

Aktifitas Enzim Lignin Peroksidase oleh *Gliomastix* sp. T3.7 pada Limbah Bonggol Jagung dengan Berbagai pH dan Suhu

Ima Mufidatul Ilmi, Nengah Dwianita Kuswytasari
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111
E-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

Abstrak—Enzim Lignin Peroksidase (LiP) merupakan enzim ekstraseluler yang mempunyai manfaat dalam berbagai bidang industri. *Gliomastix* sp. merupakan salah satu spesies yang mempunyai kemampuan mendegradasi lignin paling besar diantara kapang koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi ITS lainnya, sehingga diduga memiliki aktifitas enzim lignin peroksidase (LiP) yang besar pula. Aktifitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya suhu dan pH. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu yang berbeda terhadap aktivitas enzim lignin peroksidase dari *Gliomastix* sp. yang ditumbuhkan pada limbah bonggol jagung. Uji aktifitas enzim Lignin peroksidase dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Boeco 22. Aktifitas Lignin Peroksidase (LiP) diukur pada panjang gelombang 310 nm dengan menggunakan Veratryl alkohol sebagai substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Gliomastix* sp. T3.7 merupakan kapang yang mampu menghasilkan enzim Lignin Peroksidase pada limbah bonggol jagung, dimana aktifitas enzim LiP maksimum terdapat pada pH 6 dan suhu 35°C sebesar 8,088 U/ml.

Kata Kunci—Enzim Lignin Peroksidase, *Gliomastix* sp., bonggol jagung, pH, suhu,

I. PENDAHULUAN

Produksi komoditas pertanian Indonesia yang meningkat dari tahun ke tahun menyebabkan peningkatan limbah yang dihasilkan selama pemanenan dan pengolahannya. Limbah padat dari kegiatan pertanian seperti jerami padi, serbuk gergaji kayu, tandan kelapa sawit, batang dan bonggol jagung, serta bagase tebu tersusun oleh lignoselulosa. Lignoselulosa memiliki komposisi selulosa sebesar 45%, hemiselulosa 25-30% dari berat kering bahan dan sisanya adalah lignin [1]. Lignin merupakan polimer *phenylpropanoid* yang kompleks, heterogen dan menyusun 25-30% biomassa tumbuhan. Pada kondisi di alam, lignin sangat resisten terhadap degradasi mikrobia [2]. Kapang merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi lignin [3].

Kapang dapat mendegradasi lignin karena mampu mensintesis enzim ligninolitik. Ada tiga enzim ligninolitik dari kapang yaitu Lignin Peroksidase (LiP), Mangan Peroksidase (MnP), dan *Laccase*. Terdapat beberapa kapang yang hanya mampu mensintesis dua atau satu enzim saja [3].

Lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP) adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang menggunakan H_2O_2 dalam mendegradasi lignin, sedangkan *laccase* merupakan enzim yang mengandung tembaga dengan menggunakan molekul oksigen dalam mendegradasi lignin [4].

Lignin peroksidase (LiP) mengoksidasi unit non fenolik lignin melalui pelepasan satu elektron dan membentuk radikal kation yang kemudian terurai secara kimiawi. LiP adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang aktivitasnya bergantung pada H_2O_2 . LiP memiliki kemampuan mengkatalis beberapa reaksi oksidasi antara lain pemecahan ikatan $C\alpha-C\beta$ rantai samping propil non fenolik komponen aromatik lignin, oksidasi benzil alkohol, oksidasi fenol, hidroksil *benzylic methylene groups* dan pemecahan cincin aromatik komponen non fenolik senyawa lignin [5].

LiP adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang aktivitasnya bergantung pada H_2O_2 . LiP mengoksidasi senyawa aromatik (fenolik dan non fenolik) dengan memindahkan 1 elektron, menghasilkan *phenoxy radical* dan kation radikal. Kemudian bereaksi secara spontan dengan nukleofil (bagian utama air) dan molekul oksigen. Hasilnya sebuah “enzymatic combustion” (pembakaran secara enzimatik) yang memecah ikatan C-C dan C-O, mendepolimerasi senyawa polimer dan membuka cincin aromatik. Kebanyakan produk aromatik dan alifatik terbentuk dengan cara demikian. Veratryl alkohol merupakan produk metabolit sekunder. VA merupakan substrat untuk LiP dan menstimulasi kerjanya, kemungkinan bukan sebagai mediator elektron akan tetapi dengan mendonasikan elektron ke LiP, sehingga akan membuat siklus katalitiknya menjadi lengkap [5], [6].

Enzim lignin peroksidase yang dihasilkan oleh kapang mempunyai peluang besar untuk diaplikasikan dalam bidang industri, seperti industri pulp dan kertas [7]. Enzim lignin peroksidase juga berperan untuk degradasi polutan seperti pewarna yang dihasilkan oleh industri tekstil [8] dan biokonversi lignin yang memanfaatkan bagase tanaman tebu untuk bioethanol [9].

Menurut [10], kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu substrat, suhu, pH, kofaktor dan inhibitor. Penggunaan limbah organik lignoselulosa sebagai substrat mikroba dalam produksi enzim lignin peroksidase akan

meningkatkan nilai ekonomis dari limbah, sekaligus dapat mempercepat daur biomasa limbah tersebut di lingkungan. Limbah organik lignoselulosa mengandung lignin, selulosa dan hemiselulosa yang berperan sebagai inducer enzim lignin peroksidase. Selain itu, kebanyakan dari limbah tersebut kaya akan gula yang secara alami mudah dimetabolisme oleh mikroorganisme, hal inilah yang membuat proses produksi menjadi lebih ekonomis [11].

Jagung (*Zea mays*) merupakan tanaman pangan yang penting di Indonesia. Pada tahun 2006, luas panen jagung adalah 3,5 juta hektar dengan produksi rata-rata 3,47 ton/ha, produksi jagung secara nasional 11,7 juta ton [12]. Bonggol jagung memiliki penyusun utama berupa lignin, selulosa dan hemiselulosa. Kandungan lignin pada bonggol jagung sebesar 20,3 %, hemiselulosa 31,7 % dan selulosa 34,7 % [13]. Kebanyakan bonggol jagung ini dibakar atau langsung dibuang sehingga menjadi salah satu sumber sampah dan mencemari lingkungan. Baru-baru ini banyak studi yang mengangkat tentang pemanfaatan limbah lignoselulosa secara efektif [14]. Dalam batang jagung, selulosa dikelilingi oleh lignin, sehingga ligninlah yang terlebih dahulu diuraikan oleh jamur [15]. Dalam salah satu penelitian yang dilakukan oleh Sun [14], menyatakan bahwa proses pre treatment steam explosion yang dilakukan oleh fermentasi *Aspergillus oryzae* secara signifikan dapat mendegradasi selulosa, hemiselulosa dan lignin dalam tongkol jagung

Selain substrat pertumbuhan, pH dan suhu merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam produksi enzim lignin peroksidase. [10] melaporkan bahwa setiap enzim memerlukan suhu dan pH optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan pH berubah. [16] menambahkan bahwa dalam skala laboratorium umumnya kapang mampu tumbuh pada kisaran pH yang cukup luas yaitu antara 4,5-8,0 dengan pH optimum antara 5,5-7,5 atau bergantung pada jenis kapangnya, sedangkan menurut [17], pH media berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi enzim. Pada umumnya kapang tumbuh dan menghasilkan berbagai macam enzim pada kisaran pH asam. Adapun faktor lain yang perlu diperhatikan dalam produksi enzim lignin peroksidase yaitu suhu. [18] melaporkan bahwa suhu optimal yang diperlukan oleh *P. chrysosporium* dalam memproduksi enzim lignin peroksidase dan mangan peroksidase adalah 39°C (Singh, 2006).

Menurut [19], *Gliomastix* sp. T3.7 mempunyai kemampuan mendegradasi lignin paling besar diantara kapang koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS lainnya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang optimasi produk enzim lignolitik dimana salah satunya yaitu enzim Lignin peroksidase yang dihasilkan oleh kapang tersebut dengan menggunakan beberapa substrat alami berupa limbah organik lignoselulosa.

Uji aktivitas enzim Lignin peroksidase (LiP) oleh *Gliomastix* sp. ini dapat dideteksi dengan menggunakan spektrofotometer [20]. Dari penelitian ini diharapkan dapat

diperoleh suatu kondisi yang paling optimum dalam menghasilkan enzim Lignin Peroksidase (LiP) dengan memanfaatkan limbah bonggol jagung sebagai substrat, dengan kondisi pH dan suhu optimum bagi *Gliomastix* sp. untuk menghasilkan enzim tersebut. Sehingga dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang industri.

II. METODE PENELITIAN

A. Tahap Persiapan

Isolat *Gliomastix* sp. T.37 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS yang diisolasi dari Wonorejo Pantai Timur Surabaya. Isolat *Gliomastix* sp. disubkultur ke dalam medium PDA-C dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar.

B. Tahap Pre treatment Limbah Organik Lignoselulosa

Bonggol jagung sebanyak 2 kg di keringkan di bawah sinar matahari, kemudian substrat dipotong-potong kecil ± 3 cm. Substrat digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Kemudian dioven pada suhu 75°C selama 2 hari. Selanjutnya substrat disimpan untuk kemudian dilakukan treatment selanjutnya [14], [21], [22].

C. Pembuatan Starter

Kultur *Gliomastix* sp. usia 5 hari pada agar miring disuspensikan dengan menambahkan 10 ml aquades. Suspensi jamur sebanyak 10 % (w/v) diinokulasikan kedalam 12,5 ml medium pertumbuhan dan 2,5 gram substrat bonggol jagung. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu ruang sampai 5 hari, sampai miselium penuh. Pembuatan kultur ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya, kapang yang tumbuh pada kultur ke 3 ini disebut sebagai starter kapang [23].

D. Tahap Optimasi Produksi Enzim

Substrat bonggol jagung sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Kemudian ditambahkan 25 ml medium pertumbuhan pada masing-masing Erlenmeyer. pH diatur pada pH 4, 5 dan 6, dengan menambahkan NaOH 1 M dan HCl 1 M. Medium disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Setelah medium mencapai suhu ruang, starter sebanyak 10% (w/v) diinokulasikan ke dalam medium dan diinkubasi selama 5 hari. Pada suhu inkubasi 25^o, 30^o, dan 35^o C [2], [20].

E. Uji Aktifitas Enzim Lignin Peroksidase

Sebanyak 0,2 ml filtrat enzim, 0,05 ml H₂O₂ 5 mM; 0,1 ml *veratril alcohol* 8 mM; 0,2 ml buffer asetat 0,05 M pH 3 dan 0,45 ml akuades dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dikocok. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 310 nm pada interval waktu 0 dan 30 menit. Satu unit aktivitas enzim LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 mikromol (1 μ mol = 10⁻⁶) mol *veratril alcohol* per menit [20].

F. Analisa data

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 3 dengan setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Analisis statistik untuk penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai pH dan suhu terhadap aktivitas enzim *Gliomastix* sp. pada limbah bonggol jagung. Pengolahan data menggunakan uji *Analysis of variance* (ANOVA).

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Optimasi Produksi enzim Lignin Peroksidase pada Limbah Bonggol jagung

Tahap optimasi produksi enzim dilakukan selama 5 hari dan media dikondisikan dengan berbagai pH dan suhu untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu optimum yang diperlukan *Gliomastix* sp. untuk menghasilkan aktifitas enzim lignin peroksidase secara maksimal. Analisis aktifitas enzim lignin peroksidase oleh *Gliomastix* sp. pada limbah bonggol jagung dilakukan pada inkubasi hari ke 5. Waktu inkubasi selama 5 hari dipilih karena kapang ini dapat tumbuh maksimal dan miseliumnya dapat memenuhi medium serta dapat beradaptasi dengan medium limbah padat yang telah disediakan pada hari ke 5 [24]. Tahap awal dilakukan ekstraksi enzim kasar dari media limbah bonggol jagung. Ekstraksi dilakukan dengan buffer fosfat pH 7 untuk mempertahankan pH protein yang memerlukan kisaran pH tertentu supaya dapat mempertahankan struktur protein. Jika tidak, struktur protein akan terdenaturasi [25].

Ekstraksi enzim kasar dilakukan dengan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit, ekstraksi ini dilakukan untuk mendapatkan *crude* enzim yang nantinya akan digunakan dalam uji aktifitas enzim lignin peroksidase. Enzim lignin peroksidase termasuk enzim ekstraseluler karena berperan dalam proses degradasi. Sehingga dapat dideteksi dengan menggunakan *crude* enzim yang diambil dari supernatan setelah dilakukan sentrifugasi. Fungsi utama enzim ekstraseluler (eksoenzim) adalah melangsungkan perubahan-perubahan seperlunya pada nutrien di sekitarnya, sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel [26] dan dapat diserap langsung oleh hifa kapang. Setelah didapatkan *crude* enzim, selanjutnya dilakukan analisa aktifitas enzim lignin peroksidase.

B. Aktifitas enzim Lignin Peroksidase pada Limbah Bonggol jagung

LiP adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang aktivitasnya bergantung pada H_2O_2 . LiP mengoksidasi senyawa aromatik (phenolik dan non fenolik) dengan memindahkan 1 elektron, menghasilkan phenoxy radical dan kation radical [6]. Pengukuran Aktifitas enzim LiP menggunakan 0,05 ml H_2O_2 5 mM; 0,1 ml *veratril alcohol* 8 mM; 0,2 ml buffer asetat 0,05 M pH 3 dan 0,45 ml akuades. H_2O_2 berfungsi sebagai reduktor yang akan mengoksidasi enzim pada keadaan awal (restyng enzyme) dengan dua elektron membentuk senyawa intermediet I [27], [28]. *Veratril alcohol* berfungsi sebagai mediator dalam reaksi redoks untuk menstimulasi oksidasi LiP pada

Tabel 1.
Aktifitas Enzim Lignin Peroksidase (LiP) pada Limbah Bonggol Jagung dengan berbagai pH dan suhu

Suhu ($^{\circ}C$)	Aktifitas Enzim (U/ml)		
	pH 4	pH 5	pH 6
25	0,036	0,233	0,102
30	1,022	0,048	0,066
35	0,018	0,006	8,088*

*Aktifitas enzim Lignin Peroksidase maksimum

substrat limbah organik lignoselulosa [29], [30]. Buffer asetat berfungsi sebagai larutan penyangga untuk mempertahankan pH pada saat terjadinya reaksi enzimatik, dan pH 3 merupakan pH optimum untuk menghasilkan aktifitas LiP yang maksimum [25]. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 310 nm karena jumlah veratril aldehid yang terbentuk dapat dibaca pada panjang gelombang tersebut [31].

Pada penelitian ini, aktifitas Lignin peroksidase (LiP) maksimum terdapat pada limbah bonggol jagung pH 6 dan suhu $35^{\circ}C$. Berdasarkan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$) tidak ada pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan pH dan suhu, hal ini dapat dilihat dari nilai signifikan pH dan suhu pada uji ANOVA terhadap aktifitas LiP secara berturut-turut yaitu 0,307 dan 0,785 yang berarti lebih dari nilai $\alpha = 0,05$ dan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktifitas enzim LiP. Karena tidak ada faktor yang berpengaruh terhadap aktifitas enzim LiP, maka tidak dilanjutkan dengan uji Duncan (Tabel 1). Perlakuan beberapa pH dan suhu yang diuji dalam penelitian ini tidak berpengaruh terhadap aktifitas enzim LiP. Hal ini dapat disebabkan karena beberapa hal diantaranya *Gliomastix* sp. T3.7 dapat tumbuh optimal dan menghasilkan aktifitas enzim LiP pada range pH dan suhu yang luas, sehingga tidak terdeteksi secara signifikan pengaruhnya terhadap aktifitas enzim LiP.

Bonggol jagung merupakan medium yang paling baik untuk menghasilkan aktifitas LiP maksimum pada *Gliomastix* sp. T3.7. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh [32] bahwa *Irpex lacteus* CD2 memproduksi LiP untuk proses delignifikasi bonggol jagung. Aktifitas maksimum yang dihasilkan pada penelitian ini yaitu sebesar 8,088 U/ml.

Gliomastix sp T3.7 membutuhkan pH 6 untuk menghasilkan aktifitas enzim LiP maksimum (Tabel 1). Berbeda dengan penelitian [17], *Pleurotus ostreatus* dan *Omphalina* sp. yang ditumbuhkan pada medium bagase tebu dan TKKS menghasilkan enzim LiP maksimum pada pH 5. Sedangkan *P. Pulmonarius*, menghasilkan aktifitas LiP maksimum pada pH 3 [5]. Hal ini dapat disebabkan karena beberapa hal diantaranya perbedaan strain, media dan kondisi lingkungan [14]. *Phanerochaete chrysosporium* yang ditumbuhkan pada medium fermentasi padat (SSF) optimum menghasilkan aktifitas LiP pada pH 4,5 [30] dan *P. chrysosporium* menghasilkan aktifitas LiP maksimum pada pH yang sama, ketika ditumbuhkan pada

medium yang ditambahkan serbuk bagase tebu sebanyak 2% [33]. Kombinasi pH dan suhu sangat berbeda dari satu protein dengan protein yang lain [33-35] sehingga menyebabkan pH dan suhu optimum yang dibutuhkan oleh enzim berbeda satu sama lain. Perbedaan suhu dan pH yang dibutuhkan oleh enzim yang sama dapat disebabkan karena perbedaan strain yang menghasilkan enzim tersebut [14]

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktifitas maksimal. Profil aktifitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada diatas atau dibawah pH optimum. Aktivitas katalitik enzim didalam sel mungkin diatur sebagian oleh perubahan pada pH medium lingkungan [36].

Suhu yang diperlukan oleh *Gliomastix* sp. T3.7 untuk menghasilkan aktifitas enzim LiP maksimum adalah 35⁰C yaitu pada limbah bonggol jagung. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh [37], LiP maksimum yang dihasilkan oleh *Phanerochete chrysosporium* pada medium fermentasi padat (SSF) terdapat pada suhu 34⁰ dan 40⁰C pada medium yang ditambahkan serbuk jerami gandum [33]. Berbeda dengan yang dilaporkan oleh [38], pada banyak penelitian suhu 25⁰C merupakan suhu optimum yang diperlukan untuk menghasilkan aktifitas LiP maksimum, dimana berhubungan dengan pertumbuhan fungi itu sendiri [39]. Hal ini disebabkan karena setiap fungi mempunyai suhu optimum, minimum dan maksimum yang berbeda untuk pertumbuhannya. Pertumbuhan pada suhu di bawah suhu optimum dapat menurunkan rata-rata metabolisme selnya. Sedangkan suhu di atas optimum, menyebabkan pertumbuhan menurun dan dimungkinkan terjadinya kematian jika melampaui suhu maksimumnya [33].

Pada sebagian besar protein, denaturasi dapat terjadi pada suhu 45⁰ sampai 50⁰C. Ketika suhu naik, atom yang terdapat pada molekul enzim mempunyai energi yang besar dan mempunyai kecenderungan yang besar untuk bergerak. Atom-atom tersebut dengan cepat memperoleh cukup energi untuk menguasai interaksi lemah yang memegang struktur bersama protein globular, kemudian diikuti dengan deaktivasi (penon-aktifan). Sensitivitas sebuah protein untuk berdenaturasi pada suhu tinggi bervariasi dan dipengaruhi oleh pH medium [33-35].

IV. KESIMPULAN

Gliomastix sp. T3.7 berpotensi menghasilkan enzim Ligninolitik salah satunya adalah Enzim Lignin peroksidase. Aktifitas maksimum yang dihasilkan sebesar 8,088 U/ml. Berdasarkan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$), perlakuan pH dan suhu tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktifitas enzim LiP. Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu diperlukan range pH dan suhu yang lebih luas untuk mengetahui pengaruh dari kedua faktor tersebut. Selain itu, perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai waktu inkubasi optimum, sumber karbon dan nitrogen dengan menggunakan kondisi optimum diatas untuk mengoptimalkan aktifitas yang

dihasilkan, sehingga dapat diaplikasikan langsung dalam dunia industri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Islam, Kementerian Agama Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial melalui Beasiswa Santri Berprestasi tahun 2008-2013". Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Institut Teknologi Sepuluh Nopember yang telah membantu menyediakan dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. Perez, "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview," Departamento de Microbiologia, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18071 Granada, Spain. (2002).
- [2] D.S. Arora, M. Chander, and P. Gill, "Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw," *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 50 (2002) 115 – 120.
- [3] H. Singh, *Mycoremediation*, John Wiley & Sons, Inc. America (2006) 358-375.
- [4] A. Hattaka, "Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation," *Microbiology*, Vol. 13(1994) 125-135.
- [5] M. Tien, and T.K. Kirk, "Lignin degrading enzyme from *Phanerochete chrysosporium* : Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase," *Practice Natural academy Science USA*, Vol. 81 (1984) 2280-2284.
- [6] M. Akhtar, R.A. Blanchette and T.K. Kirk, "Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood," *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Vol.57 (1997) 159-195.
- [7] Astin, "Kinetika reaksi degradasi lignin melalui degradasi hemiselulosa oleh enzim xylanase dari *Aspergillus niger*," Tesis, Surabaya : Teknik Kimia ITS, (2007).
- [8] A. J. Wilkolazka, K. R. Janina, M. Elzbieta, and W. Wladyslaw, "Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes," *Journal Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30 (2002) 566-572.
- [9] M. Samsuri, B. Prasetya, and E. Hermiati, "Biodegradasi bagase oleh jamur pelapuk putih (white rot fungi) dan potensi pemanfaatannya untuk ethanol," *Prosiding seminar nasional XIII, Kimia dalam industry dan lingkungan* : Jakarta (2004).
- [10] A. Supriyanto, "Manfaat Jamur Pelapuk Putih *Phanerochaete chrysosporium* L1 Dan *Pleurotus Eb9* Untuk Biobleaching Pulp Kardus Bekas," Skripsi, Institut Pertanian Bogor : Bogor (2009).
- [11] H. Risdianto, S.H. Suhardi, W. Niloperbowo, dan T. Setiadi, "Produksi Lakase dan potensi aplikasinya dalam Proses pemutihan pulp," *Berita Selulosa*, Vol. 43 (2008) 1-10.
- [12] T.W. Widodo, A. Asari, N. Ana, dan R. Elita, "Bio Energi Berbasis Jagung dan Pemanfaatan Limbahnya," Balai Besar Pengembangan Mekanisasi Pertanian Serpong Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian Tromol Pos 2 Serpong : Tangerang (2006).
- [13] J.M. Cruz, and J.C. Dominguez, "Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol," *Food Biotechnology*, Vol. 14 (2000) 79–97.
- [14] F. Sun, J. Li, Y. Yuan, Z.Y. Yan, and X.F. Liu, "Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover," *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 65 (2011) 931-938.
- [15] Fadilah, S. Distantina, E.K. Artati, dan A. Jumari, "Biodelignifikasi batang jagung dengan jamur pelapuk putih *Phanerochaete chrysosporium*," *Ekuilibrum*, Vol. 7 (2008) 7 – 11.
- [16] D. Lim, *Microbiology*. New York : McGraw Hill Publishing Company (1998).
- [17] H. Widiastuti, Siswanto, and Suharyanto, "Optimasi pertumbuhan aktifitas enzim ligninolitik *Omphalia* sp. dan *Pleurotus ostreatus* pada fermentasi padat," *Menara Perkebunan*, Vol. 2 (2007) 93-105.
- [18] F. Xu, H. Chen, and Z. Li, "Solid-State production of Lignin Peroxidase (LiP) and Mangan Peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate," *Bioresource Technology*, 80 (2001) 149-151.

- [19] Y.M. Rohmah, "Studi potensi isolat kapang tanah dari Wonorejo Surabaya dalam mendegradasi lignin," Tugas Akhir. Biologi ITS : Surabaya (2012).
- [20] R.I. Syafrizal, "Aktifitas enzim ligninolitik fungi pelapuk putih *Omphalina* sp. dan *Pleurotus ostreatus* pada limbah lignoselulosa," Skripsi, Program Studi Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor : Bogor (2007).
- [21] W.H. Chen, Y.J. Tu, and H.K. Sheen, "Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating," *Applied Energy*, Vol. 82 (2011) 2726–2734.
- [22] W. Sanjaya, and S. Adrianti, "Optimasi hidrólisis enzimatik jerami padi menjadi glukosa untuk bahan baku biofuel menggunakan selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*," Tugas Akhir, Teknik Kimia ITS : Surabaya (2009).
- [23] 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 Biotechnology*, Vol. 21 (2005) 435-440.
- [24] S. M. Hossain, and N. Anantharaman, "Activity enhancement of ligninolytic enzymes of *Trametes versicolor* with bagasse powder," *African Journal of Biotechnology*, Vol.1 (2006) 189-194.
- [25] Y. A. Prasetya, "Enzim Merkuri reduktase pada Genera *Bacillus* sebagai pereduksi merkuri anorganik (Hg^{2+}) menjadi Merkuri volatil (Hg^0)," Skripsi. ITS : Surabaya (2012).
- [26] L. Howard, L. Abotsi, R. E. Jansen, and S. Howard, "Lignocellulose Biotechnology : Issues of Bioconversion and Enzyme Production," *African Journal Biotechnology*, Vol. 2 (2003) 602-619.
- [27] D. Cullen, and P.J Kersten, *A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research: Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation*, The Mycota 3rd edition. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag (1996).
- [28] A. M. Sigit, "Pola aktivitas enzim ligninolitik jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) pada media Sludge industri kertas," Skripsi, Institut Pertanian Bogor : Bogor (2008).
- [29] X. Huang, D. Wang, C. Liu, M. Hu, Y. Qu, and P. Gao, "The roles of veratryl alcohol and nonionic surfactant in the oxidation of phenolic compounds by lignin peroxidase," *Biochemistry Biophys Res Commun*, 311 (2003) 491-494.
- [30] M. Asgher, N. Ahmed, and H.M.N. Iqbal, "Hyperproductivity of extracellular enzymes from indigenous white rot fungi (*P. Chrysosporium* IBL-03) by utilizing agro-waste," *Bioresources*. Vol. 4 (2011) 4454-4467.
- [31] T. Artiningsih, "Aktivitas Ligninolitik Jenis *Ganoderma* pada Berbagai Sumber Karbon," *Biodiversitas*, Vol.7 (2006) 307-311
- [32] C. Xu, F. Ma, and X. Zhang, "Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108 (2009) 372-375.
- [33] S.M. Hossain, and N. Anantharaman, "Effect of wheat straw powder on enhancement of ligninolytic enzyme activity using *Phanerochaete chrysosporium*," *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (2008) 502-507
- [34] M.J. Peleazar, E.C.S. Chan, and N. R. Kring, *Microbiology*, 5th edition. Tata McGraw-Hill Publishing Co Ltd : New Delhi (2004).
- [35] M. L. Shulter, and F. Kargi, *Bioprocess engineering : Basic concept*, Parentice-Hall of India Pvt Ltd. New Delhi (2000).
- [36] A.L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*. Diterjemahkan oleh M. Thenawidjaya, 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Penerbit Erlangga : Jakarta (1982).
- [37] S.R. Couto, D. Moldes, and A. Sanroman, "Optimum stability conditions of pH and temperature for Ligninase and Manganase Peroksidase-dependent peroxides from *Phanerochaete chrysosporium* . application to in vitro decolorization of Poly R-478 by MnP," *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22 (2006) 607-612.
- [38] Y. Nishizawa, K. Nakabayashi, and E. Shinagawa, "Purification and characterization of laccase from white-rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2," *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (1995) 91–93
- [39] D. S. Arora, and P. K. Gill, "Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*," *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 44 (2004) 331–338