

POTENSI JAMUR TIRAM PUTIH (*QTRAMETES SP.*) KAYA LAKASE UNTUK BIOMODIFIKASI MODEL LIMBAH OBAT INDUSTRI FARMASI

Yusnidar Yusuf, Fitriani, Fitri Yuniarti

Fakultas Farmasi Dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof.DR.Hamka Jakarta
yusnidaryusuf@uhamka.ac.id

ABSTRAK

Proses sintesis kimia dari industri farmasi menghasilkan air limbah yang memiliki karakter bervariasi. Pembuangan bahan limbah seperti obat yang tidak digunakan lagi, fasilitas untuk produksi farmasi, limbah rumah sakit, ini merupakan sumber polutan. Lakase (EC.1.10.3.2) merupakan enzim oksidoreduktase, termasuk dalam kelompok enzim yang disebut protein tembaga biru (*blue copper protein*), protein enzim ini mengandung logam tembaga katalitik, yang dapat mengikat oksigen molekuler dan dapat mengoksidasi substrat kaya elektron yang berasal dari fenolik dan non-fenolik dengan air dengan mekanisme reaksi katalis-radikal. Lakase terdapat pada tanaman tingkat tinggi yang sudah lapuk, seperti halnya jamur, bakteri dan serangga, dan kelompok yang paling banyak ditemukan dari enzim hingga saat ini berasal dari jamur, memiliki fungsi lakase yang beragam. Model kimia yang dipilih untuk penelitian ini adalah diklofenak dan ibuprofen, karena merupakan obat yang muncul dengan frekuensi terbanyak dalam analisis air limbah akibat konsumsi yang digunakan sebagai anti-inflamasi dan analgesik. Isolasi parsial enzim lakase menggunakan garam amonium sulfat, aktivitas enzim lakase diuji potensinya sebagai katalis reaksi biodegradasi limbah farmasi. Sampel sebagai bahan aktif secara umum dievaluasi dengan secara eksperimental untuk melihat degradasi biologis sederhana, yaitu menggunakan lakase mentah dari spesies *Trametes*. Hasil optimal dicapai sebagai enzim mentah dengan cara diendapkan menggunakan aseton dengan kadar 60%; aktivitas spesifik ditemukan menjadi 0,67 (unit / mg), dan menunjukkan dapat dimanfaatkan untuk menangani pengurangan bahan limbah farmasi berbahaya. Biomodifikasi sangat diharapkan untuk dilakukan pada penelitian selanjutnya karena memiliki efek positif yang dapat menurunkan tingkat toksisitas dari obat-obatan yang terdapat sebagai limbah.

Kata Kunci : Enzim lakase, biomodifikasi, limbah farmasi

ABSTRACT

Chemical synthesis processes of the pharmaceuticals industry produce wastewaters which are variable in character and highly strong. Disposal of waste materials such as unused drugs, pharmaceutical production facilities, hospital wastes are the origin of the pharmaceutical pollution. Laccase is a copper-containing phenol oxidase, which can oxidize electron-rich substrates of phenolic and non-phenolic origin with a concomitant reduction of oxygen to water through a radical-catalyzed reaction mechanism. Laccases are present in higher plants, fungi, bacteria and insects, and the most studied group of enzymes to date is from fungal origin, also the functions of laccases are diverse. The chemical model chosen for the study were diclofenac and ibuprofen, as it is one of the drugs that appears with the most frequency in the analyses of waste waters due to its high consumption as an anti-inflammatory and analgesic. A

model sample for representative as common active materials was experimentally evaluated to assess the simple biological degradation, using crude laccase from *Trametes* species. Optimal results were achieved as the crude enzyme was precipitated with 60% acetone method ; the specific activity was found to be 0.67 (unit/mg), and showed can be exploited for handling the reduce of hazardous pharmaceutical waste materials.

Keywords: Enzymatic Degradation, waste by lacase, trametes sp.

PENDAHULUAN

Enzim lakase (E.C. 1.0.10.3.2). diproduksi oleh berbagai jenis jamur dan tumbuhan tingkat tinggi (Mayer dan Staples, 2002). Jamur pelapuk putih sudah diketahui sebagai kelompok jamur yang mampu mendegradasi lignin dengan menghasilkan enzim lakase (Sanchez, 2009). Enzim ini ditemukan pertama kali pada getah pohon pernis yang tumbuh di Jepang yaitu *Rhus vernicifera* pada tahun 1883, dan selanjutnya diketahui tersebar di tanaman dan jamur. Enzim ini merupakan enzim merupakan struktur benzendiol, oksigen reduktase dan sebagian merupakan glikoprotein ekstraseluler yang mengandung atom tembaga dan gugus enzimnya dinamakan oksidase tembaga biru. Lakase merupakan enzim monomerik, dimerik tetramerik dengan bobot molekul 60 – 80 kDa.

Enzim ini dapat ditemukan dalam bentuk jamur-jamur yang sangat mudah kita jumpai sehari-hari di sekitar kita. Jamur ini segera tumbuh pada batang pohon yang telah mati/tumbang. Jamur yang demikian diketahui termasuk jenis jamur pelunak golongan *trametes* spesies. Selain itu enzim lakase juga ditemukan dalam jamur tiram putih, yang dapat dikonsumsi dan tidak beracun. Jamur golongan ini termasuk dalam golongan *pleurotus* spesies.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah studi pendahuluan potensi jamur tiram putih yang tumbuh lokal di Jakarta untuk dimanfaatkan sebagai katalis ramah lingkungan untuk menurunkan kandungan limbah bahan obat, dengan model kandungan ibuprofen dan diclofenac dengan cara ekstraksi enzim lakase secara sederhana dan analisis biodegradasi bahan obat dalam limbah dengan alat spektrofotometer UV-Visible.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Jamur tiram putih, amonium sulfat, etanol, etil asetat, BSA, pereaksi Lowry, bufer asetat. Natrium diclofenac, ibuprofen. Aquades. Alat. : Spektrofotometer UV-Vis. FT-IR.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi Lakase

Analisis aktivitas enzim tiap hari diawali dengan ekstraksi enzim dari jamur tiram putih 250 gram, menggunakan larutan asetat bufer pH 4,6 sebanyak 500 mL pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 1 jam. Larutan dan substrat didekantasi dari labu dan dipindahkan kedalam tabung sentrifugasi lalu didinginkan, dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 2000 rpm.

Analisis Aktivitas Lakase (Yusnidar, 2014)

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan cara memasukkan supernatan contoh sebanyak 50 μL ke dalam 150 μL larutan 0,5 mM guaikol. Absorbansi dimernya diamati pada panjang gelombang 500 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visible. Perubahan absorbansi dimer produk guaiakol diamati setiap menit selama 10 menit. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengoksidasi 1 μmol guaiakol tiap menit pada suhu 28°C.

Analisis Konsentrasi Protein

Pengujian protein dilakukan dengan menggunakan larutan Lowry. Sebanyak 100 μL supernatan (cairan sampel yang telah disentrifugasi) dicampurkan dengan 2 mL larutan Bradford dalam kuvet. Campuran tersebut kemudian dihomogenasi menggunakan *vortex mixer* selama 10 detik. Campuran didiamkan selama 10 menit sebelum dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm

Reaksi biodegradasi model larutan limbah farmasi

Disiapkan larutan yang berbasis air-etanol (1:1) sebanyak masing-masing 100 mL yang mengandung 10.000 ppm senyawa ibuprofen atau natrium diclofenac. Selanjutnya disiapkan larutan yang berupa isolat enzim lakase 10% dalam air sebanyak 20 mL dicampurkan dengan masing-masing 50 mL larutan ibuprofen atau natrium diclofenac, diaduk selama 30 menit, serta ditambahkan beta-naftol sebanyak 2500 ppm sebagai mediator. Selesai pengadukan, campuran dimasukkan dalam corong pisah, tambahkan 15 mL etil asetat, dikocok, fasa etil asetat diambil,

ditambahkan pengering natrium sulfat, dan disaring. Filtrat masing-masing sampel diuapkan, dan selanjutnya dianalisis dengan KLT dengan pelarut pengembang heksan: etilasetat (2:1).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Enzim Kasar Lakase

Ekstraksi enzim lakase dari jamur *Trametes* diawali dengan pemotongan badan jamur yang relatif keras menjadi lebih kecil-kecil, dan selanjutnya dihaluskan dengan di blender dan ditambahkan aquades, dan disaring menggunakan kain kasar utk menahan serpihan yang ukuran besar.



Gambar 3. Sampel *Trametes sp.*

Filtrat yang diperoleh ditambahkan aseton dingin, dibiarkan agar terjadi pengendapan. Hasil pengendapan dipisahkan dari filtratnya. Selanjutnya pada filtrat ditambahkan amonium sulfat 70% untuk memperoleh endapan tahap kedua, serta diukur kadar proteinnya menggunakan spektrofotometer, serta pengukuran aktivitas enzim kasar.



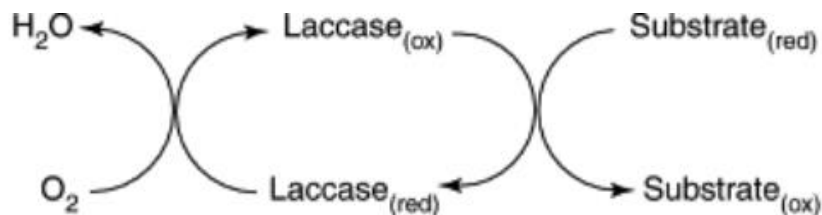
Gambar 4. Ekstrak aseton enzim kasar lakase

Pengukuran aktivitas lakase dengan mengukur perubahan guaiakol sesuai metode (Yusnidar, 2014). Perubahan absorbansi pada lambda-maksimum terukur 460 nm, adalah dimer produk guaiakol sebagai hasil aktivitas spesifik sampel enzim diamati setiap menit selama 10

menit. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengoksidasi 1 μmol guaiakol tiap menit pada suhu 28°C . Parsial purifikasi dilakukan dengan dua tahapan, yaitu pengendapan dengan aseton dingin dan dilanjutkan dengan penambahan amonium sulfat 70%. Dari hasil perhitungan menggunakan kandungan protein yang dimilikinya, diperoleh aktivitas spesifik enzim lakase sebesar 0,67 (unit/mg).

Modifikasi Diclofenac dan ibuprofen

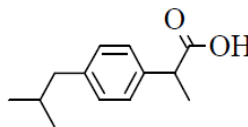
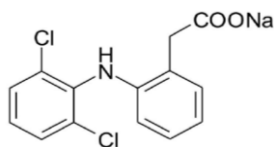
Enzim lakase mempunyai mekanisme seperti gambar berikut : Lakase menggunakan oksigen atmosfer untuk direduksi menjadi air/ H_2O , secara bersamaan enzim lakase sendiri akan teroksidasi. Peristiwa reaksi berantai ini dikenal dengan reaksi kopling. Untuk mengembalikan fungsi enzim kembali, sistem reaksi kopling ini dilengkapi dengan sistem reaksi tambahan yaitu adanya senyawa yang tersedia dan siap mereduksi enzim lakase.



Gambar 5. Mekanisme reaksi enzim lakase.

Sesuai mekanisme diatas, maka secara biologi selalu tersedia suatu substrat yang siap mereduksi enzim lakase yang telah melakukan reduksi oksigen udara menjadi materi air. Hal ini menarik perhatian para peneliti bahwa tersedianya substrat yang mampu mereduksi enzim lakase jelas akan berkaitan dengan struktur yang dimilikinya. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok senyawa yang disebut substrat dalam gambar diatas adalah senyawa berstruktur dasar fenolik. Telah diketahui bahwa fenolik mempunyai karakter sebagai pereduksi yang baik karena mempunyai gugus hidroksi yang terikat pada aromatik. Contoh substrat ini benzendiol.

Dalam penelitian ini dirancang bahwa dengan karakter seperti diterangkan diatas maka substrat ini bisa kita andaiakan suatu materi yang mirip, maka dipilihlah model struktur senyawa organik diclofenac dan ibuprofen.

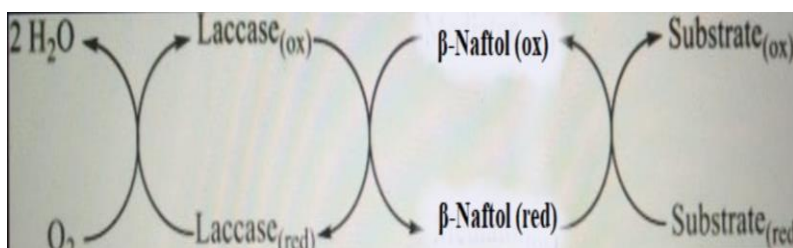


Na-diclofenac

Ibuprofen

Senyawa ini mempunyai struktur yang mirip yaitu terdiri atas aromatik dan gugus fungsi. Diharapkan dengan adanya reaksi yang melibatkan oksigen, substrat dan enzim akan terjadi oksidasi substrat dalam hal ini diclofenac atau ibuprofen. Hasil oksidasi ini dikenal dengan biomodifikasi.

Dari penelitian terdahulu diterangkan bahwa dalam optimasi reaksi yang dirancang, disimpulkan bahwa dengan adanya senyawa organik lainnya diikutkan dalam system reaksi ini, dapat menaikkan efektivitas biomodifikasi. Dari penelitian ini dirancang penambahan senyawa tipe fenolik yaitu beta-naftol, dengan skema reaksi yang diharapkan seperti gambar berikut ini.



Gambar 6. Pemanfaatan senyawa perantara beta-naftol dalam reaksi biomodifikasi

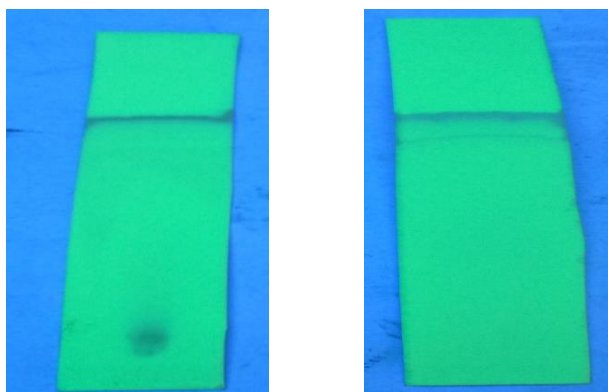
Beta-naftol dalam hal ini dapat berperan langsung mereduksi enzim lakase sehingga enzim dapat aktif kembali secara kontinu, dan hasil akhir diharapkan adalah substrat (diclofenac atau ibuprofen) akan teroksidasi lebih efektif.

Selanjutnya, hasil pemisahan produk biomodifikasi seperti gambar berikut. Pemisahan substrat dilakukan dengan metode pemisahan cai-cair dengan alat corong pisah. Produk biomodifikasi ditunjukkan dalam fasa cairan atas yang larut dalam pelarut etil asetat yang ditambahkan.



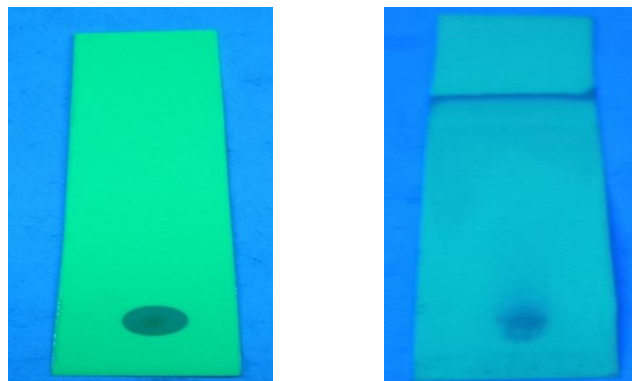
Gambar 7. Ekstraksi produk biomodifikasi diclofenac

Analisis lanjut menggunakan kromatografi lapis tipis seperti gambar, diketahui bahwa proses reaksi selama 5x2 jam disimpulkan dapat menghilangkan diclofenac secara nyata ditandai dengan tidak adanya noktah lagi, dan diduga telah berubah menjadi senyawa lain.



Gambar 8. Analisis KLT diclofenac dan produk biomodifikasi

Demikian hal nya dengan model sampel lainnya, ibuprofen seperti gambar berikut, ada perubahan terhadap noktah setelah mengalami kondisi reaksi 8x 2 jam. Dari data kromatografi terlihat ada produk lain yang mempunyai polaritas yang sangat berbeda dengan ibuprofen, dan terlihat juga masih ada ibuprofen yang masih tersisa.



Gambar 9. Analisis KLT ibuprofen dan produk biomodifikasi

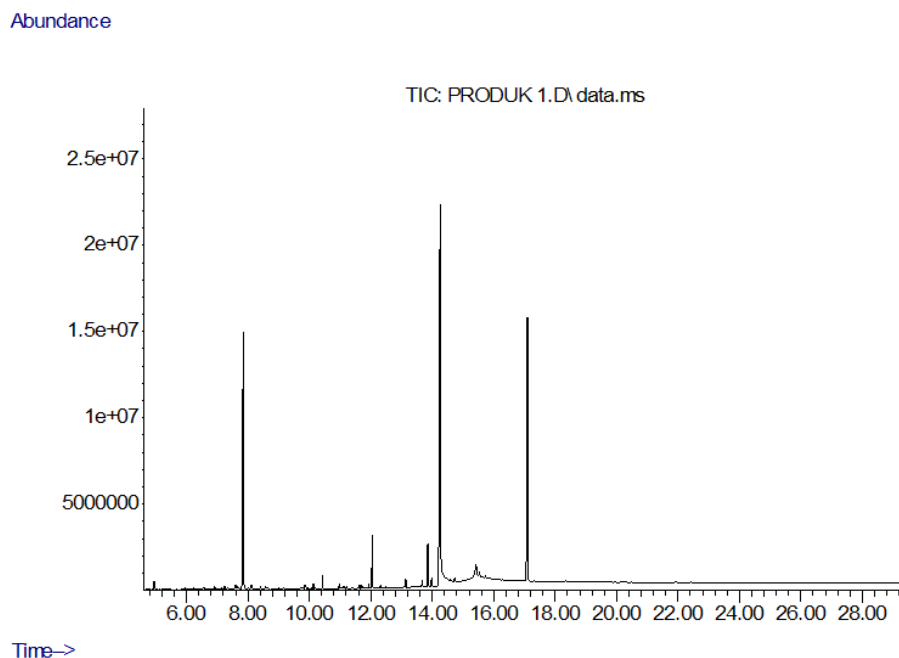
Dari data analisis awal menggunakan kromatografi, dapat disimpulkan bahwa telah terjadi proses biomodifikasi sampel uji diclofenac dan ibuprofen. Substrate diclofenac diketahui lebih mengalami biomodifikasi lebih banyak dibandingkan ibuprofen. Maka enzim lakase dari ekstraksi jamur pelapuk putih (*Trametes sp.*) mempunyai potensi yang baik untuk memodifikasi senyawa organik, dalam hal ini dimodelkan sebagai limbah farmasi.

Analisis produk modifikasi Diclofenac dan ibuprofen

Analisis lanjutan dalam penelitian ini adalah identifikasi perubahan struktur diclofenac dan ibuprofen yang diduga mengalami modifikasi dengan menggunakan gas kromatografi spektrometri massa. Analisis dilakukan dengan instrumen kromatografi gas- spektrometri massa (GC-MS) dengan kondisi seperti dalam lampiran 1.

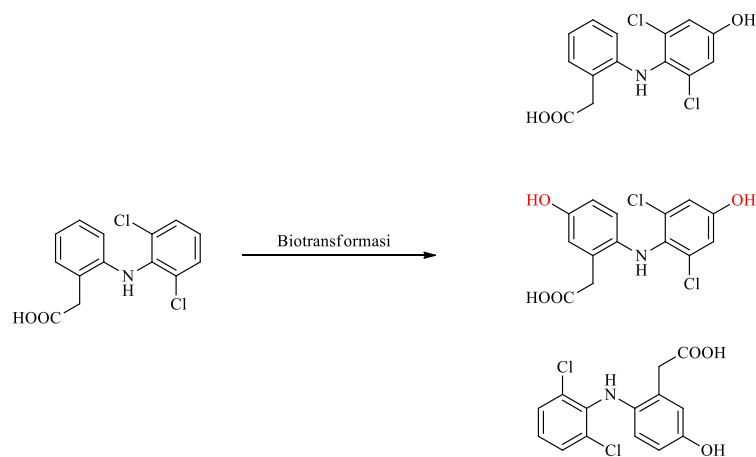
Biomodifikasi Ibuprofen

Penelitian lanjut terhadap senyawa model ke-II yaitu diclofenac dengan bantuan gas kromatografi, memberikan hasil seperti berikut :



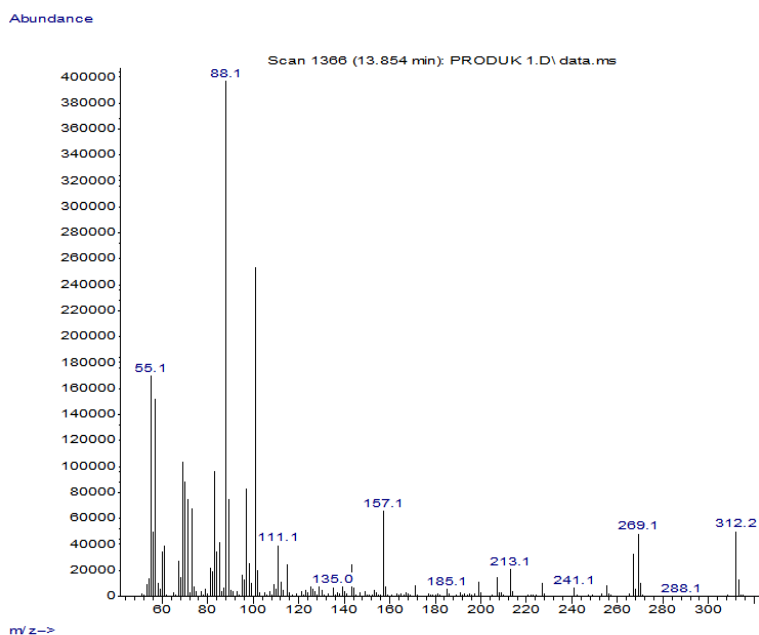
Gambar 12. Gas kromatografi produk reaksi diclofenac

Dari data penelitian ini yang menggunakan enzim kasar jamur *trametes sp.* menunjukkan adanya perubahan struktur organik yang dapat didesainkan seperti Gambar 13. Dari senyawa model diclofenac, telah diketahui adanya lajur (*biomodification pathway*) biomodifikasi sebagai berikut :



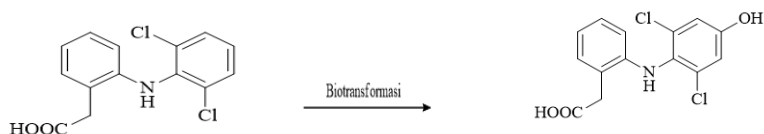
Gambar 13. Model reaksi hidroksilasi produk biomodifikasi diclofenac.

Reaksi oksidatif enzimatis dalam fisiologi biokimia telah ditemukan bahwa reaksi tersebut berupa penambahan gugus hidroksi (-OH), yang terjadi langsung pada struktur utama aromatik. Hidroksilasi ini dapat terdeteksi juga dalam pola dihidroksi maupun mono hidroksi. Reaksi oksidatif enzimatis ini diketahui salah satunya oleh adanya peran utama enzim sitokrom P450. Dalam penelitian ini, data GC-MS menunjukkan adanya produk baru yang teridentifikasi dengan pemilihan produk reaksi utama pada waktu retensi 17 menit, dengan data fragmentasi seperti gambar berikut, dengan terdeteksinya nilai m/z 279 dengan hasil fragmentasi sebagai berikut :

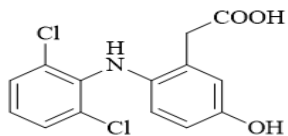


Gambar 14. Massa spektrometri produk reaksi diclofenac

Hasil tersebut sesuai dengan adanya kemungkinan reaksi enzimatis lakase trametes yang dapat merubah struktur aromatik pada senyawa diclofenac mengalami hidroksilasi , seperti pada gambar berikut



atau



Gambar 15. Produk hidroksilasi senyawa diclofenac oleh enzim lakase *trametes sp.*

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dengan menggunakan dua model senyawa organik fenolik ibuprofen dan diclofenac, dapat diambil kesimpulan bahwa jamur pelapuk kayu (*trametes sp.*) mempunyai kandungan enzim, yaitu lakase. Ekstrak kasar lakase dengan waktu kontak reaksi selama 5 jam dengan senyawa-senyawa model di atas diketahui mempunyai kemampuan sebagai katalis biomodifikasi dengan kemampuan reaksi hidroksilasi.

Enzim lakase termasuk dalam kelompok oksidoreduktase, sehingga dengan terdeteksinya gugus hidroksi (-OH) pada produk intermediet dapat disimpulkan bahwa senyawa model yang dirancang dalam penelitian ini mengalami biotransformasi. Berdasarkan hal tersebut disimpulkan bahwa enzim kasar lakase dari jamur *trametes species sp.*, mempunyai kemampuan untuk memodifikasi senyawa organik, seperti senyawa diclofenac menjadi senyawa hidroksi-diclofenac.

REKOMENDASI

Penelitian lanjut dimasa mendatang yang berkaitan dengan sifat toksisitasnya sangatlah penting untuk dilakukan oleh peneliti-peneliti selanjutnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada Kemenristek Dikti yang telah memberikan bantuan berupa dana penelitian, juga kepada Lemlitbang UHAMKA dibawah Pimpinan Prof. Dr. Suswandari, M.Pd beserta staf dan Tim, dan Kepada Rektor UHAMKA beserta jajarannya yang juga telah membantu memfasilitasi penelitian ini, juga kepada kolega teman-teman dari kimia FMIPA UI yang banyak memberikan saran dan petunjuk.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariel Marchlewicz., Dorota D., Urszula G., Danuta W., (2015), Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2015)14:229– 239.
- Ikehata, K., Naghashkar, N.J. and Gamal El-Din, M. (2006) Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone: Sci. Eng.* 28, 353-414.
- Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, M., (2010), Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens, *Biochemical Engineering Journal* , 51 (2010) 124–131.
- Tina K., Ester H., (2008), Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 10.
- Tita B., Bandur, G., Tita D., (2013). Novel Cu(II) Complex with Non-steroidal Antiinflammatory Drugs Synthesis, characterization and thermal investigation of the complex with ibuprofen, *REV. CHIM. (Bucharest)*: 64 ,No. 6.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Kohler, H.R. and Schwaiger, J. (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects

- in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat.Toxicol.* 68(2), 151-166.
- Wintgens, T., Melin, T., Schafer, A., Khan, S., Muston, M., Bixio, D. and Thoeye, C. (2006). The role of membrane processes in municipal wastewater reclamation and reuse. *Desalination* 187, 271-282.
- Yusnidar Y, Budi A, Cahyana H., (2014), Syntheses via phenolic oxidative coupling using crude peroxidase from *Brassica juncea* (L) Czern leaves and antioxidant evaluation of dimeric thymol. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 3(6), 1100-1110.