

Jurnal Teknologi Pertanian Vol. 19 No. 1 [April 2018] 25-32
Pengaruh Penambahan CuSO_4 Terhadap Aktivitas Enzim *Schizophyllum commune* [Rohmana dkk]

PENGARUH PENAMBAHAN CuSO_4 TERHADAP AKTIVITAS ENZIM *SCHYZOPHYLLUM COMMUNE* PADA DEGRADASI LIGNIN LIMBAH KULIT KAKAO

*Effect of CuSO_4 on *Schizophyllum commune* Enzyme Activity in Cacao Pod Lignin Degradation*

Irnia Nurika, Nur Hidayat, Novianti Adi Rohmana*

Jurusan Teknologi Industri Pertanian - Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi: email: noviantiadi12@gmail.com

ABSTRAK

Kulit coklat merupakan sumber lignoselulosa dari limbah pertanian dengan kandungan lignin mencapai $14.7 \pm 0.35\%$ (w/w). Lignin merupakan senyawa aromatik kompleks heteropolimer yang tidak mudah dipecah secara hidrolitik, sehingga jamur pelapuk seringkali digunakan untuk mempermudah proses degradasi lignin. Pada penelitian ini digunakan jamur pelapuk putih (*S. commune*). Selama proses pemecahan lignin, *S. commune* memanfaatkan enzim peroksidase dan lakase. Akan tetapi, produksi enzim lignolitik pada jamur pelapuk putih dalam jumlah kecil, sehingga diperlukan penambahan inducer untuk meningkatkan aktivitas enzim lignolitik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan CuSO_4 terhadap aktivitas enzim MnP dan Lakase pada *S. commune* yang berperan dalam proses pemecahan lignin sehingga dapat dihasilkan berbagai macam senyawa kimia bernilai tinggi. Tembaga dengan konsentrasi 0 mM; 0.5 mM; 1.5 mM; dan 2.5 mM ditambahkan pada *S. commune* dan di inkubasi selama 5 minggu. Hasil kemudian diekstrak dan diuji aktivitas enzim MnP dan Lakase menggunakan spektrofotometri. Hasil menunjukkan aktivitas enzim lignolitik *S. commune* terbesar yaitu 0.48 IU.L-1 untuk enzim MnP pada minggu ke-4 dengan penambahan konsentrasi CuSO_4 1.5 mM dan 0.18 IU.L-1 untuk enzim lakase pada minggu ke-3 dengan penambahan konsentrasi CuSO_4 0.5 mM dan 1.5 mM

Kata kunci : Induser, Lakase, Lignin, Mangan Peroksidase, *S. commune*

ABSTRACT

Agricultural waste such as cacao pod is a source of lignocellulosic with $14.7 \pm 0.35\%$ (w/w) lignin compound. Lignin is a heterogeneous aromatic complex which are difficult degraded by hydrolitic, so rot fungi needed on lignin degradation process. This researches used white rot fungi (*S. commune*). *S. commune* are known to breakdown lignin with peroxidase and laccase enzyme. However, ligninolytic enzyme are produced only small quantities, so needed induction for enhancemend and activated ligninolytic enzyme. Purpose this research is knowing affected concentration copper on MnP and Laccase activity of *S. commune* during degaradation of lignocellulose, so can produce various of chemical added value compound. Various consentration copper are 0 mM; 0.5 mM; 1.5 mM; and 2.5 mM added in treatment and incubated for 5 weeks. Yield extracted and MnP and Lakase activity is measured by spectrophotometry. The maximum activities enzyme synthesized by *S. commune* were observed as 0.48 IU.L-1 for manganese peroxidase (MnP) after 4 weeks incubation at 1.5 mM CuSO_4 and 0.18 IU.L-1 for laccase after 3 weeks incubation at 0.5 mM and 1.5 mM CuSO_4

Keywords : Inducer, Laccase, Lignin, Manganese Peroxidase, *S. commune*

PENDAHULUAN

Kakao merupakan komoditas unggulan dari beberapa negara di dunia seperti Pantai Gading (36.37%), Ghana (18.19%), Indonesia (15.68%), Nigeria (5.62%), Brazil (3.73%), Ekuador (3.39%) dan Malaysia (0.97%) (Widianingsih, 2009). Dalam pengolahannya dihasilkan limbah berupa kulit buah mencapai 75% (w/w) (Fauzi *et al.*, 2012) dengan kandungan lignin $14.7 \pm 0.35\%$ (w/w) (Daud *et al.*, 2013). Lignin merupakan senyawa aromatik kompleks heteropolymer (Werpy, T, Petersen, 2004) yang terdiri dari unit fenilpropanoid aril-C3, yang dihubungkan dengan berbagai jenis ikatan eter dan C-C sehingga sulit dihidrolisis (Lee *et al.*, 1999; Niemenmaa, 2008; He *et al.*, 2014). Hasil pemecahan dari lignin dapat dimanfaatkan menjadi berbagai macam bahan kimia bernilai tinggi (*Chemical added value*) diantaranya adalah vanillin (Kaur dan Chakraborty, 2013). Proses pemecahan lignin diawali dengan pemotongan rangkaian lignin atau melalui *pretreatment* salah satunya dengan metode biologis (Di Gioia *et al.*, 2011; Kaur dan Chakraborty, 2013; Ma dan Daugulis, 2014; Okano *et al.*, 2005) dengan menggunakan jamur pelapuk putih (Ward *et al.*, 2004; Niemenmaa, 2008), salah satunya adalah *Schizophyllum commune* (Tsujiyama dan Ueno, 2008).

S. commune (jamur pelapuk putih) merupakan kelompok Basidiomisetes yang mampu berperan dalam proses pemecahan lignin (Padhiar *et al.*, 2009; Di Gioia *et al.*, 2011; Ma dan Daugulis, 2014). Sebagian besar jamur pelapuk putih mampu menghasilkan enzim ekstraseluler seperti lakase, lignin peroksidase (LiP), dan manganese peroksidase (MnP) yang berperan langsung pada perombakan lignoselulosa (Gassara *et al.*, 2010) khususnya lignin (Gallage dan Møller, 2015). Selama proses degradasi lignoselulosa, *S. commune* mampu menyintesis enzim manganese peroksidase (MnP), lakase, dan lignin peroksidase (LiP) (Muslimah dan Kuswytasari, 2013).

Salah satu cara untuk meningkatkan kemampuan jamur *S. commune* dalam mendegradasi lignin dapat dengan meningkatkan aktivitas enzim lignolitik yang dihasilkan oleh jamur *S. commune* diantaranya enzim lacase dan MnP dengan penambahan inducer. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan sumber logam seperti tembaga sulfat (CuSO_4) pada proses degra-

dasi lignoselulosa mampu meningkatkan aktivitas enzim lignolitik jamur pelapuk putih (Kakezawa *et al.*, 1993; Hoshida *et al.*, 2001; Gomaa dan Momtaz, 2015).

Tembaga atau copper merupakan salah satu mikronutrient penting yang dibutuhkan oleh jamur pelapuk putih untuk menghasilkan enzim lakase (Usha *et al.*, 2014). Penambahan tembaga juga mampu menginduksi aktivitas enzim lakase (Gomaa dan Momtaz, 2015) dan MnP (Montoya *et al.*, 2015) pada jamur pelapuk putih. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Usha *et al.* (2014), menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi CuSO_4 300 μM dapat meningkatkan aktivitas enzim lakase dua kali lipat dibandingkan dengan tanpa penambahan CuSO_4 . Selain itu, penambahan tembaga pada mekanisme jamur pelapuk memiliki beberapa peran diantaranya untuk meningkatkan produksi H_2O_2 dengan ditandai meningkatnya aktivitas H_2O_2 (Bouazizi *et al.*, 2008), meningkatkan kemampuan jamur dalam mendekomposisi H_2O_2 (Yazici dan Deveci, 2010), serta meningkatkan produksi asam oksalat. Berdasarkan hasil penelitian Gomaa dan Momtaz (2015) menunjukkan bahwa penambahan 1 mM tembaga sulfat mampu meningkatkan aktivitas enzim lakase pada *white rot fungi* mencapai 51.84 U/ml.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan CuSO_4 terhadap aktivitas enzim MnP dan Lakase pada *S. commune*. Diharapkan dengan diketahuinya besaran konsentrasi CuSO_4 yang ditambahkan untuk mencapai aktivitas enzim tertinggi pada kedua enzim tersebut, juga dapat berpengaruh signifikan terhadap kemampuan jamur *S. commune* dalam memecah lignin pada limbah lignoselulosa.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk menunjang penelitian adalah kulit coklat diperoleh dari UKM kampung cokelat di Blitar (Varian Criollo), *S. commune* diperoleh dari School of life Sciences, Warwick university (United Kingdom), barley, gypsum CaSO_4 , CaCO_3 , glukosa, aquades, Malt Ekstrak, Agar, NaOH, Na_2CO_3 , guaiacol, CuSO_4 dan H_2O_2 , diperoleh dari Merck, aluminium foil, alko-

hol 70%, spirtus, parafilm, kain saring, dan kertas saring halus, etil asetat, metanol.

Alat

Alat yang dibutuhkan untuk menunjang pelaksanaan penelitian adalah *glassware* merek Pyrex (labu Erlenmeyer, corong kaca, gelas ukur, tabung reaksi, gelas beaker), autoklaf (Hirayama HVE-50), Vortex (DAIHAN Scientific VM-10), *laminar air flow* (Hirayama HVE-50), water bath (Julabo SW 22), timbangan digital (Sartorius GE2102), timbangan analitik (Kern ABJ 220-4), inkubator (Vision VS1203P3L), *freezer* (Polytron PCF315), mikro pipet 0.1-1 mL (Accumaxpro), kompor listrik (Maspion S-300), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10 UV), sentrifugasi (Thermo Fisher Scientific SL 40R), rotary evaporator (IKA RV 10), botol kaca diameter 8 cm, pinset, inoolop, bunsen, thermometer, spatula, saringan besi, centrifuge tube 500 ml.

Metode

Persiapan Mikroorganisme dan Kultur

Jamur pelapuk putih *S. commune* pada Petri *disposable* yang telah berisi media MEA (Malt extract Agar) steril dan di inkubasi pada suhu optimal masing-masing 20 ± 2 °C dan 22 ± 2 °C, masing-masing selama 5-7 hari. Kultur jamur yang telah tumbuh selanjutnya diinokulasikan pada substrat yaitu barley (barley (50% w/w), aquadest (50% w/w), CaSO_4 (5×10^{-4} % w/w) dan CaCO_3 (1.5×10^{-4} % w/w). Barley di sterilisasi suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit sebanyak 2 kali. Setelah sterilisasi menggunakan autoklaf, diamkan selama ± 10 menit (suhu ± 40 -50 °C) dan barley siap di inokulasi dengan jamur pelapuk. Jamur pada barley diinokulasikan pada substrat.

Solid State Fermentation (SSF)

Alur kerja pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada Gambar 1. Kulit coklat dipotong dengan panjang kurang lebih 2 cm menggunakan alat pemotong. Sebanyak 10 g kulit coklat ditempatkan di dalam botol kaca dan ditambahkan air sesuai kondisi bahan. Sampel kemudian di sterilisasi sebanyak dua kali pada suhu 121 °C selama 15-20 menit dengan jarak waktu antara proses sterilisasi ± 24 jam. Setelah proses sterilisasi, sampel didiamkan selama ± 10 menit (hingga suhu mencapai ± 40 -50 °C). Bahan kemudian diinokulasi dengan jamur pelapuk sebanyak 2 ± 0.2 g untuk setiap sampel dan ditambahkan

kan CuSO_4 dengan konsentrasi 0 mM; 0.5 mM; 1.5 mM; dan 2.5 mM. Sampel di inkubasi pada suhu optimal jamur pelapuk. Sampel diamati setiap 7 hari sekali atau pada minggu ke 0, 7, 14, 21, 28, dan 35, seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Ekstraksi Enzim Lignolitik

Ekstraksi enzim lignolitik (lakase dan MnP) dilakukan setiap minggu yaitu pada hari ke 0, 7, 14, 21, 28, dan 35. Sebanyak 1 g sampel dimasukkan dalam setiap tabung erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan dengan 50 mM sodium-phosphate buffer pH 6.5 (10:1 v/w). Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 °C untuk memisahkan antara miselium dengan enzim. Supernatan yang diperoleh kemudian digunakan untuk pengujian aktivitas enzim lakase dan MnP dengan menggunakan spektrofotometri (Gassara *et al.*, 2010).

Uji Aktivitas Enzim

Uji aktivitas enzim lakase ditentukan berdasarkan penelitian Zheng *et al.* (2017), 0.4 ml guaiacol 10 mM dalam 10% (V/V) acetone, 1.2 ml acetate buffer pH 5.0 100 mM dan 0.4 ml ekstrak enzim dicampur hingga homogen. Suhu diatur pada 30 °C. Oksidasi dilakukan dengan panjang gelombang 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).

Uji aktivitas MnP ditentukan pada panjang gelombang 240 nm. Prinsip dari uji aktivitas enzim ini adalah mengoksidasi Mn^{2+} menjadi Mn^{3+} . Sebanyak 1.7 ml citrate-phosphate buffer pH 3 0.1 M dicampur dengan 0.05 ml MnSO_4 0.4 M, 0.2 ml ekstrak enzim dan 0.05 ml H_2O_2 0.016 M (Gassara *et al.*, 2010).

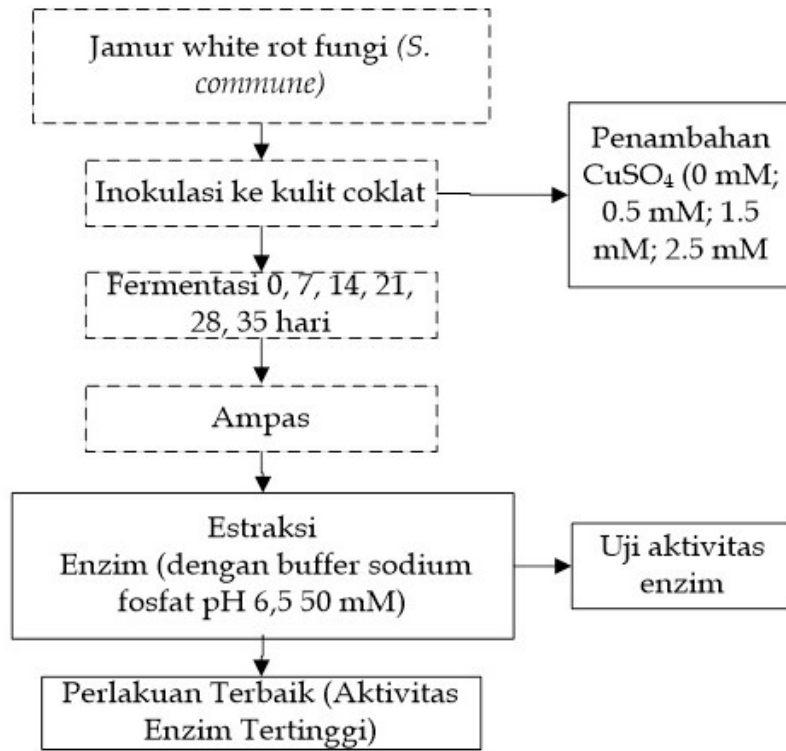
Analisis Statistika

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah RAK. Hasil data kemudian dianalisa dengan ANOVA (*Analysis of Variance*) dan diolah menggunakan minitab 18.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan CuSO_4 terhadap Aktivitas Enzim Laccase

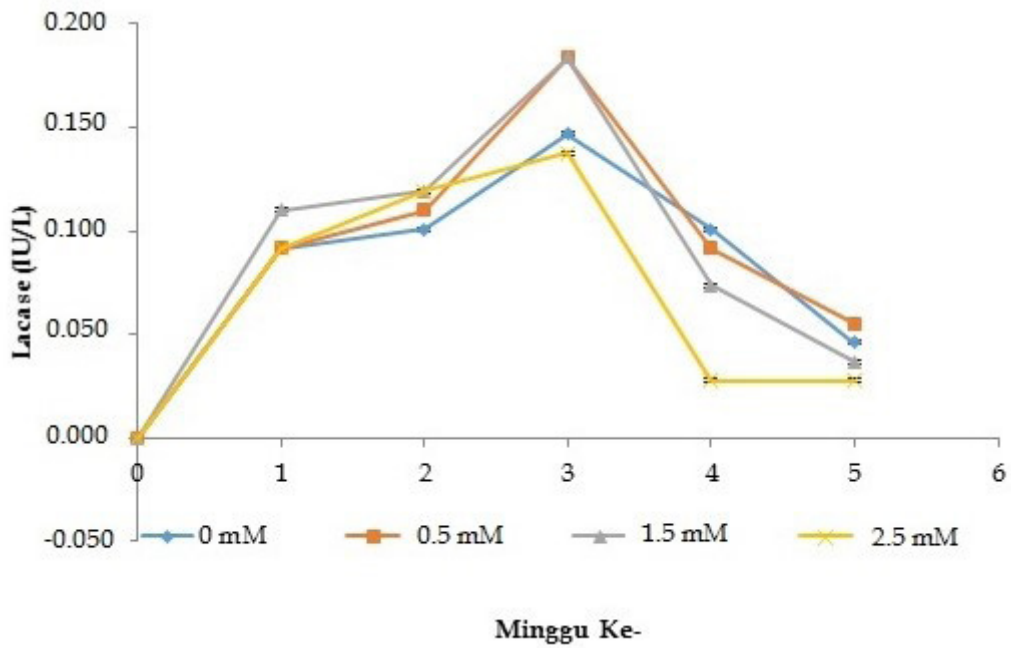
Aktivitas Lacase diamati pada penelitian ini. Pada Gambar 3 terlihat aktivitas enzim lacase tertinggi pada minggu ke-3 dengan penambahan konsentrasi CuSO_4 0.5 mM



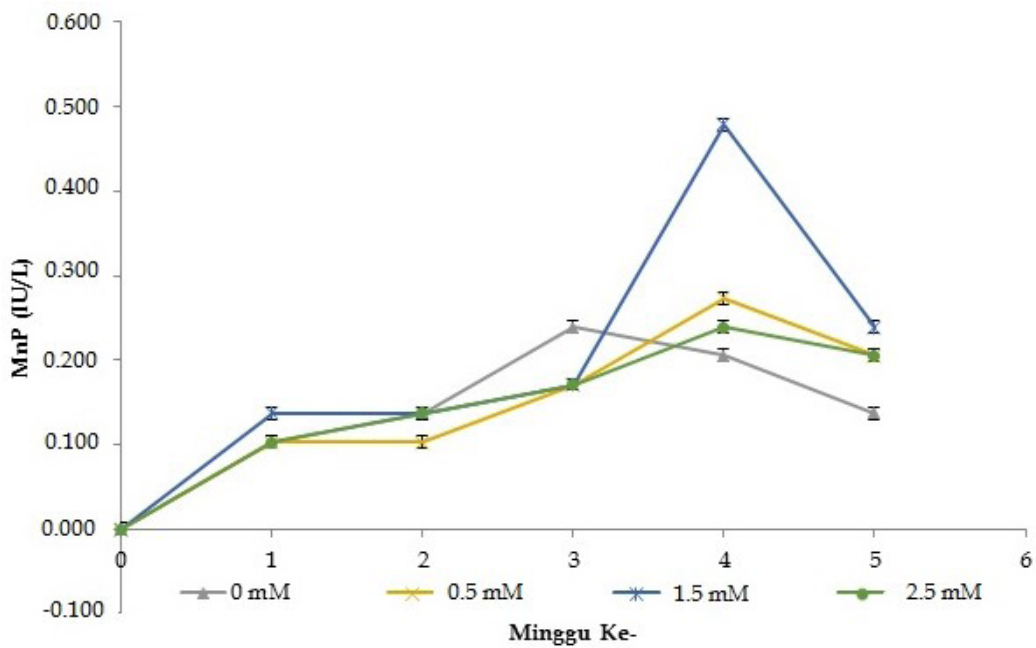
Gambar 1. Diagram alir penelitian



Gambar 2. Kulit coklat yang telah diinokulasikan dengan jamur *S. commune* dan ditambahkan CuSO_4



Gambar 3. Grafik pengaruh penambahan konsentrasi CuSO_4 terhadap aktivitas enzim lakase selama waktu inkubasi



Gambar 4. Grafik pengaruh penambahan konsentrasi CuSO_4 terhadap aktivitas enzim MnP selama waktu inkubasi

dan 1.5 mM sebesar 0.18 IU.L-1. Berdasarkan hasil uji ANOVA, lama waktu fermentasi dan penambahan konsentrasi CuSO₄ berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim lakase ($p < 0.05$).

Penambahan copper dapat menginduksi enzim laccase, induksi enzim laccase terjadi pada transkripsi dalam pembentukan enzim sehingga dapat mempengaruhi kerja enzim (Montoya *et al.*, 2015). CuSO₄ dalam hal ini bertindak sebagai katalis laccase untuk menghasilkan senyawa radikal, karena laccase tersusun oleh multicopper (multi-copper oxidase) yang memiliki kemampuan untuk mengoksidasi komponen fenolik dari lignin menggunakan molekul oksigen sehingga mampu mengkatalisis reaksi radikal (Gedikli *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005). Selain itu, laccase memiliki aktivitas phenoloxidase yang dapat mengkatalisis melalui oksidasi komponen fenoksi radikal yang tidak stabil tetapi hanya dapat mendegradasi komponen senyawa low redox fenolik potensial (Oliva-Taravilla *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017).

Aktivitas laccase yang paling tinggi terjadi pada minggu ke-3 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Montoya *et al.*, (2015), yang melaporkan bahwa untuk mencapai aktivitas lacase maksimum terjadi pada hari ke-25 sampai ke-28, atau pada minggu ke-3.

Tidak jauh berbeda dengan *S. lacrymans*, pada beberapa mikroorganisme seperti *Ganoderma applanatum*, *Peniophora sp.*, *Pycnoporus sanguineus*, dan *Coriolus versicolor* penambahan senyawa logam berat seperti tembaga mampu menginduksi aktivitas enzim lakase sehingga aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan proporsi penambahan tembaga dalam konsentrasi tertentu (Jovanovic-Malinovska *et al.*, 2012). Lakase memisahkan cincin aromatik dari fenol dan membentuk formasi struktur quinonoid baru (Witayakran dan Ragauskas, 2009). Sub struktur baru yang terbentuk menginduksi perubahan struktur tridimensional dari lignin (Martin-Sampedro *et al.*, 2011) yang mana dapat berinteraksi dengan polimer selulosa, meningkatkan interaksi lignin dan selulosa, serta menghambat penyatuan selulase menjadi serat selulosik.

Pengaruh Penambahan CuSO₄ terhadap Aktivitas Enzim MnP

Aktivitas MnP juga diamati pada penelitian ini. Hasil pengamatan aktivitas MnP

disajikan pada Gambar 4 dengan aktivitas enzim MnP tertinggi pada minggu ke-4 sebesar sebesar 0.48 IU.L-1 dengan perlakuan penambahan konsentrasi CuSO₄ sebesar 1.5 mM. Berdasarkan hasil uji ANOVA, interaksi antara lama waktu fermentasi dan penambahan konsentrasi CuSO₄ berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim MnP ($p < 0.05$).

Rata-rata aktivitas MnP pada minggu ke-0 sampai pada minggu ke-4 pada Gambar 4, mengalami peningkatan aktivitas, dan pada minggu ke-5 aktivitas enzim MnP dari jamur *S. commune* menurun. Cu³⁺ dalam CuSO₄ berperan sebagai kofaktor enzim sehingga dapat meningkatkan kerja enzim. Hasil penelitian ini lebih baik dibandingkan penambahan C:N rasio 20:1 oleh Irshad dan Asgher (2011) menggunakan *S. commune* IBL-06 hanya mampu memproduksi enzim MnP sebanyak 0.3745 IU/L.

Hasil menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi CuSO₄ 1.5 mM memberikan hasil aktivitas enzim lakase tertinggi (Gambar 4). Diduga penambahan tembaga pada jamur *S. commune* dapat meningkatkan aktivitas enzim MnP. Menurut Baldrian (2003), penambahan logam berat dengan konsentrasi rendah pada jamur pelapuk putih dapat meningkatkan aktivitas enzim lignolitik. Aktifitas enzim MnP tertinggi pada jamur *T. trogii* dicapai dengan penambahan konsentrasi Cu 1.6 mM. Akan tetapi dalam konsentrasi tertentu yang berlebihan dapat menyebabkan toksik bagi mikroorganisme tersebut (Irshad dan Asgher, 2011).

SIMPULAN

Pada penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi CuSO₄ dapat meningkatkan aktivitas enzim MnP dan lacase jamur *S. commune*. Penambahan ion logam Cu³⁺ diketahui dapat berperan sebagai kofaktor dari mekanisme kerja enzim. Hasil menunjukkan aktivitas enzim lignolitik *S. commune* terbesar yaitu 0.48 IU.L-1 untuk enzim MnP pada minggu ke-4 dengan penambahan konsentrasi CuSO₄ 1.5 mM. dan 0.18 IU.L-1 untuk enzim lacase pada minggu ke-3 dengan penambahan konsentrasi CuSO₄ 0.5 mM dan 1.5 mM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada pihak beasiswa Tesis dan Disertasi LPDP yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 78-91
- Bouazizi, H, Joulili, H, Geitmann, A, El Ferjani, E. 2008. Effect of copper excess on H₂O₂ accumulation and peroxidase activities in bean roots. *Acta Biologica Hungarica*. 59(2):233-245
- Daud, Z, Kassim, A, S, M, Aripin, A, M, Awang, H, Hatta, Z, M. 2013. Chemical composition and morphological of cocoa pod husks and cassava peels for pulp and paper production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 7(9):406-411
- Di Gioia, D, Luziatelli, F, Negroni, A, Ficca, A, G, Fava, F, Ruzzi, M. 2011. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *J. Biotechnol*. 156(4):309-316
- Fauzi, A, R, Haryadi, D, Priyanto, S. 2012. Pengaruh waktu fermentasi dan efektivitas adsorben dalam pembuatan bioetanol fuel grade dari limbah pod kakao (*Theobroma cacao*). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1):179-185
- Gallage, N, J, Møller, B, L. 2015. Vanillin-Bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla Orchid. *Mol. Plant*. 8:40-57
- Gassara, F, Brar, S, K, Tyagi, R, D, Verma, M, Surampalli, R, Y. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*. 49(3):388-394
- Gedikli, S, Aytar, P, Unal, A, Yamaç, M, Çabuk, A, Kolankaya, N. 2010. Enhancement with inducers of laccase production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2,4,5-trichlorophenol. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13(6):1-15
- Gomaa, O, M, Momtaz, O, A. 2015. Tembaga induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Braz. J. Microbiol*. 46(1):285-292
- He, J, Zhao, C, Mei, D, Lercher, J, A. 2014. Mechanisms of selective cleavage of C–O bonds in di-aryl ethers in aqueous phase. *Journal of Catalysis*. 309:280-290
- Hoshida, H, Nakao, M, Kanazawa, H, Kubo, K, Hakukawa, T, Morimasa, K, Akada, R, Nishizawa, Y. 2001. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(4):372-380
- Irshad, M, Asgher, M. 2011. Production and optimization of lignolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state medium banana stalks. *African Journal of Biotechnology*. 10(79):18234-18242
- Jovanovic-Malinovska, R, Fernandes, P, Winkelhausen, E, Fonseca, L. 2012. Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by β -galactosidase immobilized in PVA. *Appl. Biochem Biotechnol*. 168(5):1197-1211
- Kaur, B, Chakraborty, D. 2013. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Appl Biochem Biotechnol*. 169:1353-1357
- Lee, A, S, Y, Su, F, Y, Liao, Y, C. 1999. A simple and efficient hydrolyzing method for tetrahydropyranyl ethers. *Tetrahedron Letters*. 40(7):1323-1326
- Ma, X, K, Daugulis, A, J. 2014. Effect of bioconversion conditions on vanillin production by *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation. *Bioprocess. Biosyst. Eng*. 37(5):891-899
- Martin-Sampedro, R, Capanema, E, A, Hoeger, I, Villar, J, C, Rojas, O, J. 2011. Lignin changes after steam explosion and laccase-mediator treatment of eucalyptuswood chips. *J. Agric. Food Chem*. 59(16):8761-8769
- Montoya, S, Sánchez, O, J, Levin, L. 2015. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology*. 14(15):1304-1317

- Muslimah, S, Kuswytasari, N, D. 2013. Potensi Basidiomycetes koleksi biologi ITS sebagai agen biodekolorisasi zat warna RBBR. *JURNAL SAINS DAN SENI POMITS*. 2(1):2337-3520
- Niemenmaa, O. 2008. Monitoring of Fungal Growth and Degradation of Wood. Disertasi. University of Helsinki. Finland
- Okano, K, Kitagawa, M, Sasaki, Y, Watanabe, T. 2005. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology*. 120(3-4):235-243
- Oliva-Taravilla, A., Tomás-Pejó, E., Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M. 2016. Phenols and lignin: Key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase. *J. Biotechnol.* 218:94-101
- Padhiar, A, Kumar, N, P, Albert, S, Arya, A. 2009. Morphology, Anatomy and Cultural Characters of Two Wood Decaying Fungi *Schizophyllum commune* and *Flavodon flavus*. *J. Mycol. Pl Pathol.* 39(1):27-31
- Sun, X, F, Xu, F, Sun, R, C, Fowler, P, Baird, M, S. 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research*. 340(1):97-106
- Tsujiyama, S, Ueno, M. 2008. Formation of 4-Vinyl guaiacol as an intermediate in Bioconversion of ferulic acid by *Schizophyllum commune*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(1):212-215
- Usha, K, Y, Praveen, K, Reddy, B, R. 2014. Enhanced production of ligninolytic enzymes by a mushroom *Stereum ostrea*. *Biotechnology Research International*. 2014: 1-9
- Ward, G, Hadar, Y, Dosoretz, CG. 2004. 'The Biodegradation of Lignocellulose by White-rot Fungi'. Dalam DK Arora (ed.). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Marcel Dekker, New York
- Widianingsih, Y. 2009. Analisis Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Permintaan Ekspor Biji Kakao di Indonesia di Malaysia, Singapura, dan Cina. Skripsi. IPB. Bogor
- Werpy, T, Petersen, G. 2004. Top value added chemicals From biomass. Dilihat 27 Agustus 2017. <<https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>
- Witayakran, S, Ragauskas, A, J. 2009. Modification of high-lignin softwood kraftpulp with laccase and amino acids. *Enzyme and Microbial Technology*. 44(3):176-181
- Yazici, E, Y, Deveci, H. 2010. Factor affecting decomposition of hydrogen peroxide. *Proceedings of the XIIth International Mineral Processing Symposium, Cappadocia-Neveuehør, Turkey*, pp. 609-616
- Zeng, S, Qin, X, Xia, L. 2017. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal*. 119:92-100
- Zheng, F, An, Q, Meng, G, Cui, B, K. 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis* : Purification, characterization, and application. *International journal of biological macromolecules*. 102: