

PENENTUAN AKTIVITAS ENZIM *LACCASE Rhus vernicifera* MENGUNAKAN GUAIACOL SEBAGAI SUBSTRAT

Desriany Astina^{1*}, Titania T. Nugroho², Amalia Linggawati³

^{1*,2,3} Program Studi Pascasarjana Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Riau, Jln. Pattimura, Pekanbaru

Email : 1*desrianyastina@gmail.com

ABSTRAK

Enzim laccase (EC.1.10.3.2 : *oxygen oxidoreductase*) merupakan enzim ekstraseluler yang mempunyai manfaat dalam berbagai bidang industri. Enzim ini mengkatalisis proses oksidasi berbagai senyawa organik dan inorganik seperti senyawa fenolik, diamin, amin aromatic dan asam askorbat. Enzim laccase pertama kali disolasi oleh Yoshida pada tahun 1883. Ia berhasil mengekstrak dari pohon pernis Jepang (*Rhus vernicifera*). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan aktivitas enzim *laccase* komersil yang berasal dari *Rhus vernicifera* dengan menggunakan guaiacol sebagai substrat. Aktivitas enzim ini diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10S pada panjang gelombang 490 nm dengan menggunakan guaiacol sebagai substrat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim ini memiliki aktivitas sebesar $0,0247 \text{ U/L} \pm 0,0002$ (pada pH 5,5 dan temperatur 40 °C).

Kata kunci : Aktivitas enzim, Enzim *Laccase*, Guaiacol, *Laccase*, Tumbuhan pernis Jepang.

ABSTRACT

The enzyme laccase (EC.1.10.3.2: oxygen oxidoreductase) is an extracellular enzyme that has a benefit in various industrial fields. This enzyme catalyzes the oxidation of various inorganic and organic compounds such as phenolic compounds, diamine, aromatic amines and ascorbic acid. Laccase enzyme was first isolated by Yoshida in 1883. He extracted from the Japanese lacquer tree (*Rhus vernicifera*). Objectives of this study is to determine the commercial activity of the enzyme laccase derived from *Rhus vernicifera* using guaiacol as a substrate. The enzyme activity was measured using a UV-Vis spectrophotometer Thermo Scientific GENESYS 10S at a wavelength of 490 nm using guaiacol as substrate. The results of this study indicate that this enzyme has an activity of $0,0247 \pm 0,0002 \text{ U/L}$ (at pH 5,5 and a temperature of 40 °C).

Keywords : Enzyme activity, Guaiacol, Laccase enzyme, laccase, Japanes lacquer tree.

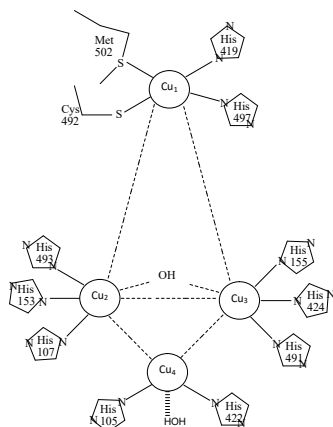
PENDAHULUAN

Enzim *laccase* (E.C1.10.3.2 : *oxygen oxidoreductase*) merupakan enzim multicopper yang mengkatalisis proses oksidasi dari berbagai jenis senyawa organik dan inorganik seperti senyawa mono, di- dan polifenol, aminofenol, metoksifenol, fenol tersubstitusi, diamin, amin aromatik dan asam askorbat (Mayer dan Staples, 2002). *Laccase* sebagian besar merupakan glikoprotein ekstraseluler yang mengandung atom tembaga dengan bobot molekul 50-100 kDa (Turston, 1994 ; Gochev dkk, 2007). Enzim ini disebut enzim multicopper karena mengandung 4 ion tembaga. *Laccase* berbentuk holoenzim aktif. Pertama kali ditemukan dalam getah pohon pernis Jepang (*Rhus vernicifera*) tahun 1883 (Thurston, 1994 ; Shradhdha dkk, 2011 ; Lu, 2012).

Fungsi *laccase* tergantung pada Cu yang terletak di tiga sisi pengikat. Cu mempunyai peranan penting dalam mekanisme katalitik. Ada tiga langkah utama dalam katalisis oleh *laccase*. Cu tipe 1 akan mereduksi substrat. Elektron kemudian ditransfer secara internal dari Cu tipe 1 ke *cluster trinuclear* (tipe 2 dan tipe 3). Molekul O₂ direduksi menjadi air di *cluster trinuclear* (Kunamneni dkk, 2008 ; Enguita dkk 2003).

Molekul O₂ terikat pada *cluster trinuclear* untuk aktivasi sisi asimetris dan akan muncul kantong pengikat O₂ tujuannya untuk membatasi akses agen pengoksidasi selain O₂. Empat electron hasil oksidasi substrat dipasangkan dengan satu molekul oksigen melalui reaksi reduksi untuk menghasilkan molekul air. Sehingga mekanisme reaksi tidak bisa terjadi langsung. *Laccase* harus berfungsi sebagai penyimpan elektron dari reaksi oksidasi substrat untuk mereduksi

molekul oksigen. Rincian reduksi O₂ belum sepenuhnya dijelaskan karena masih terus dipelajari hingga saat ini (Kunamneni dkk., 2008 ; Enguita dkk., 2003). Ilustrasi sisi aktif enzim *laccase* dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Ilustrasi sisi aktif enzim *laccase* (Kunamneni dkk., 2008)

Molekul substrat yang teroksidasi oleh *laccase* menjadi radikal yang sesuai dengan interaksi langsung pada *cluster* Cu. *Laccase* menggunakan oksigen sebagai electron untuk menghapus proton dari gugus hidroksil fenolik. Reaksi ini menghasilkan radikal yang secara spontan mampu menata ulang (rearrange), yang dapat menyebabkan fisi ikatan C-C atau C-O rantai samping alkil atau pemutusan cincin aromatik. Kemampuan *laccase* untuk mengoksidasi ditentukan oleh sifat dan posisi substituen dalam cincin fenolik substrat. Banyak substrat yang digunakan dalam studi aktifitas enzim *laccase* (Mayer dan Staples, 2002), salah satunya adalah guaiacol. Beberapa jenis substrat yang bisa digunakan sebagai substrat pada penentuan aktivitas enzim *laccase* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

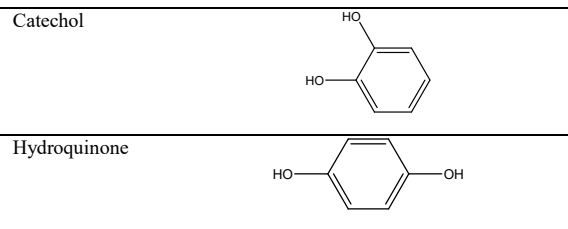
Enzim *laccase* dari *Rhus vernicifera* aktif dalam oksidasi berbagai senyawa monofenol seperti eugenol, isoeugenol, o-fenilendiamin, alkohol koniferil, katekol, fenilpropanoid dan lignokatekol. Aktivitas enzim ini dalam bentuk aceton powder dan dilakukan pada pH 7,0 untuk substrat p-fenilendiamin,

pH 8,5 untuk 2,6-dimetoksifenol (Lu dan Miyakoshi, 2012). Uji aktivitas enzim *laccase* dengan menggunakan guaiacol dilakukan pada pH asam (Gao dkk, 2013). Guaiacol digunakan sebagai substrat karena guaiacol lebih mudah diperoleh dan harga relatif lebih murah dibandingkan dengan substrat lainnya.

Guaiacol merupakan senyawa yang berbentuk kristal, tidak berwarna atau berwarna sedikit kekuningan, dengan bau aromatik yang khas, bersifat higroskopis, serta larut dalam air dan gliserol. Guaiacol adalah senyawa organik alami yang pertama kali diisolasi oleh Otto Unverdorben pada tahun 1826 (Steven, 1943). Meskipun disintesis oleh berbagai organisme, senyawa ini biasanya berasal dari guaiacum atau kreosot kayu. Guaiacol akan berwarna kecoklatan ketika terpapar udara (teroksidasi) atau cahaya (PubChem *Chemistry database*, 2017). Perubahan warna yang terjadi pada guaiacol, digunakan dalam uji aktivitas enzim *laccase* menggunakan spektrofotometer. Terjadi pergeseran panjang gelombang maksimum dari daerah UV ke daerah sinar tampak/Vis (Gao dkk., 2013).

Tabel 1. Jenis substrat untuk uji aktifitas enzim *laccase* (Naziz, 2013).

Substrat	Struktur Kimia
ABTS	
Syringaldazine	
DMP(2,6-dimetoksifenol)	
Guaiacol (2-metoksifenol)	



Uji aktivitas enzim *laccase* dilakukan dengan menggunakan metoda spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran dengan metoda ini didasarkan pada absorpsi sinar UV-Vis oleh senyawa yang mengakibatkan terjadinya transisi elektronik, yaitu elektron pada orbital ikatan tereksitasi ke orbital antiikatan. Pada saat elektron berada pada orbital anti ikatan, elektron mempunyai energi yang tinggi sehingga elektron melakukan de eksitasi ke orbital ikatan. Jika energi yang diserap tinggi, maka panjang gelombang absorpsinya kecil (persamaan Plank; $E=h.c/\lambda$). Jenis pelarut (polar atau nonpolar) dan pH larutan yang digunakan akan mempengaruhi panjang gelombang absorpsi maksimum suatu sampel. Pelarut akan mengakibatkan pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih besar (batokromik) atau ke arah yang lebih kecil (hipsokromik).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah guaiacol keluaran Sigma Aldrich, USA (nomor katalog 9000-34-6), enzim *laccase* dari tumbuhan *Rhus vernicifera* keluaran Sigma Aldrich (nomor katalog 80498-15-3), asam asetat (CH_3COOH), natrium asetat (CH_3COONa), asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), pelarut dan bahan kimia lainnya sesuai prosedur kerja.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaking incubator* (Daihan Lab Tech Co, LTD), *hotplate*, neraca analitis, peralatan gelas,

vortex, pH meter, pipet mikro, spektrofotometer UV-Vis (Thermo scientific genesys 10S).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metoda eksperimental rancangan acak kelompok. Penentuan aktivitas enzim *laccase Rhus vernicifera* dilakukan dengan menggunakan guaiacol sebagai substrat pada pH 5,5.

Preparasi Sampel

Enzim *laccase* yang digunakan adalah enzim *laccase* komersial yang berasal dari tumbuhan *Rhus vernicifera*. Enzim *laccase* dilarutkan dalam buffer asetat pH 5.5 (dalam keadaan dingin) dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Larutan enzim disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu -20°C .

Pembuatan larutan buffer

Larutan buffer yang digunakan adalah buffer asetat 0,05M pH 5,5. Pembuatan 100 mL buffer asetat adalah dengan menggunakan CH_3COOH 0,2 M 3,4 mL dan CH_3COONa 0,2 M 21,3 mL. Kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter sehingga pH larutan tepat 5,5. Larutan ditambahkan HCl 1 N jika terlewat basa dan tambahkan NaOH 1 N jika terlewat asam. Larutan ditambahkan akuades hingga 100 mL dan dihomogenkan.

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Guaiacol (10 mM) sebanyak 1 mL, enzim *laccase* dengan konsentrasi 100 U/mL sebanyak 1 mL, buffer asetat pH 5,5 sebanyak 3 mL dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Untuk blanko digunakan akuades sebagai pengganti enzim. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-700 nm dengan interval 1 nm untuk memperoleh panjang gelombang maksimum sebelum teroksidasi (t_0). Pengukuran absorbansi maksimum guaiacol teroksidasi (t_{24}) dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C , menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada

pada panjang gelombang 200-700 nm dengan interval 1nm.

Uji aktivitas enzim laccase

Penentuan aktivitas enzim *laccase* dilakukan dengan menggunakan 1 mL enzim *laccase Rhus vernicifera* (100 U/mL), 1 mL guaiacol (10mM) dan 3 mL buffer. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan inkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam menggunakan *shaker* inkubator. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum guaiacol teroksidasi (t_{24}). Aktivitas enzim *laccase* dihitung menggunakan persamaan berikut. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis 1 μ mol substrat per menit (Savitha dkk, 2011) :

$$E.A = \frac{A \times V}{t \times e \times v}$$

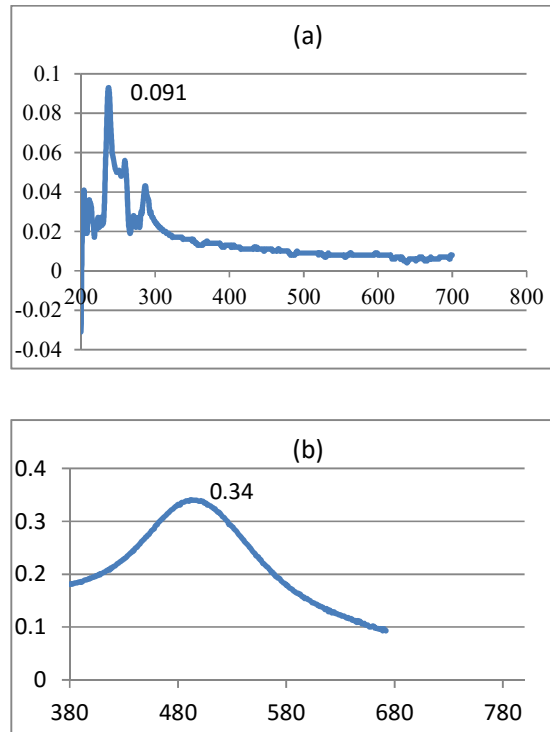
- E.A = Aktivitas enzim (U/mL)
- A = Absorbansi (pada panjang gelombang maksimum)
- V = Volume total campuran (mL)
- v = volume enzim (mL)
- t = waktu inkubasi (menit)
- e = koefisien ekstingsi molar guaiacol

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim *laccase* yang digunakan adalah enzim *laccase* yang diperoleh dari tumbuhan *Rhus vernicifera* yang diproduksi oleh Sigma Aldrich. Penentuan aktivitas enzim *laccase* dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis substrat (**Tabel 2**), salah satunya adalah guaiacol.

Guaiacol (2-metoksi fenol) digunakan sebagai substrat yang akan dioksidasi oleh *laccase* (Gao dkk., 2013 ; Savitha, 2011). Guaiacol lebih mudah diperoleh dan dengan harga yang relatif murah dibandingkan

dengan substratnya yang lain. Sebelum teroksidasi guaiacol berwarna sedikit kekuningan sedangkan setelah teroksidasi ia akan berwarna kecoklatan. *Laccase* akan mengkatalisis reaksi oksidasi pada guaiacol yang akan membentuk gugus keton dan menghasilkan H₂O.



Gambar 2. Kurva panjang gelombang maksimum guaiacol (a) sebelum teroksidasi (t_0), (b) setelah teroksidasi (t_{24}).

Pada penelitian ini diperoleh panjang gelombang absorbansi maksimum guaiacol pada pH 5,5 (t_0 dan t_{24}) yaitu dari 231 nm (**Gambar 2a**) menjadi 490 nm (**Gambar 2b**). Pergeseran panjang gelombang terjadi karena adanya pengaruh oksidasi dari enzim *laccase*. Proses oksidasi akan mengubah struktur molekul sehingga terdapat perubahan-perubahan ikatan kimia. Bertambahnya atau berkurangnya jumlah ikatan phi akan mempengaruhi kemampuan delokalisasi.

Enzim merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimia sebagai katalis suatu reaksi sehingga ia sangat rentan terhadap kondisi lingkungan. Enzim memiliki titik isoelektrik yang berbeda-beda

sesuai dengan asam amino yang terkandung di dalamnya. Perubahan pH akan mengakibatkan aktivitas enzim mengalami perubahan. Kondisi pH yang optimal akan mendukung enzim dalam melakukan aktivitasnya dengan baik. Sedangkan kondisi pH yang kurang sesuai akan mengakibatkan kerusakan atau tidak aktifnya protein dalam suatu enzim sehingga menyebabkan menurunnya fungsi dan aktivitas enzim tersebut. Oleh karena itu, setiap enzim mempunyai pH tertentu yang menyebabkan aktivitasnya mencapai keadaan optimal.

Ada dua kemungkinan yang terjadi pada enzim *laccase* yang disebabkan oleh pH. Pertama, terjadi penurunan aktivitas enzim *laccase* pada pH netral dan basa, terjadi karena jumlah anion hidroksida ($-OH$) yang meningkat. Anion $-OH$ merupakan inhibitor enzim *laccase*. Anion $-OH$ menghambat enzim *laccase* pada pusat T2/T3 sehingga terjadi perbedaan potensial redoks antara substrat dengan pusat T1 yang akan mempengaruhi pH aktivitas katalitik enzim *laccase*. Kedua, peningkatan pH akan menurunkan potensial redoks dari substrat fenolik. Keadaan ini membuat substrat fenolik lebih mudah di oksidasi oleh enzim *laccase* (Xu, 1996 ; Patel, 2010). Pada penelitian ini, penentuan aktivitas enzim *laccase* dilakukan pada pH 5,5 menggunakan guaiacol sebagai substrat, diperoleh hasil $0,0247 \pm 0,0002$ U/L. Pada umumnya, pH optimum enzim *laccase Rhus vernicifera* berada pada pH antara 3-7. Beberapa penelitian penentuan aktivitas enzim *laccase Rhus vernicifera* dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Dari **Tabel 2** dapat dilihat bahwa ada dua metoda penentuan aktivitas enzim *laccase* yaitu metoda konsumsi oksigen dan metoda pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk substrat katekol dan isoeugenol ditentukan menggunakan metoda konsumsi oksigen dan untuk substrat lainnya menggunakan metoda spektrofotometri. Jika dibandingkan dengan enzim *laccase* murni, aktivitas enzim *laccase* komersial jauh

lebih rendah jika menggunakan substrat guaiacol. Kemungkinan penggunaan p-fenilendiamin sebagai substrat lebih sesuai untuk *laccase Rhus vernicifera* dibandingkan dengan guaiacol. Jika menggunakan metoda konsumsi oksigen, lebih baik menggunakan katekol atau isoeugenol sebagai substrat. Tetapi jika dilihat dari aktivitas dan kemudahan metoda, metoda pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan substrat p-fenilendiamin, lebih dibandingkan dengan guaiacol (Lu dan Miyakoshi, 2012).

Tabel 2. Tabel aktivitas enzim *laccase* dengan berbagai substrat.

Jenis enzim <i>laccase Rhus vernicifera</i>	Metoda	Substrat	Kondisi	Aktivitas (U/g)	Rujukan
Ekstrak kasar <i>laccase Trichoderma asperellum</i> LBKURC C1	Spektrofotometri	guaiacol	pH 5,5 suhu 40 °C	$0,0956 \times 10^{-3}$	Astina, 2017
<i>Laccase Rhus vernicifera</i> (komersial)	Spektrofotometri	guaiacol	pH 5,5 suhu 40 °C	$0,0247 \times 10^{-3}$	Astina, 2017
<i>laccase</i> murni <i>Rhus vernicifera</i>	Konsumsi oksigen	katekol	pH 7,0 suhu 30 °C	$3,5 \times 10^2$	Lu dan Miyakoshi
<i>laccase</i> murni <i>Rhus vernicifera</i>	Konsumsi oksigen	isoeugenol	pH 7,0 suhu 30 °C	$1,7 \times 10^2$	Lu dan Miyakoshi
<i>laccase</i> murni <i>Rhus vernicifera</i>	Spektrofotometri	p-fenilendiamin	pH 7,5 suhu 30 °C	$5,5 \times 10^2$	Lu dan Miyakoshi

SIMPULAN

Penentuan aktivitas enzim *laccase* dari tumbuhan *Rhus vernicifera* juga bisa dengan menggunakan substrat guaiacol. Aktivitas enzim *laccase* yang diperoleh adalah $0,0247 \text{ U/L} \pm 0,0002$ dengan menggunakan guaiacol sebagai substrat dan dilakukan pada pH 5,5. Kemungkinan guaiacol bukan substrat yang ideal untuk enzim *laccase* *Rhus vernicifera* dibandingkan dengan p-fenilendiamin. Dilihat dari aktivitas dan kemudahan, metoda pengukuran absorban menggunakan spektrofotometer lebih baik menggunakan p-fenilendiamin sebagai substrat dibandingkan dengan guaiacol.

DAFTAR PUSTAKA

- Mayer. A.M., & Staples. R. C., 2002. Laccase : New Function For and Old Enzyme. *Phytochemistry*, 60 (6), 551-565.
- Turston, CF. 1994. The Structure and Function of Fungal Laccases. Review Article. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Gochev. V. K., & Krastanov. A. I., 2007. Isolation of Laccase Producing *Trichoderma* Spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13, 171-176.
- Shraddha., Sheker. R., Sehgal. S., Kamthania. M and Kumar. A. 2011. Laccase : Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011(1), 1-11.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M., 2008. Laccases and their applications : a patent review, *Recent patents on biotechnology*, 2(1), 10-24.
- Enguita. F. J., Martins. L. O., Henriques. A. O., & Corrondo. M. A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component : A Laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19416-19425.
- Gao., Huiju., Chu. X., Wang. Y., Zhou. F., Zhao. K., Mu. Z., & Qingsin., 2013. Media Optimization of *Trichoderma harzianum* ZF-2 for Laccase Production by using Respon Surface Methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1757-1764.
- PubChem *Chemistry database*. 2017. Tersedia di: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/coumpound/guaiacol#section=top>
- Naziz. M., 2013. Fermentation and Kinetic Study on Laccase Production by *Pynocorpus sanguineus*. *Disertasi*, University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Savitha, S. D., Tennali, G. B., Channur, N., Anup, A. C., Deshpande, B. P., & Murtuza, A. 2011. Isolation of laccase production fungi and partial characterization of laccase. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 1(4). 543-549.
- Patel, I. 2010. Studies into the chemoenzymatic modification of cellulose by the laccase/TEMPO system. *Disertasi*. Department of chemistry. University of Natural resources and Life Sciences. Vienna.
- Lu. R., & Miyakoshi, T. 2012. Studies on acetone powder and purified *Rhus* laccase immobilized on zirconium chloride for oxidation of phenol. *Enzyme Research*. Hindawi Publishing Corporation, 2012 (1), 1-8.
- Astina. D., 2017. Uji aktivitas enzim *laccase* produksi *Trichoderma* LBKURCC1. *Tesis*. Universitas Riau. Pekanbaru.