface methodology].

### Abstrak

Jamur pelapuk putih *Pleurotus ostreatus* telah lama diproduksi skala besar untuk dikonsumsi. Jamur ini diketahui mampu menghasilkan enzim ligninolitik. Selama ini medium limbah produksi *P. ostreatus* belum dimanfaatkan. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan medium limbah produksi jamur tiram yang berbahan dasar tandan kosong kelapa sawit (TKKS) untuk produksi enzim ligninolitik. Penentuan kondisi optimal pada penelitian ini menggunakan desain eksperimen statistika Metode Respons Permukaan (*Response Surface Method* (RSM)) dengan *software Design Expert® 10*. Variabel yang digunakan dalam riset ini adalah konsentrasi TKKS (0, 25, 50, 75, 100 %), bagian baglog (atas, tengah, dan bawah), dan

waktu inkubasi (1, 2, dan 3 bulan). Aktivitas lignin peroksidase tertinggi diperoleh pada medium dengan komposisi 50% medium pada bagian atas baglog setelah 2 bulan inkubasi dengan aktivitas sebesar 1,72 U/mL. Aktivitas mangan peroksidase tertinggi diperoleh pada medium komposisi 100% TKKS pada bagian bawah baglog setelah 3 bulan inkubasi sebesar 23,00 U/mL, dan lakase tertinggi pada medium komposisi 100% TKKS pada bagian atas baglog setelah 1 bulan inkubasi, yaitu sebesar 0,14 U/mL.

[Kata kunci: *Pleurotus ostreatus*, enzim ligninolitik, limbah media jamur, Metode Respons Permukaan]

### Pendahuluan

*Pleurotus ostreatus* atau lebih dikenal dengan nama jamur tiram merupakan jamur golongan *Basidiomycetes* yang memiliki tubuh buah berwarna putih dan berbentuk seperti cakram. Jamur ini tumbuh pada limbah lignoselulosa seperti jerami padi, sisa gergaji kayu, kulit coklat, ampas tebu, pulp kopi, pulp kertas dan batang-batang kapas (Sánchez, 2010). Lignoselulosa adalah bahan organik yang paling melimpah di bumi dan sebagian besar terdapat pada limbah agroindustri. Pemanfaatan limbah lignoselulosa untuk produksi enzim ligninolitik telah dipelajari secara ekstensif. Penelitian tentang produksi lakase, mangan peroksidase (MnP), dan lignin peroksidase (LiP) dari berbagai residu agroindustri telah banyak dilaporkan. Sebagian besar produksi enzim ligninolitik dari residu agroindustri berkaitan dengan jamur (Gassara *et al.*, 2010).

Konversi biomassa lignoselulosa menjadi bahan berguna dan bernilai ekonomi memerlukan perlakuan awal (*pre-treatment*) (Kumar *et al.*, 2009). Salah satu perlakuan awal adalah delignifikasi. Tujuan delignifikasi yang dilakukan oleh berbagai industri adalah untuk mendapat selulosa yang tidak terlapisi oleh lignin. Biodegradasi lignin sangat penting untuk diaplikasikan di industri pulp dan kertas. Hal ini merupakan aplikasi bioteknologi proses di pabrik

\*) Penulis korespondensi: [uripperwitasari@gmail.com](mailto:uripperwitasari@gmail.com)

pulp dan kertas. Enzim ligninolitik dapat menjawab tantangan industri pulp dan kertas dalam kegunaannya untuk biopulping (Widiastuti *et al.*, 2008). Selain itu enzim ligninolitik juga dapat dijadikan bahan farmaseutikal sebagai pemutih wajah dengan mekanisme yang baru (Falade *et al.*, 2017). Enzim pelarut lignin ekstraselular utama adalah lakase, MnP, dan LiP. Lakase adalah oksidase polifenol yang mengandung tembaga. Lakase mengkatalisis pelepasan empat elektron oksigen ke air dan ini biasanya disertai dengan oksidasi substrat fenolik menjadi fenoksi radikal. Berat molekul lakase antara 60-80 kDa dan titik isoelektriknya antara 3 dan 4. Mangan peroksidase adalah enzim yang mengoksidasi  $Mn^{1+}$  menjadi  $Mn^{3+}$  menggunakan  $H_2O_2$  sebagai oksidator. Bobot molekul MnP adalah 40-50 kDa dan titik isoelektriknya antara 3 sampai 4. Lignin peroksidase juga dapat mengoksidasi senyawa aromatik non fenolik.

Gen penyandi enzim ligninolitik dapat terekspresi pada media dengan kondisi sedikit nitrogen dan karbon (Sindhu *et al.*, 2016). Pengaturan ekspresi gen yang mengkode enzim ligninolitik merupakan proses yang sangat kompleks dengan berbagai faktor salah satunya adalah sumber nitrogen (Janusz *et al.*, 2013).

Penelitian tentang ekstraksi enzim ligninolitik dari fermentasi padat pernah dilakukan oleh Szaboet *al.* (2015) ekstraksi enzim dilakukan dengan proses sonifikasi media dalam buffer. Ergun *et al.* (2017) menunjukkan bahwa produksi enzim MnP maupun lakase optimum setelah 17 hari inkubasi. Widiastuti *et al.* (2008) meneliti aktivitas enzim ligninolitik selama pertumbuhan miselium dan munculnya tubuh buah *Pleurotus ostreatus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim lakase tinggi adalah pada minggu pertama inkubasi sedangkan MnP dan LiP tinggi adalah setelah minggu kedua dan keempat inkubasi. Suharyanto *et al.* (2012) melaporkan kemampuan enzim ligninolitik dari *Omphalina* sp. dalam menjernihkan limbah cair pabrik kosmetik setelah delapan hari. Kuswitasari *et al.* (2015) memproduksi enzim ligninolitik dari *Gliomastix* sp. dengan media limbah agroindustri. Selama ini produksi jamur tiram dilakukan menggunakan sisa serbuk gergaji sebagai sumber karbon, padahal limbah agroindustri yang menumpuk pada saat ini adalah limbah tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk memperoleh titik optimum produksi enzim ligninolitik dari medium limbah produksi jamur tiram yang ditanam pada baglog dengan substrat TKKS.

## Bahan dan Metode

### Isolat dan baglog

Isolat jamur *P. ostreatus* yang digunakan berasal dari CV Asa Agro Corporation. Isolat ini

ditumbuhkan pada baglog dengan variasi konsentrasi TKKS dan serbuk gergaji (Tabel 1). Selain TKKS dan serbuk gergaji, media tumbuh jamur juga ditambahkan dedak 44,64 g,  $CaCO_3$  13,39 g, dan TSP 4,47 g. Setelah baglog ditumbuhi jamur setiap bulan ke 1, ke 2, dan ke 3 media tersebut dibagi menjadi tiga bagian (bagian atas, tengah dan bawah). Kemudian diekstraksi untuk diuji aktivitas enzim ligninolitiknya.

### Analisis aktivitas enzim

Aktivitas enzim ligninolitik diukur per bulan pada baglog jamur. Sebanyak 2,5 g substrat dihaluskan dengan penambahan 20 mL buffer fosfat. Kemudian disentrifugasi 9000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan (filtrat) yang diperoleh digunakan sebagai sumber enzim. Penentuan aktivitas enzim untuk masing-masing jenis enzim mengikuti metode sebagai berikut:

#### a. Aktivitas lakase (Buswell *et al.*, 1995)

Sebanyak 0,4 mL filtrat enzim ditambah bufer asetat pH 5 0,05 M sebanyak 0,5 mL dan 0,1 mL ABTS 1 mM. Selanjutnya larutan divorteks dan pengukuran dibaca pada panjang gelombang 420 nm. Pembacaan dilakukan pada menit ke-0 dan menit 30.

#### b. Aktivitas mangan peroksidase (Kofujita *et al.*, 1992)

Sebanyak 0,1 mL bufer Na-laktat 50 mM pH 5 ditambahkan dengan 0,1 mL guaiacol 4 mM; 0,2 mL  $MnSO_4$  1mM; 0,1 mL  $H_2O_2$  1 mM dan aquades 0,3 mL, kemudian ditambahkan 0,2 mL filtrat enzim. Larutan kemudian divorteks dan dibaca pada panjang gelombang 465 nm, pada menit ke-0 dan 30.

#### c. Aktivitas lignin peroksidase (Tien & Kirk, 1984)

Veratril alkohol 8 mM sebanyak 0,1 mL ditambahkan dengan 0,2 mL bufer asetat 0,05 M pH 5, akuades 0,4 mL,  $H_2O_2$  1 mM sebanyak 0,1 mL dan 0,2 mL filtrat enzim divorteks dan dilakukan pembacaan pada menit ke-0 dan 30 pada panjang gelombang 310 nm.

Perhitungan akitivitas enzim =

$$\frac{(At - Ao) \times V_{total}(ml) \times 10^6}{\epsilon_{maks} \times d \times Vol \text{ enzim}(ml) \times t}$$

Ao = absorbansi awal (menit ke-0)  
At = absorbansi akhir (menit ke-30)  
d = ketebalan kuvet  
 $\epsilon_{maks}$  = absorpsivitas molar, untuk masing-masing substrat pada uji enzim:  
ABTS:  $36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Guaiacol:  $12100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Veratril alcohol :  $9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### Desain penelitian

Penelitian dirancang menggunakan tiga buah variabel yaitu konsentrasi TKKS, bagian baglog,

serta waktu sampling baglog (Tabel 2). Penentuan kondisi optimal pada penelitian ini menggunakan desain eksperimen statistika Metode Respon Permukaan (*Response Surface Method* (RSM)) dengan *software Design Expert® 10*. Hasil pengolahan software diperoleh 20 percobaan yang merupakan kombinasi konsentrasi medium limbah (A), bagian baglog (B), serta waktu inkubasi (C) (Tabel 3).

### Hasil dan Pembahasan

Media tumbuh dari limbah produksi jamur tiram diekstraksi untuk mendapatkan enzim ligninolitik. Komposisi baglog diberikan variasi perbandingan substrat antara TKKS dengan serbuk gergaji (Tabel 1). Ekstraksi enzim dilakukan di 3 bagian baglog (bawah, tengah, atas) serta variasi waktu pemanenan dari media limbah produksi jamur tiram (1, 2, dan 3 bulan). Hasil analisis aktivitas enzim ligninolitik, hasil eksperimen serta prediksi tersaji pada Tabel 4. Nilai ANOVA p-value dari masing-masing variabel untuk model persamaan kuadratik dalam produksi enzim ligninolitik tersaji pada Tabel 5.

### Lignin peroksidase

Melalui aplikasi RSM ditunjukkan bahwa produksi enzim lignin peroksidase dari medium limbah baglog dengan tiga buah variabel konsentrasi TKKS (A), bagian baglog (B), dan waktu inkubasi (C) dapat diprediksi dengan persamaan di bawah ini:

$$\text{Lignin peroksidase (LiP)} = 0,670 + 0,054 (A) + 0,180 (B) + 0,007 (C) - 0,044 (AB) + 0,004 (AC) - 0,019 (BC) - 0,582 (A^2) + 0,540 (B^2) - 0,607 (C^2)$$

Hasil uji aktivitas enzim lignin peroksidase serta prediksinya dapat dilihat pada Tabel 4. Lignin peroksidase optimum didapat pada komposisi baglog dengan 50 % medium limbah produksi *P. ostreatus* di bagian atas baglog setelah 2 bulan inkubasi. Kondisi optimum tersebut sama baik dari hasil pengamatan maupun dari prediksi. Aktivitas lignin peroksidase hasil pengamatan sebesar  $1,72 \pm 0,0$  U/mL lebih tinggi dari hasil prediksi yang sebesar 1,38 U/mL. Hasil pengamatan ANOVA untuk produksi lignin peroksidase menunjukkan bahwa model riset ini signifikan dengan nilai P sebesar 0,017 dan nilai  $R^2$  sebesar 0,790.

Tabel 1. Perbandingan TKKS dan serbuk gergaji yang dilakukan dalam percobaan

Table 1. Comparison of TKKS and sawdust conducted in the experiment

| Komposisi/composition | TKKS/EFBOP (g) | Serbuk gergaji/ Sawdust (g) |
|-----------------------|----------------|-----------------------------|
| B1                    | 0              | 937,5                       |
| B2                    | 234,375        | 703,125                     |
| B3                    | 468,75         | 468,75                      |
| B4                    | 703,125        | 234,375                     |
| B5                    | 937,5          | 0                           |

Table 2. Variabel optimasi produksi enzim ligninolitik dari limbah baglog *P. ostreatus*

Table 2. Variable optimization of ligninolytic enzyme production from exbaglog *P. ostreatus*

| Variabel/<br>Variable                                 | Kode/<br>Code | Level/ Level |                     |                       |                    |     |
|-------------------------------------------------------|---------------|--------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----|
|                                                       |               | 2            | -1                  | 0                     | 1                  | 2   |
| Konsentrasi TKKS (%)/<br>Concentration of EFBOP (%)   | A             | 0            | 25                  | 50                    | 75                 | 100 |
| Bagian baglog/<br>Part of baglog                      | B             | -            | Bawah/<br>under (1) | Tengah/<br>middle (2) | Atas/<br>above (3) | -   |
| Waktu inkubasi (bulan)/<br>Time of incubation (month) | C             | -            | 1                   | 2                     | 3                  | -   |

Keterangan: A= Konsentrasi TKKS (%), B= Bagian baglog, C= Waktu inkubasi (bulan)

Notes: A= Concentration of EFBOP(%), B= Part of baglog, C= Time of incubation (month)

Tabel 3. Rancangan percobaan hasil Design Expert® 10

Table 3. Experimental design from Design Expert® 10

| No | 1 | 2  | 3   | 4  | 5  | 6  | 7  | 8   | 9   | 10  | 11 | 12 | 13 | 14  | 15 | 16 | 17  | 18 | 19 | 20 |
|----|---|----|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|----|
| A  | 0 | 50 | 100 | 50 | 25 | 50 | 50 | 100 | 100 | 100 | 0  | 50 | 0  | 100 | 0  | 75 | 100 | 0  | 0  | 50 |
| B  | 3 | 2  | 2   | 3  | 1  | 3  | 2  | 2   | 1   | 3   | 1  | 2  | 2  | 3   | 2  | 2  | 1   | 1  | 3  | 1  |
| C  | 3 | 3  | 2   | 2  | 2  | 2  | 3  | 2   | 3   | 3   | 1  | 3  | 2  | 1   | 2  | 1  | 1   | 3  | 1  | 1  |

Keterangan: A= Konsentrasi TKKS (%), B= Bagian baglog, C= Waktu inkubasi (bulan)

Notes: A= Concentration of TKKS (%), B= Part of baglog, C= Time of incubation (month)

Analisis respon permukaan konsentrasi medium limbah *P. ostreatus*, bagian baglog, serta waktu inkubasi terhadap produksi lignin peroksidase ditunjukkan pada Gambar 1. Semakin tinggi komposisi konsentrasi medium limbah tidak linier dengan aktivitas lignin peroksidase yang dihasilkan. Waktu inkubasi baglog yang semakin lama juga tidak meningkatkan aktivitas lignin peroksidase. Bagian baglog terbaik untuk produksi enzim lignin peroksidase terletak di atas baglog. Hasil ANOVA memperlihatkan masing-masing variabel maupun interaksi antar variabel mempengaruhi produksi enzim lignin peroksidase. Namun kuadrat dari masing-masing variabel tidak mempengaruhi produksi lignin peroksidase (Tabel 5).

Aktivitas tertinggi lignin peroksidase diperoleh pada bagian baglog paling atas (Tabel 4). Hal tersebut disebabkan bagian atas baglog adalah tempat inokulasi jamur. Lignin peroksidase diproduksi oleh *P. ostreatus* untuk memutus ikatan C-C atau C-O-C pada rantai non-fenolik aromatik dari substrat dengan cepat (Wong, 2009; Pollegioni *et al.*, 2014). Substrat yang telah terdegradasi akan lebih mudah dimanfaatkan oleh *P. ostreatus* untuk pertumbuhannya. Sehingga di bagian atas baglog miselium *P. ostreatus* mulai tumbuh baru merambat ke bawah. Pertumbuhan miselium berbentuk seperti kapas putih yang dimulai dari tempat inokulasi bibit jamur (bagian atas baglog) kemudian menjalar ke bawah baglog

Tabel 4. Aktivitas enzim ligninolitik  
Table 4. Activity of enzyme ligninolytic

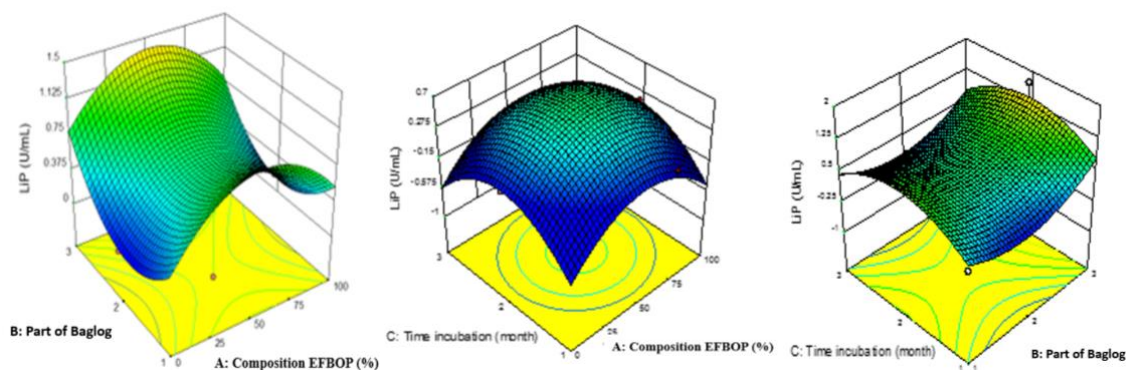
| No | A   | B | C | LiP (U/mL)        |                         | MnP (U/mL)        |                         | Lakase (U/mL)     |                         |
|----|-----|---|---|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
|    |     |   |   | actual/<br>actual | prediksi/<br>prediction | actual/<br>actual | prediksi/<br>prediction | actual/<br>actual | prediksi/<br>prediction |
| 1  | 0   | 3 | 3 | 0,036             | 0,164                   | 0,551             | 0,817                   | 0,003             | -0,014                  |
| 2  | 50  | 2 | 3 | 0,036             | 0,071                   | 10,193            | 9,256                   | 0,006             | 0,002                   |
| 3  | 100 | 2 | 2 | 0,161             | 0,143                   | 3,719             | 4,927                   | 0,052             | 0,041                   |
| 4  | 50  | 3 | 2 | 1,72              | 1,382                   | 3,306             | 4,707                   | 0,018             | 0,037                   |
| 5  | 25  | 1 | 2 | 0,143             | 0,825                   | 6,887             | 4,651                   | 0,018             | 0,027                   |
| 6  | 50  | 3 | 2 | 1,72              | 1,382                   | 3,306             | 4,708                   | 0,019             | 0,037                   |
| 7  | 50  | 2 | 3 | 0,036             | 0,071                   | 10,193            | 9,255                   | 0,006             | 0,002                   |
| 8  | 100 | 2 | 2 | 0,161             | 0,143                   | 3,719             | 4,927                   | 0,052             | 0,041                   |
| 9  | 100 | 1 | 3 | 0,072             | -0,038                  | 23,002            | 22,899                  | 0                 | -0,008                  |
| 10 | 100 | 3 | 3 | 0,036             | 0,195                   | 10,193            | 10,073                  | 0,009             | 0,023                   |
| 11 | 0   | 1 | 1 | 0,036             | -0,29                   | 2,617             | 3,721                   | 0,006             | 0,025                   |
| 12 | 50  | 2 | 3 | 0,036             | 0,071                   | 10,192            | 9,255                   | 0,003             | 0,002                   |
| 13 | 0   | 2 | 2 | 0,018             | 0,033                   | 1,928             | 0,436                   | 0,025             | 0,013                   |
| 14 | 100 | 3 | 1 | 0                 | 0,209                   | 7,3               | 4,245                   | 0,145             | 0,105                   |
| 15 | 0   | 2 | 2 | 0,018             | 0,033                   | 1,928             | 0,4365                  | 0,024             | 0,013                   |
| 16 | 75  | 2 | 1 | 0,036             | -0,064                  | 0,413             | 3,794                   | 0,003             | 0,057                   |
| 17 | 100 | 1 | 1 | 0                 | -0,1                    | 4,132             | 3,446                   | 0,006             | 0,044                   |
| 18 | 0   | 1 | 3 | 0,036             | -0,247                  | 3,444             | 6,213                   | 0,003             | 0,023                   |
| 19 | 0   | 3 | 1 | 0,018             | 0,198                   | 11,845            | 11,95                   | 0,012             | 0,017                   |
| 20 | 50  | 1 | 1 | 0,251             | 0,387                   | 5,647             | 4,798                   | 0,111             | 0,035                   |

Keterangan: A= Konsentrasi TKKS (%), B= Bagian baglog, C= Waktu inkubasi (bulan)

Notes: A= Concentration of EFBOP (%), B= Part of baglog, C= Time of incubation (month)

Tabel 5. ANOVA p-value untuk model persamaan kuadrat dalam produksi enzim ligninolitik  
Table 5. ANOVA p-value for model quadratic equations in the production of ligninolytic enzymes

| Enzyme | Model  | A      | B      | C      | AB     | AC     | BC     | A <sup>2</sup> | B <sup>2</sup> | C <sup>2</sup> |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|----------------|
| LiP    | 0,0178 | 0,5665 | 0,0896 | 0,9411 | 0,7015 | 0,9661 | 0,8650 | 0,0047         | 0,0080         | 0,0037         |
| MnP    | 0,0005 | 0,0055 | 0,1121 | 0,0094 | 0,0390 | 0,0003 | 0,0012 | 0,2974         | 0,1067         | 0,0146         |
| Lakase | 0,4824 | 0,2261 | 0,6017 | 0,0870 | 0,2253 | 0,3595 | 0,5791 | 0,9873         | 0,8378         | 0,8335         |



Gambar 1. Respon produksi lignin peroksidase  
Figure 1. Respons production of lignin peroxidase

dimana nutrisi jamur banyak tersedia (Gern *et al.*, 2008).

Respon lignin peroksidase terhadap waktu inkubasi terlihat naik pada bulan kedua inkubasi kemudian turun kembali di bulan ketiga (Gambar 1). Hal tersebut dikarenakan pada bulan pertama *P. ostreatus* baru mulai tumbuh dan pada bulan ke tiga nutrisinya sudah habis.

Hasil ANOVA untuk produksi lignin peroksidase menunjukkan nilai *Fisher's F-test* dari model ini sebesar 4,18, dengan nilai *p* untuk model ini cukup rendah yaitu sebesar 0,017. Angka ini menunjukkan bahwa model ini signifikan untuk menentukan titik optimum dalam memproduksi lignin peroksidase. Pada Tabel 5 Nilai *p* untuk masing-masing variabel konsentrasi TKKS (A), bagian baglog (B), serta waktu inkubasi (C) yang berada di atas 0,017 mengindikasikan setiap parameter tersebut mempengaruhi produksi lignin peroksidase secara signifikan. Regresi kuadrat dari analisis ini sebesar 0,79, artinya 79% produksi lignin peroksidase dapat dijelaskan dengan model riset ini.

#### Mangan peroksidase

Aplikasi RSM menunjukan produksi enzim mangan peroksidase dari medium limbah produksi *P. ostreatus* dengan tiga buah variabel konsentrasi medium (A), bagian baglog (B), dan waktu inkubasi (C) dapat diprediksi melalui persamaan di bawah ini:

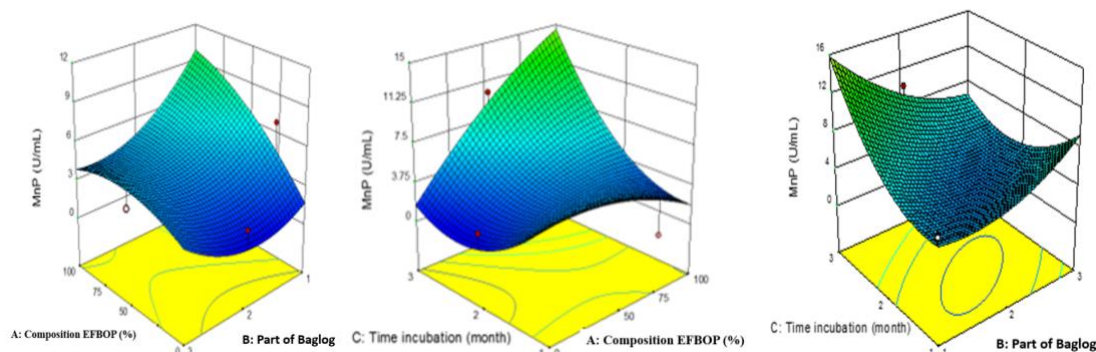
$$\text{Mangan peroxidase (MnP)} = 3,896 + 2,245 (A) - 1,149 (B) + 2,080 (C) - 1,858 (AB) + 4,240 (AC) - 3,406 (BC) - 1,214 (A^2) + 1,960 (B^2) + 3,278 (C^2)$$

Hasil uji aktivitas enzim mangan peroksidase serta prediksinya dapat dilihat pada Tabel 4. Mangan peroksidase optimum didapat pada komposisi baglog dengan 100% medium limbah di bagian bawah baglog setelah 3 bulan inkubasi. Kondisi optimum tersebut sama baik dari hasil pengamatan maupun dari prediksi. Aktivitas mangan peroksi-dase hasil pengamatan sebesar

$23,00 \pm 0,00$  U/mL lebih tinggi dari hasil prediksi yang sebesar 22,89 U/mL. Hasil pengamatan ANOVA untuk produksi mangan peroksidase menunjukkan bahwa model riset ini signifikan dengan nilai *P* sebesar 0,000452 dan nilai *R*<sup>2</sup> sebesar 0,9068.

Analisis respon permukaan konsentrasi medium limbah, bagian baglog, serta waktu inkubasi terhadap produksi mangan peroksidase ditunjukkan pada Gambar 2. Semakin tinggi konsentrasi medium limbah maka aktivitas mangan peroksidase yang dihasilkan semakin tinggi. Waktu inkubasi baglog yang semakin lama dapat meningkatkan aktivitas mangan peroksidase. Hasil ANOVA memperlihatkan masing-masing variabel, kuadratik dari masing-masing variabel maupun interaksi antar variabel seluruhnya mempengaruhi produksi enzim mangan peroksidase (Tabel 5).

Pada penelitian ini aktivitas MnP meningkat pada bulan ke tiga (Gambar 2). Penelitian yang dilakukan Lechner & Papinutti (2006) juga menunjukkan aktivitas MnP tertinggi setelah 90 hari inkubasi. Baglog dengan komposisi medium limbah 100% menghasilkan aktivitas MnP yang paling tinggi, hal ini menunjukkan bahwa TKKS sebagai mahan medium dapat dijadikan sebagai substrat pengganti selain serbuk gergaji untuk pertumbuhan *P. ostreatus*. Aktivitas enzim ligninolitik dipengaruhi pH, konsentrasi substrat, suhu, nitrogen, dan mineral seperti tembaga (Patel *et al.*, 2009, Kenkebashvili *et al.*, 2015). Montoya *et al.* (2015) menunjukan aktivitas MnP nilainya relatif stabil selama 50 hari inkubasi. Enzim mempunyai aktivitas yang optimum pada satu harga pH tertentu yang disebut juga pH optimum. Jika enzim berada pada pH yang lebih kecil dari pH optimum, maka aktivitas enzim mengkatalitik reaksi belum optimal. Sebaliknya pada pH di atas pH optimum, enzim akan terdenaturasi karena rantai polipeptida akan terputus sehingga struktur protein akan membuka (Khouni *et al.*, 2011). Hal ini menyebabkan enzim tidak lagi mempunyai aktivitas katalitik.



Gambar 2. Respon produksi mangan peroksidase  
Figure 2. Responce production of mangan peroxidase

Peran enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi sangat bergantung pada jenis substrat yang spesifik. Kontak antara substrat dengan enzim terjadi pada sisi aktif enzim. Kontak ini hanya mungkin terjadi apabila sisi aktif enzim mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Penambahan substrat akan semakin meningkatkan kontak yang terjadi pada sisi aktif enzim sampai pada konsentrasi yang optimum.

Hasil ANOVA untuk produksi mangan peroksidase menunjukkan nilai *Fisher's F-test* dari model ini sebesar 10,82 dengan nilai *p* untuk model ini cukup rendah yaitu sebesar 0,0005, angka ini menunjukkan bahwa model ini signifikan untuk menentukan titik optimum dalam memproduksi mangan peroksidase. Pada Tabel 5 Nilai *p* untuk masing-masing variabel konsentrasi TKKS (A), bagian baglog (B), serta waktu inkubasi (C) yang berada di atas 0,0005 mengindikasikan setiap parameter tersebut mempengaruhi produksi mangan peroksidase secara signifikan. Regresi kuadrat dari analisis ini sebesar 0,90, artinya 90% produksi mangan peroksidase dapat dijelaskan dengan model riset ini.

#### Lakase

Aplikasi RSM menunjukan produksi enzim lakase dari medium limbah produksi *P. ostreatus* dengan tiga buah variabel konsentrasi medium (A), bagian baglog (B), dan waktu inkubasi (C) dapat diprediksi melalui persamaan di bawah ini:

$$\text{Lakase} = 0,027 + 0,014 (A) + 0,006 (B) - 0,020 (C) + 0,017 (AB) - 0,012 (AC) - 0,007 (BC) - 0,000 (A^2) + 0,003 (B^2) - 0,004 (C^2)$$

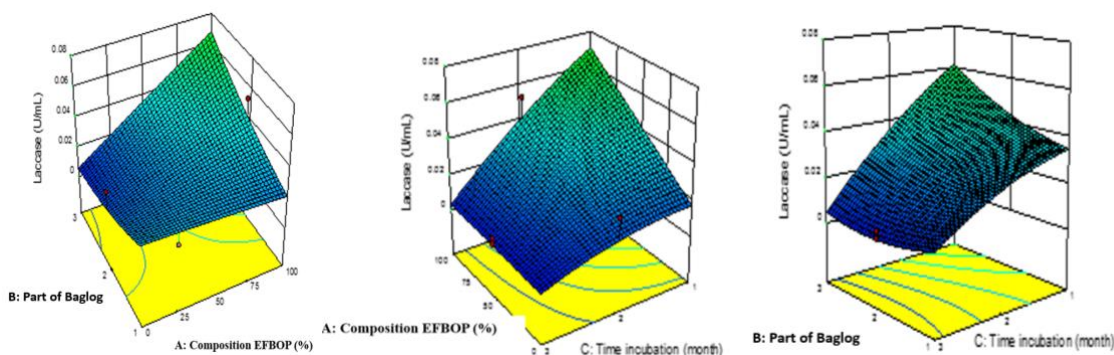
Hasil uji aktivitas enzim lakase serta prediksinya dapat dilihat pada Tabel 4. Lakase optimum didapat pada 100 % medium limbah di bagian atas baglog setelah 1 bulan inkubasi. Kondisi optimum tersebut sama baik dari hasil pengamatan maupun dari prediksi. Aktivitas lakase hasil pengamatan sebesar  $0,14 \pm 1,27 \times 10^{-6}$  U/mL lebih tinggi dari hasil prediksi yang sebesar

0,10 U/mL. Hasil pengamatan ANOVA untuk produksi lakase menunjukkan bahwa model riset ini tidak signifikan dengan nilai *P* sebesar 0,48 dan nilai  $R^2$  yang sangat kecil hanya sebesar 0,48.

Analisis respon permukaan konsentrasi medium limbah, bagian baglog, serta waktu inkubasi terhadap produksi lakase ditunjukkan pada Gambar 3. Semakin tinggi konsentrasi medium limbah maka aktivitas lakase yang dihasilkan semakin tinggi. Waktu inkubasi baglog yang semakin lama dapat meningkatkan aktivitas lakase. Hasil ANOVA memperlihatkan masing-masing variabel, kuadrat dari masing-masing variabel maupun interaksi antar variabel seluruhnya mempengaruhi produksi enzim lakase (Tabel 5).

Aktivitas lakase pada baglog bagian atas tinggi pada saat awal inkubasi, pola ini sama dengan Lechner & Papinutti (2006). Aktivitas lakase yang dihasilkan dalam riset ini masih kurang tinggi, hal tersebut diduga disebabkan karena variasi dari bahan aromatik suatu bahan dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim ligninolitik yang dihasilkan (Haritash & Kaushik, 2009).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mikiashvili et al. (2004), menggunakan kulit jeruk mandarin sebagai substratnya, menunjukkan bahwa *P. ostreatus* adalah jamur penghasil enzim lakase dan MnP. Dengan substrat kulit jeruk tersebut menghasilkan aktivitas enzim lakase tertinggi sebesar 62 U/mL. Sedangkan menggunakan substrat CMC aktivitas enzim lakase yang dihasilkan sebesar 18 U/mL, menggunakan sodium glukonat menghasilkan nilai aktivitas 9,3 U/mL. Tidak satupun dari karbohidrat murni yang digunakan sebagai substrat dapat menghasilkan enzim lakase melebihi substrat kulit jeruk mandarin. Karbohidrat murni yang memiliki partikel berupa selulosa kristal tidak dapat larut sempurna sehingga menjadi substrat yang buruk dalam memproduksi enzim. Sedangkan senyawa metabolis relatif mudah larut sempurna sehingga dapat menghasilkan aktivitas enzim yang relatif tinggi.



Gambar 3. Respon produksi lakase  
Figure 3. Responce production of laccase

Enzim lakase aktivitas tertinggi sebelum muncul tubuh buah *Agrocybe aegerita* (Isikhuemhen *et al.*, 2009). Stajic' *et al.* (2006) mengamati aktivitas lakase tertinggi pada substrat yang mengandung manitol, glukosa, dan natrium glukonat pada dua strain *P. ostreatus*. Aktivitas lakase tertinggi dihasilkan oleh *P. ostreatus* 98 yang ditanam pada medium dengan substrat polisakarida xilan. Selain itu, aktivitas lakase dapat ditingkatkan dengan cara co-cultur antara *Ganoderma lucidum* dan *Trametes versicolor* (Kuhar *et al.*, 2015)

Hasil ANOVA untuk produksi lakase menunjukkan nilai *Fisher's F-test* dari model ini sebesar 1,02 dengan nilai p untuk model ini cukup tinggi yaitu sebesar 0,48. Angka ini menunjukkan bahwa model ini tidak signifikan untuk menentukan titik optimum dalam memproduksi lakase. Pada Tabel 5 Nilai p untuk masing-masing variable konsentrasi medium limbah (A), bagian baglog (B), serta waktu inkubasi (C) yang berada di atas 0,48 mengindikasikan setiap parameter tersebut mempengaruhi produksi mangan peroksidase secara signifikan. Regresi kuadrat dari analisis ini sebesar 0,48, artinya hanya 48% produksi lakase dapat dijelaskan dengan model riset ini.

### Kesimpulan

Media produksi jamur tiram dengan substrat TKKS dapat dimanfaatkan untuk produksi enzim ligninolitik. Dari hasil ANOVA model riset ini dengan variabel konsentrasi media limbah, bagian baglog, dan waktu inkubasi secara signifikan mempengaruhi produksi lignin peroksidase dengan aktivitas tertinggi sebesar 1,72 U/mL yang diperoleh pada komposisi media limbah 50% media limbah di bagian atas baglog setelah 2 bulan inkubasi. Aktivitas mangan peroksidase juga secara signifikan dipengaruhi oleh ketiga variabel di atas, dengan aktivitas tertinggi pada komposisi 100% media limbah di bagian bawah baglog setelah 3 bulan inkubasi sebesar 23 U/mL. Sedangkan produksi lakase tidak secara signifikan dipengaruhi oleh ketiga variabel tersebut. Hasil

aktivitas lakase tertinggi sebesar 0,14 U/mL didapat pada komposisi 100% media limbah di bagian atas baglog setelah 1 bulan inkubasi

### Ucapan Terima Kasih

Kami ucapkan terima kasih kepada Dr.Yopi atas dukungan, arahan, atas kerja sama antara Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, sehingga riset yang didanai oleh Badan Pengelola Dana Perkebunan Kelapa Sawit (BPDPKS) tahun 2016 ini dapat berjalan dengan lancar.

### Daftar Pustaka

- Buswell JA , Yijin C & Shu-ting C (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganase on manganase peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett* 128 (1), 81-87.
- Ergun SO & RO Urek (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science* 15, 237-277.
- Falade AO, UU Nwodo, BC Iweriebor, E Green, LV Mabinya & AI Okoh (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open* 6(1), 1-14.
- GassaraF, Brar SK, Tyagi RD, Verma M & Surampalli RY (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal* 49(3), 388-394.
- Gern RMM, Wisbeck E, Rampinelli JR, Ninow JL & Furlan SA(2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology* 99(1), 76-82.
- Haritash AK & Kaushik CP (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169(1), 1-15.

- Hassan A, Salema AA, Ani FN & Bakar AA (2010). A review on oil palm empty fruit bunch fiber-reinforced polymer composite materials. *Polymer Composites* 31(12), 2079-2101.
- Isikhuemhen OS, Mikiashvili NA& Kelkar V (2009). Application of solid waste from anaerobic digestion of poultry litter in *Agrocybe aegerita* cultivation: mushroom production, lignocellulolytic enzymes activity and substrate utilization. *Biodegradation* 20 (3), 351-361.
- Janusz G, KH Kucharzyk, A Pawlik, M Staszczak& AJ Paszczynski (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol* 52, 1-12.
- KenkebashviliN, V Elisashvili & SP Wasser (2012). Effect of carbon, nitrogen sources, and copper concentration on the ligninolytic enzyme production by *Corioloopsis gallica*. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology* 1(2), 22-27.
- Khouni I, B Marrot, P Moulin & RB Amar (2011). Decolourization of reconstituted textile effluent by different process treatments: Enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. *Desalination* 268 (1-3), 27-37.
- Kofujita H, Matsushima A, Ohsaki T, Asada Y& Kuwahara M (1992). Production of phenol oxidizing enzyme in wood-meal medium by white rot fungi. *Mokuzai Gakkaishi* 38, 950–955.
- Kuhar F, V Castiglia & L Levin (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104, 238-243.
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ & Stroeve P (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research* 48(8), 3713-3729.
- Kuswitasari ND, M Shovitri& E Zulaika (2015). Ligninolytic enzymes produced by *Glomastix* sp. in an organic waste medium. *IPTEK the Journal for Technology and Science* 26 (1), 5-9.
- Lechner BE & VL Papinutti (2006). Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochemistry* 41,594–598
- Levin L, C Hermann & VL Papinutti (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 39, 207–214
- Mikiashvili N, Wasser S, Nevo E, Chichua D & Elisashvili V (2004). Lignocellulolytic enzyme activities of medicinally important basidiomycetes from different ecological niches. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 6, 63–71.
- Montoya S, OJ Sánchez & L Levin (2015). Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *Afr J Biotechnol* 14,1304–1317.
- Patel H, A Gupte & S Gupte (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *Bioresource* 4(1), 268-284.
- Plácido J & S Capareda (2015). Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing* 2(23), 1-14.
- Pollegioni L, Tonin F & Rosini E(2015).Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal* 282(7), 1190-1213.
- Roushdy MM, Abdel-Shakour EH & El-Agamy EI (2011). Biotechnological approach for lignin peroxidase (lip) production from agricultural wastes (rice husk) by *Cunninghamella elegans*. *Journal of American Science* 7, 6-13.
- Sánchez C (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology* 85(5), 1321-1337.
- Sindhu R, P Binod & A Pandey (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. *Bioresour Technol* 199, 76-82.
- Stajic´ M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser S, Nevo E & Vukojevic´ J (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 65–73.
- Suharyanto, I Kresnawaty, HT Prakoso & DD Eris. (2012). Ligninolytic activity of *Omphalina* sp.

- isolated from EFB and its application for decolorization of cosmetic waste. *Menara Perkebunan* 80 (2), 48-56.
- Szabo OE, E Csiszar, K Toth, G Szakacs & B Koczka (2015). Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation ultrason. *Sonochem* 22, 249-256.
- Tien M & TK Kirk (1984). Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. In: *Proc Natl Acad Sci ,USA*, 81, 2280-2284.
- Widiastuti H, Suharyanto, A Wulaningtyas & Sutamihardja (2008). Activity of ligninolytic enzymes during growth and fruiting body development of white rot fungi *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus*. *HAYATI Journal of Biosciences* 15(4), 140-144.
- Wong DW (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174-209.
- Yasmeen Q, M Asgher, MA Sheikh & H Nawaz (2013). Optimization of ligninolytic enzymes production through response surface methodology. *BioResources* 8(1), 944-968.