

PENGARUH PENAMBAHAN LAKASE DARI JAMUR TIRAM PUTIH (*Pleurotus ostreatus*) TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN TEH HIJAU

[Effect of The Addition of Laccase from White Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Towards Antioxidant Activity of Green Tea]

Tagor M. Siregar^{1)*}, A. Herry Cahyana²⁾, dan Natalia¹⁾

¹⁾ Jurusan Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan, Tangerang

²⁾ Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Jakarta

Diterima 09 April 2010 / Disetujui 12 Maret 2012

ABSTRACT

Laccase is one of the enzymes that can be used in organic synthesis using aromatic compounds (polyphenols and aminofenol) as substrates. Polyphenol compound in green tea is flavan-3-ols or catechin which are susceptible to enzymatic reaction with laccase. In this research laccase isolated from white oyster mushroom was added into the green tea extract. Addition of laccase is expected to yield products with a higher antioxidant activity. Prior to its use, laccase activity was determined and had a specific activity of 0.54 Unit/mg. The green tea extract was prepared using methanol and water as solvents. The antioxidant activity was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity method and the total flavonoid content was assayed by spectrophotometry. Antioxidant compounds are identified by using UV-Vis spectrophotometry and GC-MS. Addition of laccase into green tea extract resulted in precipitates showing a significant increase in flavonoid content and antioxidant activity. Use of methanol as solvent resulted in extract with higher antioxidant activity and total flavonoid than that extracted with water. Qualitative analysis with spectrophotometer UV-Vis and GC-MS showed that the new components in the precipitates were a variety of dimeric products with increased molecular weight and antioxidant activity. Addition of laccase into green tea extract has yielded products with higher antioxidant activity.

Key words: antioxidant, catechin, green tea, laccase enzyme, white oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)

PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memperlambat reaksi oksidasi, karena kemampuannya bereaksi dengan radikal bebas. Salah satu dampak buruk yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap kesehatan adalah timbulnya penyakit kanker. Manfaat antioksidan yang baik bagi tubuh manusia menyebabkan berbagai upaya telah dilakukan untuk mengeksplorasi sumber-sumber antioksidan dari berbagai tanaman. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan melakukan sintesis organik terhadap senyawa antioksidan yang terkandung di dalam suatu bahan. Sintesis organik pada dasarnya merupakan suatu reaksi kimia organik yang terjadi pada suatu substrat dengan melibatkan katalis. Produk yang dihasilkan dari sintesis organik ini diharapkan akan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Enzim sebagai biokatalis dapat digunakan dalam sintesis organik, karena kemampuannya yang spesifik. Lakase merupakan salah satu enzim yang dapat digunakan dalam sintesis organik, dengan substrat berasal dari komponen aromatik (polifenol dan aminofenol). Sebagai enzim yang termasuk golongan oksidoreduktase, lakase dapat mengoksidasi komponen aromatik tersebut dengan mereduksi satu molekul oksigen menjadi dua molekul air (Leite *et al.*, 2003). Teh hijau diketahui memiliki aktivitas antioksidan, yang disebabkan oleh kandungan flavonoidnya. Senyawa polifenol seperti flavonoid merupakan tipe substrat yang dapat digunakan oleh lakase. Katekin merupakan senyawa flavonoid utama yang ter-

dapat di dalam teh hijau. Berdasarkan strukturnya katekin berpotensi untuk disintesis menghasilkan produk baru dengan kemampuan antioksidan yang meningkat. Penelitian yang dilakukan Hosny dan Rosazza (2002) menunjukkan reaksi antara katekin dan lakase dapat membentuk variasi komponen produk polimer, dimer, dan oligodimer. Jamur memiliki kandungan mikronutrien yang lengkap, yakni vitamin B1, B2, D, niasin, serta berbagai unsur mineral yang diperlukan oleh tubuh, seperti kalium, kalsium, natrium, dan magnesium sehingga baik untuk dikonsumsi (Henky, 2004). Jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) adalah salah satu jamur konsumsi yang mudah dikenali. Hasil penelitian Henky (2004), Cahyana (2005), dan Leite *et al.* (2003) menunjukkan bahwa jamur tiram putih mengandung lakase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan lakase dari jamur tiram putih terhadap aktivitas antioksidan teh hijau. Penambahan lakase yang diekstrak dari jamur tiram putih ke dalam substrat (ekstrak teh hijau) diharapkan akan menghasilkan produk dengan kemampuan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Selain itu, jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi teh hijau juga akan dilihat pengaruhnya terhadap karakteristik dari produk baru yang dihasilkan.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah jamur tiram putih segar (*Bionic Farm*, Jakarta Raya), ekstrak teh hijau bubuk kering (*Nikken Foods Company*, St. Louis, USA),

*Korespondensi Penulis :
Email : tagor.siregar@uph.edu

akuades, akuabides, larutan buffer fosfat 0,2 M (KH_2PO_4) pH 6,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pereaksi *Folin Ciocalteu* p.a., metanol teknis 80%, metanol p.a., larutan DPPH 0,2 mM, larutan *Pyrocatechol* 0,2 M, AlCl_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5%, *Bovine Serum Albumin*, Na_2CO_3 2%, NaOH 0,1 N, Na-K Tartarat p.a.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah Hettich *centrifuge* EBA-20, Turner spektrofotometer SP-830, neraca analitik, lishin *freeze dryer*, Hitachi Spektrofotometer UV-VIS U-1800, Knauer HPLC, *Agilent Technologies* 6890 *Gas Chromatograph*, 5973 *Mass Selective Detector*, dan *Chemstation data system*.

Isolasi enzim kasar lakase (modifikasi Hernandez et al., 2001)

Jamur tiram putih segar ditambahkan 0,2 M larutan buffer fosfat pH 6,0 (1:2) dalam keadaan dingin (suhu 10°C), kemudian dihancurkan dengan blender. Homogenat yang diperoleh disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapannya. Supernatan tersebut ditambahkan garam ammonium sulfat 50% (b/v) dan diaduk dengan stirrer selama 2 jam, kemudian larutan diendapkan semalaman. Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang 25°C. Endapan menyandang enzim lakase kemudian disuspensikan dalam 0,2 M larutan buffer fosfat pH 6,0.

Penentuan aktivitas enzim lakase (Laela, 2005)

Aktivitas enzim lakase ditetapkan dengan mereaksikan hasil isolasi enzim kasar lakase dengan *pyrocatechol*. Ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 6; 2,5 mL larutan *pyrocatechol* 0,2 M; 0,5 mL akuades, dan 0,5 mL sampel enzim. Larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Reaksi dihentikan dengan merendam tabung dalam air mendidih selama 3 menit. Aktivitas enzim diukur pada suhu 25°C dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang $\lambda = 470 \text{ nm}$. Aktivitas spesifik enzim dapat dihitung berdasarkan *Worthington Manual Enzym*.

$$\text{Aktivitas enzim (unit/mg)} = \frac{A_{470 \text{ nm}} / \text{menit}}{6,58 \times \text{mg} / \text{mL protein}}$$

Persiapan substrat ekstrak teh hijau

Ekstrak teh hijau dilarutkan dalam dua jenis pelarut, yaitu metanol 80% dan air. Substrat yang digunakan untuk pencampuran dengan enzim maupun analisis, dibuat dalam perbandingan 1 gram ekstrak teh hijau: 100 mL pelarut.

Penambahan enzim lakase pada substrat ekstrak teh hijau (modifikasi Hosny dan Rosazza, 2002)

Pencampuran dengan menambahkan hasil isolasi enzim kasar lakase sebanyak 20 mL pada substrat ekstrak teh hijau sebanyak 100 mL, dilakukan baik dengan pelarut metanol maupun air. Pencampuran dalam suhu ruang 25°C dan dibiarkan bereaksi selama 3 jam. Hasil yang diperoleh berupa filtrat dan endapan, dipisahkan dengan kertas saring. Filtrat hasil pemisahan langsung dianalisis, sedangkan endapan dikering-

kan dahulu dengan *freeze dryer*. Endapan dari substrat teh hijau baik dengan pelarut metanol maupun air, dilarutkan kembali dalam metanol 80% (1:100) untuk dianalisis.

Analisis total flavonoid (Huang et al., 2005)

Ditimbang 2 gram AlCl_3 lalu dilarutkan dalam metanol p.a. hingga volume mencapai 100 mL. Sebanyak 4 mL larutan AlCl_3 2% dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 4 mL larutan sampel lalu dikocok. Pengukuran absorbansi dilakukan setelah inkubasi selama 10 menit pada panjang gelombang 367 nm. Blanko yang digunakan adalah 4 mL larutan AlCl_3 2% dengan 4 mL akuades.

Analisis free radical scavenging activity (Amin dan Lee, 2005)

Larutan sampel sebanyak 0,2 mL dicampur dengan 1 mL larutan campuran 0,2 mM DPPH dengan metanol p.a. kemudian ditambahkan metanol 6,8 mL. Sampel diaduk dan disimpan selama 30 menit, setelah itu absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang $\lambda = 517 \text{ nm}$ dengan larutan kontrol 1 mL DPPH ditambahkan 7 mL metanol. Aktivitas *radical scavenging* dihitung dengan mengukur perbedaan absorbansi dari radikal DPPH menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas radical scavenging (\%)} = \frac{(A_k - A_s)}{A_k} \times 100 \%$$

Keterangan : A_s = absorbansi sampel; A_k = absorbansi kontrol

Pengukuran absorbansi sampel dan kontrol dilakukan setiap 5 menit selama 30 menit.

Analisis dengan spektrofotometer UV-VIS

Sampel diencerkan baik dengan pelarut metanol maupun air. Sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam kuvet. Pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang antara 200-500 nm untuk melihat *peak* tertinggi.

Analisis dengan GC-MS

Pengujian dilakukan menurut metode Balai Penelitian Kesehatan Daerah DKI Jakarta. Sebanyak 5 μL sampel disuntikan ke dalam GC-MS. Elektron energi sebesar 70eV, temperatur suntikan 250°C, temperatur sumber ion 230°C, temperatur *interface* 280°C, dan temperatur *Quadrupole* 140°C. Helium sebagai gas pembawa dengan aliran 0,9 $\mu\text{L}/\text{menit}$.

Analisis data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dua faktor dengan perlakuan 2 x 3 sebanyak dua kali ulangan.

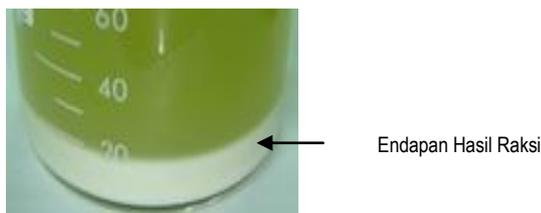
HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim lakase

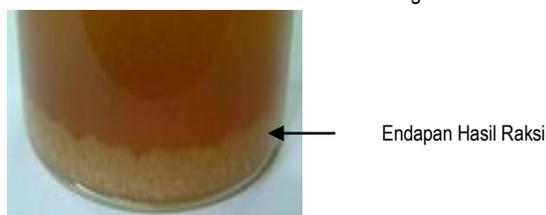
Hasil perhitungan berdasarkan *Worthington Manual Enzyme*, maka diperoleh rata-rata aktivitas spesifik enzim lakase dari hasil isolasi enzim kasar lakase adalah sebesar 0,54 unit/mg.

Reaksi substrat ekstrak teh hijau dengan enzim lakase

Substrat metanol dan substrat air adalah substrat ekstrak teh hijau dengan dua jenis pelarut yang tanpa penambahan enzim (awal). Substrat metanol berwarna hijau terang, sedangkan substrat air berwarna hijau gelap cenderung kecoklatan. Pencampuran substrat dari dua jenis pelarut dengan enzim lakase diperoleh massa atau endapan yang berwarna putih seperti yang tampak pada Gambar 1 dan Gambar 2, dimana endapan yang diperoleh merupakan hasil reaksi antara substrat dengan enzim lakase.



Gambar 1. Hasil reaksi substrat metanol dengan enzim lakase



Gambar 2. Hasil reaksi substrat air dengan enzim lakase

Hasil pencampuran antara substrat dengan enzim lakase seperti terlihat pada Gambar 1 dan 2 dipisahkan hingga menghasilkan filtrat dan endapan, kemudian dilakukan analisis kimia terhadap kedua produk tersebut. Substrat ekstrak teh hijau pelarut metanol disebut filtrat metanol dan endapan metanol, sedangkan substrat ekstrak teh hijau pelarut air disebut filtrat air dan endapan air. Pencampuran menghasilkan endapan metanol yang lebih putih dan lebih banyak untuk dianalisis, sedangkan endapan air lebih coklat dan sangat sedikit. Dari 1 g substrat ekstrak teh hijau menghasilkan sebanyak 0,4 g endapan hasil freeze drying. Endapan tersebut mempunyai tingkat kelarutan yang rendah terhadap pelarut semula sehingga campuran tersebut menjadi keruh.

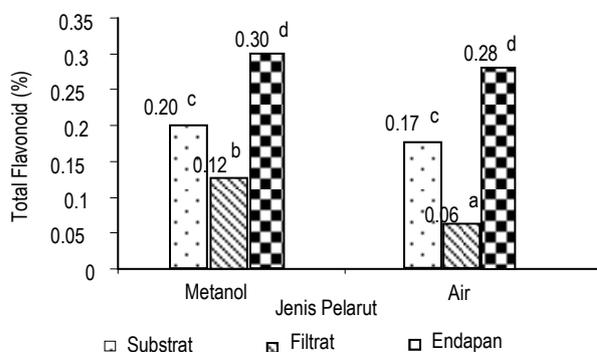
Kekeruhan pada endapan tersebut terjadi karena enzim dapat memanfaatkan ekstrak teh hijau sebagai substrat. Menurut Riva (2006), enzim lakase dapat bereaksi dengan baik terhadap substrat yang mempunyai senyawa fenolik dan amina. Reaksi yang terjadi dengan substrat menyebabkan enzim memperoleh limpahan elektron dari kopling reaksi oksidasi yang berfungsi mengembalikan bentuk semula enzim lakase tersebut setelah mereduksi oksigen menjadi air. Akibat dari limpahan elektron tersebut, substrat yang mempunyai struktur fenolik yaitu katekin akan teroksidasi dan mengalami resonansi pada struktur aromatik yang dimilikinya dan selanjutnya akan saling menstabilkan diri dengan membentuk ikatan karbon-karbon yang akan menghasilkan senyawa baru dengan sifat fisik yang berbeda dari substrat awalnya.

Total flavonoid

Pengukuran total flavonoid sampel didasarkan bahwa senyawa antioksidan utama dalam teh hijau adalah senyawa

katekin yang merupakan senyawa fenolik dalam bentuk flavonoid. Hasil pengukuran *total flavonoid content* dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil uji statistik menunjukkan total flavonoid dipengaruhi oleh jenis pelarut dan ada tidaknya penambahan enzim ($p < 0,05$), tetapi tidak ada interaksi antara faktor jenis pelarut dan faktor ada tidaknya penambahan enzim. Pada sampel substrat dan endapan baik dengan pelarut metanol dan pelarut air tidak ada perbedaan yang signifikan, sedangkan pada uji statistik antara sampel filtrat metanol dengan filtrat air berbeda nyata. Hal ini disebabkan pada dasarnya flavonoid dapat larut dalam pelarut metanol maupun air (Shahidi dan Naczki, 1995), tetapi dalam beberapa hasil penelitian seperti Pourmorad *et al.* (2006), untuk mengidentifikasi total flavonoid dengan pelarut metanol mempunyai nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut air. Pelarut metanol (CH_3) yang memiliki atom karbon lebih mampu menarik senyawa flavonoid dengan membentuk lebih banyak ikatan antar karbon, bila dibandingkan dengan pelarut air (H_2O) yang tidak memiliki atom karbon.

Endapan yang diperoleh sebagai hasil reaksi antara substrat ekstrak teh hijau dengan enzim lakase menunjukkan total flavonoid yang lebih besar dari filtrat maupun substrat awalnya. Hal ini berarti aktivitas enzim lakase dapat memanfaatkan substrat sehingga terjadi polimerisasi senyawa flavonoid seperti dimer, oligodimer, polimer yang tidak larut air. Senyawa flavonoid dari substrat berpindah ke endapan dan menghasilkan total flavonoid yang lebih tinggi. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penambahan enzim lakase terhadap substrat teh hijau dapat meningkatkan total flavonoid pada endapan dan menghasilkan total flavonoid yang lebih tinggi pada pelarut metanol.



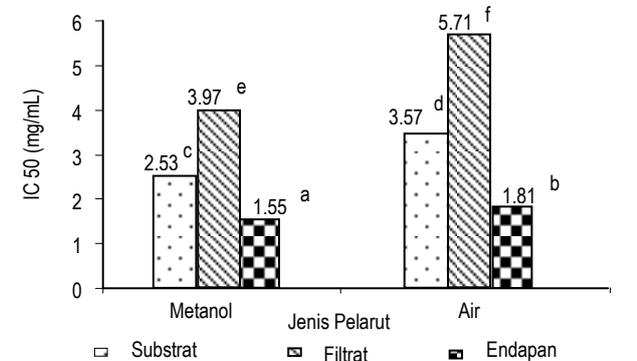
Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 3. Hasil analisa total flavonoid

Aktivitas antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *radical scavenging DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)*. Semakin besar konsentrasi sampel maka semakin berwarna kuning keemasan, warna yang terbentuk dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Kemampuan aktivitas antioksidan selanjutnya dihitung sebagai IC_{50} yang diperoleh dengan cara membandingkan absorbansi radikal bebas sebelum dan setelah direaksikan dengan antioksidan yang terdapat dalam sampel untuk setiap konsentrasi.

Gambar 4. menunjukkan nilai IC₅₀ setiap sampel uji. Nilai IC₅₀ menunjukkan konsentrasi antioksidan (mg/mL) yang dibutuhkan untuk mampu menghambat 50% radikal bebas. Semakin rendah nilai IC₅₀ maka konsentrasi antioksidan yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas semakin rendah, dengan demikian aktivitas antioksidannya semakin tinggi.



Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata (p<0,05)

Gambar 4. Aktivitas antioksidan dari sampel uji

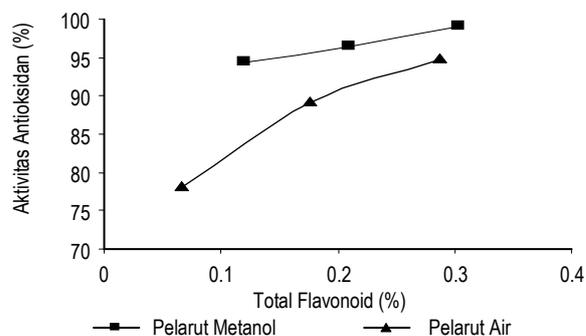
Berdasarkan uji statistik, jenis pelarut dan sampel sebelum maupun sesudah bereaksi dengan enzim berpengaruh terhadap nilai IC₅₀ ini. Interaksi diantara dua faktor tersebut juga berpengaruh, tetapi setelah dilakukan uji lanjutan dengan *one way anova*, nilai IC₅₀ setiap sampel berbeda secara signifikan. Secara umum sampel substrat metanol dan hasil reaksinya yaitu filtrat metanol dan endapan metanol mempunyai nilai IC₅₀ yang lebih rendah bila dibandingkan dengan sampel dari pelarut air. Jika dibandingkan nilai IC₅₀ substrat metanol dan substrat air (tanpa penambahan enzim) dengan nilai IC₅₀ filtrat metanol dan filtrat air (hasil reaksi dengan enzim lakase), nilai IC₅₀ filtrat metanol dan filtrat air lebih besar. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas sampel tanpa penambahan enzim lebih tinggi secara keseluruhan dibandingkan sampel filtrat. Dalam filtrat hasil reaksi dengan enzim lakase hanya terdapat sejumlah kecil senyawa fenolik sehingga saat diuji aktivitas antioksidannya lebih rendah.

Pada reaksi substrat ekstrak teh hijau dengan enzim lakase, katekin dari teh hijau kemungkinan mengalami oksidasi, dan radikal-radikal fenolik yang terbentuk saling bergabung dan menambah berat molekul yang mengakibatkan timbulnya endapan. Senyawa-senyawa fenolik baru yang dihasilkan lebih banyak terdapat pada endapan (Hernandez *et al.*, 2001). Nilai IC₅₀ untuk endapan mempunyai nilai paling rendah secara keseluruhan bila dibandingkan dengan filtrat maupun substrat awalnya. Hal ini menandakan bahwa aktivitas antioksidan pada endapan metanol maupun endapan air jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan substrat ekstrak teh hijau tanpa penambahan enzim lakase, terlebih lagi jika dibandingkan dengan filtratnya.

Korelasi antara total flavonoid dan aktivitas antioksidan

Total flavonoid dan aktivitas antioksidan mempunyai korelasi yang positif, ditunjukkan dengan semakin tinggi kan-

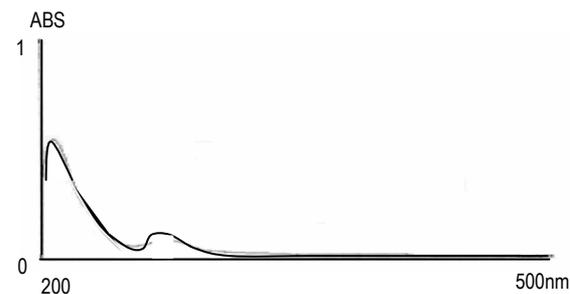
dungan flavonoid maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya. Gambar 5 menunjukkan korelasi positif baik pada pelarut metanol maupun pelarut air, tetapi substrat dengan pelarut metanol mempunyai nilai yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan pelarut air. Dalam grafik korelasi tersebut filtrat mempunyai total flavonoid dan aktivitas antioksidan terendah (titik paling kiri), substrat awal pada titik tengah, dan endapan mempunyai total flavonoid dan aktivitas antioksidan tertinggi (titik paling kanan).



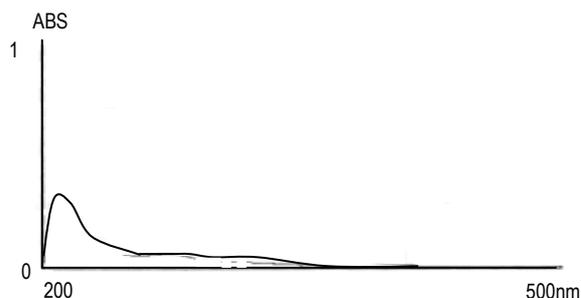
Gambar 5. Korelasi antara total flavonoid dengan aktivitas antioksidan

Spektrofotometer UV-Vis

Substrat awal metanol sebelum penambahan enzim mempunyai tiga komponen yang terdeteksi pada panjang gelombang 401 nm, 273 nm, dan 207 nm dengan grafik yang dapat dilihat pada Gambar 6. Setelah dibandingkan dengan produknya, yaitu filtrat metanol pada Gambar 7 dan endapan metanol pada Gambar 8, komponen yang terbentuk menjadi lebih banyak dengan nilai panjang gelombang yang lebih tinggi dan berbeda-beda. Filtrat metanol mempunyai bentuk grafik lebih rendah dengan komponen pada panjang gelombang 402 nm, 316 nm, 271 nm, dan 209 nm, sedangkan komponen yang terdeteksi pada endapannya mempunyai bentuk grafik lebih tinggi dengan panjang gelombang 496 nm, 382 nm, 272,5 nm, dan 205 nm.

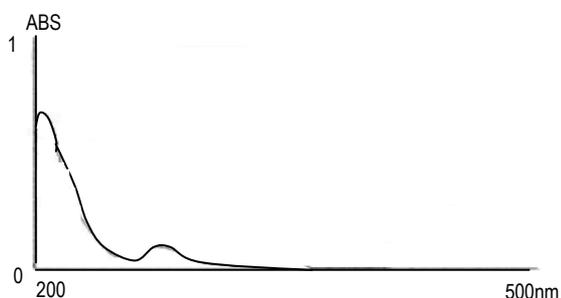


Gambar 6. Hasil spektrofotometer UV-Vis substrat methanol

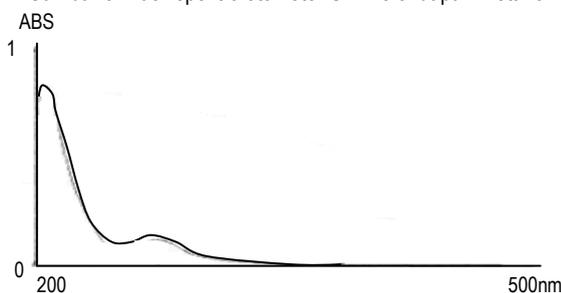


Gambar 7. Hasil spektrofotometer UV-Vis filtrat metanol

Secara keseluruhan, hasil endapannya mempunyai bentuk grafik tertinggi bila dibandingkan dengan substrat awal maupun filtratnya, demikian halnya dengan nilai panjang gelombang yang dicapai oleh komponen yang terkandung. Hasil antar endapan dibandingkan dan dapat dilihat pada Gambar 8 dan Gambar 9.



Gambar 8. Hasil spektrofotometer UV-Vis endapan metanol



Gambar 9. Hasil spektrofotometer UV-Vis endapan air

Pada endapan, grafik yang terbentuk sedikit lebih tinggi daripada endapan metanol, dan terdeteksi komponen pada panjang gelombang 467 nm, 273 nm, dan 207 nm. Dengan panjang gelombang diantara keduanya berbeda, jenis komponen yang ada dalam endapan mempunyai kandungan kimia yang berbeda. Hal ini berarti perbedaan jenis pelarut antara metanol dan air berpengaruh terhadap kandungan kimia yang terbentuk. Senyawa fenolik pada umumnya mempunyai serapan pada panjang gelombang 280 nm (Cheong *et al.*, 2005). Keseluruhan hasil sampel dengan spektrofotometer UV-vis ini terdeteksi komponen dengan panjang gelombang yang mendekati 280 nm, yang berarti mempunyai komponen fenolik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa semua sampel mempunyai aktivitas antioksidan yang diduga dari komponen fenolik.

Gas chromatography – mass spectrophotometric

Pada substrat awal difokuskan komponen dengan berat molekul 284 pada menit ke 31,52, karena berat molekul tersebut yang paling mendekati berat molekul katekin dengan struktur *epicatechin* (EC) yang mempunyai berat molekul 290 (Hosny dan Rosazza, 2002). Hasil analisis GC-MS substrat awal (metanol) dapat dilihat pada Tabel 1. Umumnya pada menit ke-23 hingga menit ke-40 terdeteksi berbagai komponen. Kafein juga terdeteksi pada menit ke-23,12 dengan berat molekul 194. Hasil analisis GC-MS substrat awal dibandingkan dengan produk hasil penambahan enzim lakase, yaitu filtrat pada Tabel 2 dan endapan pada Tabel 3. Dengan melihat tinggi

rendahnya *peak*, terjadi perubahan *peak* pada filtrat maupun endapan yang dilihat pada *range* menit ke-23 hingga menit ke-40. Filtrat mempunyai *peak* yang cenderung menurun dari substratnya, sedangkan endapan berbanding sebaliknya yaitu mempunyai *peak* yang lebih banyak dan lebih tinggi.

Tabel 1. Hasil analisis GC-MS substrat metanol

Waktu (menit)	m/z	Abundance (%)
23 – 30	109	24
	137	2
	194	40
30 – 40	213	6
	255	7
	284	55

Tabel 2. Hasil analisis GC-MS filtrat metanol

Waktu (menit)	m/z	Abundance (%)
23 – 35	109	10
	194	20
35 – 40	251	14
	376	7
	165	9
	430	4

Tabel 3. Hasil analisis GC-MS endapan metanol

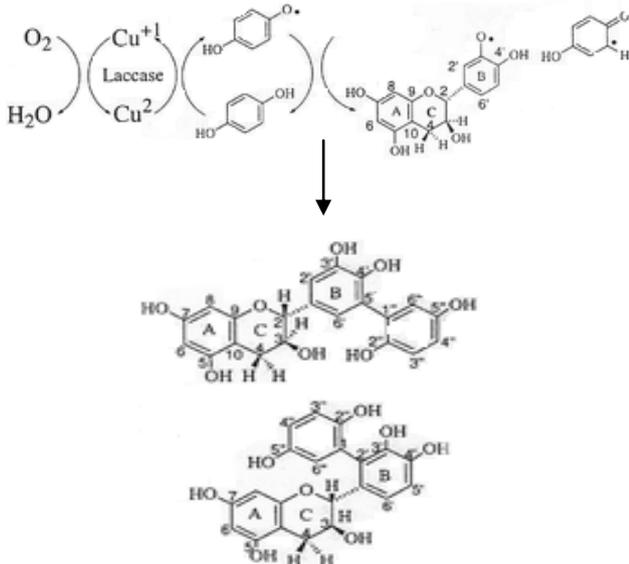
Waktu (menit)	m/z	Abundance (%)
23 – 34	109	13
	194	28
	394	7
	401	4
34 – 40	535	1
	595	1

Berat molekul yang diharapkan bila terjadi dimerisasi katekin yaitu sebesar 580 atau lebih. Berdasarkan hasil penelitian Hosny dan Rosazza (2002), endapan hasil reaksi katekin dengan enzim lakase menghasilkan struktur molekul dengan berat molekul sebesar 399, sedangkan dengan enzim peroksidase dapat menghasilkan berat molekul 576 dan 611. Dengan demikian berat molekul hasil filtrat dan endapan difokuskan yang mendekati berat molekul tersebut. Berat molekul terbesar dalam komponen di filtrat metanol yaitu 376 dan 430, sedangkan berat molekul terbesar dalam komponen di endapan metanol yaitu 394, 401, 535, dan 595. Nilai berat molekul 376 dan 430 kurang sesuai bila terjadi dimerisasi katekin, hal ini kemungkinan memang tidak terjadi dimerisasi pada filtrat melainkan terjadi pada endapannya.

Tabel 4. Hasil analisis GC-MS endapan air

Waktu (menit)	m/z	Abundance (%)
23 – 35	109	9
	194	17
35 – 40	251	10
	394	7
	396	1
	408	1

Berat molekul pada endapan paling mendekati teori, yaitu katekin dengan berat 290 mengalami perubahan struktur sehingga mempunyai berat molekul sebesar 399 (Hosny dan Rosazza, 2002). Hasil penelitian yang telah dilakukan substrat awal dengan berat molekul 284 menit ke-31,52 mengalami perubahan menjadi 394 pada menit ke-39, diduga terjadi perubahan struktur molekul seperti pada Gambar 10.



Gambar 10. Perubahan struktur dari reaksi antara katekin dengan enzim lakase (Hosny dan Rosazza, 2002).

Pada endapan air mempunyai komponen dengan berat molekul 394 menit ke-35, 396 menit ke-36,44, dan 408. Dalam endapan metanol mempunyai berat molekul yang terbesar 595, sedangkan dalam endapan air hanya mencapai berat molekul 408. Hal ini berarti endapan metanol mengalami penambahan berat molekul lebih banyak daripada endapan air. Namun komponen dengan berat molekul 394 juga dimiliki kedua endapan, berarti dalam kedua endapan ini terjadi proses penggabungan senyawa sehingga terjadi perubahan struktur molekul dan menjadi produk dimer.

KESIMPULAN

Jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) yang dimanfaatkan sebagai sumber enzim kasar lakase mempunyai aktivitas spesifik sebesar 0,54 Unit/mg protein. Enzim lakase yang diekstrak dari jamur tiram putih mampu bereaksi dengan substrat ekstrak teh hijau. Bila dibandingkan dengan substrat awal (sebelum ditambah enzim lakase), hasil analisis terhadap endapan menunjukkan peningkatan total flavonoid, aktivitas antioksidan dan berat molekul. Korelasi positif terjadi antara total flavonoid dengan aktivitas antioksidan, semakin tinggi total flavonoid maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya. Secara keseluruhan sampel dengan pelarut metanol mempunyai nilai total flavonoid dan aktivitas antioksidan lebih besar daripada seluruh sampel dengan pelarut air, demikian juga halnya pada korelasi positif antara total flavonoid dengan aktivitas antioksidan menunjukkan pelarut metanol memiliki nilai

yang lebih tinggi daripada pelarut air. Berdasarkan hasil uji kualitatif dengan spektrofotometer UV-vis, dan GC-MS terlihat adanya komponen baru dalam endapan. Hasil analisis spektrofotometer UV-vis menunjukkan bahwa seluruh sampel mengandung komponen fenolik yang berasal dari katekin. Dengan penambahan enzim terjadi perubahan berat molekul dari 284 menjadi 394. Komponen-komponen baru dengan berat molekul yang besar pada endapan menunjukkan terjadinya perubahan struktur katekin.

DAFTAR PUSTAKA

Amin I, Lee WY. 2005. Effect of different blanching times on antioxidant properties in selected cruciferous vegetables. *J of The Sci of Food and Agric* 85: 2314-2320.

Cahyana AH. 2005. Studi awal pemanfaatan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) sebagai biokatalis pembentukan senyawa antioksidan. *J Ilmu dan Teknol Pangan* 3: 1-8.

Cheong WJ, Park MH, Kang GW, Ko JH, Seo YJ. 2005. Determination of catechin compounds in korean green tea infusions under various extraction conditions by high performance liquid chromatography. *J Bull Korean Chem Soc* 26: 747-754.

Henky I. 2004. Teknologi bioproses pembibitan dan produksi jamur tiram untuk peningkatan nilai tambah. *Prosiding Seminar Nasional Untuk Negeri* 2: 123-126.

Hernandez MRT, Munguia AL, Ramirez RO. 2001. Residual compost of agaricus bisporus a source of crude laccase for enzymatic oxidation of phenolic compounds. *J Process Biochem* 36: 635-639.

Hosny M, Rosazza JPN. 2002. Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase. *J of Agric and Food Chem* 50: 5539-5545.

Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agric and Food Chem* 53: 1841-1856.

Laela N. 2005. Produksi Senyawa Bioaktif Fenolik Menggunakan Enzim Lakase Hasil Isolasi Media Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Karya Utama Sarjana Kimia. FMIPA-UI.

Leite OD, Orlando Fatibello F, Aneli de MB. 2003. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *J of The Brazilian Chemical Soc* 14: 1-12.

Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J of Biotechnol* 5: 1142-1145.

Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Review Trends in Biotechnol* 24: 219-225.

Shahidi F, Naczk M. 1995. *Food Phenolics Sources Chemistry Effects Application*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster.