

LAPORAN TEKNIS 2015

08.c/AIR 2/OT 02 02/01/2016

**APLIKASI TEKNIK RADIASI DALAM MENINGKATKAN
KEMAMPUAN INOKULAN MIKROBA TERPILIH SEBAGAI
PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA DAN BIOAGEN
REMEDIASI LINGKUNGAN**

**Tri Retno D.L., Nana Mulyana, Dadang Sudrajat, Arif
Adhari, Mawardi, Almaida dan Rika Heryani**



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2016**

LAPORAN TEKNIS 2015

08.c/AIR 2/OT 02 02/01/2016

**APLIKASI TEKNIK RADIASI DALAM MENINGKATKAN
KEMAMPUAN INOKULAN MIKROBA TERPILIH SEBAGAI
PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA DAN BIOAGEN
REMEDIASI LINGKUNGAN**

**Tri Retno D.L., Nana Mulyana, Dadang Sudrajat, Arif
Adhari, Mawardi, Almaida dan Rika Heryani**

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Industri dan Lingkungan



Dr. Sugiharto, MT
NIP. 19620705 198510 1 002

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Dr. Hendig Winarno, M.Sc
NIP. 19600524 198801 1 001

ABSTRAK

APLIKASI TEKNIK RADIASI DALAM MENINGKATKAN KEMAMPUAN INOKULAN MIKROBA TERPILIH SEBAGAI PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA DAN BIO-AGEN REMEDIASI LINGKUNGAN. Telah dilakukan penelitian aplikasi pemanfaatan iradiasi gamma untuk meningkatkan kemampuan inokulan mikroba terpilih sebagai pendegradasi limbah lignoselulosa dan sebagai bio-agen remediasi lingkungan yang meliputi : 1). **Karakteristik Molekular Kapang *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* teriradiasi untuk Proses Bioremediasi dan Delignifikasi lignoselulosa (Dadang Sudrajat,S.Si).** Informasi tentang perubahan genetik akibat iradiasi pada kapang *Trichoderma viride* dan *T. harzianum* sangat diperlukan dalam rangka meningkatkan kemampuan kedua isolat tersebut untuk proses bioremediasi dan delignifikasi lignoselulosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekular isolat kapang *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* setelah diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 0- 750 Gy melalui pendekatan ekspresi pita protein dan marka molekuler *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). Dosis iradiasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 taraf yaitu 0; 75; 125; 250; 375; 500 dan 750 Gy dengan laju dosis 0,21 kGy/jam. Ekstraksi Protein dan DNA isolat kapang dilakukan masing-masing menggunakan metode ekstraksi buffer fosfat pH 7 dan ekstraksi CTAB- fenol-kloroform. Protein dalam supernatan dianalisis dengan teknik elektroforesis (SDS-gel polikarilamid) untuk menghasilkan profil sidikjari protein. Analisis DNA RAPD kedua isolat teriradiasi dilakukan untuk melihat polimorfisme DNA akibat pengaruh iradiasi. Primer yang digunakan adalah sebanyak 4 buah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa profil protein yang dihasilkan oleh isolat iradiasi dan isolat kontrol (tanpa iradiasi) memberikan pola yang berbeda terutama pada dosis iradiasi 250 – 750 Gy berdasarkan analisis dendrogram. Profil DNA-RAPD menunjukkan variasi genetik yang tinggi antara isolat yang diradiasi pada dosis 250; 375; 500 dan 750 Gy dengan isolat kontrol 0 Gy; 75; 125 Gy dengan formasi 8 kluster. Analisis dendrogram menunjukkan nilai koefisien kesamaan (*similarity coefficient*) antara 0,35 – 0,64. 2) **Aplikasi Radiasi Sinar Gamma Dalam Meningkatkan Kemampuan Fungi Lignoselulotik Untuk Memperbaiki Kualitas Lingkungan (Dra. Tri Retno Dyah Larasati,M.Si).** Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim ekstraseluler fungi lignoselulotik yakni *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dalam mendegradasi limbah lignoselulosa. Lignoselulosa sulit didegradasi karena terdiri dari lignin, selulosa dan hemiselulosa. *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dari kelompok White Rot Fungi dapat mendegradasi lignin karena mampu mensintesa enzim lignin peroksidase (LiP). Iradiasi sinar gamma dosis rendah mampu menstimulasi peningkatan aktivitas enzim ekstraseluler. Fungi *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dalam medium slent dipapar dengan iradiasi gamma pada dosis 0 (kontrol), 200, 400, 600, 800 dan 1000 Gy. Di dalam medium cair mengandung Potatoes Dextrose Broth (PDB), garam mineral dengan substrat Lignin Alkali 0 dan 5%b/v, fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang dipapar sinar gamma dosis 600 Gy memiliki aktivitas LiP (30U/mL) sebesar 2,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (12 U/mL). Sedangkan *Ganoderma lucidum* yang dipapari radiasi gamma dengan dosis 800 Gy memiliki aktivitas LiP (34U/mL) sebesar 1,7 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol (20 U/mL). Fermentasi padat substrat serbuk kayu jati putih (*Gmelina arborea* Roxb.) selama 12 hari dengan pH 6,4; dan kadar air 79% oleh fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang diradiasi sinar gamma dosis 600 Gy memiliki efisiensi degradasi lignin sebesar 42%, sedangkan pada fungi *Ganoderma lucidum* yang diradiasi sinar gamma dosis 800 Gy memiliki efisiensi degradasi lignin sebesar 21% dengan kondisi optimal pH 7,6 dan kadar air 71,3%. 3) **Percepatan Biodelignifikasi Residu Tanaman dengan Fungi Terpilih Yang Diiradiasi Gamma untuk Perbaikan Kualitas Lingkungan (Nana Mulyana, S.ST).** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang diiradiasi sinar γ dengan perlakuan pendahuluan penambahan NaOH terhadap percepatan biodelignifikasi substrat jerami padi. Pemberian dosis iradiasi gamma sebesar 600 Gy

pada fungi *Phanerochaete chrysosporium* efektif terhadap proses SSF(Solid State Fermentation) biodelignifikasi jerami padi menghasilkan aktivitas optimal enzim lignin peroksidase sebesar 9,20 U/ml, meningkatkan kadar selulosa sebesar 31,78% dan menurunkan kadar lignin sebesar 40,76% pada masa inkubasi selama 21 hari. *Pre-treatment* pemberian NaOH sebesar 1% tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap efektivitas proses SSF biodelignifikasi jerami padi.

Kata kunci : radiasi gamma, RAPD-PCR, delignifikasi, lignin peroksidase (LiP), kapang, *Trichoderma harzianum*, *trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*

PENDAHULUAN

Penelitian mengenai penggunaan iradiasi gamma untuk meningkatkan kemampuan mikroba dalam bioremediasi dan bioproses telah banyak dilakukan. Hasil penelitian Abo- State dkk.[1] telah melakukan iradiasi *Aspergillus niger* penghasil enzim selulase dengan sinar gamma dengan maksud meningkatkan aktivitas enzim. Pada dosis 500 Gy dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase sebesar 21% dibanding kontrol. Dipanwita Das *et.al* [2] juga telah melakukan Iradiasi sinar gamma dosis rendah terhadap *Aspergillus* sp, untuk meningkatkan kemampuan reduksi logam berat Cd. Pada dosis 60 Gy dapat meningkatkan daya reduksi logam berat Cd. Melihat potensi beberapa jenis kapang teriradiasi, dari hasil penelitian terdahulu diantaranya isolat *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, dan *Trichoderma viride* dalam mereduksi logam berat Pb dan Cd. Maka untuk itu akan dilakukan penelitian tentang informasi perubahan genetik mikroba tersebut melalui ekspresi pita protein dan DNA dengan metode Elektroforesis SDS-PAGE dan RAPD-PCR.

Limbah lignoselulosa sulit didegradasi. Lignoselulosa adalah makro-molekul kompleks yang terdiri dari lignin, selulosa dan hemiselulosa. Proses degradasi lignoselulosa adalah susunan yang heterogen dari polisakarida yang terdapat pada dinding sel. Selulosa merupakan polimer linier dari D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4 glikosidik dan sangat erat berasosiasi dengan hemiselulosa dan lignin. Lignin adalah polimer yang sangat tidak teratur dan tidak larut, memiliki ikatan kovalen dengan hemiselulosa [2]. Fungi lignoselulolitik dari kelompok *White rot fungi* merupakan mikroorganisme yang paling aktif dalam mendegradasi lignin dengan menghasilkan CO₂ dan H₂O [3]. Fungi *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dianggap baik karena memiliki kemampuan lignolitik, yakni mampu menghasilkan enzim lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP) yang dapat mendegradasi lignin. Karena lignin merupakan senyawa yang heterogen dengan berbagai tipe ikatan sehingga tidak dapat diuraikan oleh enzim hidrolisis. LiP adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang aktivitasnya bergantung pada H₂O₂. veratryl alkohol

merupakan produk metabolit sekunder. Veratryl alkohol merupakan substrat untuk menstimulasi kinerja LiP bukan sebagai mediator elektron akan tetapi dengan mendonasikan elektron ke LiP, sehingga melengkapi siklus katalitiknya [4]. Penggunaan fungi *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* yang dikombinasikan dengan proses *Solid State Fermentation* (SSF) mampu menghasilkan produk yang lebih baik. Hal ini dikarenakan selama proses fermentasi akan membawa fungi atau mikroba yang telah dikultivasi berinteraksi dengan kuat pada substrat yang tidak larut air serta mendapatkan konsentrasi nutrisi tertinggi dari substrat[5]. (Bhargav *et al.*, 2008). Fermentasi substrat padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) didefinisikan sebagai proses fermentasi oleh mikroorganisme yang tumbuh dalam material padat tanpa adanya air bebas.

Degradasi jerami padi dilakukan untuk menghancurkan lignin dan memecah polisakarida (Jurado *et al.*, 2009), sehingga dapat meningkatkan pencernaan selulosa dan hemiselulosa sebagai sumber energi pakan ternak dan dapat meningkatkan kualitas jerami padi (Prihartini *et al.*, 2011). Salah satu cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas jerami padi adalah dengan cara metode fermentasi alternatif yakni fermentasi fasa padat atau *Solid State Fermentation* (SSF). *Phanerochaete chrysosporium* adalah salah satu jenis mikroorganisme yang berkemampuan baik dalam menghasilkan enzim. Aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi bisa ditingkatkan baik melalui proses fisik, kimia maupun biologis. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan cara iradiasi sinar gamma dosis rendah. Sinar gamma memiliki energi yang lebih tinggi sehingga daya penetrasinya ke dalam sel lebih besar. Dengan demikian, sinar gamma sangat efektif untuk menembus dinding sel yang dimiliki jamur (Busby, 2003). Dosis rendah radiasi pengion pada mikroorganisme terbukti dapat meningkatkan aktivitas enzim organophosphorus hidrolase (Chapalamadugu, 1992). Proses *pretreatment* pada bahan lignoselulosa perlu dilakukan untuk mempermudah proses hidrolisis yaitu untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah dihidrolisis oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi bentuk monomer, sehingga dapat mengurangi penggunaan enzim dan dapat menekan biaya (Dashtban *et al.*, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) mengetahui karakteristik molekular isolat kapang *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* setelah diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 0- 750 Gy melalui pendekatan ekspresi pita protein dan marka molekular *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), 2) meningkatkan aktivitas enzim ekstraseluler fungi lignoselulolitik yakni *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dalam mendegradasi limbah lignoselulosa, dan 3) mengetahui efektivitas fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang diiradiasi sinar γ dengan perlakuan pendahuluan penambahan NaOH terhadap percepatan biodelignifikasi substrat jerami padi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

Media *Potatoes Dextrose Agar* - PDA (Difco), Agarose (*Invitrogen*), Larutan buffer eskstraksi (0.1M Tris-HCl, pH 8; 2.5 M NaCl; 3,5% CTAB), larutan bufer TE(10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), Larutan bufer TBE (Tris-Borate-EDTA), Proteinase-K (20mg/ml)(*Invitrogen*), larutan RNase A (Sigma), Larutan PCI (phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1), Larutan chloroform-isoamylalcohol (24:1), isopropanol (Merck), ethanol absolut (Merck), dNTP mix (*Invitrogen*), enzim *Taq DNA polymerase* (Qiagen), Oligonucleotide primer (*Invitrogen*). Kultur *Phanerochaete chrysosporium*, dan *Ganoderma* sp. hasil biakan Laboratorium Biologi Universitas Nusa Bangsa(UNB)-Bogor, LA(Lignin-Alkali), serbuk kayu jati putih (*Gmelina arborea Roxb.*), jerami padi *Potato Dextrose Agar* (PDA), KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Yeast ekstrak, alkohol 70%, MnSO_4 , H_2O_2 , *veratryl alcohol*, aquades, aluminium foil, kapas dan kertas label. Kapang *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma Viride*, dan *Aspergillus niger* koleksi laboratorium Lingkungan, PAIR-BATAN, *buffer* sodium citrate 0,1 M, media *Potatoes Dextrose Agar* (PDA), *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) , , *carboxymethyl cellulose* (CMC), dinitro salycylic acid (DNS), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Cd SO_4 , Kertas saring Whatman no.1.

Alat yang digunakan :

Mini Gel DNA Electrophoresis (BIORAD), Alat PCR model *Mastercycler Gradient* (Effendorf-Germany), Pipet mikro (Gilson-USA), UV Transilluminator (Vilber Lourmat-France), Alat pemanas/*waterbath* (OHAEUS), Microcentrifuge (Sorvall, USA), Vortex (Kimax), Neraca Analitik (Acculab BL 210), *autoclave*, oven, *laminar air flow*, timbangan digital, inkubator, *rotary shaker*, kertas saring Whatmann no.1, spektrofotometer tipe 20 D, *magnetic stirrer*, ose, hand sprayer, Bunsen, petri disk, sumber isotop Cobalt-60 dalam gamma *chamber* 4000A dengan laju dosis 2,1 kGy/jam, pengocok, pH meter (Eutech Instrumens, Singapura), neraca analitik (Acculab BL 210, Sartorius, Germany) , Spektrofotometer UV-VIS (HITACHI, Japan), Atomic Absorbtion Spectrophotometer (AAS) Perkin Elmer Model 200/400 (USA), Saringan Gooch, Pompa vacuum (Biorad), (Hitachi, Japan) dan peralatan gelas .

Iradiasi Kapang. Isolat kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* koleksi kelompok Lingkungan PAIR-BATAN. Masing-masing isolat

kapang yang telah diremajakan, diinokulasikan pada medium PDA dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Biakan berumur 3 hari tersebut kemudian diiradiasi sinar Gamma isotop Cobalt-60 dalam *chamber* IRPASENA 4000A di Pusat Aplikasi Isotop Radiasi – BATAN, Pasar Jumat Jakarta dengan laju dosis 2,1 kGy/jam. Dosis iradiasi yang digunakan adalah 0 kGy (kontrol, tanpa iradiasi); 75; 125 Gy; 250 Gy; 375 Gy; 500 Gy; dan 750 Gy.

Penyiapan Inokulum Kapang Hasil Iradiasi. Kapang hasil iradiasi ditumbuhkan dalam 50 ml medium cair *PDB* selama 7 hari dalam kondisi goyang pada suhu 30°C. Pada akhir inkubasi, miselia sel kemudian dilakukan ekstraksi protein dan DNA.

Ekstraksi Protein Kapang Iradiasi. Ekstraksi protein kapang menggunakan metode CHEN.J [6]. Panen miselia kapang dilakukan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no.1. Ekstraksi protein dilakukan dengan cara menggerus 50 gr miselia dalam Nitrogen cair (N₂) menggunakan mortar. Serbuk miselia dipindahkan dalam tabung mikrofuse dan dilarutkan dalam bufer ekstraksi fosfat (pH 7), dan disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit. Protein terlarut dianalisis kandungan proteinnya.

Analisis Pola Protein Kapang Iradiasi. Sampel protein dianalisis dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan panjang gel 80 mm dan ketebalan 1,5 mm. Gel yang digunakan adalah gel *polyacrilamid* 10 % yang terdiri atas lima persen *stacking gel* dan 10 % *separating gel*. Sampel ekstrak protein dicampur dengan larutan bufer dalam tabung mikro dan dipanaskan pada suhu 95°C. Larutan tersebut diambil dengan pipetor dan dimasukkan ke dalam sumuran (*well*) pada gel. Sampel dalam gel tersebut dielektroforesis pada suhu ruang dengan kuat arus 80mA selama 2-3 jam. Gel selanjutnya dicuci dengan campuran asam asetat *glacial*, metanol dan akuades dengan perbandingan volume 20:60:120 ml(1:3:6) selama 30 menit. Gel kemudian diwarnai dalam larutan satu persen (w/v) *Coomassie Blue* selama tiga jam. Gel kemudian diproses melalui *destaining* dengan menggunakan campuran larutan 50 % methanol, 10 % asam asetat *glacial*, dan 40 % akuades sampai pita protein terlihat jelas. Pola pita protein setiap isolat dalam gel kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Data ini kemudian dianalisis dengan menggunakan program MVSP versi 3.1 [7]. Untuk menentukan similaritas di antara isolat kapang dengan menggunakan koefisien SSM dan algoritma UPGMA dan hasilnya disajikan dalam bentuk Dendrogram.

Ekstraksi DNA kapang Iradiasi. Isolasi dan ekstraksi DNA dari miselia *Trichoderma harzianum* iradiasi menggunakan metode BRODA P [8]. Miselia dari isolat kapang (\pm 200 g) dimasukkan

kedalam tabung mikrosentrifuse steril dan ditambahkan 800 µl larutan bufer ekstraksi dan 150 µl larutan proteinase K (20 mg/ml). Campuran divortex selama 5 menit, dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C, selama 30 menit. Campuran disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar, supernatan dipindahkan pada tabung sentrifuse baru dan ditambahkan volume sama larutan phenol: khloroform : isoamilalkohol (25:24:1) dan divortex. Campuran disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan dipindahkan lagi pada tabung sentrifuse stril baru dan ditambahkan volume sama larutan khloroform : isoamilalkohol (24:1) dan divorteks seperti perlakuan diatas. Supernatan dipindahkan pada tabung sentrifuse steril baru dan ditambahkan volume sama larutan isopropanol dingin dan divorteks. Campuran disentrifuse 13.000 rpm selama 15 menit sampai terbentuk endapan DNA didasar tabung. Pelet DNA dicuci dengan 800 µl etanol 70%. Pelet DNA dikeringkan dalam desikator. Dan dilarutkan dala 100 µl larutan TE bufer. DNA divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 0.8% dalam bufer Larutan bufer TBE (Tris-Borate-EDTA) dengan pewarna etidium bromida (0.5 µg mL⁻¹). Elektroforesis DNA dilakukan pada 100 V selama 45 menit dan DNA diamati dengan UV Transilluminator. Konsentrasi DNA ditentukan dengan cara membandingkan tingkat perpendaran band DNA hasil ekstraksi dengan DNA standar (SIGMA). yang sudah ditentukan konsentrasinya

Analisis Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) Kapang Iradiasi.

Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan teknik RAPD-PCR menggunakan 4 macam primer dengan urutan basa seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan Basa primer untuk Amplifikasi DNA *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* iradiasi.

Nama Primer	Urutan Basa (5'----- 3')
1. AA-4	AATCGGGCTG
2. A-11	AGGGGTCTTG
3. OPH-7	CTGCATCGTG
4. OPH16	TCTCAGCTGG

Analisis RAPD dilakukan dengan menggunakan random primer dari Life Technologies- Invitrogen (Tabel 1), Reaksi PCR menggunakan HotStarTaq™ Master Mix kit (Qiagen, Clifton Hill, Vic.). Volume reaksi yang digunakan dalam analisa RAPD ini adalah 25 µl yang terdiri dari cetakan DNA (dengan konsentrasi 10ng), 12.5 µL HotStarTaq™ Master Mix (1× buffer PCR, 1.25 unit HotStarTaq™ polymerase, 200 mM untuk tiap-tiap dNTP), MgCl₂ (dengan konsentrasi bervariasi yaitu 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM dan 3.5 mM) dan primer (dengan konsentrasi 2.5 pmol, 5 pmol dan 7.5 pmol). Program siklus termal adalah : aktivasi awal pada 95°C selama 15 menit diikuti dengan 30, 40 atau 45 siklus yang terdiri dari 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 36°C dan 2 menit

pada 72°C. Selanjutnya diikuti dengan 1 siklus pemanjangan final pada 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi diamati dengan elektroforesis pada 1% gel agarose dalam buffer TBE dan diwarnai dengan etidium bromide.

Skoring dan Analisis Data. Pengamatan DNA hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan UV transluminator. DNA kemudian di beri skor berdasarkan jarak tempuhnya (bp) dan diberi skor yaitu 0 apabila tidak ada pita yang muncul dan 1 untuk kenampakan yang ada. Data biner yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan MVSP versi 2.0. Modul SIMQUAL digunakan dalam menggeneralisirkan matriks similaritas Koefesien Jaccard. Ukuran similaritas dikonversi ke dalam jarak genetik menggunakan rumus $S_{ij} = a/(a+b+c) * 100\%$. Matriks jarak yang diperoleh digunakan analisis pengelompokkan. Hasil pengelompokan kemudian digunakan dalam menyusun dendogram dengan metode *unweighted pair-group method with arithmetic mean* (UPGMA). [7].

Preparasi Kultur Fungi. Medium Dasar yang digunakan terdiri dari larutan garam mineral. Komposisi medium dasar dalam 1 liter aquades terdiri dari 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g $MnSO_4$; 2 g yeast ekstrak. Komposisi Media dasar dimodifikasi dari Pointing (1999) [9]. Medium Lignin Agar (LA) adalah medium yang mengandung medium dasar sebanyak 1 liter, lignin alkali (Sigma) 0,25 % (w/v), 16 g agar, dan 100 mg *chloramphenicol*. Medium dimodifikasi dari Marginingrum (2001) [10]. Isolat fungi *P. chrysosporium*, dan *G. lucidum* ditumbuhkan pada tabung reaksi yang berisi 25 mL medium PDA (*Slent/ miring*). Kemudian diinkubasi 3-7 hari pada suhu 28-30°C. di tempat gelap. Viabilitas dan pertumbuhan fungi diamati.

Iradiasi Fungi. Perkembangbiakan *Phanerochaete chrysosporium*, dan *Ganoderma* sp yang berumur 3-7 hari tersebut kemudian diiradiasi sinar Gamma isotop Cobalt-60 dalam *gamma chamber* 4000A dengan laju dosis 2,1 kGy/jam. Dosis iradiasi yang digunakan adalah 0 Gy (kontrol, tanpa iradiasi); 200 Gy; 400 Gy; 600 Gy; 800 Gy dan 1000 Gy.

Pertumbuhan dan Aktivitas LiP Fungi Dalam Lignin Alkali (Sigma). Disiapkan botol yang berukuran 250 mL kemudian ditambahkan 30 ml larutan nutrisi dan garam mineral, ditambahkan Lignin Alkali (sigma) 0,1%. Setiap liter larutan nutrisi dan garam mineral mengandung 24 g PDB, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 dan 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Semua medium SmF disterilkan dengan autoklaf pada 121 °C selama 2x15 menit kemudian didinginkan. Ke dalam 30 mL

medium SmF steril diinokulasi 1 mL kultur cair fungi *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma, sp* dengan kerapatan masing-masing sekitar 10^6 spora/mL, kemudian diinkubasi dalam shaker mekanis pada 75 rpm dan suhu ruang 28-32 °C selama 4 hari

Uji Aktivitas Enzim Lignin Peroksidase. Sebanyak 0,2 mL filtrat enzim, 0,05 mL H_2O_2 5 mM; 0,1 mL *veratril alcohol* 8 mM; 0,2 mL buffer asetat 0,05 M pH 3 dan 0,45 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok [11]. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 310 nm pada interval waktu 0 dan 10 menit. Satu unit aktivitas enzim LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengubahan 1 mikromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6}$) mol veratril alkohol per menit.

Fermentasi Substrat Padat Serbuk Kayu jati putih. Sebanyak 5 g (berat kering) substrat serbuk kayu jati putih dimasukkan ke dalam plastik ditambahkan 10 mL larutan nutrisi dan garam mineral. Setiap liter larutan nutrisi dan garam mineral mengandung 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 dan 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Akuades ditambahkan ke dalam substrat sehingga diperoleh perbandingan substrat dan cairan sekitar 1:2,5 atau kadar kelembaban sekitar 89,5% [12]. Ke dalam substrat steril diinokulasi kultur cair fungi *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma, sp* sesuai dengan perlakuan pada rancangan penelitian. Inokulasi kultur cair fungi dengan kerapatan masing-masing sekitar 10^6 spora/mL dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*. Substrat yang tidak diinokulasi kultur cair fungi digunakan sebagai kontrol. Semua substrat dalam plastic ditutup rapat dan diinkubasi di ruang gelap (tanpa pencahayaan) pada 28-32 °C selama 12 hari. Pengukuran parameter pH, bobot biomassa mikroba dan aktivitas enzim LiP dilakukan pada hari ke-4 masa pertumbuhan kedua fungi tersebut. Sedangkan pengukuran parameter pH, kadar air dan kadar bahan organik dilakukan pada hari ke-0, 4, 8 dan 12 selama proses SSF berlangsung. Evaluasi kadar lignin, selulosa, hemiselulosa, zat ekstratif, kadar abu dan efisiensi degradasi lignin dilakukan pada awal dan akhir proses SSF (hari ke-12).

Kultivasi Fungi *Phanerochaete chrysosporium*. Kultur fungi *Phanerochaete chrysosporium* dengan perlakuan dosis iradiasi gamma yang berbeda, masing-masing dikultivasi dalam media *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) yang diagitasi dengan *shaker* mekanis pada 75-100 rpm dan suhu ruang sekitar 28-32°C selama 4 hari. Setelah 4 hari periode kultivasi, dilakukan pengamatan aktivitas lignin peroksidase dan bobot kering biomassa fungi *Phanerochaete chrysosporium* dalam media cair tersebut.

Pertumbuhan dan Aktivitas Lignin Peroksidase Fungi Dalam Substrat Jerami Padi. Sebanyak 1,5 g (berat kering) substrat jerami padi dimasukkan ke dalam botol yang berukuran 250 mL kemudian ditambahkan 30 ml larutan nutrisi dan garam mineral. Setiap liter larutan nutrisi dan garam mineral mengandung 24 g PDB, 5 g yeast ekstrak, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 dan 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Semua medium SmF disterilkan dengan autoklaf pada 121°C selama 2×15 menit kemudian didinginkan. Ke dalam 30 mL medium SmF steril diinokulasi 1 mL kultur cair fungi *Phanerochaete chrysosporium* dengan kerapatan masing-masing sekitar 10^6 spora/mL, kemudian diinkubasi dalam shaker mekanis pada 75 rpm dan suhu ruang $28-32^\circ\text{C}$ selama 4-6 hari.

Preparasi Substrat Jerami Padi (Ong et al., 2012). Jerami padi (*Oryza sativa* L.) dikeringkan dan dicacah dengan chopper mekanis, kemudian dihaluskan dengan cutting mill dan diayak sehingga diperoleh substrat jerami padi dengan ukuran partikel <2 mm. Pada penelitian ini dilakukan perlakuan pendahuluan alkali dengan NaOH. Pada perlakuan pendahuluan alkali, ke dalam substrat ditambahkan larutan 1% NaOH dengan perbandingan 1:10 kemudian campuran bahan tersebut diaduk secara merata dan dibiarkan selama 1-2 jam lalu dilakukan pencucian sebanyak 2-3 kali dengan air mengalir dan dikeringkan dalam oven pada 40°C sampai diperoleh berat yang konstan.

Fermentasi Substrat Padat Jerami Padi (Pensupa et al., 2013). Sebanyak 80 g (berat kering) substrat jerami padi dimasukkan ke dalam botol fermentasi yang berukuran 500 mL kemudian ditambahkan 80 mL larutan nutrisi dan garam mineral. Setiap liter larutan nutrisi dan garam mineral mengandung 5 g yeast ekstrak, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 dan 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Akuades ditambahkan ke dalam substrat sehingga diperoleh perbandingan substrat dan cairan sekitar 1:7,5 atau kadar kelembaban sekitar 9,5% Untuk semua perlakuan dilakukan pengaturan pH substrat sampai sekitar 5,5 dengan menambahkan larutan 2,5% asam sitrat teknis. Ke dalam substrat steril diinokulasi kultur cair fungi *Phanerochaete chrysosporium* sesuai dengan perlakuan pada rancangan penelitian. Inokulasi kultur cair fungi dengan kerapatan masing-masing sekitar 10^6 spora/mL dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*. Substrat yang tidak diinokulasi kultur cair fungi digunakan sebagai kontrol. Semua substrat dalam botol fermentasi ditutup rapat dan diinkubasi di ruang gelap (tanpa pencahayaan) pada $28-32^\circ\text{C}$ selama 21 hari.

Uji Aktivitas Enzim Lignin Peroksidase (Bonnen et al., 1994). Sebanyak 0,2 mL filtrat enzim, 0,05 mL H_2O_2 5 mM; 0,1 mL *veratril alcohol* 8 mM; 0,2 mL buffer asetat 0,05 M pH 3 dan 0,45

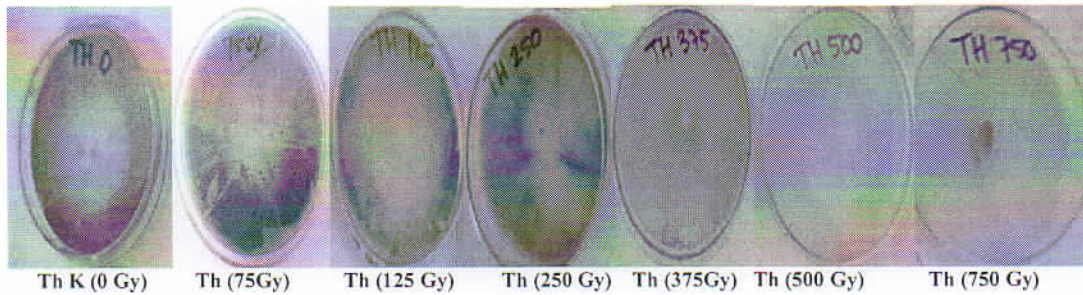
mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 310 nm pada interval waktu 0 dan 30 menit. Satu unit aktivitas enzim LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 mikromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6}$) mol veratril alkohol per menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat kapang *Trichoderma viride* (Tv) dan *Trichoderma harzianum* (Th) yang diiradiasi pada dosis 0-750 Gy terlihat mampu tumbuh pada medium PDA setelah inkubasi pada 30°C (Gambar 1). Terdapat perbedaan morfologi baik dari isolat *T. viride* maupun *T. harzianum* antara Kontrol (0 Gy) terutama pada dosis iradiasi 500 Gy. Hasil pengamatan karakterisasi *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* secara makroskopis meliputi warna koloni dan bentuk koloni yang dapat dilihat pada Gambar1, menunjukkan bahwa dari 7 isolat *Trichoderma viride* hasil iradiasi berdasarkan morfologinya terjadi perkembangan warna koloni yang berbeda dari hari ke-1 sampai hari ke-7. Perkembangan warna koloni diawali dengan warna putih, kemudian kuning setelah setelah umur 7 hari. Isolat *T. viride* pada dosis iradiasi 0 – 375 Gy memiliki morfologi yang sama kecuali pada dosis 500 Gy warna koloni menjadi agak pucat. Sementara itu koloni *Trichoderma harzianum* pada dosis iradiasi 0 -375 Gy perkembangan koloninya diawali warna putih, putih agak kehijauan, hijau muda, hijau dan hijau tua setelah umur 7 hari, namun pada isolat *T. harzianum* dengan dosis iradiasi 500 Gy dan 750 Gy warna koloni yang terlihat dari hari ke-3 hingga ke-7 terdapat warna putih kehijauan .

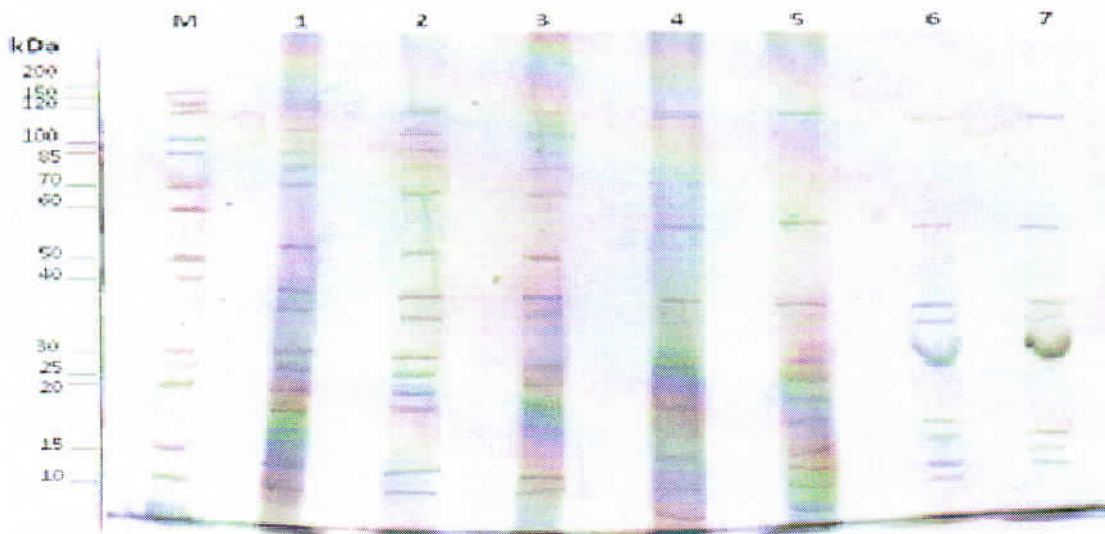


Tv K (0 Gy) Tv (75Gy) Tv (125Gy) Tv (250Gy) Tv (375Gy) Tv (500Gy) Tv (750Gy)



Gambar 1. Pertumbuhan dan morfologi isolat kapang *Trichoderma viride* (Tv) dan *Trichoderma harzianum* (Th) hasil iradiasi pada dosis 0; 75; 125; 250; 375; 500; dan 750 Gy pada medium PDA.

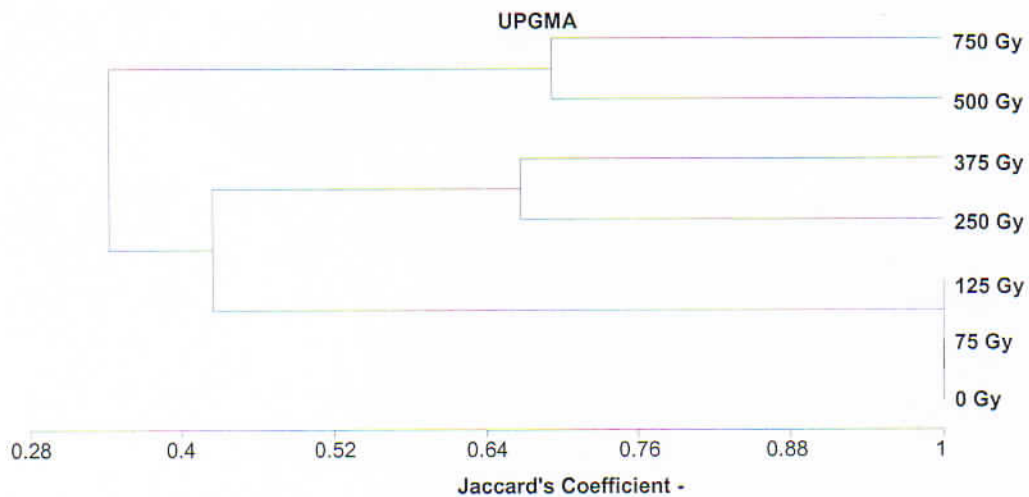
Profil pita protein selular isolat kapang *Trichoderma viride* iradiasi dapat dilihat pada Gambar 2. Dari hasil elektroforesis gel poliakrilamid terdapat sejumlah pita protein yang memiliki berat molekul (BM) berbeda-beda. Pada hasil elektroforesis di atas terdapat beberapa pita protein pada isolat hasil iradiasi pada dosis 0 -125 Gy mempunyai kesamaan pola protein. Berat molekul dari protein mayor ini berkisar 10 – 120 kDa (Tabel 1). Pada dosis iradiasi 0; 75; dan 125 Gy memiliki protein mayor yang sama. Dari dosis 250 Gy sampai dengan 750 Gy terdapat perbedaan pola protein (polimorfik). Protein dari Sampel individu membentuk pola karakteristik dengan kedua



Gambar 2. Profil protein *Trichoderma viride* iradiasi dengan menggunakan Elektroforesis SDS-Gel Poliakrilamid . Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy), lajur 3 (125Gy); Lajur 4 (250 Gy); Lajur 5 (375 Gy); Lajur 6 (500 Gy); Lajur 7 (750 Gy); M (Marker, Protein ladder).

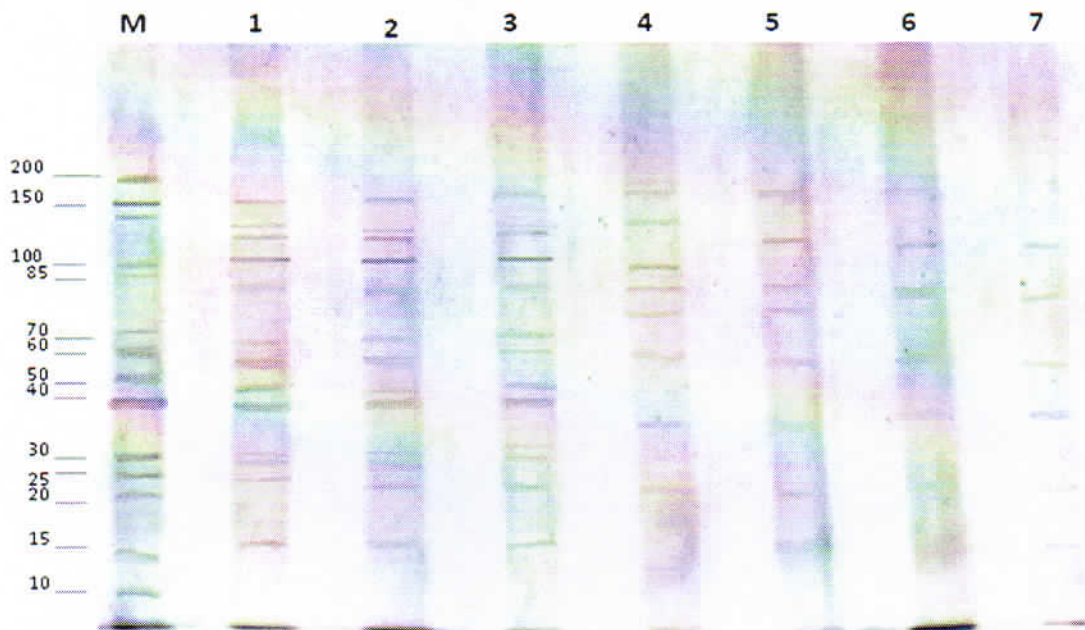
Tabel. 1. Analisis profil protein Isolat *Trichoderma viride* Iradiasi dengan SDS-PAGE

No. Pita Protein	BM Protein (KDa)	Dosis Radiasi (Gy)						
		0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
1	120	+	+	+	+	+	+	+
2	115	+	+	+	-	-	-	-
3	85	+	+	+	-	-	-	-
4	75	+	+	+	-	-	-	-
5	70	+	+	+	-	-	-	-
6	58	-	-	-	+	+	+	+
7	55	+	+	+	-	-	-	-
8	40	+	+	+	-	+	+	+
9	38	+	+	+	+	+	+	+
10	35	+	+	+	-	-	+	+
11	32	-	-	-	-	-	+	+
12	30	+	+	+	+	+	-	-
13	25	+	+	+	+	+	-	-
14	20	+	+	+	+	+	-	-
15	18	+	+	+	+	+	-	-
16	17	-	-	-	-	+	+	-
17	16	-	-	-	-	+	+	+
18	15	-	-	-	+	+	+	+
19	13	+	+	+	+	+	+	-
20	10	+	+	+	+	+	+	-
21	8	-	-	-	+	+	-	-
22								
Total		15	15	15	9	10	9	8

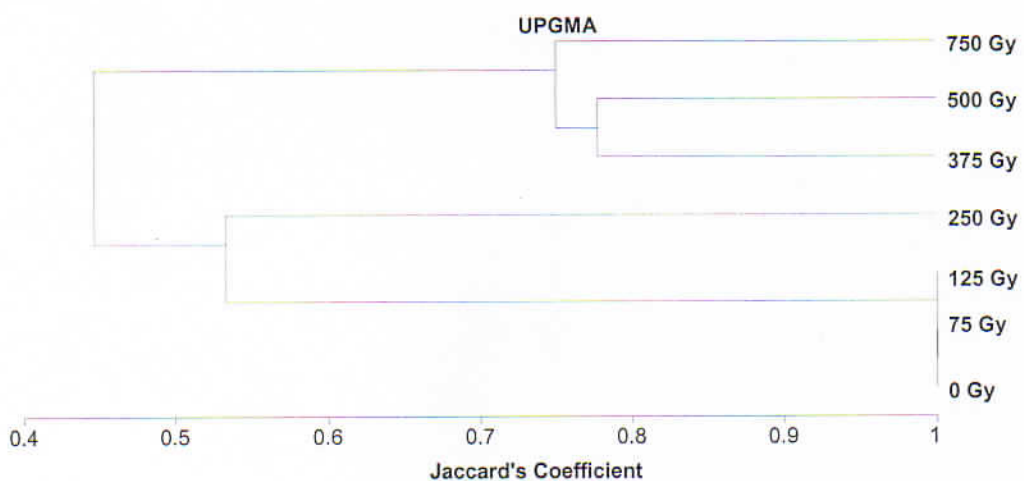


Gambar 3. Dendrogram *Cluster Analysis* berdasarkan jumlah pita protein 7 isolat *Trichoderma viride* iradiasi menggunakan analisis algoritma *UPGMA*.

perbedaan kualitatif dan kuantitatif. Pengaruh dari radiasi sinar gamma menunjukkan dapat menyebabkan fragmentasi awal protein pada dosis 250 Gy dan agregasi berikutnya karena silang molekul protein pada dosis 500 dan 750 Gy untuk *Trichoderma viride*.



Gambar 4. Profil protein *Trichoderma harzianum* iradiasi dengan menggunakan Elektroforesis SDS-Gel Poliakrilamid. Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy), lajur 3 (125Gy); Lajur 4 (250 Gy); Lajur 5 (375 Gy); Lajur 6 (500 Gy); Lajur 7 (750 Gy); M (Marker Protein ladder).

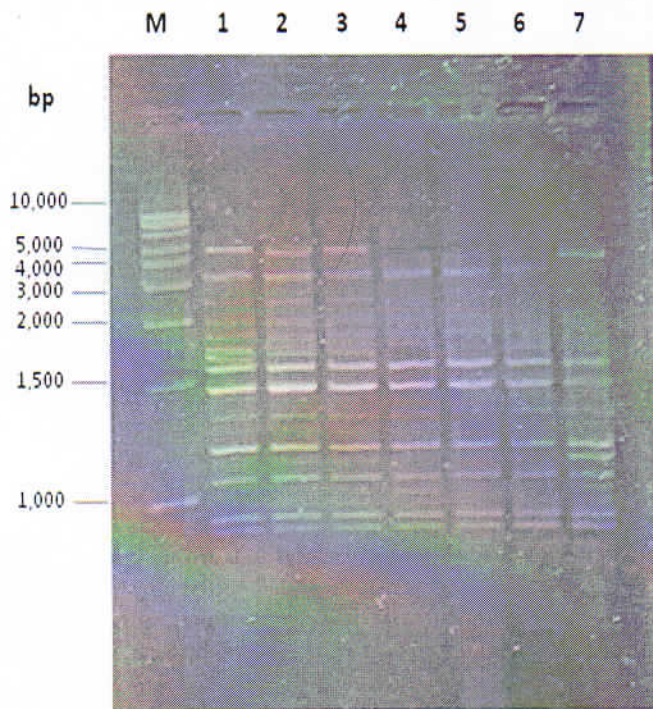


Gambar 5. Dendrogram *Cluster Analysis* berdasarkan jumlah pita protein 7 isolat *Trichoderma harzianum* menggunakan analisis algoritma *UPGMA*

Tabel. 2. Analisis profil protein Isolat *Trichoderma harzianum* Iradiasi dengan Elektroforesis SDS-Gel poliakrilamid.

No Pita Protein	BM Protein (KDa)	Dosis Radiasi (Gy)						
		0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
1	150	+	+	+	+	+	+	-
2	120	+	+	+	+	-	-	-
3	115	+	+	+	-	+	+	+
4	110	+	+	+	+	-	-	-
5	85	+	+	+	+	+	+	+
6	75	-	-	-	+	+	-	-
7	70	+	+	+	+	-	-	-
8	60	+	+	+	+	+	+	+
9	50	+	+	+	-	-	-	-
10	40	+	+	+	-	-	-	-
11	35	-	-	-	+	+	+	+
12	30	+	+	+	-	-	-	-
13	28	+	+	+	-	-	-	-
14	25	+	+	+	+	+	+	+
15	15	+	+	+	+	+	+	+
Total		13	13	13	10	8	7	6

Analisis terhadap dendrogram profil protein menunjukkan bahwa isolat *Trichoderma harzianum* kontrol K (tanpa iradiasi); dosis iradiasi 75; dan 125 Gy dapat dibedakan secara jelas dengan isolat dengan dosis iradiasi 250; 375; 500; dan 750 Gy (Gambar 3). Berdasarkan dendrogram pada Gambar 3 dengan nilai similaritas 35% isolat-isolat tersebut dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok. Kelompok A terdiri dari isolat K (0 Gy), 75, dan 125 Gy. Kelompok B hanya isolat 250 Gy. Kelompok C terdiri dari isolat 375; 500; dan 750 Gy. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa aplikasi profil sidik jari protein merupakan instrumen yang cukup ampuh untuk menyingkap karakteristik molekular isolat *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* akibat pengaruh iradiasi sinar gamma. Secara umum, hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi induksi melalui sinar gamma mempengaruhi kemampuan *Trichoderma* sp dalam meningkatkan aktivitas enzim.



Gambar 6. Profil DNA RAPD *Trichoderma viride* iradiasi hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer A-11. Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy); Lajur 3 (125Gy); Lajur 6 (250 Gy); Lajur 6 (375 Gy); Lajur 7 (500 Gy); Lajur 8 (750 Gy); M (Marker, 1Kb ladder).

Hasil analisis keragaman genetik dari isolat *Trichoderma viride* radiasi berdasarkan amplifikasi RAPD-PCR menggunakan primer A-11 dan OPH-7 menunjukkan pola pita DNA yang berbeda (polimorfik) mulai dari dosis iradiasi 250; 375; 500; dan 750 Gy (Gambar 4 dan 5). Semua primer yang digunakan menghasilkan pita polimorfik. Primer A-11 mempunyai pita monomorfik pada ukuran 2750, 2000, 1300, 900, 600 dan 500 bp (Tabel. 3). Sedangkan pita polimorfik terdapat pada isolat hasil iradiasi 250 Gy; 375 Gy; 500; dan 750Gy masing-masing berjumlah 2, 4, 3, dan 6 buah. Primer OPH-7 memiliki pita monomorfik pada ukuran 500; 1400; 1350; 600; dan 500 bp. Sedangkan pita polimorfik terdapat pada isolat hasil iradiasi 250 Gy; 375 Gy; 500; dan 750Gy masing-masing berjumlah 2, 2, 1, dan 1 buah seperti ditunjukkan Gambar 8 dan Tabel.4.

Hasil analisis pengelompokan (*cluster analysis*) RAPD-PCR dari primer A11 menggunakan metode *Unweight Pair Group Method Average* (UPGMA) berupa dendrogram pada tingkat kesamaan genetik 47%, isolat *Trichoderma viride* iradiasi membentuk 3 kelompok. Kelompok A terdiri dari isolat K (0); 75; dan 125 Gy.

Kelompok B terdiri dari isolat 250 dan 375 Gy. Kelompok C terdiri dari isolat isola 500 dan 750 Gy (Gambar 7.). Sedangkan pengelompokkan dari primer OPH-7 pada tingkat kesamaan genetik 68%, isolat *Trichoderma viride* iradiasi membentuk 5 kelompok . Kelompok A terdiri dari isolat K (0); 75; dan 125 Gy. Kelompok B terdiri dari isolat 500 Gy. Kelompok C terdiri dari isolat 250 Gy. Kelompok D terdiri dari isolat 375 Gy. Kelompok E terdiri dari isolat 750 Gy (Gambar 9.).

Dari hasil pengamatan diatas, maka mutasi radiasi dari isolat kapang terjadi *Trichoderma viride* mulai dari dosis iradiasi 250 – 750 Gy Suatu genotip dikategorikan sebagai mutan apabila profil DNA-nya berbeda dari profil DNA kontrol dan profil tersebut konsisten berbeda pada semua primer yang digunakan.

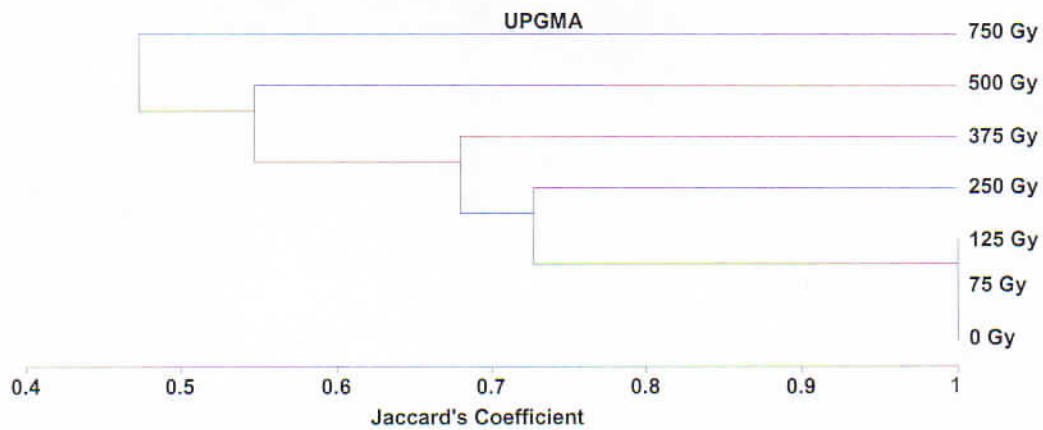
Tabel. 3. Pita monomorfik dan polimorfik dari *Trichoderma viride* iradiasi dengan primer A-11.

Ukuran pasangan basa	Dosis Radiasi (Gy)						
	0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
5000							---*
4000					---		
3500				---			
2750	---	---	---	---	---	---	---
2000	---	---	---	---	---	---	---
1750							---
1600	---	---	---	---	---	---	---
1550				---	---	---	---
1475	---	---	---	---	---	---	---
1300	---	---	---	---	---	---	---
1200							---
1000	---	---	---	---	---	---	---
900	---	---	---	---	---	---	---
875						---	---
600	---	---	---	---	---	---	---
500	---	---	---	---	---	---	---
400					---	---	---
300					---	---	---

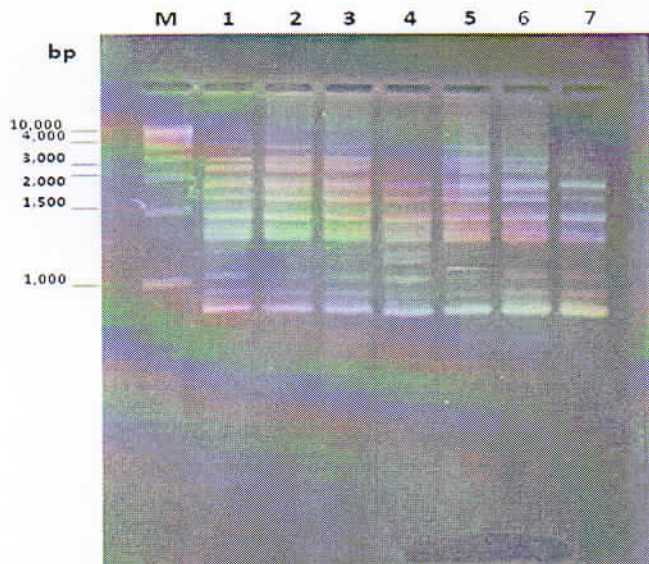
Keterangan :

--- : pita yang muncul pada gel agarose

---*: pita polimorfik



Gambar 7. Dendrogram hubungan similaritas genetik isolat *Trichoderma viride* iradiasi dengan menggunakan primer A-11.



Gambar 8. Profil DNA RAPD *Trichoderma viride* iradiasi hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer OPH-7. Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy); Lajur 3 (125 Gy); Lajur 4 (250 Gy); Lajur 5 (375 Gy); Lajur 6 (500 Gy); Lajur 7 (750 Gy); M (Marker, 1Kb ladder).

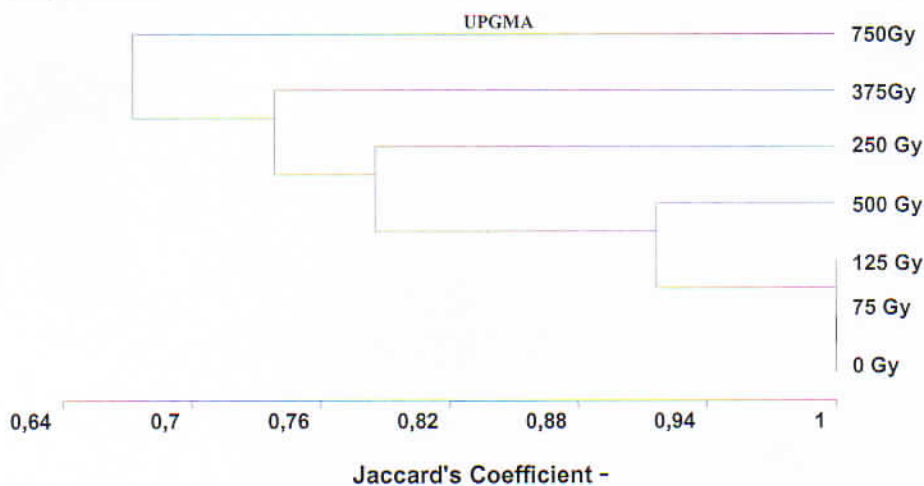
Tabel. 4. Pita monomorfik dan polimorfik dari *Trichoderma viride* iradiasi dengan primer OPH-7.

Ukuran pasangan basa	Dosis Radiasi (Gy)						
	0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
4000	---	---	---		---		
3000	---	---	---		---	---	
2500	---		---		---	---	
1800	---	---	---	---	---	---	---
1500	---	---	---	---	---	---	---
1475	---	---	---	---	---	---	---
1450	---	---	---	---	---	---	---
1400	---	---	---	---	---	---	---
1350	---	---	---	---	---	---	---
1300				---	---	---	---
1250				---			
1200					---		---
1100	---	---	---	---	---	---	---
800	---	---	---	---	---	---	---
700	---	---	---	---	---	---	---

Keterangan :

--- : pita yang muncul pada gel agarose

---*: pita polimorfik

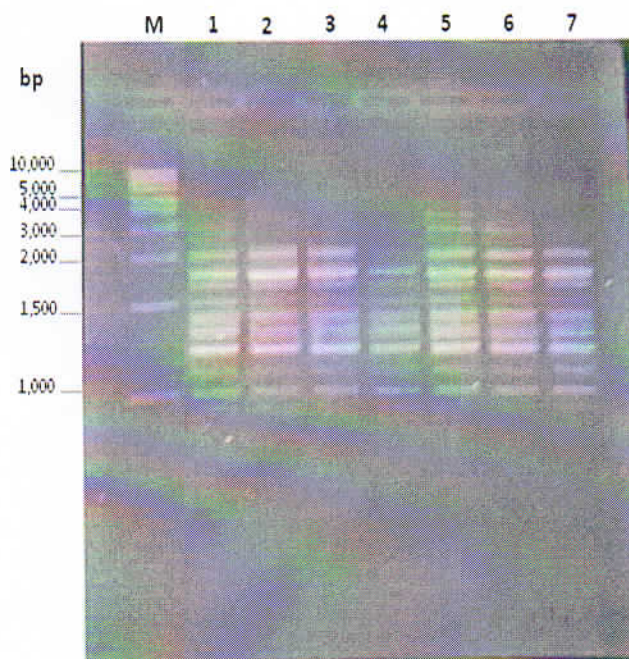


Gambar 9. Dendrogram hubungan similaritas genetik isolat *Trichoderma viride* iradiasi dengan menggunakan primer OPH-7.

Hasil analisis keragaman genetik dari isolat *Trichoderma harzianum* iradiasi berdasarkan amplifikasi RAPD-PCR menggunakan primer AA-04 dan OPH-16 juga menunjukkan pola pita DNA yang berbeda (polimorfik) mulai dari dosis iradiasi 250; 375; 500; dan 750 Gy (Gambar 7 dan 8). Semua primer yang digunakan menghasilkan pita polimorfik. Primer AA-04 mempunyai pita monomorfik pada ukuran 1300; 1250; dan 1100

bp (Tabel. 5). Sedangkan pita polimorfik terdapat pada isolat hasil iradiasi 250 Gy; 375 Gy; 500; dan 750Gy masing-masing berjumlah 1, 2, 1, dan 1 buah. Primer OPH-16 memiliki pita monomorfik pada ukuran 1300; 1200; dan 600 bp. Sedangkan pita polimorfik terdapat pada isolat hasil iradiasi 250 Gy; 375 Gy; 500; dan 750Gy masing-masing berjumlah 1, 2, 1, dan 1 buah, seperti ditunjukkan Gambar 8 dan Tabel.4.

Hasil analisis pengelompokkan (*cluster analysis*) RAPD-PCR dari primer AA-04 menggunakan metode *Unweight Pair Group Method Average* (UPGMA) berupa dendrogram pada tingkat kesamaan genetik 60%, isolat *Trichoderma harzianum* iradiasi membentuk 4 kelompok. Kelompok A terdiri dari isolat K (0); 75; dan 125 Gy. Kelompok B terdiri dari isolat 750 Gy. Kelompok C terdiri dari isolat 375 dan 500 Gy (Gambar 11.). Sedangkan pengelompokkan dari primer OPH-16 pada tingkat kesamaan genetik 60%, isolat *Trichoderma harzianum* iradiasi membentuk 4 kelompok. Kelompok A terdiri dari isolat K (0); 75; dan 125 Gy. Kelompok B terdiri dari isolat 750 Gy. Kelompok C terdiri dari isolat 250 dan 375 Gy. Kelompok D terdiri dari isolat 250 Gy. (Gambar 13).

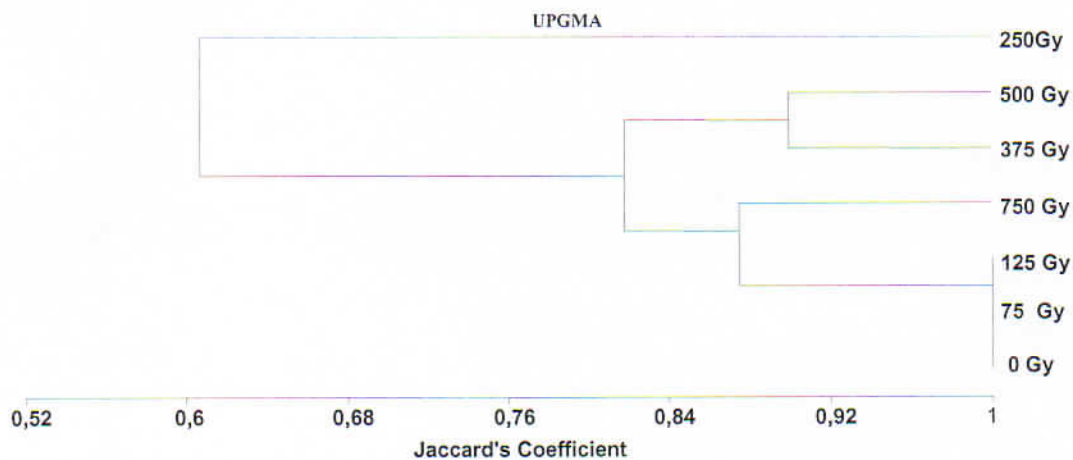


Gambar 10. Profil DNA RAPD *Trichoderma harzianum* iradiasi hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer AA-04. Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy); Lajur 3 (125Gy); Lajur 6 (250 Gy); Lajur 6 (375 Gy); Lajur 7 (500 Gy); Lajur 8 (750 Gy); M (*Marker, 1Kb ladder*).

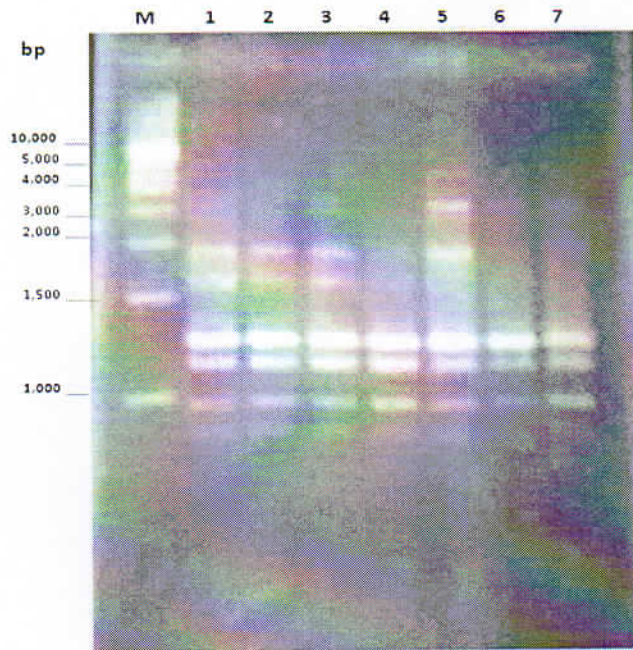
Tabel. 5. Pita monomorfik dan polimorfik dari *Trichoderma harzianum* iradiasi dengan primer AA-04

Ukuran pasangan basa	Dosis Radiasi (Gy)						
	0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
4000					---*		
3000					---*	---*	
2000	---	---	---		---	---	---
1850				---			
1700	---	---	---		---	---	---
1500	---	---	---		---	---	---
1400	---	---	---	---	---	---	---
1300	---	---	---	---	---	---	---
1250	---	---	---	---	---	---	---
1100	---	---	---	---	---	---	---
1000	---	---	---	---	---	---	---
900							---

Keterangan :
 --- : pita yang muncul pada gel agarose
 ---* : pita polimorfik



Gambar 11. Dendrogram similaritas genetik 7 isolat *Trichoderma harzianum* iradiasi dengan menggunakan primer AA-04



Gambar 12. Profil DNA RAPD *Trichoderma harzianum* iradiasi hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer OPH 16. Lajur 1 (0 Gy); Lajur 2 (75 Gy); Lajur 3 (125Gy); Lajur 4 (250 Gy); Lajur 5 (375 Gy); Lajur 6 (500 Gy); Lajur 7 (750 Gy); M (Marker, 1Kb ladder).

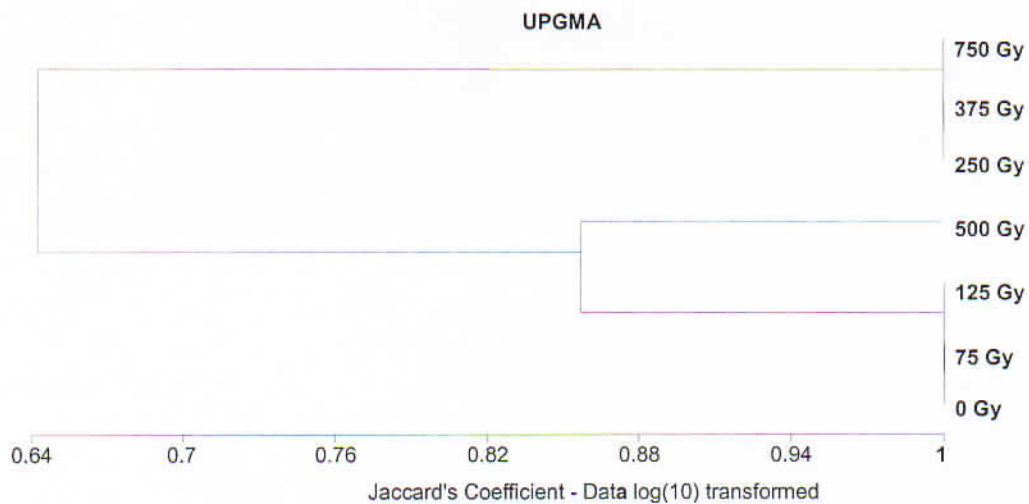
Tabel. 9. Pita monomorfik dan polimorfik dari *Trichoderma harzianum* iradiasi dengan primer OPH-16

Ukuran pasangan basa	Dosis Radiasi (Gy)						
	0 (kontrol)	75	125	250	375	500	750
4000					---	---	---
1900	---	---	---		---		
1800	---	---	---				
1450	---	---	---	---	---	---	---
1400				---			
1300	---	---	---	---	---	---	---
1200	---	---	---	---	---	---	---
900	---	---	---	---	---	---	---
600	---	---	---		---		

Keterangan :

--- : pita yang muncul pada gel agarose

---* : pita polimorfik



Gambar 13. Dendrogram similaritas genetik 7 isolat *Trichoderma harzianum* iradiasi dengan menggunakan primer OPH 16

Dari hasil pengamatan diatas, maka mutasi radiasi dari isolat kapang *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* terjadi mulai dari dosis iradiasi 250 – 750 Gy. Suatu genotip dikategorikan sebagai mutan apabila profil DNA-nya berbeda dari profil DNA kontrol dan profil tersebut konsisten berbeda pada semua primer yang digunakan.

Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan urutan nukleotida pada keempat primer yang digunakan, sehingga menyebabkan perlekatan primer di sepanjang DNA genom sampel juga berbeda. Pita yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat bergantung pada bagaimana primer mengenal daerah komplemennya pada cetakan (*template*) DNA yang digunakan. Semakin banyak situs penempelan dari primer yang digunakan, maka semakin banyak jumlah pita DNA yang dihasilkan [10]

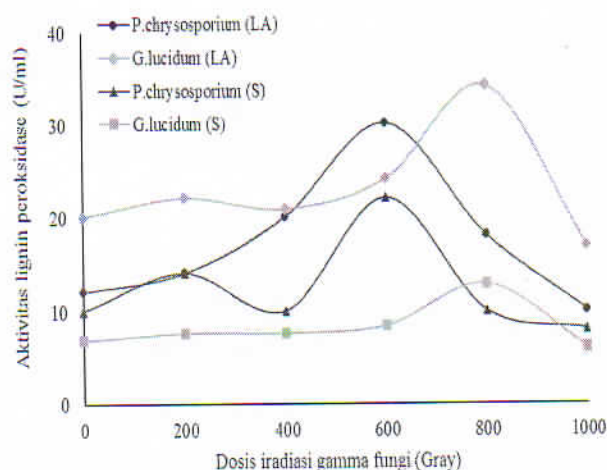
Dari sejumlah marka molekuler, ternyata tidak ada mutan yang terdeteksi pada isolat yang mendapat perlakuan dosis iradiasi 75 dan 125 Gy, karena memiliki profil RAPD yang serupa dengan Kontrol (0 Gy). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya dosis sinar γ yang digunakan untuk mutasi [11].

KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* iradiasi pada dosis 500 Gy memiliki perbedaan karakteristik morfologis dibandingkan dengan isolat Kontrol (0 Gy).
2. Analisis molekuler protein *T. viride* dan *T. harzianum* berdasarkan profil sidikjari protein merupakan instrumen yang cukup ampuh untuk menyingkap karakteristik molekuler isolat *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* akibat pengaruh iradiasi sinar gamma.
3. Dari hasil analisis molekuler menggunakan marka RAPD-PCR, maka mutasi radiasi dari isolat kapang *Trichoderma viride* dan *Trichoderma harzianum* terjadi mulai dari dosis iradiasi 250 – 750 Gy

Aktivitas enzim LiP

Dosis optimum radiasi sinar gamma ditentukan melalui pengujian aktivitas enzim LiP. Aktivitas enzim LiP pada *Phanerochaete chrysosporium* dan *Ganoderma lucidum* dengan dosis iradiasi 0, 200, 400, 600, 800 dan 1000 Gy dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh radiasi gamma terhadap aktivitas LiP fungi.

Grafik kelangsungan hidup spora *Phanerochaete chrysosporium* menunjukkan kenaikan viabilitas karena radiasi yang menstimulasi germinasi [19]. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa radiasi gamma dapat mengubah struktur genom. Kerusakan untai ganda genom lebih efektif menggunakan perpindahan energi cahaya tinggi dari pada perpindahan energi rendah [20]. Dalam kemampuannya mendegradasi lignin, enzim peroksidase terlebih dahulu dioksidasi oleh H_2O_2 , yang juga dihasilkan oleh fungi, untuk membentuk zat antara. Zat ini selanjutnya direduksi oleh sebuah elektron dan membentuk zat kedua yang bersifat radikal. Selanjutnya zat kedua mengoksidasi

substrat berikutnya dengan satu elektron sehingga siklus katalitis tersebut lengkap. Senyawa veratril alkohol merupakan metabolit sekunder yang juga dihasilkan oleh jamur. Ditemukan bahwa beberapa substrat tertentu yang tidak dapat dioksidasi oleh lignin peroksidase akan teroksidasi jika di dalam campuran inkubasi terdapat veratril alkohol [21]. H_2O_2 dan veratril alkohol merupakan mediator dalam proses biodelignifikasi [22].

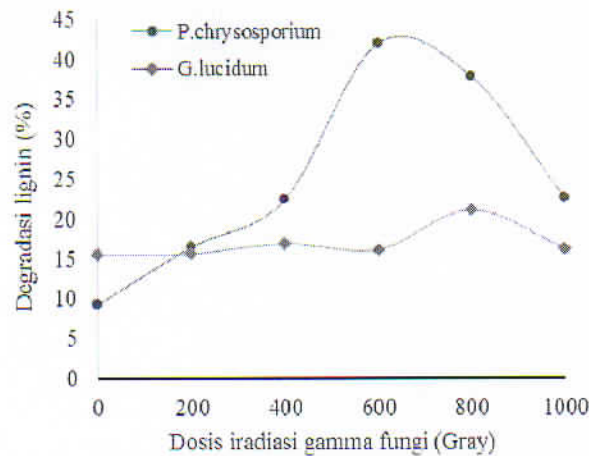
Interaksi sinar gamma dengan suatu sel akan menghasilkan radikal bebas atau spesi oksigen reaktif di antaranya adalah radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH^{\cdot}), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal bebas tersebut dapat mengganggu struktur dan fungsi dari komponen sel sehingga memicu terjadinya stres oksidatif. Sebagai akibat dari stress yang ditimbulkan, sel tersebut akan mengembangkan mekanisme proteksi untuk melawan efek oksigen reaktif dengan menghasilkan enzim yang lebih banyak [23]. Lydia *et al.*, 1994, juga menyatakan bahwa mutasi akibat radiasi menyebabkan fungsi terstimulasi kemudian memperbaiki bagian terinduksi untuk menghasilkan enzim yang lebih banyak daripada sebelum diradiasi [24].

Analisa aktivitas enzim Lignin Peroksida (LiP) dilakukan dengan cara metode *Sub-merged Fermentation* dengan beda perlakuan dalam waktu 4 hari. LiP adalah enzim peroksidase ekstraseluler yang aktivitasnya bergantung pada H_2O_2 [25]. Dalam metabolismenya, fungi pelapuk putih ini memproduksi suatu zat dengan berat molekul rendah yang merupakan kofaktor atau mediator bagi kerja enzim. Mediator ini bersama sama dengan enzim lignin peroksidase akan berfungsi aktif dalam pendegradasian lignin. Mediator yang dibutuhkan oleh enzim lignin peroksidase adalah veratryl alkohol dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Penambahan H_2O_2 berfungsi sebagai reduktor yang akan mengoksidasi enzim pada keadaan awal (*resting enzyme*) dengan dua elektron membentuk senyawa intermediet I. Sedangkan penambahan *veratril alcohol* berfungsi sebagai mediator dalam reaksi redoks untuk menstimulasi oksidasi LiP pada substrat limbah organik lignoselulosa [26]. Dengan penambahan *veratril alcohol* sebagai kosubstrat, maka ko-substrat ini akan dioksidasi oleh peroksida menjadi suatu kation radikal yang kemudian mendegradasi lignin. Pada penambahan buffer asetat berfungsi sebagai larutan penyangga untuk mempertahankan pH pada saat terjadinya reaksi enzimatik, pada pH 3 yang merupakan pH optimum untuk menghasilkan aktifitas LiP yang maksimum. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 310 nm karena jumlah veratryl aldehid yang terbentuk dapat dibaca pada panjang gelombang tersebut. Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim LiP menggunakan substrat lignin alkali lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan substrat serbuk kayu. Aktivitas enzim LiP pada *G.lucidum* lebih tinggi dengan menggunakan lignin alkali (Sigma) dibandingkan dengan menggunakan substrat serbuk kayu dengan nilai 34 U/ml pada dosis 800 Gy. Aktivitas enzim LiP pada *P.chrysosporium* menggunakan lignin alkali (Sigma) mencapai 30 U/ml

pada dosis 600 Gy. Pada *P.chrysosporium* kenaikannya terlihat tidak signifikan tetapi pada dosis yang optimal *P.chrysosporium* lebih tinggi aktivitas LiP dibandingkan dengan *G.lucidum*. Sumber karbon mempengaruhi aktivitas LiP. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas LiP menggunakan lignin alkali (sigma) lebih tinggi dari pada substrat serbuk kayu, karena lignin alkali (sigma) mengandung banyak sumber karbon. Aktivitas enzim LiP tertinggi ditunjukkan oleh *G.lucidum*, aktivitas enzim ini memang lebih tinggi daripada aktivitas enzim *P.chrysosporium* [27].

- Degradasi Lignin

,Proses degradasi lignin dipengaruhi oleh pertumbuhan fungi *P.chrysosporium* dan *G.lucidum* dalam memproduksi enzim LiP yang dapat mendegradasi lignin. Degradasi lignin merupakan reaksi spontan upaya memenuhi kebutuhan nutrien untuk pertumbuhan. Hasil perombakan komponen lignoselulosa ini akan dimanfaatkan oleh fungi untuk pertumbuhan yang berarti akan menekan proses degradasi lignin dan aktivitas degradasi akan terjadi kembali jika ketersediaan nutrien dalam media berkurang.



Gambar 2. Dosis radiasi vs degradasi lignin

Perombakan kandungan lignin oleh fungi pelapuk putih akan melibatkan kerja enzim ligninolitik yang akan menguraikan lignin menjadi karbondioksida (CO₂), enzim tersebut adalah lignin peroksidase dan mangan peroksidase [34]. Enzim ligninolitik ini bekerja aktif dengan adanya oksigen, kunci reaksi degradasi lignin oleh fungi pelapuk putih adalah biokatalis enzim ligninase yang mengkatalis oksidasi cincin aromatik lignin untuk melepas ikatan-ikatan pada cincin aromatiknya dan membentuk radikal-radikal kation. Kemudian radikal-radikal tersebut menjalani reaksi spontan membawa kearah degradasi lignin, sebagian radikal memecah ikatan intramolekul lignin dan sebagian lagi memecah cincin aromatik [35].

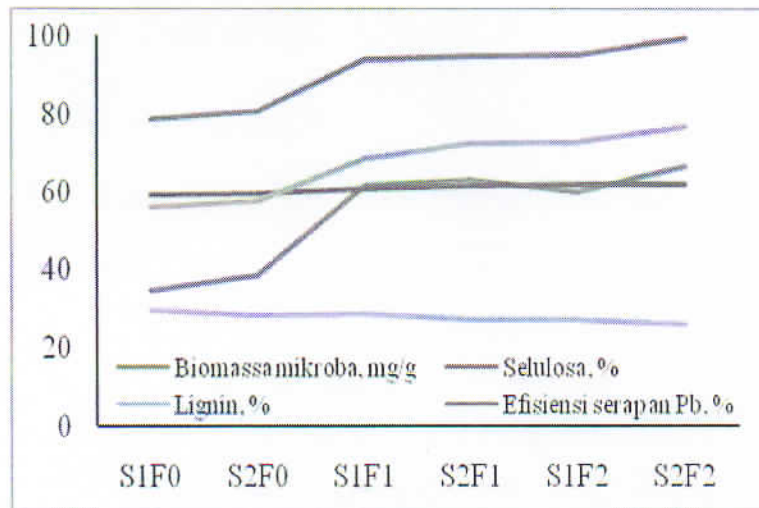
Gambar 2 menunjukkan pengaruh radiasi sinar gamma terhadap efisiensi degradasi lignin dari fungi *P. chrysosporium* dan *G. lucidum* pada proses SSF selama 12 hari menggunakan substrat serbuk kayu jati putih. Aktivitas fungi *P.chrysosporium* pada dosis 600 Gy menghasilkan kemampuan degradasi lignin optimal sebesar 42%. Pada penelitian yang sebelumnya menyatakan bahwa degradasi lignin tongkol kapas yang difermentasi dengan *P.chrysosporium* sebesar 21% setelah difermentasi selama 4-10 hari. Sedangkan, hasil penelitian Fadilah *et al.*, (2008) yang menggunakan fungi pelapuk putih *P.chrysosporium* mampu mendegradasi lignin mencapai 81,4% pada inkubasi selama 30 hari dengan substrat batang jagung [21]. Waktu fermentasi berpengaruh terhadap efisiensi degradasi lignin. Dosis yang paling optimal dalam mendegradasi lignin pada *G.lucidum* berada pada rentang dosis 400 Gy -800 Gy. Pada rentang dosis optimal tersebut *G.lucidum* mampu mendegradasi lignin hingga 21% pada dosis 800 Gy lebih rendah jika dibandingkan dengan kemampuan degradasi lignin *P.chrysosporium*. Dilihat dari kemampuan mendegradasi lignin terhadap kedua fungi pelapuk putih tersebut *P.chrysosporium* lebih baik dalam mendegradasi lignin dibandingkan dengan *G.lucidum* yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi lignin juga tetapi tidak mengalami peningkatan atau kenaikan yang signifikan terhadap setiap dosisnya.

KESIMPULAN

Perlakuan iradiasi gamma dosis rendah mampu meningkatkan aktivitas enzim LiP dari *P.chrysosporium* dan *G.lucidum*. Fungi *P. chrysosporium* yang diradiasi dengan dosis 600 Gy memberikan aktivitas enzim LiP optimal sebesar 30 U/ml sedangkan aktivitas enzim LiP yang dihasilkan *G. lucidum* pada dosis optimal 800 Gy adalah 34 U/ml. Kemampuan degradasi lignin fungi *P. chrysosporium* sebesar 42% pada dosis 600 Gy lebih tinggi dibandingkan dengan degradasi lignin dari *G. lucidum* sebesar 21% pada dosis 800 Gy.

Uji efektivitas substrat dan hidrolisa dari biodelignifikasi kayu jati putih (*gmelina arborea roxb.*) dengan *phanerochaete chrysosporium* untuk menurunkan konsentrasi Pb dan Cd dalam medium cair.

Berdasarkan keseluruhan data SSF dan data biosorpsi logam yang didapat, variabel-variabel yang dihasilkan dari penelitian ini saling berkesinambungan dan mendukung satu dengan yang lainnya. Efisiensi keseluruhan data pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Efisiensi SSF dan Biosorpsi Ion Logam Pb^{2+} dan Cd^{2+}

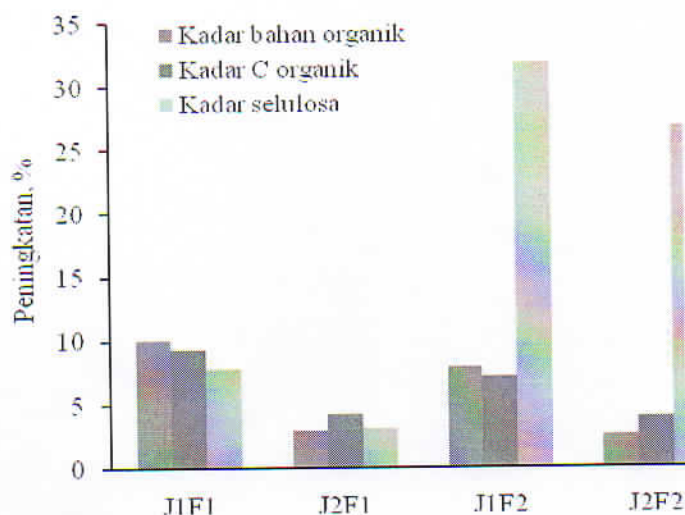
Berdasarkan Gambar 16, peningkatan persentase bobot biomassa mikroba pada medium diikuti dengan peningkatan serapan ion logam Pb^{2+} dan Cd^{2+} . Selain itu peningkatan BBM juga diikuti dengan penurunan kadar lignin dan peningkatan kadar selulosa di dalam substrat

Kesimpulan

1. Serapan terhadap ion logam Pb^{2+} efisien pada substrat dengan fungsi *Phanerochaete chrysosporium* yang diradiasi gamma dengan dosis 600 Gy dengan *pre-treatment* NaOH yakni mampu menyerap sebesar 14,92 mg/g dan serapan terhadap logam Cd^{2+} efisien pada substrat dengan fungsi *Phanerochaete chrysosporium* yang diradiasi gamma dengan dosis 600 Gy tanpa *pre-treatment* NaOH yakni mampu menyerap sebesar 1,17 mg/g.
2. Pemberian dosis iradiasi gamma sebesar 600 Gy pada fungsi *Phanerochaete chrysosporium* efektif terhadap proses biodelignifikasi dan biosorpsi ion logam, sehingga substrat dengan radiasi gamma mampu menyerap logam lebih baik dari pada substrat yang tanpa diradiasi gamma.

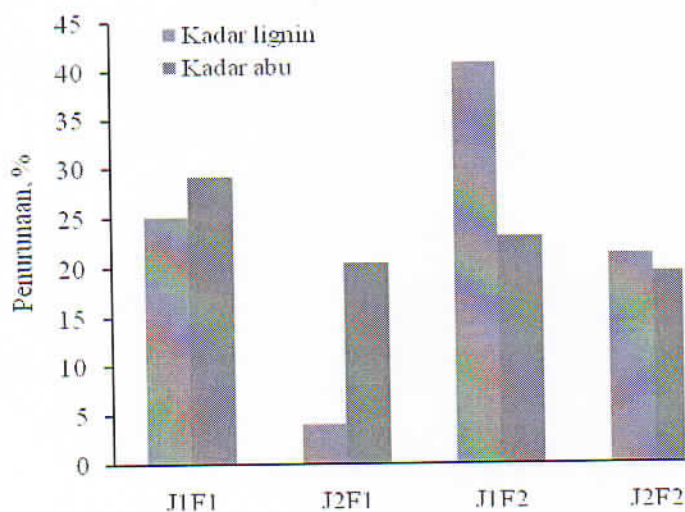
Uji efektivitas LiP fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang di iradiasi gamma menggunakan pretreatment NaOH pada delignifikasi jerami padi

Berdasarkan keseluruhan data SSF dan data uji efektivitas parameter yang terukur pada proses delignifikasi jerami padi menggunakan fungi *Phanerochaete chrysosporium* yang diradiasi sinar gamma dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2 di bawah.



Gambar 1. Peningkatan Kadar Bahan organik, C-organik dan Selulosa selama 21 hari

Pada gambar 1 tampak bahwa perlakuan J1F2 (dosis 600 Gy) mampu meningkatkan kadar selulosa, yang menunjukkan bahwa terjadi degradasi lignin yang meningkatkan kadar selulosa.



Gambar 2. Penurunan Kadar lignin dan abu selama 21 hari

Pada Gambar 2 tampak bahwa perlakuan radiasi sinar gamma J1F2(dosis 600 Gy) mampu menurunkan kadar lignin optimal.

Kesimpulan :

1. Pemberian dosis iradiasi gamma sebesar 600 Gy pada fungi *Phanerochaete chrysosporium* efektif terhadap proses SSF(Solid State Fermentation) biodelignifikasi jerami padi menghasilkan aktivitas optimal enzim lignin peroksidase sebesar 9,20 U/ml.
2. *Pre-treatment* pemberian NaOH sebesar 1% tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap efektivitas proses SSF biodelignifikasi jerami padi, sedangkan iradiasi sinar gamma dengan dosis 600 Gy memberikan pengaruh yang signifikan dengan meningkatkan kadar selulosa sebesar 31,78% dan menurunkan kadar lignin sebesar 40,76% pada masa inkubasi selama 21 hari.

DAFTAR PUSTAKA

1. ABO-STATE MAM, AI HAMMAD, M SWELIM and RB GANNAM. Enhanced Production of Cellulase(S) By *Aspergillus spp.* Isolated From Agriculture Wastes by Solid State Fermentation. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 8(4): 402-410 [2010].
2. DIPANWITA DAS, A. CHAKRABORTY, S.BHAR, M. SUDARSHAN, and S.C.SANTRA. Gamma Irradiation in modulating cadmium bioremediation potential of *Aspergillus sp.* Journal of Environmental Science, toxicology and Food Technology. Vol.3, Issue 6: 51-55 (2013).
3. TOWNER KJ and COCKAYNE A. *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*. Chapman & Hall. London (1995).
4. GOES L.B, DA COSTA ABL, FREIRE LLC, DE OLIVEIRA NT. Randomly amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonisms against *Rhizoctonia solani*. Brazillian Archives of Biology and technology 45(2): 151-160 (2002).
5. ATIENZAR FA, VENIER P, JHA AN, DEPLEDGE MH,. Evaluation of the RAPD assay for detection of DNA damage and mutations. Mut Res.521:151-163 (2002).

6. M. SIDDIQUE AWAN, NABILA TABBASAM, N. AYUB. Gamma radiation induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production. *Molecular Biology Reports*. Vol. 38: 1367-1374 (2011).
7. CHEN, J.; W., WANG; W., CHEN; AND G., GAO; J.A. Preliminary analysis on gel electrophoresis of *Trichoderma*. *Chinese J. of Biological Control*, **15** (2): 77-80 (1999).
8. Kovach, WL 2007, *MVSP- A multivariate statistical package for windows*, Ver.3.1, Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
9. RAEDER U, BRODA P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl. Microbiol.* 1985;1:17-20. doi: 10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479
10. TINGEY, S.V., RAFALSKY, J.A., WILLIAMS, S.J.K., . Genetic analysis with RAPD markers. In: Proceedings of the Symposium Application of RAPD Technology to Plant Breeding, Crop Science Society of America, Minneapolis, MN, pp. 3-8 (1992).
11. TABASOM NASERIPOUR, SAEED NASROLLAH NEJAD, SAMMIRA SHAHBAZI, and KAMARAN RAHNAMA. Using gamma-ray to increased exoglucanase activity in *Trichoderma* and improvement of *Sclerotinia* rot of canol biocontrol. *Biological Forum – An International Journal (Special Issue 2015)* **7**(2): 57-60(2015).
12. BPPT Kelompok Teknologi Pengelolaan Air Bersih dan Limbah Cair. 2012. Petunjuk Teknik Penanganan Limbah Lingkungan Hidup. www.kelair.bppt.go.id/Publikasi/BukuPetnisLimbLH/06KAYU.pdf. 159-168.
13. Perez, J., J.M. Dorado, T. Rubia, J. Martinez. 2002. Biodegradation and Biological treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. *Int. Microbiol.* **5**, 53-63.
14. V..Sasikumar, V. Priya, C. Shiv Shankar and D. Sathiah Sekar (2014, November 6), Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes [On line], *Journal of Academia and Industrial Research*, Vol.3, pp. 291-294.
15. Busse, N., D. Wagner, M. Kraume and P. Czermak, 2013, Reaction Kinetic of Versatile Peroxidase for The Degradation of Lignin Compounds, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Science Publication, Vol.9 (4): 365-394, [online], <http://www.thescipub.com/ajbb.toc>
16. Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M., dan Javed, S. 2008. Solid State Fermentation: An Overview. *Chem, Biochem, Eng Q.* Vol. 22: 49-70.
17. Chakravarty, B. and S. Sen, (2001), Enhancement of regeneration potential and variability by gamma-irradiation in cultured cells of *Scilla indica*, *Biol. Plant.* **44**: 189-193.
18. Afify, A.E.M.R., M. Abo-El-Seoud, G.M. Ibrahim, I. M.M. Helal and B. W. Kassem, (2012), Exposing of *Trichoderma* spp. to gamma radiation for stimulating its pesticide biodegradation activity, *J. Rad. Res. Appl. Sci.* **5**(2):440-454.
19. Haggag, W.M. and H.A.A. Mohamed, (2002), Enhancement of antifungal metabolites production from gamma-rays induced mutants of some *Trichoderma* sp. for control onion white rot disease, *Plant Pathology Bulletin* **11** : 45-56.
20. Pointing S.B. 1999. Qualitative Methods for The Determination of Lignocellulotik Enzyme Production by Tropical Fungi. *Juornal Fungal Diversity.* **2**: 17-33.
21. Marginingrum, D. dan N. Karningsih. 2001. Studi Degradasi Lignin ekstraktif Menggunakan Bakteri *Serratia marcescens* dengan Menggunakan Metode Reaktor Batch. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Pusat Penelitian Geoteknologi LIPI*. Surakarta: 149-157.

22. 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.
23. Pensupa, N., Jin, M., Kokolski, M., dan Archer, D.B. 2013. A Solid State Fungal Fermentation Based Strategy for the Hydrolysis of Wheat Straw. *J. Bioresource Technology*, Vol. 149: 261-267.
24. S.Pal and Vimala Y., (2011), Bioremediation of Chromium from Fortified Solutions by *Phanerochaete Chrysosporium* (MTCC 787), *J.Bioremed. and Biodegrad.* 2 :5, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000127>.
25. Safaria, S., Idiawati, N. dan Zaharah, T. A. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *Jurnal Kimia dan Kemasan*, Vol 2 No. 1: 46-51.
26. Rahayuningsih, M. 2003. Toksisitas dan Aktivitas Dipterisidal Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis israelensis* Tipe Liar dan Mutan pada Berbagai Formulasi Media dan Kondisi Kultivasi. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
27. Pelczar, M.J.Jr dan Chan, E.C.S. 2006. Dasar-dasar Mikrobiologi. Volume 1. Hadioetomo R.S., Imas T., Tjitrosomo S. S., Angka S.L., Penerjemah; Jakarta: UI Pr. Terjemahan dari: *Elements of microbiology*.
28. M.A.M. Abo-State, O. Khatab, A. Abo-El Nasar and B. Mahmoud, (2011), factors Affecting laccase Production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*, *World applied Sciences Journal*, 14 (11) : 1607 – 1619.
29. Afify Abd El-Moneim MR, Mohamed A Abo-El-Seoud, Ghada M Ibrahim and Bassam W Kassem. (2013). Stimulating of Biodegradation of Oxamyl Pesticide by Low Dose Gamma Irradiated Fungi. *J Plant Pathol Microb*, Vol.4 (9).
30. I. Piri, M. Babayan, A. Tavassoli and M. Javaheri, (2011, December 30), The Use of gamma irradiation in agriculture, *African Journal of Micro. Reserch*, Vol.5 (32), pp. 5806–5811,[online], <http://www.academicjournals.org/AJMR>.
31. K. Boominathan, S.B. Das, T.A.Randall, R.L.Kelley and C.A. Reddy, (1990, Jan), Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. of Bacteriology*, 172(1), 260 – 265.
32. Fadilah, Sperisa D, Enny Kris. A, Arif, J. 2008. Biodelignifikasi Batang Jagung Dengan Jamur Pelapuk Putih *Phanerochaete chrysosporium*. *Ekuilbrium*, Vol. 7 (1): 7-11.
33. Koduri,R.S. and Tien, M., (1994), Kinetic Analysis of Lignin Peroxidase: Explanation for the Mediation Phenomenon by Veratryl alcohol, *Biochemistry*, 33: 4225 – 4230.
34. Sreedhar, M., chaturvedi, A., Aparna,M., Kumar, P.D., Singhai, R.K. and Babu, V., (2013), Influence of γ -radiation stress on scavenging Enzymes Activity and Cell Ultra Structure in Groundnut (*Arachis hypogaea L.*), *Applied Science Resource*, Vol.4 No.2:35 – 44.
35. Lydia A, Sjarief SH, Sutarmi A, dan Sudrajad D, 1994. Pengaruh Kapang Iradiasi untuk Produksi Glukosa dari Tepung sagu. *Majalah BATAN*. 27: 3–4, 25–34.
36. Ima, Mufidatul Ilmi, dan Nengah, Dwianita Kuswytasari. 2013. Aktifitas Enzim Lignin Peroksidase oleh *Gliomastix* sp. T3.7 pada Limbah Bonggol Jagung dengan Berbagai pH dan Suhu. Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS). *Jurnal Sains dan Seni POMITS* Vol. 2, No.1 2337-3520.
37. N. Mehboob, M.J. Asad, M. Imran, M. Gulfranz, F.H. Watoo, S.H. hadri and M. Asghar, (2011, August, 29), Production of lignin peroxidase by *Ganoderma leucidum* using solid state fermentation, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(48), pp. 9880–9887,[online], <http://www.academicjournals.org/AJB>.
38. T. Artiningsih. 2006. Aktivitas Lignolitik Jenis *Ganoderma* pada Berbagai Sumber Karbon. *Biodiversitas*, Vol.7 : 307-311.
39. Hilakore, M. 2008. Peningkatan Kualitas Nutritif Putak Melalui Fermentasi Campuran *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* Sebagai Pakan Rumanisia. Tesis, Institut

- Pertanian Bogor, Bogor.
40. D. Rahmadi, (2003, Desember), Parameter Metabolisme Rumen In Vitro Limbah Kubis Terensilase pada lama Pemeraman Berbeda, *J.Indo.Trop.Anim.Agric.*, Vol.28 (4) : 218 – 223.
 41. Haddadin, M.S.Y., Haddadin, J., arabiyat, I.I., and Hattar, B. 2009, Biological Conversion of Olive Pomace into Compost Using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Biores. Technol.*, 100 : 4773 – 4782.
 42. Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., Jiang, R. and Yu, Z., 2010, Effects of Inoculation with *P. chrysosporium* at Various Time Points on Enzyme Activities During Agricultural Waste Composting, *Biores. Technol.*, 101 ; 222 – 227.
 43. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., 2000, Biodegradation of Lignin in Compost Environment, *Bioresources Technology*, 72 : 169 – 183.
 44. Irawati D, Azwar N.R., Syafii W., dan Artika I.M. 2009. Pemanfaatan Serbuk Kayu untuk Produksi Etanol dengan Perlakuan Pendahuluan Delignifikasi Menggunakan Jamur *Phanerochaete chrysosporium*. *Jurnal Ilmu Kehutanan*, 3 (1).
 45. Vallie, K., J. Barry., Brock., K. Dinesh., Joshi., and Michael. 1992. Degradation of 2,4 toluen by the lignin degrading fungi *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Appl. And Env. Microbiol.* 8 : 221 – 228.
 46. Akhtar.M., R.A. Blanchette and T.K. Kirk. 1997. Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood. *Advances in Biochem. Engineering Biotechnology.*, 57:159-195.