

## Pola aktivitas enzim ligninolitik *Pleurotus ostreatus* pada limbah *sludge* pabrik kertas

*Activity pattern of ligninolytic enzyme of Pleurotus ostreatus in sludge waste of paper factory*

Happy WIDIASTUTI & TRI-PANJI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

### Summary

*Sludge is a solid waste abundantly available on paper factory that is economically unutilized and tends to pollute environment. This waste can be used as growth media for oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) as edible mushroom and ligninolytic enzymes production as well. A research has been conducted to study the activity pattern of ligninolytic enzymes of oyster mushroom grown on the sludge waste of recycle paper factory. Six treatments were examined consisted of three media combinations (sawdust, sludge, sludge mixed with sawdust), with and without supplementing with rice bran, lime, and gypsum, and two mushroom strains Bogor oyster mushroom (JTB) and China Taipei oyster mushroom (JTT). Monitoring of ligninolytic enzyme activity consisting of laccase, mangan peroxidase (Mn-P) and lignin peroxidase (Li-P), was subsequently regularly started since inoculation, at vegetative phase (four and six weeks), primordial formation, phase of fruiting body formation, and two weeks after formation of fruiting body. Each treatment was repeated three times, so that 216 bag logs of oyster mushroom cultures were performed. The results showed that laccase, Mn-P, and Li-P activities could be observed on sludge or mixture of sludge+sawdust media inoculated with P. ostreatus. Generally, the highest activity of ligninolytic enzymes especially for laccase and MnP were observed at the first vegetative growth phase i.e. before emerging primordial of fruiting body (1.697 & 2.113 U/mL, 4.394 & 2.314 U/mL respectively*

*for JTB and JTT laccase and JTB & JTT Mn-P). The highest Li-P activity was affected by the kind of media and strain of inoculum. In sludge medium, the highest Li-P activity was observed in vegetative growth phase (2.706 & 4.014 U/mL respectively for JTB and JTT) while in a mixture of sludge + sawdust the highest activity of that enzyme was observed in primordial phase of growth (2.509 & 1.9 U/mL respectively for JTB and JTT). Addition of supplement to the sludge increased ligninolytic activity, while laccase activity of sludge was suggested could be more enhanced by mixing the sludge with sawdust and enrich with rice bran, gypsum and lime.*

[Keywords: Ligninolytic enzyme, sludge waste, *Pleurotus ostreatus*, polute environment].

### Ringkasan

*Sludge* merupakan limbah padat yang tersedia melimpah di pabrik kertas dan belum dimanfaatkan secara ekonomis sehingga berpotensi mencemari lingkungan. Limbah ini dapat dimanfaatkan sebagai medium tumbuh jamur konsumsi seperti jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dan penghasil enzim ligninolitik. Penelitian dilakukan untuk mempelajari pola aktivitas enzim ligninolitik jamur tiram pada limbah *sludge* pabrik kertas selama fase vegetatif sampai setelah fase generatif. Enam perlakuan yang diuji berupa tiga kombinasi komposisi medium (serbuk gergaji, *sludge*, campuran *sludge* dan serbuk gergaji), dengan

dan tanpa pengayaan, yaitu penambahan dedak, kapur, dan gipsum, serta dua strain jamur tiram Bogor (JTB) dan jamur tiram China Taipei (JTT). Pengamatan aktivitas enzim ligninolitik meliputi lakase, mangan peroksidase (Mn-P) dan lignin peroksidase (Li-P) dilakukan sejak saat inokulasi, pada fase vegetatif (empat dan enam minggu), pada saat pembentukan primordia, fase tubuh buah, dan dua minggu setelah pembentukan tubuh buah. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali sehingga terdapat 216 *bag log* jamur tiram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas ligninolitik dijumpai pada medium *sludge* dan campuran *sludge*+serbuk gergaji yang diinokulasi *P. ostreatus*. Aktivitas enzim ligninolitik tertinggi khususnya lakase dan MnP teramati pada fase pertumbuhan vegetatif pertama yaitu sebelum terbentuknya primordia (1,697 & 2,113 U/mL, 4,394 & 2,314 U/mL masing-masing untuk lakase JTB dan JTT dan MnP JTB & JTT). Aktivitas LiP tertinggi dipengaruhi oleh jenis medium dan strain inokulum. Pada medium *sludge*, aktivitas LiP tertinggi dijumpai pada fase vegetatif (2,706 & 4,014 U/ml masing-masing untuk JTB dan JTT) sedangkan pada medium campuran *sludge*+serbuk gergaji, aktivitas enzim tertinggi dijumpai pada fase primordia (2,509 & 1,9 U/ml berturut-turut untuk JTB dan JTT). Pengayaan *sludge* meningkatkan aktivitas ligninolitik, sedangkan aktivitas lakase pada *sludge* diduga dapat lebih ditingkatkan dengan menambahkan serbuk gergaji disertai pengayaan berupa gipsum, dedak, dan kapur.

### Pendahuluan

*Sludge* (lumpur hasil pengolahan limbah) merupakan salah satu jenis limbah yang dihasilkan pabrik kertas. Jumlah limbah jenis ini paling besar dibandingkan dengan limbah padat lainnya yaitu sekurangnya sebesar 20 ton per hari di satu pabrik kertas. Limbah ini belum dimanfaatkan secara ekonomis dan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan. Salah satu cara untuk mengatasinya ialah

dengan mendaur ulang limbah tersebut menjadi bahan yang bermanfaat.

Limbah industri pertanian pada umumnya merupakan limbah ligno-selulosa yang merupakan bahan campuran yang sulit didegradasi dibandingkan dengan jenis polisakarida lainnya. Lignin yang terkandung dalam limbah ligno-selulosa menyebabkan limbah ini sulit terdegradasi. Bagaimanapun juga, banyak dilaporkan bahwa jamur pelapuk putih (JPP) adalah jamur yang paling efisien mendegradasi lignin, dan salah satu JPP yang telah banyak dikenal ialah jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) yang dapat dikonsumsi.

Secara umum jamur merupakan organisme yang tidak memiliki klorofil, sehingga tidak dapat menggunakan energi matahari untuk menghasilkan senyawa kimia yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Sebagai penggantinya, jamur memiliki berbagai enzim ekstra seluler seperti enzim ligninolitik yang dapat mendegradasi senyawa organik kompleks untuk membentuk senyawa yang larut yang selanjutnya dapat diserap oleh jamur untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya. Jamur tiram pada umumnya dibudidayakan menggunakan serbuk gergaji sebagai medium tumbuh (Gunawan, 1990) seperti kayu albizia yang mengandung C organik 26,4%. Jamur ini bersifat saprofitik dan termasuk dalam JPP karena mampu merombak selulosa dan lignin. Widiastuti & Gunawan (1988) melaporkan bahwa medium *sludge* pabrik kertas yang berbahan baku kayu dapat digunakan sebagai medium tanam jamur tiram.

Enzim lignoselulolitik sangat potensial pemanfaatannya pada beberapa industri misalnya industri pulp dan kertas untuk biopulping (Bourbonnais *et al.*, 1992), de-kolorisasi limbah tekstil (Gianfreda *et al.*,

1999), biosensor (Yaropolov *et al.*, 1994), pendeградasi organopolutan seperti TNT (trinitro-toluena), poliklorinated bifenils (PCBs), organoklorin, PAH dan pengawet kayu (Pointing, 2000), juga dalam fermentasi teh dan kopi dan vinifikasi (Lante *et al.*, 1992), sedangkan Mn-P dari *Bjerkandera* sp. galur BOS55 untuk *biobleaching* (Moreira *et al.*, 1997). Aplikasi enzim ligninolitik dalam industri merupakan teknologi yang ramah lingkungan.

Produksi lakase sangat dipengaruhi oleh konsentrasi nitrogen dalam medium kultur (Gianfreda *et al.*, 1999) dan sumber karbon yang digunakan (Galhaup *et al.*, 2003). Selain itu, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa penambahan Cu pada medium pertumbuhan secara nyata meningkatkan sintesis lakase dan regulasi sintesis isoform lakase lainnya pada tahap transkripsi gen pada *Trametes versicolor*, *P.ostreatus*, dan *Ceriporiopsis subvermispota* (Collin & Dobson 1997, Karahanian *et al.*, 1998, Palmieri *et al.*, 2000). Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivitas enzim ligninolitik di samping dipengaruhi oleh komposisi substrat, dan terdapatnya kosubstrat juga dipengaruhi oleh umur kultur, khususnya dalam kaitannya dengan fase perkembangan jamur. Percobaan ini dilakukan untuk menetapkan pola aktivitas enzim ligninolitik jamur tiram yang ditumbuhkan di limbah *sludge* pabrik kertas dari fase vegetatif hingga setelah fase generatif.

#### Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor. *Sludge* segar diperoleh dari pabrik kertas di Bekasi, serbuk gergaji *Albizia falcataria* didapat dari penggergajian

kayu di Sukabumi, dan bibit jamur tiram JTB dan JTT diperoleh dari Lab Mikologi IPB. Pada saat awal dilakukan analisis kadar C, dan N *sludge* dan serbuk gergaji (Tabel 1). Kecuali bahan pengaya yang terdiri dari dedak, kapur, dan gipsum dari sumber lokal, bahan lain yang digunakan memiliki spesifikasi p.a.

#### Pembiakan jamur dan analisis aktivitas enzim ligninolitik

Persiapan isolat dilakukan dengan peremajaan *P. ostreatus* pada medium PDA. Inokulum dibuat dengan menumbuhkan kultur pada medium biji sorghum yang diinkubasi pada suhu kamar selama dua minggu. Sebelum digunakan sebagai medium, serbuk gergaji terlebih dahulu direndam semalam menggunakan air PAM, sedangkan untuk *sludge* hanya dilakukan pengaturan kadar air (50-60%). *Sludge* dan serbuk gergaji ditimbang pada wadah yang berbeda atau dicampur sesuai perlakuan (serbuk gergaji, *sludge*, campuran *sludge* dan serbuk gergaji 50:50, v/v). Hal yang sama juga dilakukan untuk perlakuan pengayaan berupa penambahan dedak (12,5%), kapur (2,8%), dan gipsum (1,5%) (Widiastuti & Gunawan, 1988). Keenam jenis medium selanjutnya dikomposkan selama tiga hari dan selanjutnya medium sebanyak 1 kg dimasukkan ke

Tabel 1. Kadar karbon dan nitrogen *sludge* dan serbuk gergaji.

Table 1. Carbon and nitrogen concentration of *sludge* and sawdust.

Analisis Analysis	<i>Sludge</i>	Serbuk gergaji Sawdust
Karbon ( <i>carbon</i> ) (%)	40,24	47,7
Nitrogen ( <i>nitrogen</i> ) (%)	0,32	0,29
Rasio CN	126	164
<i>Carbon nitrogen ratio</i>		

dalam kantong plastik tahan panas. Setelah *bag log* dipasterisasi selama delapan jam  $65^{\circ}\text{C}$  sebanyak dua kali dengan selang waktu satu malam, selanjutnya medium diinokulasi dengan bibit jamur tiram JTB atau JTT sebanyak 10 g/*bag log*. Semua *bag log* yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu  $22\text{-}28^{\circ}\text{C}$ . Setelah miselium menutupi *bag log* (dua bulan), tutup *bag log* dibuka dan kondisi ruang dilembapkan. Pengamatan dilakukan terhadap aktivitas enzim ligninolitik pada saat inokulasi, fase vegetatif (empat dan enam minggu), primordia, pembentukan tubuh buah, dan dua minggu setelah pembentukan tubuh buah.

Analisis enzim ligninolitik dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan ekstraksi enzim dari kultur medium padat tersebut. Ekstraksi dilakukan menggunakan bufer fosfat (pH 7) pada perbandingan medium dan bufer 1:2 (v/v) dan ekstrak kasar enzim yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm, selama 10 menit, pada suhu  $0\text{-}4^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh ekstrak yang jernih. Ekstrak kasar enzim selanjutnya dianalisis aktivitas masing-masing enzim ligninolitik pada pH 5 (Widiastuti *et al.*, 2007) meliputi lakase (Niku-Poavola *et al.*, 1988), Mn-P (Widiastuti *et al.*, 2007), dan Li-P (Tien & Kirk, 1984).

#### Analisis data

Perlakuan yang diuji ialah komposisi medium (serbuk gergaji, *sludge*, campuran serbuk gergaji+*sludge* 50:50 (% v/v)) dengan dan tanpa pengayaan, dan strain jamur tiram (JTB dan JTT) dengan tiga ulangan untuk setiap perlakuan. Analisis aktivitas enzim ligninolitik dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim yang merupakan komposit dari tiga ulangan.

## Hasil dan Pembahasan

### *Pertumbuhan miselium*

Pada tahap peremajaan di medium PDA, pertumbuhan miselium antara jamur tiram China Taipei (JTT) dan jamur tiram Bogor (JTB) berbeda. Miselium JTT nampak tumbuh lebih cepat dan tebal dibandingkan dengan JTB. Hal yang sama juga diperoleh ketika kedua jamur tersebut ditumbuhkan pada sorghum sebagai inokulum.

Pada semua medium produksi yang diuji, miselium kedua jamur dapat tumbuh. Namun demikian JTT tidak dapat membentuk tubuh buah pada medium *sludge* saja baik dengan maupun tanpa pengayaan, sedangkan tubuh buah JTB tidak terbentuk hanya pada medium *sludge* tanpa pengayaan.

### *Aktivitas enzim ligninolitik pada medium serbuk gergaji*

Pada medium serbuk gergaji, baik JTB maupun JTT menghasilkan enzim ligninolitik (Tabel 2). Aktivitas ligninolitik maksimum baik Mn-P, Li-P maupun lakase untuk JTT ialah pada fase vegetatif. Hal yang sama juga dijumpai pada JTB kecuali aktivitas Li-P ialah pada fase primordia (generatif). Secara umum aktivitas Mn-P dan lakase terjadi selama fase perkembangan jamur dari saat vegetatif hingga fase setelah generatif. Pada serbuk gergaji aktivitas Mn-P maksimum lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas Li-P dan lakase. Pada medium serbuk gergaji aktivitas ligninolitik JTB maksimum lebih tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari JTT (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa pada medium serbuk gergaji dengan kandungan karbon yang tinggi (47,7%)

*Pola aktivitas enzim ligninolitik Pleurotus ostreatus pada limbah sludge.....*

Tabel 2. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium serbuk gergaji dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 2. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown on sawdust media at inoculation (vegetative) up to two weeks after fruiting body formation (after generative phase)

Waktu/fase (Period/phase)	Lakase Laccase U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
Vegetatif ( <i>Vegetative</i> )						
4 minggu ( <i>weeks</i> )	1,030	1,438	2,369	2,700	tt	tt
6 minggu ( <i>weeks</i> )	1,664	1,183	5,923	3,416	0,806	1,792
Generatif ( <i>Generative</i> )						
Primordia ( <i>Primordial</i> )	1,458	1,168	1,074	1,253	2,045	0,717
Tubuh buah ( <i>Fruiting body</i> )	1,576	0,743	0,579	0,647	0,591	tt
Setelah generatif ( <i>Mature</i> )						
Setelah tubuh buah ( <i>After fruiting body</i> )	0,477	1,361	0,372	2,603	tt	tt

Keterangan (*Note*): tt : tidak terdeteksi aktivitas enzim (*undetected enzyme activity*)

dan N yang rendah (0,29%), serta rasio C/N yang lebih tinggi (164) jamur tiram aktif mengekskresikan enzim ligninolitik. Lankinen (2004) melaporkan bahwa kandungan N yang rendah dapat menginduksi aktivitas ligninolitik JPP.

*Aktivitas enzim ligninolitik pada medium sludge*

Hasil analisis menunjukkan bahwa limbah *sludge* bereaksi sedikit masam (pH 6,7), mengandung 40,24% C, 0,32% N, rasio C/N 126, selulosa 33,65% dan lignin 31,65%. Karakteristik *sludge* dalam penelitian ini berbeda dengan *sludge* yang digunakan dalam penelitian Widiastuti & Gunawan (1988). *Sludge* yang digunakan Widiastuti & Gunawan (1988) ialah *sludge* yang berasal dari pabrik kertas yang berbahan baku kayu yang mempunyai kandungan C yang lebih rendah (29,85% C), kandungan N yang sedikit lebih tinggi (0,361% N) dan nilai rasio C/N yang jauh lebih rendah (83). Dalam

penelitian ini *sludge* berasal dari pabrik kertas berbahan baku kertas karton bekas. Perbedaan bahan baku menghasilkan karakteristik *sludge* yang berbeda.

Pola aktivitas enzim ligninolitik pada medium *sludge* saja tidak berbeda dibandingkan dengan medium serbuk gergaji khususnya aktivitas enzim maksimum ialah pada fase vegetatif (empat sampai enam minggu). Walaupun demikian, aktivitas ligninolitik pada medium *sludge* dari fase primordia hingga tubuh buah tidak teramati pada medium ini, karena tidak ada pembentukan primordia dan tubuh buah baik pada JTB maupun JTT (Tabel 3). Aktivitas Mn-P lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas lakase dan LiP pada JTB. Sedangkan pada JTT aktivitas Li-P maksimum lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas lakase dan Mn-P. Aktivitas lakase dan Mn-P maksimum dari JTB lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan dari JTT, sedangkan untuk Li-P terjadi hal yang

Tabel 3. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium *sludge* dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 3. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown on *sludge media* at inoculation (vegetative) until two weeks after fruiting body formation (after generative phase).

Waktu/fase ( <i>Period/phase</i> )	Lakase <i>Laccase</i> U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
Vegetatif ( <i>Vegetative</i> )						
4 minggu ( <i>weeks</i> )	0,176	0,222	2,507	tt	1,470	0,161
6 minggu ( <i>weeks</i> )	1,542	0,220	1,763	2,314	0,591	2,473
Generatif ( <i>Generative</i> )						
Primordia ( <i>Primordial</i> )	-	-	-	-	-	-
Tubuh buah ( <i>Fruiting body</i> )	-	-	-	-	-	-
Setelah generatif ( <i>Mature</i> )	-	-	-	-	-	-
Setelah tubuh buah ( <i>After fruiting body</i> )	-	-	-	-	-	-

Keterangan (*Note*): tt : tidak terdeteksi aktivitas enzim (*undetected enzyme activity*)

- : tidak dilakukan analisis (*not analyzed*)

sebaliknya, yaitu aktivitas Li-P JTT lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas Li-P JTB.

Aktivitas enzim ligninolitik yang dihasilkan oleh jamur tiram di dalam medium *sludge* lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim ligninolitik pada medium serbuk gergaji, kecuali aktivitas Li-P pada JTT. Hasil ini menunjukkan bahwa *sludge* lebih berpotensi sebagai medium produksi enzim Li-P oleh JTT dibandingkan dengan serbuk gergaji, namun tidak demikian halnya untuk lakase dan Mn-P. Rendahnya aktivitas lakase dan Mn-P pada medium *sludge* diduga disebabkan terdapatnya unsur-unsur mikro non esensial yang relatif tinggi seperti Pb dan B. Hasil analisis pendahuluan menunjukkan bahwa kandungan Pb dan B *sludge* ialah 23,2 ppm dan 94,4 ppm. Selain itu, kedua enzim tersebut adalah katalis reaksi oksidasi sehingga aerasi sangat mempengaruhi aktivitasnya. Secara fisik *sludge* memiliki struktur yang lebih

padat sehingga aerasi lebih rendah dibandingkan dengan serbuk gergaji. Hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas kedua enzim ini pada medium *sludge* baik oleh JTB maupun JTT lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim tersebut pada medium serbuk gergaji. Lebih rendahnya aktivitas lakase dan Mn-P pada medium *sludge* dibandingkan dengan serbuk gergaji diduga disebabkan aerasi pada *sludge* yang kurang baik dibandingkan dengan serbuk gergaji.

#### *Aktivitas enzim ligninolitik pada medium campuran sludge dan serbuk gergaji*

Pada medium campuran serbuk gergaji dan *sludge*, aktivitas enzim ligninolitik pada umumnya mencapai puncak pada minggu keenam (vegetatif) (1,586 dan 1,870 U/mL untuk lakase JTB dan JTT; 3,912 & 2,121 U/mL untuk Mn-P JTB dan JTT) sedangkan aktivitas Li-P dari JTB maksimum teramati pada

fase pembentukan primordia (generatif) yaitu 2,509 U/mL (Tabel 4). Periode ini sama dengan periode aktivitas maksimum Li-P JTB pada medium serbuk gergaji. Hasil ini menunjukkan adanya pergeseran aktivitas Li-P tertinggi pada JTB dibandingkan dengan penggunaan medium *sludge* saja. Walaupun demikian pada medium campuran *sludge* dan serbuk gergaji, aktivitas enzim Li-P dari JTB lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim Li-P di medium serbuk gergaji saja atau *sludge* saja. Selain itu, pada medium campuran *sludge* dan serbuk gergaji, aktivitas Mn-P dan Li-P JTB lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas Mn-P dan Li-P dari JTT, sedangkan aktivitas lakase JTT pada medium campuran *sludge* dan serbuk gergaji lebih tinggi dibandingkan dengan JTB.

Penambahan serbuk gergaji pada *sludge* dapat meningkatkan aktivitas enzim ligni-nolitik JTB, sedangkan untuk JTT hanya untuk enzim lakase yang

meningkat. Di antara ketiga enzim ligninolitik yang dianalisis, aktivitas lakase tampak paling stabil dari fase vegetatif hingga fase setelah tubuh buah yaitu 1,183-1,586 U/mL pada JTB dan 1,016-1,870 U/mL pada JTT, sedangkan untuk Mn-P dan Li-P penurunan aktivitasnya lebih tinggi khususnya setelah pembentukan tubuh buah.

*Aktivitas enzim ligninolitik pada medium serbuk gergaji yang diperkaya*

Pada medium serbuk gergaji yang diperkaya dengan dedak, kapur, dan gipsum, aktivitas Mn-P tertinggi JTB teramati pada minggu keenam (2,948 U/mL). Aktivitas lakase maksimum untuk JTB (1,905 U/mL) ialah pada fase vegetatif sedangkan Li-P mencapai puncak pada fase pembentukan tubuh buah (2,133 U/mL). Pada JTT aktivitas Mn-P maksimum ialah pada fase vegetatif, sedangkan untuk lakase dan Li-P terjadi

Tabel 4. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium *sludge* + serbuk gergaji dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 4. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown on *sludge*+ sawdust media at inoculation (vegetative) until two weeks after fruiting body formation (after generative phase)

Waktu/fase ( <i>Period/phase</i> )	Lakase <i>Lacasse</i> U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
<b>Vegetatif (<i>Vegetative</i>)</b>						
4 minggu ( <i>weeks</i> )	1,183	1,016	1,424	tt	1,080	0,233
6 minggu ( <i>weeks</i> )	1,586	1,870	3,912	2,121	1,111	1,900
<b>Generatif (<i>Generative</i>)</b>						
Primordia ( <i>Primordial</i> )	1,507	1,021	1,708	2,025	2,509	0,771
Tubuh buah ( <i>Fruiting body</i> )	1,310	1,486	2,631	1,419	1,487	0,627
Setelah generatif ( <i>Mature</i> )						
Setelah tubuh buah ( <i>After fruiting body</i> )	1,444	1,387	tt	tt	tt	tt

Keterangan (*Note*): tt : tidak terdeteksi aktivitas enzim (*undetected enzyme activity*)

pada fase generatif (Tabel 5). Selain itu, pada medium ini, aktivitas Mn-P lebih tinggi dibandingkan dengan Li-P dan lakase, baik yang dihasilkan oleh JTB maupun JTT. Aktivitas Mn-P dan Li-P maksimum yang dihasilkan oleh JTB lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh JTT, tetapi sebaliknya untuk lakase. Hasil ini menunjukkan bahwa pengayaan serbuk gergaji tidak mempengaruhi pola aktivitas Mn-P, namun menurunkan aktivitas tertingginya. Pengayaan serbuk gergaji memperlambat aktivitas Li-P, yaitu dari fase vegetatif menjadi generatif, khususnya pada JTT. Pengayaan menurunkan aktivitas maksimum Mn-P, namun meningkatkan aktivitas Li-P tertinggi.

*Aktivitas enzim ligninolitik pada medium sludge yang diperkaya*

Pada medium *sludge* yang diperkaya terlihat bahwa enzim ligninolitik yang aktif lebih dahulu ialah Li-P, baik yang

dihasilkan oleh JTB maupun JTT. Aktivitas lakase dan Mn-P baru nampak pada minggu keenam (vegetatif) dan pada minggu ini pula aktivitas lakase dan Mn-P mencapai puncaknya. Aktivitas Li-P mencapai puncak pada saat vegetatif, yaitu minggu keempat untuk JTB dan minggu keenam untuk JTT (Tabel 6). Hasil ini menunjukkan bahwa secara umum aktivitas tertinggi enzim ligninolitik ialah pada fase vegetatif. Pola ini sama dengan pola pada medium *sludge* yang tidak diperkaya, yaitu aktivitas ligninolitik tertinggi ialah pada fase vegetatif. Kecuali Li-P, aktivitas lakase dan Mn-P dari JTB lebih tinggi dibandingkan dengan JTT. Walaupun demikian, aktivitas enzim ligninolitik JTT pada fase generatif tidak dapat teramati karena tidak dijumpai primordia dan tubuh buah. Pengayaan *sludge* meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik tertinggi, kecuali Mn-P yang dihasilkan oleh JTT. Pengayaan medium

Tabel 5. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium serbuk gergaji yang diperkaya dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 5. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown enriched sawdust media at inoculation (vegetative) until two weeks after fruiting body formation (after generative phase).

Waktu/fase (Period/phase)	Lakase Laccase U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
Vegetatif (Vegetative)						
4 minggu (weeks)	1,07	1,009	tt	0,689	tt	tt
6 minggu (weeks)	1,905	0,644	2,948	2,08	0,502	1,523
Generatif (Generative)						
Primordia (Primordial)	0,528	1,313	1,446	tt	2,097	1,219
Tubuh buah (Fruiting body)	0,366	0,382	tt	tt	2,133	1,828
Setelah generatif (Mature)						
Setelah tubuh buah (After fruiting body)	1,563	1,116	2,920	0,895	tt	tt

Keterangan (Note): tt : tidak terdeteksi aktivitas enzim (undetected enzyme activity)



*Pola aktivitas enzim ligninolitik Pleurotus ostreatus pada limbah sludge.....*

Tabel 6. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium *sludge* diperkaya dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 6. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown on enriched *sludge* media at inoculation (vegetative) until two weeks after fruiting body (after generative phase).

Waktu/fase ( <i>Period/phase</i> )	Lakase <i>Laccase</i> U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
Vegetatif ( <i>Vegetative</i> )						
4 minggu ( <i>weeks</i> )	0,141	tt	tt	tt	2,706	1,398
6 minggu ( <i>weeks</i> )	1,606	0,412	4,394	2,151	0,43	4,014
Generatif ( <i>Generative</i> )						
Primordia ( <i>Primordial</i> )	0,528	-	1,446	-	1,971	-
Tubuh buah ( <i>Fruiting body</i> )	0,963	-	1,405	-	0,896	-
Setelah generatif ( <i>Mature</i> )						
Setelah tubuh buah ( <i>After fruiting body</i> )	0,7	-	tt	-	tt	-

Keterangan (*Note*): tt : tidak terdapat aktivitas enzim (*undetected enzyme activity*)  
 - : tidak dilakukan analisis (*not being analyzed*)

*sludge* yang diinokulasi JTB, menginduksi pembentukan tubuh buah, sedangkan pada JTT pengayaan tidak berpengaruh terhadap pembentukan tubuh buah. Terdapatnya vitamin B dalam dedak diduga dapat meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik. Pada medium *sludge* yang diperkaya, enzim ligninolitik yang stabil dari fase vegetatif hingga generatif ialah lakase dan Li-P yang dihasilkan oleh JTB.

*Aktivitas enzim ligninolitik pada medium campuran sludge dan serbuk gergaji yang diperkaya*

Pengamatan aktivitas ligninolitik pada medium campuran *sludge* dan serbuk gergaji yang diperkaya menunjukkan bahwa aktivitas lakase (1,697 & 2,113 U/mL masing-masing untuk JTB dan JTT) dan Mn-P (2,672 & 1,57 U/mL masing-masing untuk JTB dan JTT)

tertinggi terjadi pada fase vegetatif (empat sampai enam minggu), sedangkan aktivitas Li-P tertinggi pada JTB tercapai pada fase generatif (0,717 U/mL). Aktivitas Li-P tidak teramati sejak fase pembentukan tubuh buah. Aktivitas lakase dan Li-P yang dihasilkan oleh JTT lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh JTB, sedangkan untuk Mn-P terjadi hal yang sebaliknya (Tabel 7).

Pengayaan meningkatkan aktivitas lakase tertinggi, baik yang dihasilkan oleh JTB maupun JTT, sedangkan untuk Mn-P dan Li-P pengayaan menurunkan aktivitas dan stabilitas enzim ini. Aktivitas enzim yang stabil dari fase vegetatif hingga generatif ialah lakase yang dihasilkan oleh JTB (dalam kisaran 1,294 – 1,697 U/mL). Hasil ini sama dengan yang dijumpai pada medium campuran *sludge* dan serbuk gergaji tanpa pengayaan.

Tabel 7. Aktivitas enzim ligninolitik ekstrak enzim kasar jamur tiram JTB dan JTT pada medium *sludge* + serbuk gergaji diperkaya dari saat inokulasi (vegetatif) hingga dua minggu setelah tubuh buah (setelah fase generatif).

Table 7. Activity of ligninolytic enzyme of crude enzyme extract of oyster mushroom JTB and JTT grown on enriched *sludge*+ sawdust media at inoculation (vegetative) until two weeks after fruiting body (after generative phase).

Waktu/fase (Period/phase)	Lakase Laccase U/uL		Mn-P U/uL		Li-P U/uL	
	JTB	JTT	JTB	JTT	JTB	JTT
Vegetatif ( <i>Vegetative</i> )						
4 minggu ( <i>weeks</i> )	1,697	1,4	tt	1,57	tt	tt
6 minggu ( <i>weeks</i> )	1,6	2,113	2,672	tt	0,627	1,452
Generatif ( <i>Generative</i> )						
Primordia ( <i>Primordial</i> )	1,461	-	1,061	-	0,717	-
Tubuh buah ( <i>Fruiting body</i> )	1,294	1,375	0,317	tt	tt	tt
Setelah generatif ( <i>Mature</i> )						
Setelah tubuh buah ( <i>After fruiting body</i> )	1,507	1,273	1,915	tt	tt	tt

Keterangan (*Note*): tt : tidak terdeteksi aktivitas enzim (*undetected enzyme activity*)

- : tidak dilakukan analisis (*not being analyzed*)

#### Aktivitas enzim ligninolitik secara umum

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi enzim ligninolitik pada umumnya terjadi pada pembentukan miselium atau fase vegetatif, yaitu berkisar antara empat sampai enam minggu, sedangkan pada saat fase generatif terjadi penurunan aktivitas enzim tersebut (Tabel 8). Hasil serupa juga dilaporkan Ohga *et al.* dan Singh *et al.* dalam Machado & Matheus (2006), yang menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi lakase untuk sebagian besar fungi seperti *Agaricus bisporus*, *P. sajorcaju* dan *Lentinula edodes* ialah pada tahap kolonisasi (miselium) dan penurunan aktivitas enzim terjadi awal pembentukan primordia. Hal serupa juga dikemukakan Durrant *et al.* (1991). Hasil serupa dilaporkan Xie *et al.* (2001), bahwa aktivitas lakase dan Mn-P pada *Pleurotus* sp. yang ditumbuhkan pada medium cair mencapai

maksimum pada hari ke 10. Namun, hasil ini sedikit berbeda dengan yang dilaporkan Vladimir *et al.* (2003) pada *P. ostreatus*. Dalam penelitiannya ditunjukkan bahwa aktivitas Mn-P tertinggi terjadi saat kolonisasi dan awal pembentukan primordia dan kemudian terjadi penurunan aktivitas Mn-P. Penurunan Mn-P akan diikuti dengan peningkatan aktivitas lakase hingga pembentukan tubuh buah. Selanjutnya pada fase miselium terjadi kembali peningkatan aktivitas Mn-P. Hal yang sama juga terjadi pada medium *sludge* kecuali untuk aktivitas Mn-P. Aktivitas Mn-P tertinggi terlihat lebih awal (minggu keempat dan keenam, 2,507 & 2,314 U/mL), baik yang dihasilkan oleh JTB maupun JTT. Untuk medium *sludge* yang dicampur serbuk gergaji, aktivitas lakase JTB maksimum (1,586 U/mL) muncul lebih awal demikian pula aktivitas Mn-P yang dihasilkan JTT (2,121 U/mL), walaupun

*Pola aktivitas enzim ligninolitik Pleurotus ostreatus pada limbah sludge.....*

Tabel 8. Pola aktivitas enzim ligninolitik dua galur jamur tiram dari fase vegetatif hingga generatif pada enam medium yang diuji.

Table 8. Activity pattern of two strain oyster mushroom from vegetative to generative phase in six sludge media examined.

Medium/Enzim <i>Media/Enzyme</i>	JTB			JTT		
	Vegetatif <i>Vegetative</i>	Generatif <i>Generative</i>	Setelah generatif <i>Mature</i>	Vegetatif <i>Vegetative</i>	Generatif <i>Generative</i>	Setelah generatif <i>Mature</i>
<i>Serbuk gergaji (Sawdust)</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vvv	vv	v	vvv	v	vv
MnP	vvv	v	v	vvv	v	vv
LiP	v	vv	-	vv	-	-
<i>Sludge</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vv	-	-	v	-	-
MnP	vv	-	-	vv	-	-
LiP	vv	-	-	vv	-	-
<i>Sludge+Serbuk gergaji Sludge+ sawdust</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vvv	v	vv	vvv	vv	vv
MnP	vvv	vv	-	vv	v	-
LiP	vv	vv	-	vv	v	-
<i>Serbuk gergaji+pengaya Sawdust + enriched sludge</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vv	v	vv	v	vv	v
MnP	vv	v	vv	vv	-	v
LiP	v	vv	-	V	vv	-
<i>Sludge+pengaya Sludge + enriched sludge</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vv	v	v	v	-	-
MnP	vvv	v	-	vv	-	-
LiP	vv	v	-	vvv	-	-
<i>Sludge+serbuk gergaji+pengaya Sludge+sawdust+enriched sludge</i>						
Lakase ( <i>Laccase</i> )	vv	v	vv	vv	v	v
MnP	vvv	v	vv	v	-	-
LiP	v	v	-	v	-	-

Keterangan (Notes): v =rendah (*small*); vv = sedang (*moderate*); vvv = tinggi (*high*)

masih dalam fase yang sama yaitu vegetatif. Perbedaan ini diduga disebabkan komposisi medium yang digunakan.

Ford *et al.* (2007) mengemukakan bahwa umur kultur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi biodegradasi PCP (pentaklorofenol) di samping adanya kosubstrat, dan komposisi substrat. Bagaimanapun juga, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa medium yang menghasilkan aktivitas enzim ligninolitik yang relatif stabil dari saat inokulasi hingga setelah fase tubuh buah untuk lakase berturut-turut ialah medium serbuk gergaji, *sludge*+serbuk gergaji, *sludge* yang diperkaya, dan *sludge*+serbuk gergaji yang diperkaya, sedangkan untuk Mn-P dan Li-P stabilitas enzim dalam penelitian ini tidak terlihat.

Becker & Sinitsyn (1993), Martinez *et al.* dan Giardina *et al.* dalam Lankinen (2004) mengemukakan bahwa *P. ostreatus* merupakan jamur yang menghasilkan kombinasi lakase dan Mn-P. Hal yang sama juga dikemukakan Hatakka *et al.* (1994), bahwa Li-P tidak terdeteksi baik dalam kultur cair maupun kultur padat dari substrat lignoselulosa. Namun demikian Akhmedova (1996) dalam Caramelo *et al.* (1998) menjumpai adanya aktivitas Li-P pada *P. ostreatus*. Hal yang hampir sama juga dikemukakan Chen *et al.* (1991), bahwa *P. chrysosporium* tidak memproduksi peroksidase pada kultur cair, namun pada kultur padat yang mengandung karbon rendah dengan penambahan sumber N dalam bentuk NH<sub>4</sub> dijumpai aktivitas Li-P. Mester *et al.* (1995) juga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas peroksidase sebagai respons terhadap konsentrasi N yang tinggi. Penelitian ini mendeteksi enzim Li-P dengan aktivitas yang tinggi pada medium *sludge* yang diperkaya. Hal ini diduga disebabkan lebih rendahnya C/N

rasio atau lebih tingginya kandungan N dalam *sludge* dibandingkan dengan serbuk gergaji.

Aktivitas lakase, Mn-P dan Li-P dapat dijumpai pada limbah *sludge* atau yang mengandung *sludge* yang diinokulasi *P. ostreatus*, namun aktivitas tersebut lebih rendah dibandingkan dengan serbuk gergaji. Aktivitas lakase tertinggi untuk JTB dan JTT ialah pada medium campuran serbuk gergaji dan *sludge* yang diperkaya yaitu sebesar 1,697 U/mL dan 2,113 U/mL (setara dengan 4,24 U/g dan 5,28 U/g). Aktivitas lakase tertinggi ini lebih rendah jika dibandingkan dengan aktivitas lakase *A. bisporus* yang dilaporkan Bonnen *et al.* (1994) yaitu sebesar 8,5 U/g.

Aktivitas Mn-P tertinggi dalam penelitian ini ialah pada medium *sludge* yang diperkaya yaitu mencapai 4,394 U/mL atau setara dengan 21,95 U/g yang dihasilkan oleh JTB. Bonnen *et al.* (1994) menunjukkan bahwa aktivitas Mn-P ialah 2,4 U/g. Aktivitas enzim pada penelitian Bonnen *et al.* (1994) lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas Mn-P tertinggi yang dihasilkan dalam penelitian ini. Aktivitas MnP dalam penelitian ini juga lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Xianghua *et al.* (2007). Xianghua *et al.* (2007) melaporkan bahwa produksi enzim Mn-P yang dihasilkan oleh *P. chrysosporium* ialah sebesar 380 U/L, dan dengan penambahan glukosa aktivitasnya meningkat menjadi 666 U/L.

Pada medium *sludge* saja yang diperkaya dijumpai aktivitas Li-P tertinggi baik pada JTB (2,706 U/mL setara 13,53 U/g) maupun JTT (4,014 U/mL, setara 20,07 U/g). Hasil ini menunjukkan bahwa *sludge* mempunyai potensi sebagai substrat enzim LiP dan MnP yang diduga disebabkan terdapatnya unsur mikro esensial seperti Mn dan Fe yang diperlukan

untuk aktivitas kedua enzim tersebut. Walaupun demikian perbaikan aerasi pada *sludge* diduga dapat memperbaiki aktivitas enzim tersebut.

### Kesimpulan

Aktivitas lakase, Mn-P dan Li-P dapat dijumpai pada limbah *sludge* yang diinokulasi *P. ostreatus*. Aktivitas enzim lignolitik dipengaruhi oleh tahap perkembangan jamur. Pada umumnya aktivitas enzim lignolitik tertinggi ialah pada fase vegetatif yaitu mencapai 2,113; 4,394 dan 4,014 U/mL masing masing untuk lakase, Mn-P dan Li-P yang teramati pada medium *sludge*+serbuk gergaji yang diperkaya, *sludge* yang diperkaya, dan *sludge* yang diperkaya. Tidak terbentuknya tubuh buah pada media *sludge* dan kaitannya dengan morfologi miselium dan pola aktivitas enzim merupakan kajian yang dapat dipelajari dalam usaha meningkatkan produksi tubuh buah jamur pada medium *sludge* saja.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bonnen, A., M. L.H. Anton & A. B. Orth. (1994). Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 960-965.
- Bourbonnais, R. & G. Price (1992). Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2' azinobis (3-ethylen thiazoline-6 sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 823-827.
- Caramelo, L., Martinez M. J. & A. T. Martinez (1998). A search for ligninolytic peroxidase in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha keto g thiomethylbutyric acid and lignin model dimmers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 916-922.
- Chen, A.H.C., C.G. Dosoretz & H. E Grethlein (1991). Ligninase production by immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* grown under nitrogen-sufficient conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 404-407.
- Collins, P. J. & A. D. Dobson (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3444-3450.
- Durrant, A. J., D.A.Wood & R. B. Cain (1991). Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 751-755.
- Ford, C. I., M. Walter, G. I. Northcott, H. J. Di, K. C. Cameron & T. Trower (2007). Fungal inoculum properties : Extracellular enzyme expression and pentachlorophenol removal by new Zealand *Trametes* species in contaminated field. *J. Environ. Qual.*, **36**, 1749-1759.
- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser & D. Haltrich (2003). Increased production of laccase by the wood degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 529-536.
- Gianfreda, I., F. Xu & J. M Bollag (1999). Laccase a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.*, **3**, 1-25.
- Gunawan, A.W. (1990). *Budidaya Jamur Tiram* (Audio Visual). Bogor, PAU Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor. 22p.
- Hatakka, A. (1994). Lignin Modifying enzyme from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation FEMS *Microbiol. Rev.*, **13**, 125-135.
- Karahanian, E., G. Corsini, S. Lobos & R. Vicufia (1998). Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermi-ispora*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 65-74.

- Lankinen, P. (2004). Ligninolytic enzymes of the basidiomycetes fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. (Disertasi) Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology. Viikki Biocenter, University of Helsinki, Finland. 23 Nov 2004.
- Lante, A., A. Crapisi, G. Pasini, A. Zamorani & P. Spettoli (1992). Immobilized laccase for must and wine processing, *Enzyme Eng.*, **11**, 558-562.
- Machado, K. M. G. & D. R. Matheus (2006). Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian J. Microbiol.*, **37**, 468-473.
- Mester, T. Pena M. & J. A. Field (1995). Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 778-784.
- Moreira, M.T, G. Feijoo, R. Sierra-Alvarez, J.M Lema & J. A. Field (1997). Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. *J. Biotechnol.*, **53**, 237-251.
- Niku-Poavola, M. L., E. Karhunen, P. Salola & V. Raunia (1988). Ligninolytic enzyme of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.*, **254**, 877-884.
- Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco., B. Fontanella & G. Sannia (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 920-924.
- Pointing, S. B., E. B. G. Jones & L. L. P. Vrijmoed (2000). Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguines* in submerged liquid culture. *Mycologia*, **92**, 139-144.
- Tien, M. & T. K. Kirk (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *In Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2280-2284.
- Vladimir, E., E. David, K. Eva, T. Nino & K. Tamar (2003). Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr) Kumm. (Agaricomycetideae). *Internai. J. Medicinal Mushroom*, **5**, 193-198
- Widiastuti, H. & A. W. Gunawan (1991). Pemanfaatan limbah pabrik kertas sebagai campuran medium dalam budidaya jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*). Dalam: Darnaedi D. et al. (Ed), *Prosiding Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional Biologi X, 24-26 September 1991*. Bogor, Perhimpunan Biologi Indonesia dan PAU Ilmu Hayat IPB.
- Widiastuti, H., Siswanto & Suharyanto (2007). Optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim ligninolitik dari *Omphalina* sp dan *Pleurotus ostreatus* pada fermentasi padat. *Menara Perkebunan*, **75**, (2), 93-105.
- Xie, J., Sun X, I. Ren & Y. Z. Zhang (2001). Studies on lignocellulolytic enzymes production and biomass degradation of *Pleurotus* sp2 and *Trametes gallica* in wheat straw cultures. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, **17**, (5), 575-578.
- Xianghua, W., F. Yan & Z. Xiaoyan (2007). Influence of glucosa feeding on the ligninolytic enzyme production of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Front Environ. Sci. Engin. China*, **1**, (1), 89-94.
- Yaropolov, A. I., O. V. Scorobogatk'a, S S Vartanov & S. D. Varvolomeyev (1994). Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 257-280.