

# Imobilisasi Enzim Ligninolitik Kapang Tanah pada Bentonit

Dian Dwiyanita dan N. Dwianita Kuswytasari

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

*e-mail:* kuswytasari@bio.its.ac.id

**Abstrak**—Limbah cair industri kertas mengandung lignin dalam konsentrasi tinggi. Polimer organik tersebut sulit didegradasi di lingkungan. Lignin dapat didegradasi oleh enzim ligninolitik yang merupakan enzim pendegradasi lignin. Degradasi limbah cair kertas oleh enzim ligninolitik ini akan lebih efisien jika dilakukan imobilisasi terlebih dahulu terhadap enzim ligninolitik yang digunakan. Imobilisasi enzim ligninolitik dengan menggunakan bentonit akan dilakukan pada penelitian ini untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas enzim ligninolitik dari konsorsium kapang *Gliomastix sp.* dan *Mycelia sterilia*. Teknik imobilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah adsorpsi. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil aktivitas tertinggi enzim ligninolitik terimobilisasi bentonit yaitu laccase 849,54 U/ml, LiP 1227,6 U/ml dan MnP 199,72 U/ml.

**Kata Kunci**—Bentonit, Imobilisasi enzim, Kapang, Ligninolitik.

## I. PENDAHULUAN

LIGNIN merupakan polutan organik tinggi yang sulit didegradasi di lingkungan karena memiliki struktur kimia yang kompleks [1]. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa lignin dapat didegradasi oleh kapang penghasil enzim ligninolitik [2]. Berdasarkan Penelitian [3], diketahui bahwa *Gliomastix sp.* dan *Mycelia sterilia* merupakan kapang yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi lignin sebesar 1.4 cm dan 1.29 cm pada medium padat lignin agar chloramphenicol (LAC) dan sebesar 46.96% dan 44.76% pada medium cair lignin chloramphenicol (LC). Menurut [4], produksi enzim ligninolitik dari konsorsium terbaik menggunakan medium bagase tebu.

Enzim pendegradasi lignin merupakan enzim ligninolitik, yang merupakan enzim oksidatif atau enzim non-spesifik yang bekerja melalui mediator bukan protein. Enzim ini secara umum terdiri dari dua kelompok utama yaitu Laccase (Lac) dan Peroksidase. Peroksidase terdiri dari lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP) [5].

Penggunaan enzim dalam kondisi bebas pada degradasi polutan industri sangat tidak ekonomis karena memiliki stabilitas yang rendah, serta pemanenan dan purifikasi produk yang lebih sulit, dan tidak dapat digunakan dalam proses teknologi yang sinambung [6]. Oleh karena itu perlu dilakukan imobilisasi terlebih dahulu. Imobilisasi adalah pengikatan enzim secara fisik pada suatu tempat tertentu yang masih memiliki aktivitas katalitik [7]. Beberapa tahun terakhir, telah terjadi peningkatan pemanfaatan mineral lempung alam untuk

proses ini. Salah satu jenis mineral lempung tersebut adalah bentonit. Bentonit memiliki potensi untuk digunakan sebagai support material imobilisasi karena memiliki nilai ekonomis yang rendah serta tersedia secara alami. Selain itu, bentonit juga memiliki luas permukaan yang tinggi yang baik digunakan dalam metode adsorpsi imobilisasi enzim [8].

Pada penelitian ini dilakukan imobilisasi enzim lignolitik dengan menggunakan bentonit untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas enzim ligninolitik dari konsorsium kapang *Gliomastix sp.* dan *Mycelia sterilia* dalam mendegradasi lignin.

## II. METODOLOGI

### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret s.d Juli 2016. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

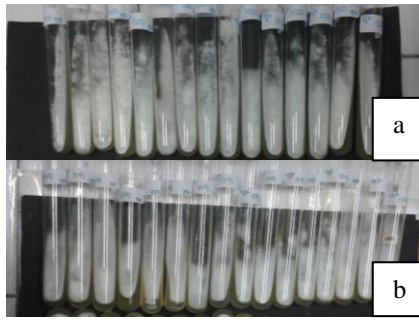
### B. Alat, Bahan dan Cara Kerja

#### 1) Subkultur Isolat Uji

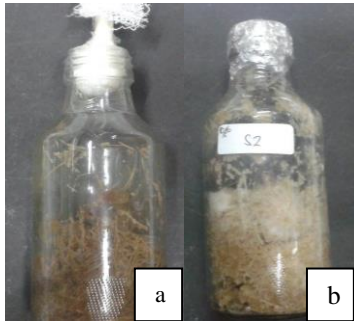
Isolat kapang yang digunakan adalah *Gliomastix sp.* (LM 1020) dan *Mycelia sterilia* (1041) kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. Kedua isolat tersebut disubkultur pada medium PDA-C miring (slant agar) dalam tabung reaksi secara duplo. Satu kultur untuk kultur stok dan yang lainnya untuk kultur kerja. Kultur tersebut diinkubasi selama 5-8 hari pada suhu kamar dalam kondisi aerob. Kultur stok kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C selama 30 hari untuk sediaan biakan, sedangkan kultur kerja digunakan dalam proses selanjutnya [9].

#### 2) Pembuatan Medium Basal –Chloramphenicol

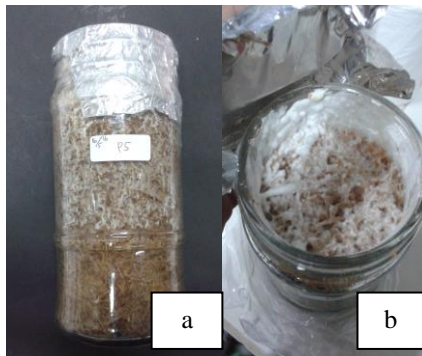
Medium basal dalam 1 L akuades dibuat dengan komposisi sebagai berikut (g/L) : ekstrak yeast 2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 g serta Mn<sup>2+</sup> 248 µM. Komposisi medium



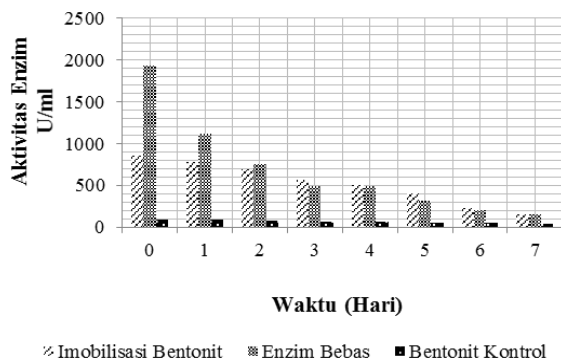
Gambar 1. (a). Subkultur isolat *Gliomastix sp.*, (b). Subkultur isolat *Mycelia sterilia*



Gambar 2. (a). Starter kontrol, (b). Starter konsorsium kapang

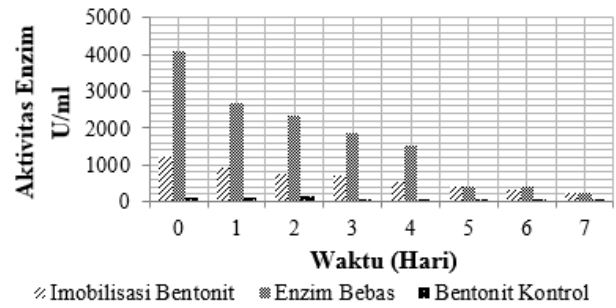


Gambar 3. Pertumbuhan konsorsium kapang pada medium produksi, (a). Tampak depan (b).Tampak atas



Gambar 4. Aktivitas Enzim *Laccase* Terimobilisasi Bentonit

disiapkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml, setelah itu ditambahkan akuades hingga volume 1 L. Medium dipanaskan menggunakan magnetic stirrer hingga homogen selanjutnya dikondisikan hingga pH 5. Dilakukan sterilisasi



Gambar 5. Aktivitas Enzim LiP Terimobilisasi Bentonit

menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, 1,5 atm. Penambahan 0,5 g chloramphenicol dilakukan sebelum sterilisasi [9].

1) Tahap Pre-Treatment Bagase Tebu

Bagase tebu diberikan perlakuan sebelum digunakan sebagai media pertumbuhan. Substrat sebanyak 2 kg dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian dipotong kecil ± 3 cm. Substrat digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Kemudian dioven pada suhu 75°C selama 2 hari. Selanjutnya substrat disimpan untuk kemudian digunakan sebagai medium pertumbuhan [9].

2) Pembuatan Starter

Kultur *Gliomastix sp.* dan *Mycelia sterilia* usia 5-8 hari pada agar miring disuspensikan dengan menambahkan 1,5 ml aquades. Kultur diinokulasikan ke dalam 25 ml medium basal serta Mn<sup>2+</sup> 248 µM dan 5 gram substrat bagase tebu. Komposisi medium ini merupakan medium padat yang dimodifikasi dari metode fermentasi media padat (solid state fermentation). Selanjutnya starter diinkubasi pada suhu ruang sampai 6 hari hingga miselium penuh. Selanjutnya, kapang yang tumbuh pada medium ini disebut sebagai starter kapang [10].

3) Tahap Produksi Enzim Ligninolitik

Substrat bagase tebu sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam botol kaca 500 ml. Medium basal pH 5 sebanyak 250 ml serta Mn<sup>2+</sup> 248 µM kemudian ditambahkan pada botol kaca. Medium disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Setelah medium mencapai suhu ruang, starter diinokulasikan ke dalam medium dan diinkubasi selama 21 hari [11][12].

4) Ekstraksi Enzim Kasar

Biakan kapang yang telah tumbuh pada bagase tebu setelah diinkubasi selama 21 hari diambil sebanyak 30 gram, kemudian digerus dalam mortar bersama 120 ml buffer fosfat pH 7. Setelah itu dimasukkan ke tabung Eppendorf dan disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu -4°C. Supernatan dipisahkan dari pelet lalu dimasukkan ke tabung Eppendorf yang lain. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar [12].

5) Uji Aktivitas Enzim Ligninolitik dari Medium Produksi Enzim Laccase

Larutan sampel yang akan dianalisis dibuat dengan 0,4 ml filtrat enzim dicampur dengan 0,5 ml buffer asetat 0,5 M pH 5 dan 0,1 ml ABTS 1mM. Campuran ini dimasukkan ke dalam

kuvet kemudian dihomogenkan. Setelah dihomogenkan larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm dengan interval waktu 0 sampai 30 menit. Aktivitas enzim diukur dengan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas Enzim U/ml} = \frac{(A_t - A_o) \times V_{\text{total}} \times [10]^9}{(\epsilon_{\text{max}} \times d \times V_{\text{enzim}} \times t)}$$

Keterangan :

$A_t$  = Absorbansi pada menit ke 30

$A_o$  = Absorbansi pada menit ke 0

$\epsilon_{\text{max}}$  = Absorptivitas molar ABTS (36000 M-1 cm-1)

$D$  = Tebal kuvet (cm)

$T$  = Waktu (menit)

$V_{\text{total}}$  = Volume total bahan (ml)

$V_{\text{enzim}}$  = Volume filtrat enzim (ml)

Satu unit aktivitas enzim Laccase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 mikromol ( $1 \mu\text{mol} = [10]^{-6}$ ) mol) ABTS per menit.

#### 6) Enzim Lignin Peroksidase (LiP)

Aktivitas LiP diukur berdasarkan reaksi dengan veratryl alcohol. Sebanyak 0,2 ml filtrat enzim, 0,05 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM; 0,1ml veratryl alcohol 8mM; 0,2 ml buffer asetat 0,05 M pH 3 dan 0,45 ml akuades dimasukkan kedalam kuvet kemudian dikocok. Larutan tersebut dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 310 nm pada interval waktu 0 dan 30 menit [13].

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim U/ml} = \frac{(A_t - A_o) \times V_{\text{total}} \times [10]^9}{d \times V_{\text{enzim}} \times t}$$

Keterangan :

$A_t$  = Absorbansi pada menit ke 30

$A_o$  = Absorbansi pada menit ke 0

$\epsilon_{\text{max}}$  = Absorptivitas molar veratryl alcohol (9300 M-1 cm-1)

$D$  = Tebal kuvet (cm)

$T$  = Waktu (menit)

$V_{\text{total}}$  = Volume total bahan (ml)

$V_{\text{enzim}}$  = Volume filtrat enzim (ml)

Satu unit aktivitas enzim LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 mikromol ( $1 \mu\text{mol} = [10]^{-6}$ ) mol) veratryl alcohol per menit.

#### 7) Enzim Mangan Peroksidase (MnP)

Aktivitas MnP diukur berdasarkan reaksi dengan guaiakol pada panjang gelombang 465 nm. Komposisi bahan adalah sebagai berikut : 0,2 filtrat enzim; 0,3 ml aquades; 0,1 ml buffer Sitrat fosfat 50 mM pH 4,5; 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; 0,2 ml MnSO<sub>4</sub> 1 mM dan 0,1 ml guaiakol 4 mM. Semua bahan dimasukkan ke dalam kuvet 1 ml, kemudian dikocok perlahan dan absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer pada 0 dan 30 menit (A(U)). Aktivitas MnP didapat dengan mengulang reaksi tanpa MnSO<sub>4</sub> dengan penambahan aquades menjadi 0,5 ml (B(U)) [14]. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim U/ml} = \frac{(A_t - A_o) \times V_{\text{total}} \times [10]^9}{(\epsilon_{\text{max}} \times d \times V_{\text{enzim}} \times t)}$$

Keterangan :

$A_t$  = Absorbansi pada menit ke 30

$A_o$  = Absorbansi pada menit ke 0

$\epsilon_{\text{max}}$  = Absorpsivitas molar Guaiakol (12100 M-1cm-1)

$d$  = Tebal kuvet (cm)

$t$  = Waktu (menit)

$V_{\text{total}}$  = Volume total bahan (ml)

$V_{\text{enzim}}$  = Volume filtrat enzim (ml)

#### 8) Imobilisasi Enzim Ligninolitik

Bentonit dicampurkan dengan sulphuric acid, dibilas dengan aquades dan dikeringkan pada suhu 100°C selama 2 jam. Bentonit 40 gram dicampurkan dengan enzim ligninolitik 200 ml, di rotary shaker selama 2 jam dalam suhu ruang. Padatan disaring dan dibilas dengan aquades untuk menghilangkan enzim yang tidak teradsorpsi.

Enzim ligninolitik dalam bentonit sebanyak diambil dengan 100  $\mu$ l syringe dan ditambahkan secara perlahan pada larutan hexane jenuh selama 1 menit. Imobilisasi dilakukan pada ice bath [8] [15].

#### 9) Uji Aktivitas Enzim Ligninolitik Terimobilisasi Bentonit

Metode pengujian sama dengan uji aktivitas enzim ligninolitik dari medium produksi. Pada pengujian ini dilakukan pengukuran sebanyak 7 kali selama 1 minggu.

#### 10) Uji Kontrol Bentonit

Metode pengujian sama dengan uji aktivitas enzim ligninolitik dari medium produksi. Pada pengujian ini penggunaan enzim diganti dengan bentonit.

#### 11) Penentuan Stabilitas Enzim dari Aktivitas Enzim Sisa Ligninolitik

Kestabilan enzim dapat dilihat dari aktivitas enzim sisa, Aktivitas enzim sisa ligninolitik ditentukan dengan cara mencari persentase hasil bagi aktivitas enzim setelah penyimpanan dan sebelum penyimpanan, yaitu sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas Sisa} = \frac{(\text{Aktivitas enzim setelah penyimpanan})}{(\text{Aktivitas enzim sebelum penyimpanan})} \times 100\% \quad [16]$$

### C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini mengkaji aktivitas dari enzim ligninolitik konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia yang terimobilisasi pada bentonit. Komponen enzim yang diukur adalah enzim Laccase, Lignin Peroksidase, dan Mangan Peroksidase.

### D. Analisis Data

Data penelitian dianalisa secara deskriptif kualitatif. Uji dilakukan untuk mengetahui aktivitas dari enzim ligninolitik konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia yang terimobilisasi pada bentonit.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat murni Gliomastix sp. (LM 1020) dan Mycelia sterilia (LM 1041) yang tersedia dalam sediaan biakan disubkultur kedalam medium PDA-Chloramphenicol. PDA (Potato Dextrose Agar) merupakan medium yang kaya nutrisi untuk pertumbuhan kapang, serta mengandung dekstrosa sebagai sumber karbon yang berasal dari fermentasi karbohidrat [17]. Antibiotik Chloramphenicol digunakan untuk

menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut [18], Chloramphenicol merupakan broad-spectrum antibiotic yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri namun tidak menghambat pertumbuhan kapang. Subkultur isolat dilakukan selama 5-8 hari dimana hasil menunjukkan bahwa isolat Gliomastix sp. lebih cepat tumbuh memenuhi tabung dibandingkan dengan Mycelia sterilia. Gambar 1 menunjukkan pertumbuhan miselium masing-masing isolat Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia yang telah diinkubasi selama 5-8 hari. Dari gambar tersebut dapat dilihat secara makroskopis bahwa kedua miselium isolat berwarna putih. Isolat Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia yang telah tumbuh memenuhi tabung selanjutnya digunakan untuk pembuatan starter.

Pembuatan starter menggunakan medium basal yang ditambahkan bagase tebu dengan pH 5. Menurut [4], bagase tebu dan pH 5 merupakan medium fermentasi padat serta pH yang optimal untuk menghasilkan aktivitas enzim ligninolitik tertinggi dari konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia. Medium basal yang digunakan mengandung ekstrak yeast yang berisi asam glutamat sebagai sumber nitrogen. Metabolisme nitrogen berperan dalam pengaturan degradasi lignin sebagai bagian dari metabolisme sekunder kapang [19]. Selain ekstrak yeast terdapat juga  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  sebagai makronutrien yang mendukung pertumbuhan kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia [20].

Optimalisasi juga dilakukan pada tahap ini dengan menambahkan ion logam  $\text{Mn}^{2+}$  248  $\mu\text{M}$  yang berdasarkan penelitian [4] dapat meningkatkan pertumbuhan serta aktivitas enzim ligninolitik yang dihasilkan oleh konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia. Beberapa enzim memerlukan ion-ion logam tertentu untuk meningkatkan aktivitasnya. Pada konsentrasi tertentu, ion logam dapat bertindak sebagai aktivator dan pada konsentrasi tertentu pula dapat bertindak sebagai inhibitor. Ion logam  $\text{Mn}^{2+}$  dapat berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat untuk menstabilkan konformasi aktif enzim [21]. Pertumbuhan starter konsorsium kapang ditunjukkan dalam gambar 2 dimana dihasilkan miselium kapang konsorsium Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia berwarna putih yang tumbuh memenuhi medium starter.

Pertumbuhan konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia dalam medium produksi ditunjukkan dalam gambar 3 dimana dapat dilihat miselium konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia yang berwarna putih tumbuh pada bagian atas medium produksi.

Setelah 21 hari dilakukan ekstraksi enzim dari medium produksi konsorsium kapang Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia. Menurut [22], ekstraksi menggunakan buffer fosfat berfungsi untuk menjaga kestabilan pH enzim sehingga mencegah terjadinya denaturasi. Ekstraksi enzim dilakukan dengan sentrifugasi untuk mendapatkan enzim kasar yang akan digunakan untuk analisis aktivitas dan imobilisasi enzim. Hal tersebut sesuai dengan [2] yang menyatakan enzim ligninolitik merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dideteksi melalui

enzim kasar yang didapat dari supernatan hasil sentrifugasi.

Enzim ligninolitik kasar yang telah diperoleh kemudian dianalisis aktivitasnya, terdapat tiga enzim ligninolitik yang dianalisis yaitu enzim Laccase, Lignin Peroksidase, dan Mangan Peroksidase. Laccase dianalisis dengan menggunakan substrat ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) yang berperan sebagai mediator untuk oksidasi komponen non fenolik [23]. Lignin Peroksidase berfungsi bersama kofaktor veratryl alkohol yang melindungi enzim dari inaktivasi oleh  $\text{H}_2\text{O}_2$  berlebih, namun juga berperan sebagai mediator redoks selama oksidasi molekul lain [24]. Sedangkan Mangan Peroksidase menggunakan guaiacol sebagai mediator pada reaksinya [25]. Analisis aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu yang disesuaikan dengan substrat atau mediator yang digunakan. Panjang gelombang 420 nm untuk enzim laccase, dimana panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang maksimum untuk analisis aktivitas laccase dengan menggunakan substrat ABTS [26]. Lignin Peroksidase diukur dengan menggunakan panjang gelombang 310 dan Mangan Peroksidase pada panjang gelombang 465 karena jumlah guaiacol yang hilang saat reaksi dapat dideteksi pada panjang gelombang tersebut [25].

Selanjutnya dilakukan imobilisasi enzim ligninolitik kasar dengan menggunakan bentonit. Imobilisasi enzim dilakukan untuk mempertahankan stabilitas enzim. Imobilisasi enzim merupakan penjelekan enzim dalam matriks polimer atau pengikatan enzim pada suatu material pembawa [27]. Namun tetap mempertahankan sifat katalitiknya [28]. Bentonit merupakan mineral lempung alam yang digunakan sebagai material support imobilisasi enzim ligninolitik karena strukturnya inert, termotabil, dan memiliki kemampuan pertukaran ion. Imobilisasi enzim ligninolitik dengan bentonit menggunakan teknik adsorpsi dimana gaya interaksi yang terjadi antara material support dan senyawa dapat merupakan ikatan hidrogen, gaya Van Der Waals serta interaksi hidrofobik [29].

Imobilisasi enzim ligninolitik dianalisis aktivitasnya setiap hari selama masa simpan 7 hari untuk diketahui pengaruh imobilisasi terhadap aktivitasnya.

1. Aktivitas Enzim Laccase Terimobilisasi Bentonit
2. Aktivitas enzim laccase terimobilisasi bentonit ditunjukkan dalam grafik (gambar 4).

Berdasarkan grafik di atas dapat diketahui bahwa aktivitas enzim laccase terimobilisasi bentonit memiliki aktivitas yang tidak terlalu tinggi. Aktivitas tertinggi didapat pada hari ke-nol dengan nilai sebesar 849,54 U/ml, sedangkan aktivitas terendah terdapat pada hari ketujuh sebesar 152,78 U/ml. Enzim laccase yang terimobilisasi bentonit mengalami penurunan yang cukup tinggi, dimana penurunan tertinggi sebesar 180,56 U/ml terjadi pada hari keenam. Enzim laccase yang terimobilisasi bentonit memiliki kestabilan yang rendah dengan nilai aktivitas enzim sisa sebesar 17,98%, aktivitas enzimnya pun menurun seiring waktu penyimpanan. Hal ini dapat dikarenakan karena perubahan konformasi enzim laccase

setelah diimmobilisasi dan terbatasnya fleksibilitas enzim laccase tersebut pada bentonit [15].

Enzim laccase yang terimmobilisasi bentonit aktivitas teringginya masih dibawah enzim laccase bebas karena mengalami penurunan aktivitas setelah diimmobilisasi yang disebabkan oleh perubahan struktural enzim [30]. Namun meskipun aktivitasnya lebih rendah, stabilitas enzim laccase yang terimmobilisasi bentonit lebih tinggi dibanding stabilitas enzim laccase bebas, dimana nilai aktivitas enzim sisanya 7,66%. Hal ini menyebabkan aktivitas enzim laccase bebas pada penyimpanan hari ketiga hingga hari ke tujuh lebih rendah dari aktivitas enzim laccase terimmobilisasi bentonit [16].

1. Aktivitas Enzim Lignin Peroksidase (LiP) Terimmobilisasi Bentonit
2. Aktivitas enzim LiP terimmobilisasi bentonit ditunjukkan dalam grafik (gambar 5).

Berdasarkan grafik diatas dapat diketahui bahwa aktivitas enzim lignin peroksidase (LiP) terimmobilisasi bentonit mengalami penurunan setiap harinya selama masa simpan tujuh hari. Aktivitas enzim LiP yang terimmobilisasi bentonit memiliki nilai tertinggi sebesar 1227,6 U/ml pada hari ke-nol dan aktivitas terendah pada hari ketujuh sebesar 250.9 U/ml.

Aktivitas enzim LiP terimmobilisasi bentonit lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim LiP bebas, dimana nilai aktivitas enzim LiP bebas tertinggi adalah 4094,48 U/ml sedangkan aktivitas terendahnya sebesar 232,975 U/ml. Hal tersebut dapat disebabkan akibat denaturasi enzim selama proses immobilisasi atau rendahnya afinitas substrat terhadap enzim terimmobilisasi bentonit [31]. Namun meskipun aktivitasnya lebih rendah, stabilitas enzim LiP yang terimmobilisasi bentonit lebih tinggi dibanding stabilitas enzim LiP bebas, dimana nilai aktivitas enzim LiP sisa yang terimmobilisasi bentonit adalah 8,76%. Sedangkan aktivitas enzim LiP bebas sisa adalah 5,68%. Hal ini menyebabkan aktivitas enzim LiP bebas pada hari ketujuh lebih rendah pada dari aktivitas enzim LiP terimmobilisasi bentonit [16].

1. Aktivitas Enzim Mangan Peroksidase (MnP) Terimmobilisasi Bentonit
2. Aktivitas enzim MnP terimmobilisasi bentonit ditunjukkan dalam grafik (gambar 6).

Berdasarkan grafik di atas dapat diketahui bahwa aktivitas enzim MnP terimmobilisasi bentonit tertinggi didapatkan pada hari ke-nol dengan nilai sebesar 199.72 U/ml dan aktivitas terendah pada hari ketujuh dengan nilai sebesar 41.32 U/ml.

Aktivitas enzim MnP terimmobilisasi bentonit masih lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim MnP bebas, dimana nilai aktivitas enzim MnP bebas tertinggi adalah 4407,71U/ml sedangkan aktivitas terendahnya sebesar 165,289 U/ml. Hal ini dapat disebabkan karena terjadinya perubahan kondisi optimum aktivitas enzim ligninolitik. Setelah diimmobilisasi, kondisi optimum aktivitas enzim, seperti pH dan temperatur optimum cenderung berubah dari kondisi optimum aktivitas enzim bebas. Umumnya terjadi kenaikan pH dan temperatur untuk mencapai aktivitas enzim yang

hampir setara dengan aktivitas enzim bebas [32].

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan data-data yang diperoleh serta pembahasan yang telah diberikan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas enzim laccase terimmobilisasi bentonit tertinggi sebesar 849,54 U/ml.
2. Aktivitas enzim LiP terimmobilisasi bentonit tertinggi yaitu sebesar 1227,6 U/ml.
3. Aktivitas enzim MnP terimmobilisasi bentonit tertinggi yaitu sebesar 199.72 U/ml.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. Faradilla, "Bioremediasi Limbah Cair Industri Kertas Menggunakan Teknik Immobilisasi Enzim Kasar Dan Biomassa Sel Jamur", Skripsi. UGM : Yogyakarta (2013).
- [2] R.T. Howard, E. Abotsi, E.L., Jansen van Rensburg, and Howard, S. "Lignocellulose Biotechnology : Issue of Bioconversion and Enzyme Production". African Journal of Biotech. 2 (2003) 602 -619.
- [3] Y.M., Rohmah, N.D., Kuswytasari, dan M. Shovitri, 2011. "Studi Potensi Isolat Kapang tanah dari Wonorejo Surabaya dalam Mendegradasi Lignin". Tugas Akhir. Biologi FMIPA ITS : Surabaya (2011).
- [4] D.W., Intani, dan N.D., Kuswytasari, "Aktivitas Enzim Ligninolitik Jamur Gliomastix sp. dan Mycelia sterilia dengan Induksi logam pada Limbah Bagase", Tugas Akhir. Biologi FMIPA ITS : Surabaya (2015).
- [5] J. Perez, 2002. "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview". Departement of Microbiology, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18071 Granada, Spain.
- [6] A., Zubriene, S., Budiene, N., Romskevicius T., Gorochoveva, E., Matulionis and Dienys G. "Immobilization of Hydrolases onto chitosan microparticles". Chemical. 4 (2003) 14:21.
- [7] I., Chibata ed, "Immobilized Enzyme Research and Development", Halsted Press, New York (1978).
- [8] Y., Yesiloglu, "Utilization of bentonite as a support material for immobilization of Candida rugosa lipase", Journal of Elsevier Process Biochemistry, Vol. 40 (2005) 2155-2159.
- [9] SK.M., Hossain, and N., Anantharaman, "Activity Enhancement of Ligninolytic Enzyme of Trametes versicolor with Bagase Powder", African Journal of Biotechnology, Vol 5 (2006) pp. 180-194. India: Departement of Chemical Engineering.
- [10] J. Yang, Y. Hong Li, W. He Xiang, and C. Wen Xin, "Purification and characterization of Lignin Peroxidases from Penicillium decumbens P6", Journal of Microbiology and Botechnology, Vol. 21 (2005) 435-440.
- [11] D.S. Arora, M. Chander, and P.Gill, "Involvement of Lignin Peroxidase, Manganase Peroxidase and laccase in degradation and Selective Ligninolysis of Wheat Straw," International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 50 (2002) 115-120).
- [12] R.I. Syafrizal. 2007. "Aktivitas enzim ligninolitik fungi pelapuk putih Omphalina sp. dan Pleurotus ostreatus pada limbah lignoselulosa, Skripsi. Bogor : Biokimia IPB (2007).
- [13] M. Tien, and T. K. Kirk, "Lignin Degrading Enzyme from Phanerochaete chrysosporium : Purification, Characterization and Catalytic Properties of a Unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring Oxygenase", Practice Natural Academy Science USA, Vol. 81 (1984) 2280-2284).
- [14] R. Fitria, "Optimasi Produksi Enzim Lignolitik oleh Isolat A-1 dan G. Lucidum serta Pemurnian Parsial dan Karakteristik Lakase". Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia (2005).
- [15] M.E. Sedaghat, M. Ghiacia, H. Aghaeia, S. Soleimani-Zadba, "Immobilization of  $\alpha$ -amylase on Na-bentonite and modified bentonite", Applied Clay Science, (2009) 46125-130.
- [16] I.M. Isya, A. Roosdiana, and Sutrisno. "Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Xilanase Amobil dalam Kitosan". Kimia.Student Journal, Vol. 2, (2014) No. 1, pp. 333 -339.

- [17] J. F. MacFaddin, "Media for the Isolation-Cultivation Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol.1". Williams and Wilkins: Baltimore (1985).
- [18] G.M. Mueller, G.F. Bills., & M.S. Fosteer. "Biodiversity of fungi : Inventory and Monitoring methods", Elsevier Academic Press Inc: Amsterdam (2004).
- [19] A. Fadilah, S. Distantina, S.R. Dwiningsih, dan D. S. Ma'rifah, "Pengaruh Penambahan Glukosa dan Ekstrak Yeast terhadap Biodelignifikasi Ampas Batang", EKUILIBRIUM Vol. 8, (2009) No. 1. P: 29 –33.
- [20] D. Komalasari, "Isolasi, identifikasi, dan pengujian kemampuan kapang selulolitik dari naskah kuno kertas eropa asal keraton kasepuhan cirebon", Skripsi, Biologi. FMIPA UI : Jakarta (2012).
- [21] T. Palmer, "Understanding Enzymes". Ellis Harwood : Chichester, West Sussex, England (1991).
- [22] Y. A. Prasetya, "Enzim Merkuri reduktase pada Genera Bacillus sebagai pereduksi merkuri anorganik (Hg<sup>2+</sup>) menjadi Merkuri volatil (Hg<sup>0</sup>)", Tugas Akhir, ITS : Surabaya (2012).
- [23] C.F. Thurston, "The structure and function of fungal laccases", Microbiology 140: (1994) 19-26.
- [24] M. Akhtar, R.A. Blanchette and T.K. Kirk, "Fungal Delignification and Biochemical Pulping of wood", Advance in Biotechnology, 57: (1997) 159-195.
- [25] H. Huang, G.M. Zeng, L. Tang, H. Yu, X.M. Xi, Z.M. Chen and G.H. Huang, "Effect of Biodelignification of Rice Strew on Humification and Humus Quality by Phanerochaete chrysosporium and Streptomyces badius, International Biodeterioration and Biodegradation, 61 : (2008) 331-336.
- [26] H. Widiastuti, dan Tripanji, "Pola Aktivitas Enzim Ligninolitik Pleurotus ostreatus pada limbah Sludge Pabrik Kertas", Jurnal menara perkebunan, Vol. 76 (2008) No.1, 47-60, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan : Bogor.
- [27] Tischer and Wedekind, "Immobilized enzyme: methode and application", Springer : Berlin, Heidelberg (1999).
- [28] C. Spahn, & S. D. Minter, "Enzyme Immobilization in Biotechnology", Recent Patents on Engineering, Vol 2 (2008) No.3 : 195-200.
- [29] R.G. Burn, "Interaction of enzymes with soil minerals and organic colloids", Soil Science Society of America, Madison, (1986) 439-452.
- [30] M.Y. Chang, and R.S. Juang, "Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes", Enzyme Microb. Technol, 36 (2005) 75–82.
- [31] O. Prakash & N. Jaiswal, "Immobilization of a Thermostable Amylase on Agarose and Agar Matrices and its Application in Starch Stain Removal", World Appl Sci. J., 13 (2011) No.3 : 577-577.
- [32] F. Sebayang, "Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nenas serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan", Jurnal Sains Kimia, 10 (2006) (1): 20-26.