

## Eksplorasi dan karakterisasi bakteri aerob ligninolitik serta aplikasinya untuk pengomposan tandan kosong kelapa sawit

*Exploration and characterization of ligninolytic aerobic bacteria and its application in composting oil palm empty fruit bunch*

Haryo Tejo PRAKOSO, Happy WIDIASTUTI\*), SUHARYANTO & SISWANTO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No 1. Bogor 16128, Indonesia

Diterima tanggal 21 Januari 2014/disetujui tanggal 28 April 2014

### Abstract

*Lignin is a complex compounds that makes up the cell walls of plants and is quite difficult to degrade at normal ambient condition. One of the organic materials with high lignin content is empty fruit bunches (EFB) of oil palm. So far, the well-studied microorganism to degrade lignin is of a class of fungi. Utilization of bacteria to degrade lignin in EFB has rarely been reported although application of the bacteria is very important if it is associated with aerobic composting which requires regular turning process and supporting clean development mechanism (CDM). The objective of this study was to explore and characterize the bacteria having capability to degrade lignin in EFB. The result showed that from 14 types of sample, 12 and 11 isolates were obtained through non enrichment and enrichment methods respectively. Qualitative test was performed using a lignin derivative dye (methylene blue/MB) suspended in Luria Bertani (LB) solid media and the formation of the clear zone was observed, while quantitative assay was performed with enzyme activity assays of laccase (Lac), manganese peroxidase (Mn-P), and lignin peroxidase (Li-P). The best isolate (FS isolate) was obtained from enrichment method that able to make 0.6 cm clear zone of LB media + MB and actively produced laccase, manganese peroxidase with and without addition of Mn with an activity of 2.68, 20.02, and 0.36 U/mL, respectively. While the best isolate from non enrichment method was CRK 1, that was able to make 0.3 cm clear zone and produced Mn-peroxidase with and without addition of Mn as much as 2.09 and 0.23 U/mL, respectively. Application of the decomposer formula could speed up the declining rate of C/N ratio and suppressing Escherichia coli and Salmonella sp. in EFB compost produced.*

[Keywords: Microorganisms, lignin depolymerization, decomposer formula, waste treatment, empty-fruits bunches]

### Abstrak

Lignin merupakan senyawa kompleks yang menyusun dinding sel tanaman dan cukup sulit didegradasi secara alami. Salah satu bahan organik yang mempunyai kadar lignin tinggi adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Sejauh ini, mikroorganisme yang banyak dipelajari dalam mendegradasi lignin adalah dari golongan jamur. Penggunaan bakteri dalam mendegradasi lignin pada TKKS belum banyak dilaporkan walaupun peran bakteri ligninolitik aerob sangat penting jika dikaitkan dengan proses pengomposan secara aerob yang membutuhkan pembalikan secara berkala dan program *clean development mechanism* (CDM). Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi dan meng-

karakterisasi bakteri yang berpotensi mendegradasi lignin dalam pengomposan TKKS. Dari 14 jenis sampel diperoleh sebanyak 12 dan 11 isolat melalui metode tanpa dan dengan pengkayaan. Uji kualitatif dilakukan dengan mengukur terbentuknya zona bening pada media Luria Bertani (LB) padat yang mengandung senyawa warna turunan lignin (biru metilen/MB). Uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur aktivitas lakase, Mn-peroksidase, dan lignin peroksidase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat FS merupakan isolat terbaik dari metode pengkayaan yang mampu membentuk zona bening pada medium LB + MB 0,6 cm, sedangkan isolat terbaik dari metode tanpa pengkayaan adalah CRK 1 dengan zona bening 0,3 cm pada medium yang sama setelah inkubasi semalam. Isolat FS memiliki aktivitas lakase, Mn-peroksidase dengan dan tanpa Mn berturut-turut adalah sebesar 2,68; 20,02; dan 0,36 U/mL, sedangkan isolat CRK 1 memiliki aktivitas Mn-peroksidase dengan dan tanpa Mn berturut-turut adalah 2,09 dan 0,23 U/mL. Aplikasi formula dekomposer pada pengomposan 200 ton TKKS mampu mempercepat laju penurunan nisbah C/N dan menekan populasi *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp.

[Kata kunci: Mikroorganisme, depolimerisasi lignin, formula dekomposer, penanganan limbah, tandan kosong kelapa sawit]

### Pendahuluan

Lignin merupakan senyawa kompleks yang terdiri dari subunit fenilpropana yang terdimetoksilasi, monometoksilasi, dan non-metoksilasi (Martinez *et al.*, 2005), dan banyak ditemukan pada dinding sel sekunder tanaman. Senyawa tersebut mengisi celah di antara selulosa, hemiselulosa, dan pektin sehingga membuat dinding sel lebih kaku, hidrofobik serta sulit didegradasi oleh mikroorganisme (Bugg *et al.*, 2010). Salah satu bahan organik dengan kandungan lignin yang tinggi adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yakni sebesar 15 -18% (Ariffin *et al.*, 2008). Widiastuti *et al.* (2008) melaporkan bahwa beberapa kelompok jamur pelapuk putih dari golongan basidiomisetes dapat mendegradasi lignin karena menghasilkan enzim ligninolitik seperti lakase (Lac), lignin peroksidase (Li-P), dan Mn-peroksidase (Mn-P). Depolimerisasi lignin menggunakan fungi sering menghasilkan beragam senyawa aromatik berbobot molekul rendah seperti guaiakol, koniferil alkohol, *p*-kumarat, ferulat, protokatekuat, *p*-hidroksibenzoat dan vanilat (Masai *et al.*, 2007). Penggunaan jamur dalam proses dekomposisi lignin sudah banyak dilaporkan.

\*) Penulis Korespondensi: happywidastuti@yahoo.com

Nasrul & Maimun (2009) menggunakan *Phanerochaete chrysosporium*, salah satu spesies fungi dari golongan basidiomisetes yang enzim ligninolitiknya sudah banyak dipelajari untuk mengomposkan TKKS. Amira et al. (2013) juga melaporkan penggunaan jamur dari golongan Deuteromiset yaitu *Trichoderma sp.* dalam mengomposkan TKKS dan dilaporkan bahwa aktivitas enzim yang terlihat cukup tinggi adalah xylanase dan selulase.

Isu meningkatnya gas rumah kaca yang menyebabkan pemanasan global beberapa dasawarsa terakhir perlu diantisipasi dengan berbagai macam cara. Terkait pengurangan gas rumah kaca dalam pengomposan TKKS, peranan bakteri aerobik sebagai dekomposer sangat dibutuhkan. Penggunaan dekomposer jamur untuk proses fermentasi substrat padat seperti TKKS terkendala oleh struktur morfologis jamur berupa miselium sehingga diduga pembalikan pada tumpukan kompos untuk pemerataan proses, penurunan panas yang terlalu tinggi dan pemberian aerasi akan mengganggu pertumbuhan miselium dan kolonisasi jamur. Hal tersebut secara empiris dapat dilihat pada fermentasi tempe kedelai, oncom, dan produksi jamur konsumsi akan gagal bila substrat diganggu dengan pembalikan dan pengadukan. Tumpukan kompos (*windrow*) yang jarang dilakukan pembalikan, akan menciptakan kondisi anaerob dan mengarah pada pembentukan gas rumah kaca. Pengurangan emisi gas rumah kaca merupakan parameter yang harus diperhatikan bila suatu pabrik kompos ingin menerapkan praktik mekanisme pembangunan bersih (*clean development mechanisms*).

Penggunaan bakteri dalam proses dekomposisi lignin belum banyak dilaporkan, namun beberapa peneliti menggunakan *Sphingomonas sp.*, *Streptomyces sp.* (Bugg et al., 2010), *Pseudomonas sp.* (Delalibera et al., 2007), *Bacillus SCH1*, *Ochrobactrum sp.*, *Leucobacter sp.* (Rahman et al., 2013) sebagai bakteri ligninolitik. Goenadi et al. (2006) telah melakukan eksplorasi mikroba tropika khususnya fungi tingkat rendah seperti *Trichoderma sp.* dan fungi pelapuk putih yang terbukti mampu meningkatkan laju pengomposan limbah padat perkebunan. Menurut Masai et al. (2007) enzim yang dihasilkan bakteri ligninolitik tersebut tidak sepenuhnya sama dengan yang dimiliki oleh jamur pelapuk putih, walaupun ada beberapa bakteri yang memiliki sistem enzim yang sama dengan yang dipunyai oleh jamur (Bugg et al., 2010). Beberapa di antaranya adalah glutathione-S-transferase yang dapat memutus ikatan  $\beta$ -aril eter yang merupakan ikatan terbanyak dalam lignin (50-70%) dan dioksigenase yang mengkatabolisme struktur bifenil, asam vanilat, dan asam siringat dalam lignin (Masai et al., 2007). Bakteri penghasil enzim tersebut berpeluang besar untuk dimanfaatkan dalam proses dekomposisi lignin karena masing-masing tanaman memiliki struktur lignin penyusun dinding sel yang unik.

Isolasi bakteri yang berpotensi mendegradasi lignin sudah pernah dilaporkan dari beberapa sampel yang mengandung lignin seperti tanah di bawah balok kayu yang terdekomposisi (Bandounas et al., 2011), tanah sekitar kebun kelapa sawit (Rahman et al., 2013), kotoran gajah dan saluran gastrointestinal kuda dan banteng yang merupakan hewan ruminansia (Wahyudi et al., 2010). Pemanfaatan enzim lignin peroksidase dari bakteri untuk *biobleaching* pernah dilaporkan oleh Bholay et al. (2012), sedangkan Arias et al. (2003) melaporkan hasil yang sama untuk enzim lakase. Pemanfaatan bakteri ligninolitik aerob yang dapat mendegradasi lignin dari TKKS belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri ligninolitik aerob unggul yang memiliki kemampuan untuk mempercepat dekomposisi TKKS.

## Bahan dan Metode

### Sampel untuk isolasi bakteri ligninolitik

Sampel berupa padatan dan cairan diperoleh dari area pengomposan TKKS di Pabrik Kompos di Palembang, Sumatera Selatan (Tabel 1). Sampel padat dimasukkan ke dalam plastik *high density polyethylene* (HDPE) kemudian diberi label, sedangkan sampel cair dimasukkan ke dalam botol dan diberi label.

### Isolasi bakteri dengan metode tanpa pengakayaan

Sampel yang diperoleh diencerkan serial dari  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-8}$  menggunakan larutan garam fisiologis. Larutan hasil pengenceran (0,1 mL) kemudian ditaburkan dan diratakan di atas permukaan medium nutrient agar mengandung asam galat 0,4 mL/L dan diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama satu sampai tiga hari. Selanjutnya isolat yang tumbuh dimurnikan dan disimpan untuk pengujian lebih lanjut.

### Isolasi bakteri dengan metode pengkayaan

Isolasi bakteri dengan metode pengkayaan dilakukan mengikuti Bandounas et al. (2011) yang dimodifikasi dengan mengganti sumber karbon yang semula menggunakan *non-dialysed* Kraft lignin dengan serbuk kering TKKS berukuran 50 mesh. Sampel padat sebanyak 5 g atau sampel cair sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam 100 mL larutan garam fisiologis dan selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  sambil digoyang pada kecepatan 200 rpm. Selanjutnya 5 mL campuran tersebut dipindahkan ke dalam 100 mL Mineral Medium Lignin (MML) kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  sambil digoyang pada kecepatan 200 rpm. Komposisi MML (per liter aquades) adalah:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,55 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,85 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1 g, EDTA 10 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,2 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,4 mg,

Tabel 1. Jenis sampel yang digunakan dalam isolasi bakteri ligninolitik.

Table 1. Type of samples used in the ligninolytic bacterial isolation.

No	Jenis sampel/Type of sample	Sandisampel/Sample code
1	Serabut/Fiber	F1
2	Abu boiler /Boiler ash	AB
3	Tanah dalam pabrik kompos/Soil in compost processing plant	TPK
4	Serabut segar /Fresh fiber	FS
5	Kompos 45 hari/Compost produced after 45 days	K1
6	Kompos 40 hari/Compost produced after 40 days	K2
7	Kompos 25 hari/Compost produced after 25 days	K3
8	Kompos 20 hari/Compost produced after 20 days	K4
9	Ampas perasan break cutter/Break cutter cake compost	APB
10	Bubur pabrik kompos/Compost sludge	BPK
11	Air limbah biogas/Biogas POME	CLB
12	Air limbah PMKS kolam asidifikasi/POME from acidified pond	CKA
13	Air lindi kompos/Compost leachate	CLK
14	Rembesan kompos/Leak water of compost	CRK

MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mg, serbuk TKKS 50 mesh 5 g. Sedangkan untuk bakteri genus *Bacillus* ditambahkan lagi CuSO<sub>4</sub> 0,5 mg, dan yeast extract 0,1 g. Setelah itu, dilakukan transfer suksesif dengan cara sebanyak 1 mL suspensi dari medium MML yang lama di-transfer ke medium MML yang baru, kemudian diinkubasi ulang pada kondisi yang sama. Transfer suksesif tersebut dilakukan sebanyak tujuh kali. Hasil transfer suksesif kemudian dikulturkan pada medium agar miring Luria Bertani (LB) untuk pengujian selanjutnya.

#### Uji kualitatif kemampuan ligninolitik

Isolat yang didapat, baik dari metode tanpa maupun dengan pengkayaan, diuji kemampuan ligninolitiknya secara kualitatif dengan cara mengukur zona bening yang dihasilkan pada medium LB yang diberi pewarna derivat lignin yaitu biru metilen (*metilen blue*) dengan konsentrasi 25 mg/L (Bandounas *et al.*, 2011). Medium LB + biru metilen diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 atm, lalu dituangkan ke cawan Petri steril. Uji bakteri ligninolitik dilakukan dengan cara meratakan 0,1 mL suspensi bakteri umur 48 jam pada permukaan (*spread plate method*) medium padat LB + biru metilen. Bakteri ligninolitik dikulturkan pada suhu 30°C selama 24 jam. Terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut menghasilkan enzim yang mendegradasi lignin yang ada di sekitarnya.

#### Uji kuantitatif kemampuan ligninolitik

Karakterisasi isolat juga dilakukan dengan mengukur kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim Lac, Li-P, dan Mn-P. Preparasi untuk pengukuran ketiga enzim tersebut dilakukan bersamaan. Sebanyak 2 g serbuk TKKS ukuran 50 mesh ditambahkan ke dalam 100 mL bufer fosfat pH 7 dan disterilisasi menggunakan autoklaf. Isolat bakteri kemudian diinokulasi ke suspensi TKKS

tersebut dan diinkubasi selama seminggu pada suhu 30°C dan digoyangkan dengan kecepatan 200 rpm.

Analisis aktivitas lakase mengikuti metode yang dikemukakan Sheikhi *et al.*, (2012). Sebanyak 0,4 mL alikuot ditambahkan pada campuran 0,5 mL bufer asetat pH 5 dan 0,1 mL ABTS 1 mM kemudian divorteks. Untuk pengukuran enzim Li-P, 0,2 mL alikuot ditambahkan pada campuran 0,1 mL veratril alkohol, 0,2 mL bufer asetat pH 5, 0,05 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan 0,45 mL aquades kemudian divorteks (Tien & Kirk, 1988). Analisis aktivitas enzim Mn-peroksidase dilakukan mengikuti metode yang dikemukakan Huang *et al.* (2010) dengan dua macam pengukuran. Pengukuran yang pertama adalah menambahkan 0,2 mL alikuot pada campuran 0,1 mL natrium laktat pH 5, 0,1 mL guaiakol, 0,2 mL MnSO<sub>4</sub>, 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan 0,3 mL aquades. Pengukuran yang kedua dilakukan dengan tidak menggunakan MnSO<sub>4</sub> sehingga volume aquades yang dipakai adalah 0,5 mL. Kedua hasil pencampuran dalam penentuan kadar enzim Mn-P kemudian divorteks. Penentuan kadar enzim Lac, Li-P, dan Mn-P dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang secara berurutan adalah 420 nm, 310 nm, dan 465 nm pada menit ke 0 dan 30. Satu unit aktivitas lakase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi 1 µmol ABTS per menit. Satu unit aktivitas lignin peroksidase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang mengoksidasi 1 µmol veratril alkohol per menit. Satu unit aktivitas Mn-peroksidase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk mengoksidasi 1 µmol guaiakol per menit.

#### Keefektifan formula dekomposer bakteri ligninolitik

Bakteri ligninolitik terpilih selanjutnya diformulasi menggunakan campuran zeolit dan gambut (1:1, b/b) sebagai bahan pembawa. Dalam formulasinya dua bakteri ligninolitik terpilih dipadukan dengan bakteri selulolitik isolat K3. Bakteri K3 adalah bakteri selulolitik yang diisolasi dari kompos TKKS

hasil inkubasi 25 hari yang menunjukkan pembentukan zone bening sebesar 0,75 cm pada medium CCRA (data tidak ditunjukkan). Populasi masing-masing bakteri dalam formula dekomposer berkisar antara  $10^7$ - $10^8$  cfu/g. Selanjutnya, formula dekomposer yang diperoleh diuji keefektifannya dalam pengomposan TKKS pada skala komersial. Jumlah TKKS segar yang digunakan adalah 200 ton. Bahan tersebut sebelumnya sudah dicacah dengan mesin pencacah (*rotary chipper*) berukuran 10-25 cm. TKKS di-hamparkan (*windrow*) pada bangsal pengomposan di atas lantai semen dengan ketinggian 2,5-3,0 m dan lebar 2-2,5 m. Dua perlakuan yang diuji adalah tanpa dan dengan pemberian formula dekomposer bakteri ligninolitik aerob. Dosis formula dekomposer yang digunakan 4 kg untuk tiap ton TKKS.

Formula dekomposer diaplikasikan dengan cara melarutkan 4 kg formula ke dalam 100 L air limbah asal instalasi biogas. Sebelum digunakan, TKKS di-jenuhkan dengan air limbah yang berasal dari instalasi biogas, disiram dengan campuran bakteri ligninolitik aerob. Cairan bakteri ligninolitik aerob disiramkan pada tumpukan TKKS selapis demi selapis dan diinkubasi selama 110 hari. Tumpukan TKKS disiram dengan air limbah asal instalasi biogas tiap hari pada minggu pertama dan tiga hari sekali pada tiga minggu berikutnya hingga memiliki kadar air sekitar 50%. Selama masa inkubasi, dilakukan pembalikan TKKS setiap dua hari dengan mesin pembalik berjalan (*dump tractor turner*) dan bersamaan dengan pembalikan juga dilakukan penyiraman dengan air limbah asal instalasi biogas untuk menjaga kadar air tetap optimum. Peubah yang diamati setiap tiga hari adalah kadar air, kadar oksigen, dan suhu, sedangkan kadar C (Walkley & Black) dan N (Kjeldahl) serta pH diamati setiap 10 hari. Populasi *E. coli* diperiksa dengan metode MPN menggunakan *EC broth*, sedangkan populasi *Salomonella* sp. diperiksa dengan menumbuhkannya pada medium *Salmonella & Shigella* agar (SSA) setiap 30, 60, dan 90 hari inkubasi.

## Hasil dan Pembahasan

### Isolasi bakteri ligninolitik

Isolasi bakteri ligninolitik yang dilakukan dengan metode yang dilaporkan Bandounas *et al.* (2011) dengan modifikasi sumber karbon berupa TKKS ukuran 50 mesh, menunjukkan bahwa isolat yang tumbuh dari metode pengkayaan cenderung murni dibandingkan dengan metode tanpa pengkayaan (data tidak ditunjukkan). Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri yang tumbuh sudah terseleksi yakni hanya bakteri yang dapat memanfaatkan sumber karbon dari TKKS saja. Transfer suksesif dilakukan untuk meng-kondisikan bakteri agar dapat beradaptasi pada satu-satunya sumber karbon yang diberikan pada medium tersebut. Dari 14 sampel, sebanyak 12 isolat diperoleh melalui metode tanpa pengkayaan dan 11 isolat didapatkan melalui metode pengkayaan sehingga total isolat yang diperoleh adalah 23.

Bakteri yang diisolasi dari metode tanpa pengkayaan lebih banyak berasal dari sampel cair (tujuh isolat) daripada sampel padat (lima isolat). Sedangkan bakteri yang diisolasi dari metode pengkayaan lebih banyak berasal dari sampel padat (tujuh isolat) daripada sampel cair (empat isolat). Hal ini meng-indikasikan bahwa senyawa lignin lebih banyak terdapat pada sampel yang padat seperti di tanah dari pada dalam sampel cair seperti di air danau atau air limbah, sehingga bakteri yang dapat memanfaatkan senyawa lignin lebih banyak diisolasi pada tanah. Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Bholay *et al.* (2012) yang mengisolasi bakteri ligninolitik dari sampel kompos kotoran sapi, tanah, tunggul pohon dan air danau menggunakan prinsip pengkayaan.

### Karakterisasi isolat ligninolitik

Pada uji kualitatif degradasi ligninolitik menurut Bandounas *et al.* (2011), kemampuan pembentukan zona bening masing-masing isolat yang diperoleh dari metode tanpa pengkayaan dan dengan pengkayaan menunjukkan bahwa tidak semua isolat yang diperoleh mempunyai kemampuan membentuk zona bening (Tabel 2 dan 3). Pembentukan zona bening pada isolat tanpa pengkayaan adalah 0,3 cm dan berkisar antara 0 sampai 0,6 cm untuk isolat yang diperoleh dengan pengkayaan. Pembentukan zona bening terbesar dari metode tanpa pengkayaan diperoleh pada isolat CRK 1, CRK 3, K 4.1 dan K 4.2 yaitu 0,3 cm, sedangkan dari metode pengkayaan yaitu isolat FS dan CLB yang mampu membentuk zona bening sebesar 0,6 cm. Gambar 1 menunjukkan pembentukan zona bening isolat CRK yang ditumbuhkan pada medium LB yang ditambahkan biru metilen. Zona bening yang terbentuk mengindikasikan adanya degradasi biru metilen oleh isolat CRK. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni CRK 0,3 cm. Walaupun demikian Bholay *et al.* (2012) melaporkan bahwa biru metilen juga dapat digunakan untuk pengujian kemampuan lignolitik secara kuantitatif yaitu dengan melihat derajat demetilasi lignin peroksidase terhadap biru metilen.

Tabel 2 dan 3 menjelaskan bahwa masing-masing sebanyak delapan isolat (FS1, FS2, FS3, CRK2, CRK4, CKA1, CKA2, dan CKA3) dan lima isolat (AB, TPK, BPK, CKA, CRK) tidak menunjukkan pembentukan zona bening pada medium uji biru metilen namun memiliki aktivitas lignolitik. Hal ini diduga isolat-isolat tersebut tidak mendegradasi biru metilen namun dapat mendegradasi senyawa pewarna lain seperti biru toluidin dan biru azure seperti yang dikemukakan oleh Boundunas *et al.* (2011). Hasil uji kuantitatif kemampuan ligninolitik isolat yang diperoleh melalui metode tanpa pengkayaan disajikan pada Tabel 2, sedangkan yang diperoleh dari metode dengan pengkayaan disampaikan pada Tabel 3. Aktivitas lakase isolat yang diperoleh dari metode tanpa pengkayaan berkisar antara 0 – 0,48 U/mL, sedangkan aktivitas Mn-peroksidase dengan dan tanpa

Tabel 2. Aktivitas enzim ligninolitik isolat bakteri hasil isolasi dengan metode tanpa pengkayaan yang ditumbuhkan dalam medium padat LB + biru metilen dan medium cair mengandung TKKS 2%.

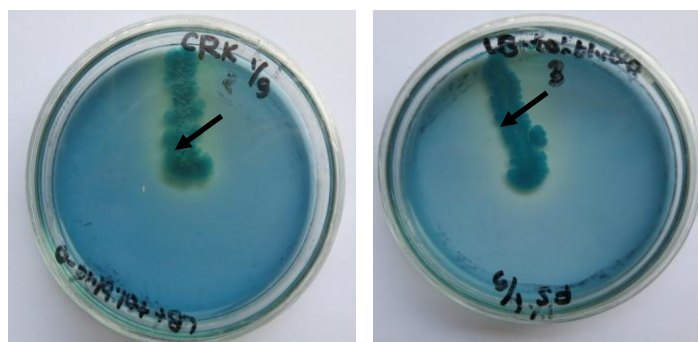
Table 2. Ligninolytic activity of bacteria isolates obtained from non-enrichment method grown on solid medium of LB + methylene blue and liquid medium containing 2% EFB.

No	Sampel Sample	Zona bening Clear zone (cm)	Aktivitas enzim (Enzyme activity) (U/mL)			
			Lakase Laccase	Mn- peroxidase Mn-ese peroxidase		Lignin peroxidase Lignin peroxidase
				+Mn	-Mn	
1	K4 1	0,3	0	0,344	0.069	0
2	K4 2	0,3	0	0	0.055	0
3	FS 1	0	0	0	0.000	0
4	FS 2	0	0	0,399	0.647	0
5	FS 3	0	0	0	0.096	0
6	CRK 1	0,3	0	2,080	0.234	0
7	CRK 2	0	0	0,220	0.028	0
8	CRK 3	0,3	0	0,537	0	0
9	CRK 4	0	0,231	0	0	0.143
10	CKA 1	0	0	0	0.152	0
11	CKA 2	0	0,484	0,014	0.083	0
12	CKA 3	0	0	0	0.028	0

Tabel 3. Aktivitas enzim ligninolitik isolat bakteri hasil isolasi dengan metode pengkayaan yang ditumbuhkan dalam medium padat LB + biru metilen dan medium cair mengandung TKKS 2%.

Table 3. Ligninolytic activity of bacteria isolates obtained from enrichment method grown on solid medium of LB + methylene blue and liquid medium containing 2% EFB.

No	Sampel Sample	Zona bening Clear zone (cm)	Aktivitas enzim (Enzyme activity) (U/mL)			
			Lakase Laccase	Mn- peroxidase Mn-ese peroxidase		Lignin peroxidase Lignin peroxidase
				+Mn	-Mn	
1	AB	0	0	0	0	1,6487
2	TPK	0	0	0	0	1,7700
3	FS	0,6	2,6782	20,0245	0,3581	0
4	K2	0,5	0	0	0	3,9427
5	K3	0,03	0	0	0,0275	4,6595
6	APB	0,05	0	0	0,0275	3,8351
7	BPK	0	0,0023	0	0	1,2306
8	CLB	0,6	0,0481	0	0,0138	0
9	CKA	0	0	0	0	5,0538
10	CLK	0,05	0	0	0,0551	0
11	CRK	0	0	0	0,2342	2,8495



Gambar 1. (A). Isolat CRK (hasil isolasi tanpa pengkayaan) dan (B). Isolat FS (hasil isolasi dengan pengkayaan) membentuk zona bening (tanda panah) pada medium LB + 25 mg/Lbiru metilen.

Figure 1. (A). Clear zone formation of CRK and (B) FS isolate grown on LB medium added with 25 mg/L methylene blue.

penambahan Mn adalah 0 - 2,08 U/mL dan 0 - 0,65 U/mL dan aktivitas lignin peroksidase adalah 0 - 0,14 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua isolat hasil isolasi memiliki aktivitas enzim lakase. Satu isolat dapat memiliki satu, dua atau tiga jenis enzim lignolitik yang membuat isolat-isolat tersebut unik dalam hal kemampuan ligninolitiknya.

Isolat yang diperoleh dengan metode pengkayaan menunjukkan bahwa kisaran aktivitas lakase adalah 0 - 2,68 U/mL, aktivitas peroksidase dengan dan tanpa Mn masing-masing adalah 0 - 20,2 dan 0 - 0,36 U/mL, sedangkan aktivitas lignin peroksidase berkisar antara 0 - 5,05 U/mL. Hasil ini serupa dengan yang diperoleh dari metode tanpa pengkayaan yaitu masing-masing isolat mempunyai keunikan dalam aktivitas ligninolitiknya. Enzim Lac, Mn-P, dan LiP sangat jarang ditemukan berada pada satu organisme. Namun demikian, Rahman *et al.* (2013) berhasil mengisolasi tiga bakteri yang memiliki enzim ligninolitik lengkap.

Pengamatan terhadap isolat yang diperoleh tanpa dan dengan pengkayaan menunjukkan bahwa bakteri yang menghasilkan enzim lignin peroksidase banyak diperoleh dengan menggunakan metode pengkayaan. Aktivitas lignin peroksidase tertinggi yaitu sebesar 5,0538 U/mL diperoleh dari isolat CKA. Inisiasi produksi lignin peroksidase pada jamur berkaitan erat dengan respons kondisi metabolisme sekunder mereka dalam menanggapi penipisan nutrisi (Bugg *et al.*, 2011). Mekanisme yang sama diduga terjadi pada bakteri. Medium MML merupakan medium mineral minim nutrisi (Bandounas *et al.*, 2011) dengan sumber karbon dari TKKS sehingga bakteri yang tumbuh adalah bakteri yang mampu memanfaatkan TKKS sebagai sumber karbon dan energi.

Aktivitas lignolitik tidak selalu diikuti dengan kemampuan melarutkan senyawa biru metilen. Isolat yang paling potensial untuk mendegradasi lignin, masing-masing yang diperoleh dari metode tanpa dan dengan pengkayaan, adalah isolat CRK dan FS karena keduanya memberikan hasil terbaik pada uji kualitatif dan uji kuantitatif ligninolitik. Isolat CRK 1 setelah diinkubasi semalam menghasilkan zona bening sebesar 0,3 cm dan memiliki aktivitas enzim Mn-P, baik tanpa maupun dengan induksi Mn, yaitu berturut-turut sebesar 0,23 U/mL dan 2,08 U/mL. Sedangkan isolat FS setelah diinkubasi semalam menghasilkan zona bening sebesar 0,6 cm dan memiliki aktivitas enzim Lac sebesar 2,69 U/mL.

Aktivitas enzim Lac isolat FS lebih besar jika dibandingkan dengan *Streptomyces cyaneus* (1,2 U/mL) (Ariaset *et al.*, 2003) dan *Bacillus sp.* SHC1 (0,002U/mL) (Rahman *et al.*, 2013). Oliveira *et al.* (2009) melaporkan bahwa *Bacillus pumilus* memiliki aktivitas enzim Mn-P, dengan penambahan MnSO<sub>4</sub>, sebesar 0,0064 U/mL yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan isolat CRK 1 dan FS. Sedangkan aktivitas enzim Mn-P isolat *Bacillus sp.* SHC1 tidak jauh berbeda dengan isolat CRK 1 yaitu sebesar 2,009 U/mL (Rahman *et al.*, 2013).

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat CRK 1 termasuk ke dalam Gram positif, sedangkan

isolat FS dan K3 adalah Gram negatif (Gambar 2). Tiga isolat terbaik yang diperoleh oleh Rahman *et al.* (2013) merupakan campuran antara Gram positif dan Gram negatif dengan komposisi dua isolat Gram positif dan satu isolat Gram negatif. Analisis bioinformatika yang dilakukan oleh Bugg *et al.* (2010), menjelaskan bahwa setiap bakteri, baik yang tergolong Gram positif maupun negatif, memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mendegradasi lignin, tergantung jenis enzim yang dimiliki oleh masing-masing bakteri tersebut.

Selain enzim Lac, Mn-P, dan Li-P, Masai *et al.* (2007) melaporkan enzim lain yang berperan dalam degradasi lignin yaitu glutathione S transferase pada *Sphingomonas paucimobilis* yang berperan dalam memutus ikatan β-aril eter yang menyusun sampai dengan 60% ikatan pada struktur *hardwood* lignin. Potensi isolat yang diperoleh dalam menghasilkan enzim glutathione S transferase perlu dikaji untuk mendapatkan mekanisme yang lebih lengkap dalam mendegradasi TKKS.

#### Keefektifan formula dekomposer bakteri ligninolitik

Di samping lignin, TKKS mengandung selulosa dalam jumlah yang cukup besar yakni 37% - 45,95%. Oleh sebab itu, formulasi dekomposer untuk percobaan pengomposan pada skala lapang digunakan kombinasi bakteri ligninolitik dan isolat bakteri selulolitik. Isolasi bakteri pendegradasi selulosa dilakukan menggunakan medium *Cellulose-Congo Red Agar* (CCRA) (Feng *et al.*, 2013) dengan komposisi per liter: yeast extract 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g, MgSO<sub>4</sub> 0,25 g, merah kongo 0,5 g, gelatin 2 g, karboksimetil selulosa (CMC) 1,88 g yang dimodifikasi dengan penambahan 100 mL filtrat serbuk TKKS dan agar 15 g. Hasil isolasi dan seleksi diperoleh isolat bakteri selulolitik K3 yang berasal dari kompos umur 25 hari. Formula dekomposer yang diuji merupakan kombinasi isolat ligninolitik CRK dan FS serta isolat selulolitik K3.

Pengujian dekomposer dalam pengomposan TKKS dilakukan selama 110 hari untuk mengetahui kemampuan maksimal formula tersebut. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kadar air pada awal pengomposan berkisar antara 58-61%, kemudian berfluktuasi namun cenderung menurun hingga mencapai kadar air di bawah 40% pada inkubasi 77 hari (Gambar 3). Pertumbuhan bakteri mencapai optimum pada kadar air antara 60-70% sehingga diduga kadar air yang rendah menyebabkan penurunan aktivitas. Penstabilan kadar air dilakukan dengan penjemuran diawal proses pengomposan yaitu pada saat preparasi TKKS sebagai bahan baku kompos. Proses penyiraman dilakukan secara bertahap dalam jangka waktu tujuh hari. Namun demikian, hal tersebut belum dapat menjaga stabilitas kadar air TKKS selama pengomposan karena sulitnya air menembus gumpalan TKKS dengan ketinggian 2,5-3 m.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kadar oksigen lebih besar atau sama dengan 10% sehingga

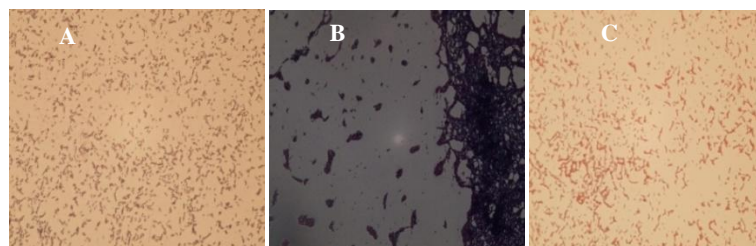
kondisi ini mencerminkan proses yang terjadi adalah aerobik (Baskoro, Komunikasi pribadi). Kondisi yang aerob diharapkan dapat mendukung aktivitas bakteri ligninolitik. Pembalikan untuk menjaga kondisi tetap aerob juga dilakukan secara rutin yaitu setiap dua hari sekali pada minggu pertama dan tiga hari sekali pada tiga minggu selanjutnya, sedangkan sisanya tidak dilakukan pembalikan karena dianggap sebagai proses pematangan. Gambar 4. menunjukkan perbedaan kadar oksigen antara TKKS yang diberi formula dekomposer bakteri ligninolitik (BL) dibandingkan dengan tanpa BL berkisar antara 0,1 – 2,1%.

Hasil analisis pH menunjukkan bahwa pH kompos di atas netral dan cenderung meningkat hingga pada kisaran pH 9, walaupun limbah biogas yang digunakan untuk menyiram TKKS bereaksi netral hingga sedikit alkalin pH 7-8 (Gambar 5). Perbedaan pH antara TKKS yang diberi dan tanpa formula dekomposer BL tidak cukup nyata. Reaksi TKKS yang cenderung basa kemungkinan disebabkan oleh deaminasi protein air limbah dari instalasi biogas yang digunakan dalam penyiraman maupun dari ammonia yang dihasilkan TKKS (Supadma & Arthagana, 2008).

Gambar 6 menyajikan hasil pengamatan suhu kompos yang berkisar 60-78°C. Hal ini menunjukkan

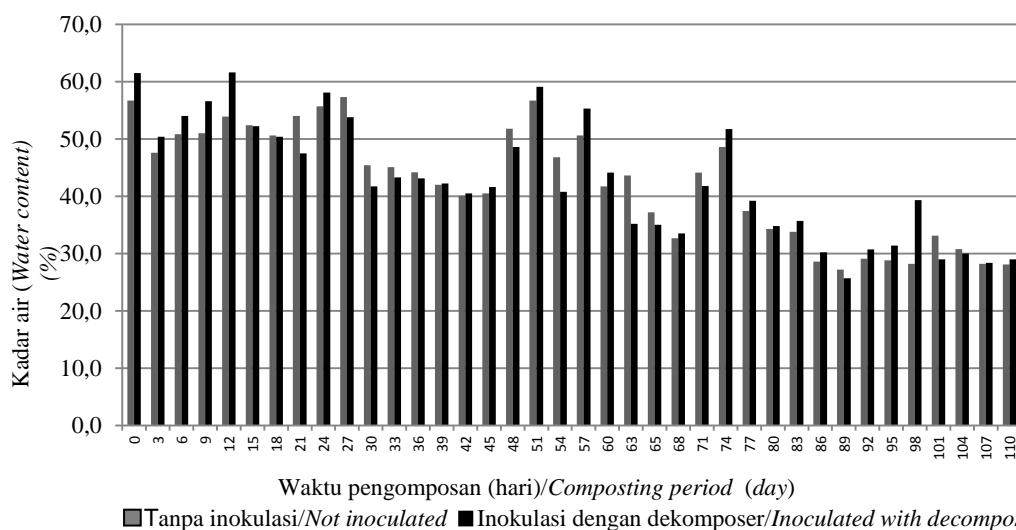
terjadinya akumulasi panas sebagai akibat aktivitas mikroba dalam proses pengomposan. Suhu TKKS antara yang diberi dan tanpa formula dekomposer BL tidak jauh berbeda walaupun terdapat kecenderungan dengan penambahan formula dekomposer BL, suhu sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa BL. Walaupun bakteri ligninolitik yang digunakan sebagai bahan aktif dekomposer BL berasal dari kompos pada lokasi yang sama, dampak suhu tinggi (60-78°C) terhadap aktivitas bakteri dalam formula dekomposer BL belum diketahui secara pasti. Untuk mengetahui pengaruh suhu tinggi terhadap aktivitas bakteri lignolitik maka perlu dilakukan pengujian pada kondisi *in vitro*.

Analisis nisbah C/N menunjukkan bahwa penurunan nisbah C/N yang sangat tajam terjadi pada periode 0–35 hari (Gambar 7). Penurunan nisbah C/N TKKS yang diberi formula dekomposer bakteri ligninolitik lebih tinggi dibandingkan dengan yang tanpa bakteri ligninolitik. Nisbah C/N setelah inkubasi 30 hari menunjukkan angka 25 dan pada inkubasi 70 hari tercapai nisbah C/N 20 pada perlakuan dengan BL. Sedangkan pada saat akhir inkubasi yaitu 99 hari nilai nisbah C/N lebih kurang 17 sedangkan tanpa formula dekomposer bakteri ligninolitik adalah sekitar 18. Rendahnya perbedaan rasio C/N kompos dengan



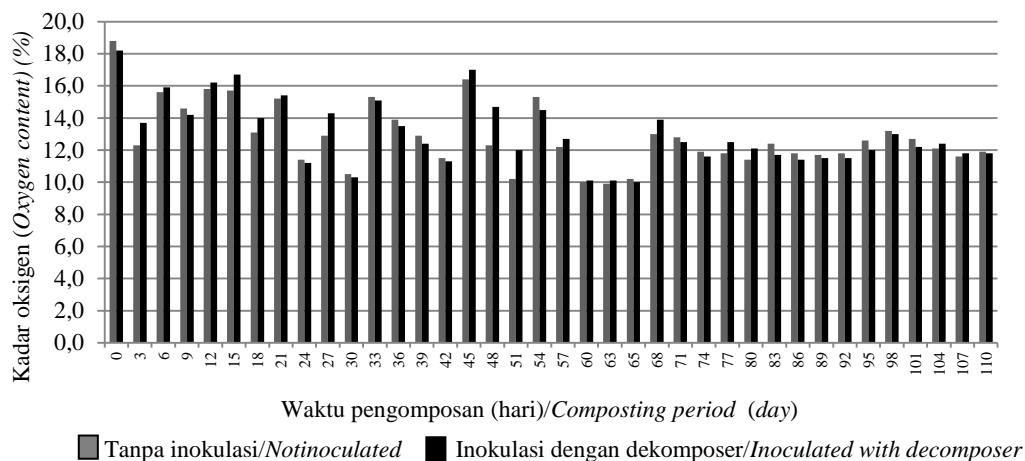
Gambar 2. Hasil uji pewarnaan Gram isolat (A) FS, (B) CRK1 dan (C) K3.

Figure 2. Gram staining of (A)FS, (B) CRK1 and (C) K3 isolates.



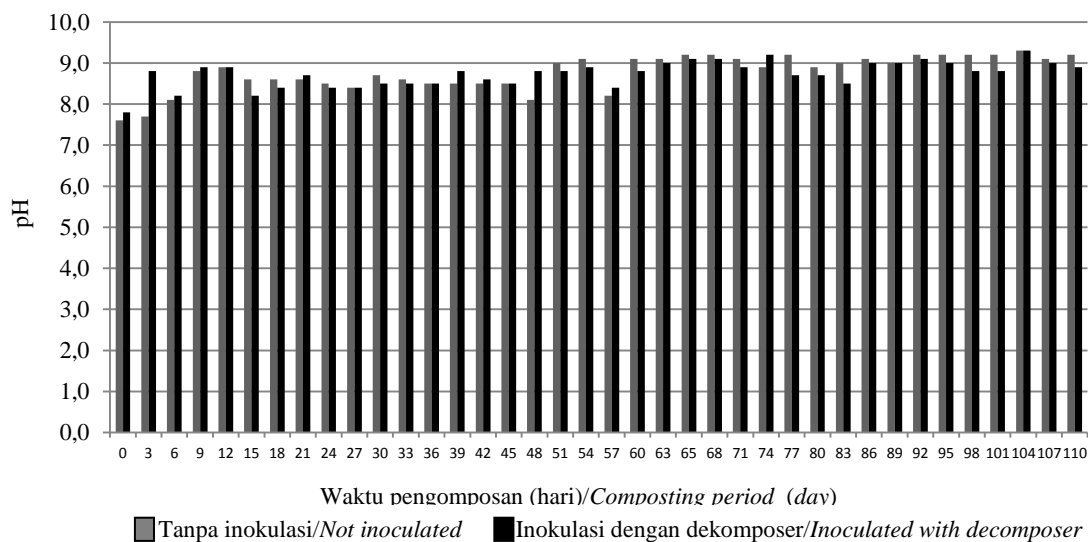
Gambar 3. Kadar air kompos TKKS tanpa dan dengan formula dekomposer bakteri ligninolitik (BL). Kadar air merupakan rata-rata dari kadar air pada ketinggian 2, 4, dan 6 m dalam pengomposan selama 110 hari.

Figure 3. Water content of EFB without and with lignolytic bacteria formula. Water content was average of 2, 4, and 6 m height of compost during composting period of 110 days.



Gambar 4. Kandungan oksigen TKKS tanpa dan dengan formula dekomposer BL. Kandungan oksigen merupakan rata-rata kadar oksigen TKKS pada ketinggian 2, 4, 6 m dalam pengomposan selama 110 hari.

Figure 4. Oxygen content of EFBOP without and with LB of decomposer formula. Oxygen content was average of 2, 4, and 6 m height of compost during composting period of 110 days.



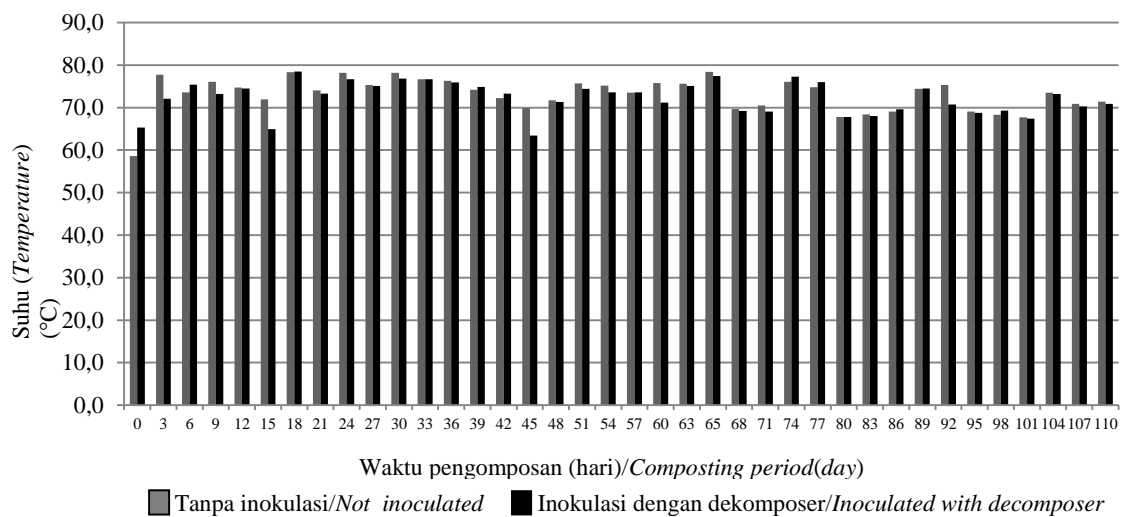
Gambar 5. Reaksi pH tumpukan TKKS tanpa dan dengan formula dekomposer BL. Nilai pH TKKS merupakan rata-rata pH pada ketinggian 2, 4, 6 m dalam pengomposan selama 110 hari.

Figure 5. The pH reaction of EFB without and with LB formula. The pH reaction was average of 2, 4, and 6 m height of compost during composting period of 110 days.

dan tanpa formula BL diduga disebabkan kondisi yang tidak optimum untuk mikroba BL seperti kadar air yang cenderung rendah, dosis aplikasi belum optimal, pencampuran dekomposer ke dalam TKKS dan aerasi yang belum merata. Goenadi (2006) melaporkan bahwa *Trichoderma pseudokoningii* yang diisolasi dari TKKS dapat menurunkan nisbah C/N dari 52 menjadi 13 setelah diinkubasikan selama 30 hari. Dilihat dari komponen nisbah CN, penurunan C tidak tinggi namun peningkatan kadar N sedikit lebih tinggi pada TKKS yang diberi formula BL, sehingga menghasilkan nilai nisbah CN yang lebih rendah.

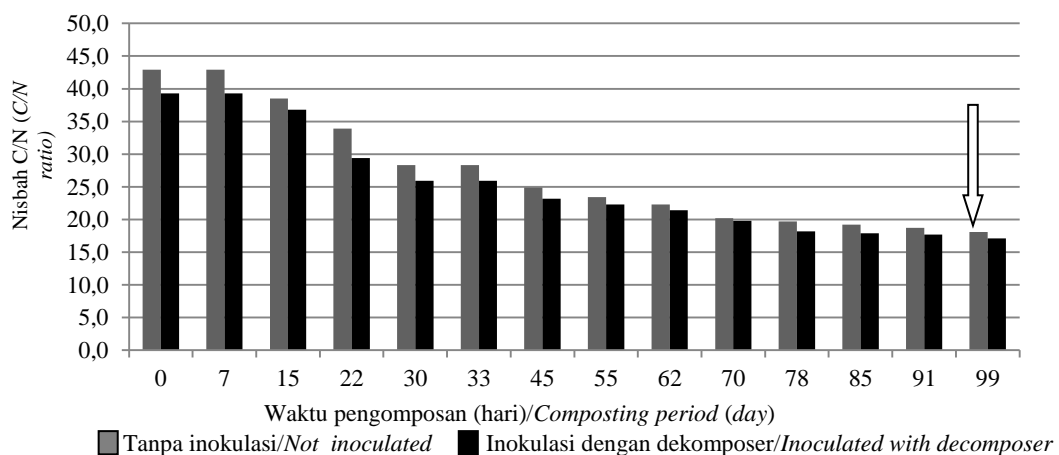
Hasil analisis *E. coli* dan *Salmonella* sp. yang merupakan kontaminan menunjukkan bahwa pemberian formula bakteri lignolitik, menghasilkan populasi kontaminan yang rendah sedangkan pada kompos tanpa bakteri lignolitik menghasilkan populasi *E. coli* dan *Salmonella* sp. yang cukup tinggi khususnya pada inkubasi 30 hari (Tabel 4). Kompetisi antara bakteri lignolitik dengan kontaminan, kemungkinan dapat menekan jumlah kontaminan khususnya pada kompos segar, walaupun demikian dugaan ini perlu diuji lebih lanjut.





Gambar 6. Suhu TKKS tanpa dan dengan pemberian formula dekomposer BL. Suhu merupakan rata-rata TKKS pada ketinggian 2, 4, 6 m dalam pengomposan selama 110 hari.

Figure 6. Temperature of EFB without and with LB formula. Temperature was the average measurement of 2, 4, and 6 m height of compost during composting period of 110 days.



Gambar 7. Nisbah C/N kompos TKKS tanpa dan dengan formula dekomposer bakteri ligninolitik. Nilai nisbah C/N merupakan rata-rata nisbah C/N pada ketinggian 2,4,6 m TKKS selama pengomposan 110 hari.

Figure 7. C/N ratio of EFBOP without and with ligninolytic bacteria formula. C/N ratio is average of 2, 4, and 6 m height of compost during composting period of 110 days.

Tabel 4. Karakteristik kompos TKKS dari hasil percobaan skala 200 ton.

Table 4. Characteristics of EFB compost derived from 200 ton experiment scale.

Perlakuan pengomposan Composting treatment	Lama pengomposan Composting duration (hari/day)	Karakteristik (Characteristics)				
		C (%)	N (%)	Nisbah Ratio C/N	<i>E. coli</i> CFU g <sup>-1</sup>	<i>Salmonella</i> sp. CFU g <sup>-1</sup>
Tanpa inokulasi/ Not inoculated	30	43,99	1,43	30,76	1,1 x 10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>
Inokulasi dekomposer/ Decomposer inoculation	30	43,53	1,79	24,32	Tidak terdeteksi/ Not detected	Tidak terdeteksi/ Not detected
Tanpa inokulasi/ Not inoculated	60	45,03	1,58	28,50	< 3	Tidak terdeteksi/ Not detected
Inokulasi dekomposer/ Decomposer inoculation	60	42,89	1,56	27,49	< 3	Tidak terdeteksi/ Not detected
Tanpa inokulasi/ Not inoculated	90	22,03	2,13	10,34	<3	Tidak terdeteksi/ Not detected
Inokulasi dekomposer/ Decomposer inoculation	90	22,38	2,24	9,99	15	Tidak terdeteksi/ Not detected

## Kesimpulan

Telah diperoleh 23 isolat bakteri yang berpotensi mendegradasi lignin, yaitu 11 isolat didapatkan melalui metode pengkayaan dan 12 isolat didapatkan melalui metode tanpa pengkayaan. Isolat bakteri ligninolitik terbaik dari metode tanpa pengkayaan yaitu isolat CRK 1 dengan kemampuan dekolorisasi biru metilen 0,3 cm, aktivitas Mn-peroksidase dengan penambahan Mn dan tanpa penambahan Mn masing-masing sebesar 2,09 U/mL dan 0,23 U/mL. Isolat terbaik dari metode dengan pengkayaan yaitu isolat FS dengan kemampuan dekolorisasi biru metilen 0,6 cm, aktivitas lakase 2,68 U/mL, Mn-peroksidase dengan penambahan Mn 20,02 U/mL dan tanpa penambahan Mn yaitu 0,36 U/mL.

Metode pengkayaan dapat meningkatkan jumlah bakteri terisolasi penghasil lignin peroksidase. Isolat bakteri CKA adalah isolat penghasil lignin peroksidase tertinggi yaitu sebesar 5,05 U/mL. Formula dekomposer bakteri ligninolitik dapat menghasilkan kompos TKKS dengan nisbah C/N 18 pada inkubasi 99 hari.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan kerjasama BPBPI dan PT Pinago Utama, Palembang melalui Kontrak Penelitian No.13/SPK/BPBPI/VIII/2012. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direksi, Pimpinan, dan Staf PT Pinago Utama atas bantuan penyediaan fasilitas percobaan lapang, sarana, dan prasarana sehingga penelitian ini dapat terselenggara dengan baik.

## Daftar Pustaka

Amira RD, AR Roshanida, SH Mohd-Setapar&MI Rosli (2013). Biodegradation oil palm residues into compost using filamentous fungi. *Adv Sci Let* 12(5), 3529-33.

Ariffin H, MA Hassan, MS Umi Kalsom, N Abdullah & Y Shirai (2008). Effect of physical, chemical, and thermal pretreatments on the enzymatic hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. *J Trop Agric Fd Sc* 36(2), 1-10.

Arias ME, M Arenas, J Rodriguez, J Soliveri, AS Ball & M Hernandez (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a non phenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environment Microbiol* 69(4), 1953-58.

Bandounas L, NJP Wierckx, JH Winde & HJ Ruijsenaars (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol* 11(1), 94.

Bholay AD, BV Borkhataria, PU Jadhav, KS Palekar, MV Dhalkari & PM Nalawade (2012). Bacterial lignin peroxidase: A tool for biobleaching and biodegradation of industrial effluents. *Univ J Environment Res Technol* 2(1), 58-64.

Bugg TD, M Ahmad, EM Hardiman & R Singh (2010). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr Op Biotechnol* 22, 1-7.

Bugg TD, M Ahmad, EM Hardiman & R Rahmanpour (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* 28, 1883-1896.

Delalibera I, A Vasanthakumar, BJ Burwitz, PD Schloss, KD Klepzig, J Handelsman & KF Raffa (2007). Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera), colonizing red pine. *Symbios* 43, 97-104.

Feng HW; Y E. Zhi, W W Shi, L Mao & P Zhou (2013). Isolation, identification and characterization of a straw degrading *Streptomyces griseorubens* JSD -1. *African J Microbiol Res* 7(22), 2730-2735.

Goenadi DH (2006). *Developing Technology for Biodecomposition of Fresh Solid Wastes of Plantation Crops under Tropical Condition*. Bogor, IPB Press, 228 p

Huang DL, GM Zeng, CL Feng, SHU, MH Zhao, C Lai, Y Zhang, XY Jiang & HL Liu (2010). Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. *Chemosphere* 81, 1091-109.

Martinez AT, M Speranza, FJ Ruiz-Duenas, P Ferreira, S Camarero, F Guillen, MJ Martinez, A Gutierrez & JC del Rio (2005). Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8(3), 195-204.

Masai E, Y Katayama & Fukuda M (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol and Biochemist* 71(1), 1-15.

Nasrul & T Maimun (2009). Pengaruh penambahan jamur pelapuk putih (*white rot fungi*) pada proses pengomposan tandan kosong kelapa sawit. *J ReKay Kim Ling* 7(2), 194-199.

Oliveira PL, MCT Duarte, AN Ponezi & LG Durrant (2009). Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazil J Microbiol* 40, 818-826.

Rahman NHA, NAA Rahman, SA Aziz & MA Hassan (2013). Production of ligninolytic enzymes by newly isolated bacteria from palm oil plantation soils. *Bioresour* 8(4), 6136-50.

Sheikhi F, M Roayaei Ardakani & S Rodriguez-Couto (2012). The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* wpi with two classes of chemical compounds as substrates. *Indian J Microbiol* 52 (4), 701-707.

Tien M & TK Kirk (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood et al. (eds) *Methods in 238 enzymology. Biomass, part b, lignin, pectin, and chitin*. San Diego, Academic Press, Vol. 161, 238-249.

Yang JS, W Liu & JR Ni (2006). Isolation, identification, of lignin-degrading bacteria and purification of lignin peroxidase. *Pub Med* 27(5), 981-985.

Wahyudi A, MN Cahyanto, M Soejono & Z Bachruddin (2010). Potency of lignocelluloses degrading bacteria isolated from buffalo and horse gastrointestinal tract and elephant dung for feed fiber degradation. *J Ind Trop Anim Agric* 35 (1), 34-41.

Widiastuti H, Suharyanto, A Wulaningtyas & RTM Sutamihardja (2008). Activity of ligninolytic enzymes during growth and fruiting body development of white rot fungi *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus*. *Hayati* 5(4), 140-144.