



Studi Kinetika Lakase untuk Proses Biorefining Pulp Kimia

Hendro Risdianto^{1*}, Sonny Kurnia Wirawan

Balai Besar Pulp dan Kertas, Kementerian Perindustrian, Jl. Raya Dayeuhkolot No. 132, Bandung 40258

*E-mail : hendrorisdianto@yahoo.com

Abstract

Laccase has a role to delignify lignin in unbleached pulp. This process could be used in refining process. Delignification could assist the water penetration into fiber. Therefore, the following refining process would be much easier. To determine the biorefining (laccase pretreatment) conditions, laccase is reacted with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) substrate. Concentration of ABTS and temperature of reaction were investigated in this study. A concentration of 0.1 – 2 and temperature of 30-70°C were used in this study. The Michaelis Menten Equation was used to estimate the Michaelis Menten Constant (K_m) and maximum of reaction rate (v_{max}). The result showed that K_m and v_{max} value were 0.213 and 0.0013 mM/s, respectively. The maximum reaction rate was observed at 50°C with the thermodynamic properties of activation energy and deactivation energy were 4.8 and 46,3 kcal/mol, respectively. Those conditions are useful for the refining pretreatment of chemical pulp.

Keywords: biorefining, delignification, laccase, Michaelis Menten

Pendahuluan

Pada proses pembuatan pulp dan kertas, refining merupakan proses untuk memodifikasi serat dengan tujuan meningkatkan ikatan serat dan mengembangkan kekuatan kertas. Karena pentingnya proses ini, maka proses refining merupakan jantung proses pembuatan kertas. Namun, proses refining merupakan proses dengan tingkat energi yang tinggi. Pada proses refining, terutama untuk pulp belum putih, lignin sangat berpengaruh terhadap hasil karena sifatnya yang hidrofob. Air membantu proses pengembangan serat selama refining. Lakase dengan kemampuannya mendegradasi lignin dapat membantu untuk proses penyerapan air yang akhirnya dapat membantu proses refining menghasilkan fibrilasi eksternal (Gharekhhani dkk., 2015). Lecourt dkk. (2010) telah menggunakan lakase dengan bantuan mediator sebagai perlakuan awal proses refining pulp belum putih Pinus radiate. Hasil perlakuan lakase mampu meningkatkan kualitas pulp untuk panjang putus dan kekuatan tarik. Proses refining dengan perlakuan lakase dapat menurunkan energi sebesar 36%.

Lakase (benzodiol: oxygen oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) merupakan enzim ekstraseluler yang menggunakan senyawa oksigen untuk menjalankan reaksi oksidasi berbagai senyawa oksigen untuk menjalankan reaksi oksidasi berbagai senyawa aromatik dan nonaromatik. Penggunaan lakase dalam proses refining pulp memerlukan kondisi yang optimum seperti konsentrasi substrat dan suhu (Hamidi, 2013).. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi tersebut dengan reaksi enzimatik lakase menggunakan senyawa aromatik dengan berat molekul besar mirip dengan lignin yaitu ABTS (2,2'-azinodi-[3-ethyl-benzo-thiazolin- 6-sulphonic acid])

Metode Penelitian

a. Enzim, substrat dan larutan penyangga

Enzim yang digunakan adalah lakase dari *Trametes versicolor* diperoleh dari Sigma Aldrich. Substrat untuk reaksi enzimatik adalah ABTS yang diperoleh dari Sigma Aldrich. Lakase sebanyak 0,01 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. diencerkan sampai tanda tera dengan aquadest. Larutan enzim dipipet ke dalam *tube scale* 0,5 mL dan dijadikan menjadi 20 tabung dan selanjutnya dilakukan pengenceran 4 kali. ABTS ditimbang sebanyak 0,0550 gram kemudian dibuat variasi konsentrasi yaitu 0,1 mM, 0,5 mM, 0,8 mM, 1 mM, 1,5 mM, dan 2 mM. Larutan penyangga asetat yang digunakan memiliki pH 4,6.

b. Penentuan kinetika lakase

Reaksi enzimatik dilakukan dalam kuvet pada suhu kamar yang terdiri atas 900 μ L larutan penyangga asetat 10 μ L lakase dan 100 μ L ABTS dengan variasi 0,1 mM, 0,5 mM, 0,8 mM, 1 mM, 1,5 mM, dan 2 mM). Setiap 5 menit diamati nilai absorbansi pada panjang gelombang 420 nm selama 120 menit menggunakan spektrofotometer Genesys 20. Aktivitas lakase ditentukan berdasarkan Risdianto dkk (2012).



Penentuan kinetika reaksi lakase ditentukan dengan mengukur aktivitas lakase pada berbagai konsentrasi substrat. Parameter kinetika ditentukan dengan menginkubasikan enzim dengan berbagai variasi substrat dan suhu. Selanjutnya, nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimum (V_{maks}) dapat ditetapkan dengan menggunakan beberapa persamaan seperti persamaan Lineweaver-Burk (1), Hanes-Woolf (2) dan Eadie-Hofstee (3).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks} [S]} + \frac{1}{V} \quad (1)$$

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{maks}} [S] + \frac{K_m}{V_{maks}} \quad (2)$$

$$V = - \frac{K_m V}{[S]} + V_{maks} \quad (3)$$

c. Penentuan kondisi suhu optimum

Perlakuan lakase dengan ABTS seperti dijelaskan pada penentuan kinetika lakase namun dengan variasi suhu 30-70°C.

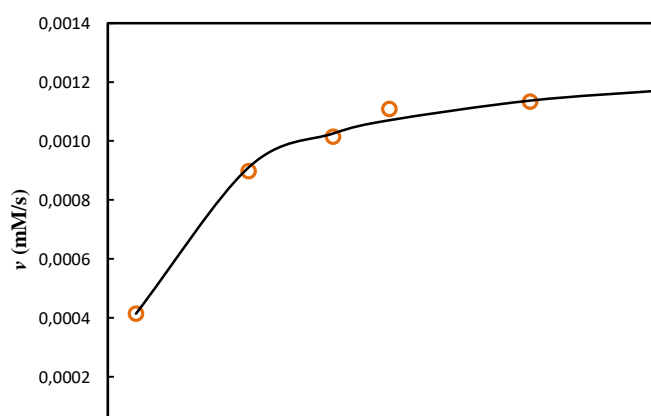
Hasil dan Pembahasan

a. Parameter Michaelis Menten

Penentuan nilai K_m dan V_{maks} diperlukan untuk mengetahui kinetika reaksi dari suatu enzim, dan bermanfaat sebagai informasi dasar terhadap penggunaan enzim tersebut. Nilai K_m dan V_{maks} dari suatu enzim dapat diketahui berdasarkan aktivitas suatu enzim pada variasi konsentrasi substrat yang berbeda yakni 0.1 mM – 1 mM yang berfungsi untuk pembuatan kurva Michaelis-Menten (Gomes dkk., 2009). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi atau aktivitas enzim digambarkan pada plot Michaelis-Menten (Gambar 1). Peningkatan aktivitas lakase belum murni terjadi secara linear dari konsentrasi 0.1 mM sampai dengan 1 mM. Hal ini dijelaskan melalui teori kinetika bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat maka energi dan frekuensi benturan juga akan semakin tinggi sehingga kompleks antara enzim dengan substrat dalam membentuk kompleks akan semakin banyak (Saropah dkk., 2012). Nilai K_m dan V_{maks} ditentukan melalui beberapa pendekatan yakni persamaan Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, dan Hanes-Woolf seperti disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai K_m dan V_{maks}

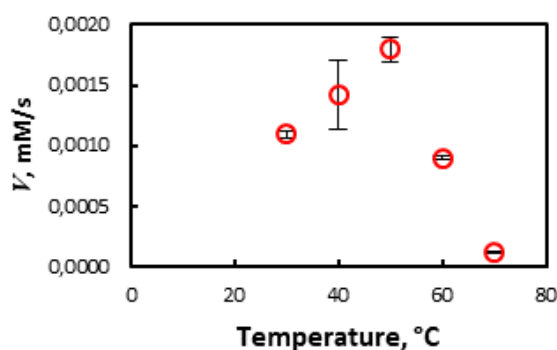
Metode	K_m	V_{maks} (mM/min)
Lineweaver-Burk	0,2133	0,0013
Eadie-Hofstee	0,2141	0,0013
Hanes-Woolf	0,2069	0,0013



Gambar 1. Kurva Michaelis-Menten

b. Suhu optimum

Aktivitas lakase meningkat saat suhu dinaikkan sampai mencapai maksimal dan kemudian menurun seperti disajikan pada Gambar 2. Suhu optimum reaksi enzimatik lakase adalah 50°C. Kenaikan suhu di atas suhu optimum reaksi enzimatik akan menyebabkan denaturasi enzim sehingga kecepatan reaksinya menurun. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang menyatakan bahwa aktivitas optimum lakase berada pada kisaran suhu 50 - 75°C (Patrick dkk, 2009; Reiss dkk, 2011)



Gambar 2. Suhu optimum kecepatan reaksi lakase

Kesimpulan

Kinetika reaksi enzimatik lakase dapat didekati dengan persamaan Michaelis-Menten dan suhu optimum 50°C. Hasil ini dapat digunakan untuk proses perlakuan awal pada refining pulp kimia.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini didanai oleh Balai Besar Pulp dan Kertas tahun 2016. Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim penelitian di BBPK, Nurulaeli Fidayanti Ahsani dan Mirna Ulfa Fauziah dari UIN Sunan Gunung Djati yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Daftar pustaka

- Hamidi, NH. Enzymatic depolymerization of lignin by laccases. University of Nottingham, Ph.D Thesis, 2013.
- Lecourt, M., Soranzo, A. and Petit-Conil, M. Refining of Pine radiata and eucalyptus kraft pulps assisted with commercial laccase mediator systems, *O PAPEL* 2010, 72(8), pp. 57–61.
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H. and Setiadi, T. Optimisation of laccase production using white rot fungi and agriculture wastes in solid state fermentation, *ITB Journal of Engineering Science* 2012, 44 B(2). doi: 10.5614/itbj.eng.sci.2012.44.2.1.
- Gomes, E., Aguiar, A. P., Carvalho, C. C., Bonfá, M. R. B., Da Silva, R. and Boscolo, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes, *Brazilian Journal of Microbiology* 2009, 40(1), pp. 31–39. doi: 10.1590/S1517-83822009000100005.
- Saropah, D. A., Jannah, A. and Maunatin, A. Kinetika Reaksi Enzimatik Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul, *Alchemy* 2012, 2(1), pp. 35–45.
- Patrick F., Mtui G., mshandete, AM., Johansson G., Kivaisi A. Purification and characterization of a laccase from the basidiomycete *Funalia trogii* (Berk.) isolated in Tanzania. *African Journal of Biochemistry Research* 2009, Vol. 3 (5), pp. 250-258.
- Reiss R., Ihssen J., Thöny-Meyer L. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology* 2011, 11:9, pp. 1-11.



Lembar Tanya Jawab

Moderator : Didi Dwi Anggoro (Universitas Diponegoro Semarang)
Notulen : Alfiena Intan Zahirah

- Penanya : Achmad Chumaedi (Teknik Kimia Polinema)
Pertanyaan : Reaksi: $E + S \rightleftharpoons ES$, bukannya harusnya ada enzim diruas kanan?
Jawaban : Ya benar. Tetapi enzim sebagai biokatalis dan akan kembali lagi yang ditinjau adalah persamaan Michaelis-Menten
- Penanya : Didi Dwi Anggoro (Universitas Diponegoro Semarang)
Pertanyaan : Apa alasan digunakan suhu 30-70°C?
Jawaban : Lakase diproduksi pada suhu ruang, tetapi kondisi operasi pulp dan kertas sekitar 50-60°C. Enzim dapat bekerja dengan baik sekitar 50°C sesuai kondisi operasi pabrik.

