



# PRODUKSI ENZIM LIGNINOLITIK DAN DEKOLORISASI PEWARNA SINTETIS OLEH ISOLAT BARU JAMUR TROPIS *Cymatoderma dendriticum* WM01

## PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES AND DECOLORIZATION OF SYNTHETIC DYES BY A NEW ISOLATE TROPICAL FUNGUS *Cymatoderma dendriticum* WM01

Maulida Oktaviani\*, Nissa Nurfaejrin Solihat, Yusup Amin, Dede Heri Yuli Yanto

Pusat Penelitian Biomaterial, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong-Bogor 16911

\*Corresponding author: maulida.oktaviani26@gmail.com

Naskah Diterima: 31 Agustus 2020; Direvisi: 28 November 2020; Disetujui: 28 Maret 2021

### Abstrak

Penggunaan pewarna sintetik pada berbagai industri telah menimbulkan pencemaran lingkungan. Jamur pelapuk putih (JPP) yang umumnya menghasilkan enzim ligninolitik dipercaya mampu mendegradasi senyawaan ini. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat baru JPP *Cymatoderma dendriticum* WM01 dalam memproduksi enzim ligninolitik dan mendekolorisasi pewarna sintetik. Skrining aktivitas enzim diukur berdasarkan pertumbuhan jamur pada media agar alkali-lignin, sedangkan aktivitas dekolorisasi diukur berdasarkan kemampuan jamur mendekolorisasi pewarna *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) pada medium agar. Kemampuan dekolorisasi dan aktivitas enzimatik jamur terhadap tiga jenis pewarna menggunakan media Dzapek-Dox cair yang masing-masing mengandung pewarna RBBR, *Acid Blue 129* (AB129), dan *Reactive Black 5* (RB5). Hasil penelitian menunjukkan pembentukan zona merah kecokelatan pada media alkali-lignin akibat adanya aktivitas degradasi lignin oleh jamur, sedangkan pemudaran warna pada media agar-RBBR menunjukkan kemampuan dekolorisasi jamur terhadap pewarna sintetis. *C. dendriticum* WM01 mendekolorisasi pewarna RBBR, AB129, dan RB5 dengan efisiensi masing-masing sebesar 22,6%, 81,9%, dan 12,1%. Selama proses dekolorisasi hanya enzim mangan peroksidase (0,3 U/L) yang dihasilkan oleh *C. dendriticum* WM01. Menariknya, penambahan ekstrak daun jati (50 mg/20 mL) mampu meningkatkan aktivitas enzim mangan peroksidase hingga 37,6 U/L dan lakase hingga 208,1 U/L. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *C. dendriticum* WM01 berpotensi untuk digunakan pada dekolorisasi air limbah pewarna tekstil.

**Kata kunci:** *Cymatoderma dendriticum*; Dekolorisasi; Ekstrak daun jati; Enzim ligninolitik; Pewarna sintetik

### Abstract

The use of synthetic dyes in various industries caused environmental pollution. White-rot fungi, which generally produce ligninolytic enzymes, are believed to be able to degrade these recalcitrant compounds. This study aims to investigate the ability of the new isolate white-rot fungus *Cymatoderma dendriticum* WM01 to decolorize synthetic dyes. Screening of ligninolytic activity was based on fungal growth on alkali-lignin agar media, while decolorization activity was observed by the fungal ability to decolorize *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) dye in agar medium. The strain was tested to decolorize RBBR, *Acid Blue 129* (AB129), and *Reactive Black 5* (RB5) dyes in Dzapek-Dox broth media. The results showed the formation of a red-brownish area on alkali-lignin agar media, indicated degradation of lignin by strain WM01. The strain was able to decolorize RBBR, AB129, and RB5 dyes with efficiency of 22.6%, 81.9%, and 12.1%, respectively. During decolorization, only manganese peroxidase (0.3 U/L) was detected in culture medium. Interestingly, the addition of teak leaf extract (50 mg/20 mL) increased the activity of manganese peroxidase to 37.6 U/L and laccase to 208.1 U/L. This study suggests that *C. dendriticum* WM01 has the potential to be used in decolorization of textile dye wastewater.

**Keywords:** *Cymatoderma dendriticum*; Decolorization; Ligninolytic enzyme; Synthetic dyes; Teak leaf extract

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v14i2.17184>

## PENDAHULUAN

Penggunaan pewarna sintetik pada industri pulp, kertas, dan tekstil di Indonesia meningkat pesat selama beberapa tahun terakhir (Badan Koordinasi Penanaman Modal, 2014). Pewarna dari golongan azo dan *anthraquinone* merupakan jenis pewarna yang sering digunakan karena harganya murah, memiliki solubilitas yang baik, dan mampu menghasilkan warna menarik serta atraktif (Liu et al., 2017; Tavares et al., 2020). Namun, penggunaan pewarna sintetik tersebut tidak diiringi dengan penanganan limbah yang memadai. Sebagian besar industri tekstil membuang limbah cair pasca produksi ke lingkungan (Bagewadi, Mulla, & Ninnekar, 2017; Kabbout & Taha, 2014; Sun et al., 2017). Pembuangan limbah cair tersebut ke lingkungan dalam jumlah yang besar akan membahayakan ekosistem lingkungan dan kehidupan manusia karena sifatnya yang toksik, karsinogenik, dan mutagenik (Simões et al., 2019). Penanganan limbah cair khususnya yang mengandung senyawa atau pewarna sintetik, sangat penting untuk dilakukan sebelum membuang limbah ke lingkungan (Ayed, Mahdhi, Cheref, & Bakhrouf, 2011).

Jamur pelapuk putih khususnya dari golongan *Basidiomycota*, telah diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi berbagai senyawa xenobiotik dan pewarna sintetik karena kemampuannya untuk memproduksi enzim ligninolitik ekstraseluler seperti lakase, mangan peroksidase (MnP), dan lignin peroksidase (LiP) (Rao et al., 2019). Penelitian dewasa ini berfokus pada kemampuan enzim ligninolitik jamur dalam degradasi lignin dan dekolonisasi serta detoksifikasi berbagai macam limbah berwarna yang dihasilkan oleh berbagai industri pulp, kertas, serta tekstil (Kahraman & Gurdal, 2002; Wesenberg, Kyriakides, & Agathos, 2003). Perombakan zat warna oleh enzim ligninolitik diawali dari oksidasi enzim ligninolitik oleh oksigen dan selanjutnya enzim ligninolitik dalam keadaan teroksidasi tersebut mengoksidasi zat warna tekstil (Siswanto, Suharyanto, & Fitria, 2007).

Produksi enzim ligninolitik dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti komposisi medium, perbandingan karbon dan nitrogen,

pH, suhu, aerasi, serta ada tidaknya agen penginduksi (Kaushik & Malik, 2009). Enzim ligninolitik hanya disekresikan dalam jumlah yang sedikit dengan produktivitas yang rendah, sehingga pemanfaatannya dalam berbagai industri masih sangat terbatas (Vrsanska, Buresova, Damborsky, & Adam, 2015). Oleh karena itu, dibutuhkan agen penginduksi yang mampu meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik, baik berupa bahan kimia sintetis atau alami. Oktaviani dan Yanto (2016) melaporkan bahwa penambahan  $\text{CuSO}_4$  sebesar 0,1 mM ke dalam media pertumbuhan jamur mampu meningkatkan aktivitas enzim lakase dari 158 U/L menjadi 1.636,6 U/L. Veratril alkohol dan  $\text{MnSO}_4$  juga dilaporkan mampu menginduksi aktivitas enzim lakase (Siswanto et al., 2007). Selain senyawa-senyawa kimia tersebut, bahan lignoselulosa seperti serasah daun, tandan kosong kelapa sawit (TKKS), kapas, dan serbuk kayu juga dapat dijadikan sebagai alternatif medium untuk memproduksi enzim lakase (Akpinar & Ozturk, 2017; Wang et al., 2019).

Indonesia sebagai negara megabiodiversitas sangat berpotensi untuk memanfaatkan enzim ligninolitik yang dihasilkan oleh jamur. Penelitian dekolonisasi pewarna sintetik oleh jamur ligninolitik di Indonesia sebagian besar masih terbatas pada jenis *Pleurotus* (Dewi, Ilyas, & Sari, 2019; Dimawarnita & Panji, 2019), *Trametes* (Anita, Sari, & Yanto, 2019; Ardiati, Yanto, Anita, & Watanabe, 2019; Pertiwi, Dewi, & Sari, 2020; Yanto, Auliana, Anita, & Watanabe, 2019) dan *Ganoderma* (Martina, Roza, & Sirait, 2015; Pratiwi, Indrianingsih, Darsih, & Hernawan, 2017). Penelitian pendahuluan dengan menggunakan jamur *C. dendriticum* strain WM01 telah dilakukan dengan menggunakan tiga jenis pewarna sintetis (*reactive blue* 19, *acid orange* 52, dan *basic violet* 1), serta mediator kimia 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl radical (TEMPO) dan *violuric acid* (Sari et al., 2018). Namun, belum dilakukan penelitian mengenai aktivitas pertumbuhan jamur *C. dendriticum* WM01 dan kemampuan dekolonisasi jamur tersebut terhadap jenis pewarna yang berbeda. Penggunaan agen penginduksi alami seperti ekstrak daun jati juga belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi

kemampuan dekolorisasi jamur *C. dendriticum* WM01 hasil isolasi dari kawasan hutan Laiwangi Wanggameti, Pulau Sumba, terhadap pewarna sintetik golongan *anthraquinone* dan azo, yaitu *Remazol Brilliant Blue Reagent* (RBBR), *Acid Blue 129* (AB129), dan *Reactive Black* (RB5), serta pengaruh penambahan mediator alami ekstrak daun jati terhadap aktivitas enzimatik jamur.

## MATERIAL DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi pewarna *Remazol Brilliant Blue Reagent* (RBBR), *Acid Blue 129* (AB129), dan *Reactive Black* (RB5) (Sigma Aldrich, USA), *yeast extract* (Himedia Chemicals, India), pepton (Himedia Chemicals, India), *dzapek dox broth* (Bacto, Jepang), dan bahan kimia lainnya yang diperoleh dari Merck (Jerman).

### Mikroorganisme

Isolat jamur yang digunakan dalam penelitian, yaitu isolat baru jamur *Cymatoderma dendriticum* strain WM01 koleksi Puslit Biomaterial LIPI. Jamur WM01 merupakan hasil isolasi dari kawasan hutan Laiwangi Wanggameti, Taman Nasional Matalawa, Pulau Sumba, Nusa Tenggara Timur pada bulan Maret hingga April 2016.

### Uji Laju Pertumbuhan

Isolat jamur yang telah murni ditumbuhkan pada media padat RBBR dan *Malt Extract Agar* (MEA) (pH 4,5). Inokulum (1 cm) jamur ditanam ke media agar dengan menggunakan *cork-borer* dan diinkubasi pada suhu  $\pm 25$  °C selama 7 hari. Pertumbuhan jamur diamati dengan menghitung diameter koloni jamur yang tumbuh pada media padat.

### Uji Kualitatif Enzim Ligninolitik dan Dekolorisasi pada Media Padat

Uji degradasi lignin dilakukan pada media selektif alkali-lignin dan pewarna RBBR. Inokulum (1 cm) jamur ditumbuhkan pada media padat alkali lignin yang mengandung komposisi (per Liter):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3 g, KCl 0,3 g,  $\text{NaNO}_3$  3 g, *yeast extract* 0,3 g, *malt extract* 1,5 g, KOH 3 butir, agar 30 g, guaiacol 60  $\mu\text{L}$ , lignin 300  $\mu\text{L}$ , kloramfenikol 0,75 g, dan *benomyl* 300  $\mu\text{L}$  (Anita, Yanto, & Fatriasari, 2011). Sedangkan

media RBBR memiliki komposisi (per Liter), untuk lapisan bawah adalah Media *Dzapek-Dox* 35 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g; *yeast extract* 2 g; pepton 2 g; agar 20 g; lignin 2 g; glukosa 10 g. Lapisan atas adalah *malt extract* 5 g, *benomyl* 10 mg, RBBR 1 g, agar 10 g (Oktaviani & Yanto, 2016). Biakan jamur kemudian diinkubasi pada suhu  $\pm 25$  °C selama 7 hari. Warna merah cokelat yang timbul pada media alkali-lignin seiring pertumbuhan jamur merupakan tanda keberadaan enzim ligninolitik, sedangkan kemampuan dekolorisasi jamur akan terlihat apabila warna biru dari RBBR berkurang atau terbentuknya zona bening pada media.

### Uji Dekolorisasi pada Media Cair

Inokulum (1 cm) sebanyak tiga *plug* diinokulasikan pada 20 mL media *Dzapek-Dox* cair dalam erlenmeyer 100 mL. Biakan kemudian diinkubasi statis pada suhu  $\pm 25$  °C selama 7 hari. Setelah 7 hari, pewarna tekstil RBBR, AB129, dan RB5, masing-masing sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam kultur sehingga mencapai konsentrasi akhir 100 mg/L. Kontrol menggunakan media *Dzapek-Dox* tanpa penambahan jamur. Tiap perlakuan dilakukan dalam tiga ulangan. Sampling dilakukan setiap 24, 48, dan 72 jam, dengan menyaring miselium fungi dan diambil supernatan/filtratnya untuk diuji laju dekolorisasi. Pengukuran dekolorisasi dilakukan dengan mengukur perubahan absorbansi tiap pewarna dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV-1800 Shimadzu, Japan). Efisiensi dekolorisasi (%) dihitung berdasarkan rumus (1) dengan  $A_{initial}$  merupakan absorbansi kontrol/blank, sementara  $A_{observed}$  merupakan absorbansi kultur perlakuan (Yanto, Tachibana, & Itoh, 2014). Efisiensi dekolorisasi (%) =

$$\left( 1 - \left( \frac{A_{observed}}{A_{initial}} \right) \right) \times 100 \quad (1).$$

### Pembuatan Ekstrak Daun Jati

Sebanyak 100 g daun jati dicuci hingga bersih kemudian ditambahkan 100 mL air deionisasi menggunakan blender selama  $\pm 15$  menit. Filtrat dipisahkan dengan residunya melalui kertas saring kemudian ditempatkan dalam botol *freeze drier*. Ekstrak daun jati

diperoleh dengan mengeringkan filtrat menggunakan *freeze dryer* selama  $\pm 24$  jam.

### Pengaruh Ekstrak Daun Jati sebagai Agen Penginduksi Enzim Ligninolitik

Penambahan ekstrak daun jati ke dalam media pertumbuhan jamur ditujukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun jati terhadap aktivitas enzim ligninolitik. Inokulum (1 cm) sebanyak tiga *plug* diinokulasikan pada 20 mL media Dzapek-Dox cair yang telah ditambahkan ekstrak daun jati hingga mencapai konsentrasi akhir sebanyak 50 mg/20 mL. Biakan kemudian diinkubasi statis pada suhu  $\pm 25$  °C selama 7 hari. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setelah 7 hari.

### Uji Aktivitas Enzim Ligninolitik secara Kuantitatif

Aktivitas enzim ligninolitik (Lakase, MnP, dan LiP) yang disekresikan dalam kultur jamur diukur berdasarkan metode (Minussi, De Moraes, Pastore, & Durán, 2001) dengan sedikit modifikasi. Pengukuran lakase dilakukan dengan mencampurkan supernatan kultur jamur sebanyak 0,9 mL ke dalam campuran larutan yang terdiri dari 0,75 mL bufer sodium asetat 0,1 M dan 0,1 mL *syringaldazine* 0,5 mM. Aktivitas enzim lakase dihitung dengan mengukur absorbansi oksidasi *syringaldazine* pada 525 nm selama 1 menit menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Jumlah *syringaldazine* yang hilang dihitung sesuai persamaan Beer, dengan nilai konstanta untuk *syringaldazine* sebesar 65.000/M/cm. Aktivitas lakase dinyatakan dalam satuan unit yang setara dengan banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi satu  $\mu\text{mol}$  substrat dalam 1 menit.

Aktivitas manganese peroksidase (MnP) diukur berdasarkan pembentukan  $\text{Mn}^{3+}$  dalam bufer sodium malonat (pH 4,5) dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada panjang gelombang 470 nm. Satu unit MnP dinyatakan dalam satuan unit yang setara dengan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membentuk 1  $\mu\text{mol}$   $\text{Mn}^{3+}$  selama 1 menit pada suhu 25 °C. Sebanyak 1 mL supernatan kultur ditambahkan ke dalam campuran yang terdiri dari 1,75 mL buffer malonat (pH 4,5); 0,125 mL 2,6 dimetoksifenol 20 mM; 0,125 mL  $\text{MnSO}_4$  20 mM; dan 0,3 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM. Campuran tersebut kemudian diukur dengan

Spektrofotometer UV-Vis pada 470 nm selama 1 menit.

Aktivitas lignin peroksidase (LiP) diukur berdasarkan aktivitas oksidasi veratril alkohol pada panjang gelombang 310 nm. Satu unit LiP didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi satu  $\mu\text{mol}$  veratril alkohol per menit per liter supernatan kultur. Sebanyak 1 mL supernatan kultur ditambahkan ke dalam campuran yang terdiri dari 0,3 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM dan 2 mL buffer LiP. Campuran tersebut kemudian diukur absorbansinya pada 310 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas enzim (U/L) dihitung berdasarkan persamaan (2) dengan nilai  $\epsilon$  untuk lakase, LiP, dan MnP masing-masing adalah sebesar 6.500, 9.300, dan 49.600/M/cm (Yanto et al., 2014).

$$\left(\frac{U}{\text{mL}}\right) = \left(\frac{\text{Abs}}{\epsilon}\right) \times \left(\frac{V_{\text{campuran}} (\mu\text{L})}{10^6}\right) \times 10^6 \times \left(\frac{60/t}{V_{\text{enzim}} (\mu\text{L}/10^3)}\right) \quad (2).$$

## HASIL

### Pertumbuhan Jamur pada Media Padat

Pertumbuhan jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 dinilai dengan mengukur diameter koloni jamur yang tumbuh pada media padat pewarna RBBR dan MEA. Pengamatan selama 7 hari menunjukkan bahwa jamur WM01 dapat tumbuh pada kedua jenis media. Pertumbuhan jamur terjadi secara horizontal, yaitu diameter atau luas koloni meningkat namun tidak menebal (Gambar 1). Berdasarkan Gambar 2, jamur WM01 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama, baik ketika ditumbuhkan pada media RBBR ataupun pada media MEA. Pada hari ke-7 inkubasi, terlihat bahwa koloni jamur WM01 hampir memenuhi seluruh cawan petri atau mencapai diameter koloni 80 mm.

### Uji Kualitatif Enzim Ligninolitik dan Dekolorisasi pada Media Padat

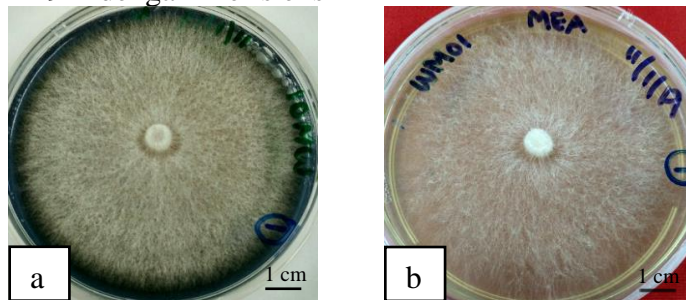
Jamur *C. dendriticum* ditumbuhkan pada media padat alkali-lignin dan pewarna RBBR untuk mengetahui keberadaan enzim ligninolitik dan kemampuan mendekolorisasi pewarna (*dye*) sintetik. Gambar 3 menunjukkan pertumbuhan jamur pada kedua media. Hasil menunjukkan bahwa terjadi perubahan warna media menjadi coklat kemerahan pada media alkali-lignin seiring

pertumbuhan jamur. Hal yang sama juga terjadi pada media RBBR, di mana warna biru pada media perlahan hilang atau terbentuk *clear zone* seiring pertumbuhan jamur.

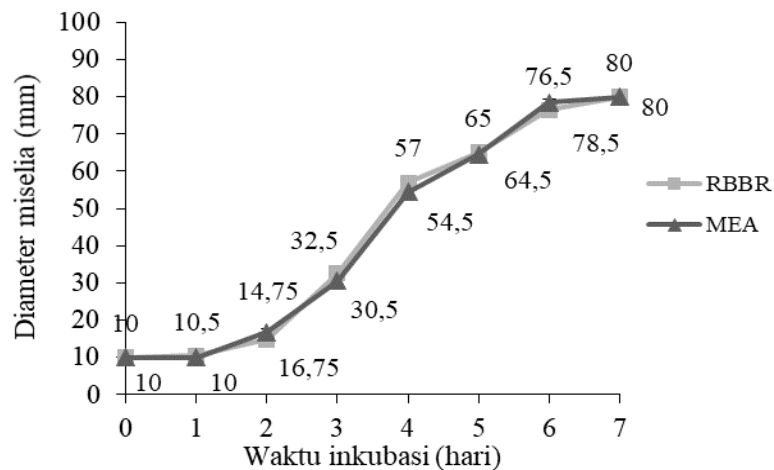
### Uji Dekolorisasi pada Media Cair

Uji dekolorisasi pada media cair dilakukan dengan menggunakan tiga pewarna sintetik, yaitu RBBR, AB129, dan RB5. Gambar 4 menunjukkan nilai efisiensi dekolorisasi ketiga pewarna sintetik oleh jamur WM01 pada media Dzapek-Dox cair. Hasil menunjukkan bahwa jamur WM01 mampu mendekolorisasi AB129 dengan efisiensi

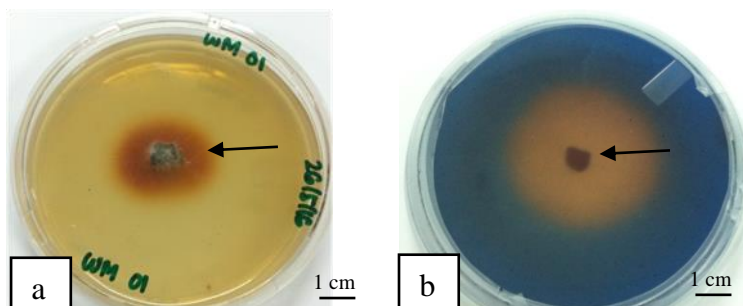
dekolorisasi tertinggi (81,9%) pada hari ke-3 dibandingkan dengan dua pewarna lainnya. Efisiensi dekolorisasi RBBR mencapai nilai tertinggi sebesar 22,6% pada hari ke-3, sedangkan efisiensi dekolorisasi RB5 merupakan yang terendah yaitu sebesar 12,1% pada hari ke-2 inkubasi. Hal ini disebabkan perbedaan jenis pewarna yang digunakan. RBBR dan AB129 adalah pewarna dengan golongan antrakuinon yang relatif lebih mudah didegradasi dengan jamur pelapuk putih dibandingkan dengan pewarna RB5 yang merupakan pewarna dari golongan diazo.



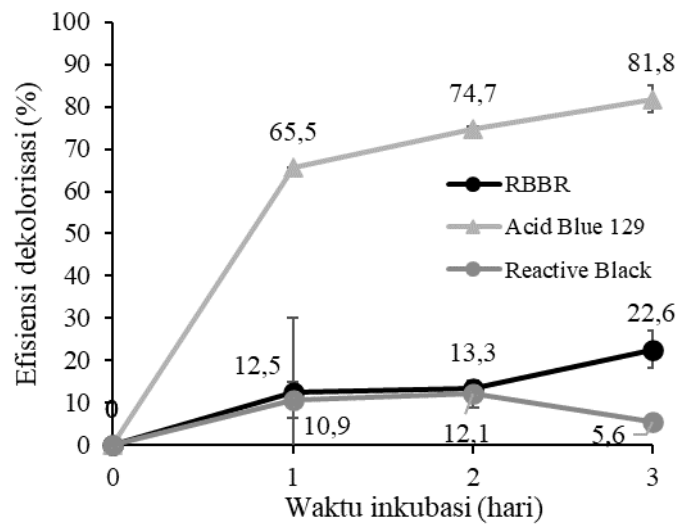
**Gambar 1.** Jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 pada media padat berwarna *Remazol Brilliant Blue R* (a) dan *Malt Extract Agar* (b)



**Gambar 2.** Pertumbuhan diameter miselia koloni jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 pada media padat berwarna *Remazol Brilliant Blue R* dan *Malt Extract Agar* selama 7 hari



**Gambar 3.** Pertumbuhan jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 pada media alkali-lignin (a) dan pewarna *Remazol Brilliant Blue R* (b). Tanda panah menunjukkan perubahan warna media



**Gambar 4.** Efisiensi dekolorisasi pewarna sintetik RBBR, AB129, dan RB5 oleh jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 pada media Dzapek-Dox cair

#### Aktivitas Enzim Ligninolitik pada Jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01

Aktivitas enzim ligninolitik selama dekolorisasi 24–72 jam juga telah diuji. Tabel 1 menunjukkan aktivitas enzim ligninolitik selama dekolorisasi tiga pewarna sintetik oleh jamur *C. dendriticum* WM01. Pada umumnya, aktifitas enzim meningkat dengan penambahan waktu inkubasi.

Aktivitas enzim ligninolitik (lakase, MnP, dan LiP) yang dihasilkan oleh jamur WM01 (tanpa proses dekolorisasi) telah diuji Hasil menunjukkan bahwa jamur *C. dendriticum* WM01 hanya menghasilkan enzim MnP dalam jumlah 0,3 U/L setelah 7

hari inkubasi pada media cair. Tidak ada aktivitas enzim lakase dan LiP yang terdeteksi pada media pertumbuhan (Tabel 2).

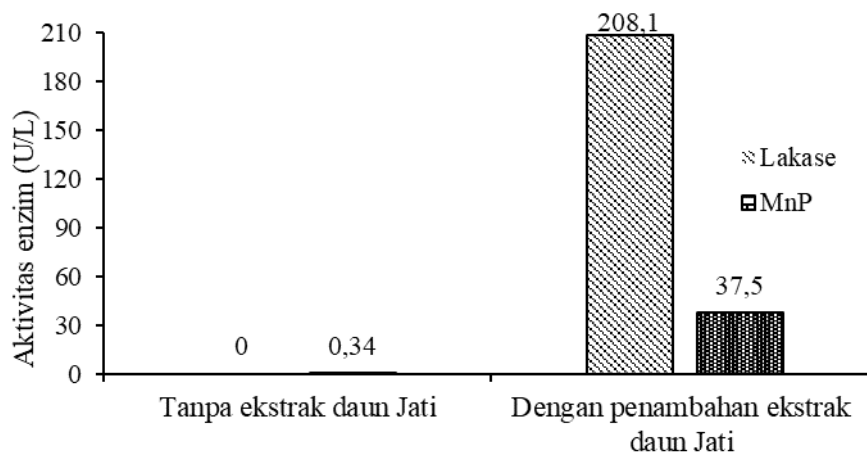
Penambahan ekstrak daun jati dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun jati sebagai penginduksi enzim ligninolitik. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas enzim MnP meningkat dari sebesar 0,3 U/L menjadi 37,6 U/L setelah penambahan ekstrak daun jati sebesar 50 mg/20 mL (Gambar 5). Hal yang menarik adalah enzim lakase dengan konsentrasi sebesar 208,1 U/L terdeteksi pada media pertumbuhan setelah penambahan ekstrak daun jati sebesar 50 mg/20 mL.

**Tabel 1.** Aktivitas enzim ligninolitik jamur *Cymatoderma dendriticum* WM01 selama dekolorisasi

Pewarna	Waktu inkubasi (jam)	Aktivitas enzim (U/l)		
		Mangan peroksidase (MnP)	Lakase	Lignin peroksidase (LiP)
<i>Remazol</i>	24	3,21 ± 0,3	-	-
<i>Brilliant Blue R</i> (RBBR)	48	3,9 ± 0,5	-	-
	72	5,5 ± 0,3	-	-
<i>Acid blue 129</i>	24	3,24 ± 0,3	-	-
	48	4,2 ± 1,1	-	-
	72	10,4 ± 0,1	-	-
<i>Reactive black</i>	24	3,9 ± 0,7	-	-
	48	3,6 ± 0,3	-	-
	72	3,1 ± 0,2	-	-

**Tabel 2.** Aktivitas enzim ligninolitik jamur *C. dendriticum* WM01 pada media cair

Isolat	Waktu inkubasi (hari)	Aktivitas enzim (U/l)		
		Mangan peroksidase (MnP)	Lakase	Lignin peroksidase (LiP)
WM01	7	0,3	-	-



**Gambar 5.** Pengaruh penambahan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) sebesar 50 mg/20 mL terhadap aktivitas enzim lakase dan MnP

## PEMBAHASAN

Jamur *C. dendriticum* WM01 merupakan salah satu *Basidiomycota* koleksi Puslit Biomaterial LIPI, yang diperoleh dari hasil isolasi dari kawasan hutan Laiwangi Wanggameti, Sumba. Jamur WM01 mampu tumbuh baik pada media padat MEA maupun pada media padat yang mengandung pewarna RBBR dengan pola pertumbuhan yang hampir sama. Fase lag terjadi selama 1 hari yang menunjukkan bahwa koloni jamur masih melakukan adaptasi terhadap kondisi medium yang baru (Risdiyanto et al., 2007). Fase ini tidak ada penambahan diameter koloni jamur. Fase log atau fase percepatan tumbuh terjadi pada hari ke-2 hingga hari ke-6. Laju pertumbuhan jamur WM01 sebesar 13,3 mm/hari pada media RBBR dan 13,7 mm/hari pada media MEA. Pada hari ke-7, miselia jamur tampak memenuhi seluruh permukaan media dalam cawan petri.

Uji kualitatif enzim ligninolitik dilakukan menggunakan media alkali-lignin. Keberadaan enzim pendegradasi lignin yaitu peroksidase non-spesifik ditandai dengan adanya warna merah coklat pada permukaan medium yang mengindikasikan oksidasi *guaiacol* (Sun et al., 2017). Berdasarkan gambar 3, diketahui bahwa jamur WM01 memiliki aktivitas ligninolitik. Hal ini diketahui dari terbentuknya warna merah kecoklatan pada media seiring dengan pertumbuhan jamur.

Uji dekolorisasi jamur WM01 dilakukan pada media padat yang mengandung pewarna sintetik RBBR. Berkurangnya warna biru pada media atau terbentuknya *clear zone*

menunjukkan bahwa jamur WM01 mampu mendegradasi pewarna RBBR. Diameter zona bening yang terbentuk pada media RBBR hampir sama dengan diameter koloni jamur yaitu mencapai 76,5 mm pada hari ke-6 inkubasi.

Pewarna sintetik dari golongan azo dan *anthraquinone* merupakan pewarna sintetik yang paling banyak digunakan dalam industri tekstil (Zeng et al., 2012). Beberapa penelitian juga melaporkan aktivitas dekolorisasi jamur pelapuk putih terhadap beberapa pewarna sintetik dari golongan azo (contoh RB5) dan *anthraquinone* (contoh RBBR dan AB129). Vaithanomsat, Apiwatanapiwat, Petchoy, dan Chedchant (2010) melaporkan aktivitas dekolorisasi jamur pelapuk putih *Datronia* sp. KAPI0039 sebesar 86% dan 88,01%, terhadap RBBR (1.000 mg/L) dan RB5 (600 mg/L) setelah 7 hari inkubasi. Dekolorisasi jamur pelapuk putih KRUS G terhadap RBBR juga dilaporkan oleh Sumandono, Saragih, Watanabe, dan Amirta (2015), yaitu sebesar 84% (100 ppm) dan 93,32% (500 ppm) setelah 6 hari inkubasi. Zeng et al. (2012) melaporkan dekolorisasi RBBR (50 mg/L), AB129 (83,3 mg/L), dan RB5(18,3 mg/L) oleh *Trametes trogii* SYBC0LZ masing-masing sebesar 89,4%, 71,8%, dan 1,5%. Hal yang menarik pada penelitian ini bahwa jamur WM01 memiliki aktivitas dekolorisasi terhadap pewarna *anthraquinone*, seperti RBBR dan AB129, yang lebih besar daripada aktivitas dekolorisasi terhadap RB5 (diaz). Pewarna dari golongan *anthraquinone* memiliki aktivitas didegradasi yang lebih tinggi daripada

pewarna dari golongan azo dan *triphenylmethane* (Abadulla et al., 2000; Hu, Chao, Zhang, Xue, & Qian, 2009; Liu et al., 2017). Pewarna dengan struktur yang sederhana dan berat molekul yang rendah menunjukkan aktivitas dekolorisasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pewarna dengan struktur kimia yang lebih kompleks dan berat molekul besar. Namun demikian, diperlukan kajian yang lebih mendalam terkait perbedaan aktivitas dekolorisasi antara satu golongan pewarna dengan pewarna lainnya karena berkaitan dengan mekanisme dan proses yang lebih kompleks (Vaithanomsat et al., 2010).

Hasil uji aktivitas enzim ligninolitik selama dekolorisasi menunjukkan bahwa hanya enzim MnP yang dihasilkan oleh jamur WM01. Tidak ada aktivitas enzim lakase maupun LiP yang terdeteksi dalam media kultur. Hal ini menarik karena biasanya MnP dihasilkan oleh fungi bersamaan dengan lakase atau LiP (Niladevi, 2009). Produksi MnP pada kultur jamur menunjukkan bahwa MnP merupakan enzim ligninolitik utama dari jamur WM01 dan berperan utama dalam dekolorisasi pewarna sintetik. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan peran MnP sebagai enzim ligninolitik utama dalam dekolorisasi pewarna tekstil. Kariminiaae-Hamedani, Sakurai, dan Sakakibara (2007) melaporkan aktivitas MnP oleh jamur pelapuk putih strain L-25, dalam mendekolorisasi berbagai pewarna sintetik golongan azo, diazo, dan *anthraquinone* dengan efisiensi sebesar 84,9–99,6%. Aktivitas MnP (EC 1.11.1.13) juga ditemukan pada kultur *Phanerochaete chrysosporium* dan jamur pelapuk putih lain termasuk *Pleurotus ostreatus* (Singh, Singh, & Singh, 2015).

Walaupun merupakan enzim yang berperan utama dalam dekolorisasi pewarna sintetik, sayangnya MnP hanya dihasilkan dalam jumlah yang sedikit. Sekitar 0,3 U/L MnP dihasilkan oleh jamur WM01 selama 7 hari inkubasi (tanpa penambahan pewarna) dan meningkat menjadi sekitar 3–10 U/L selama proses dekolorisasi. Vrsanska et al. (2015) melaporkan bahwa pada media cair, enzim ligninolitik hanya disekresikan dalam jumlah yang sedikit dengan produktivitas yang rendah. Enzim ligninolitik, termasuk lakase, MnP, dan LiP, merupakan metabolit sekunder yang wajar

apabila dihasilkan dalam konsentrasi rendah pada saat jamur masih berada pada fase metabolisme primer (Acevedo et al., 2011). Penambahan inducer dalam hal ini ekstrak jati, dimaksudkan untuk meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik. Peningkatan aktivitas enzim MnP dari 0,3 U/L menjadi 37,6 U/L terjadi setelah penambahan ekstrak daun jati sebesar 50 mg/20 mL. Aktivitas enzim lakase juga terdeteksi pada media kultur setelah penambahan ekstrak daun jati. Daun jati diketahui memiliki kandungan flavonoid (Januarti, Santoso, & Razak, 2017). Flavonoid, khususnya yang memiliki struktur fenolik, diketahui dapat menginduksi proses metabolisme sekunder dan pembentukan lakase pada jamur (Qiu, Zhang, & Chen, 2014). Kemungkinan lainnya adalah adanya kandungan lakase pada ekstrak daun jati. Selain pada jamur, aktivitas enzim lakase, juga terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi walaupun penelitian mengenai keberadaannya masih sangat terbatas. Mayer dan Staples (2002) melaporkan adanya aktivitas lakase pada daun *Aesculus parviflora*. Penelitian lainnya juga menyebutkan bahwa lakase telah berhasil dipurifikasi dari daun tumbuhan *Leucaena leucocephala* dengan aktivitas spesifik sebesar 58,5 U/mg (Jaiswal, Pandey, & Dwivedi, 2014). Selanjutnya, Jaiswal, Pandey, dan Dwivedi (2015) dalam penelitiannya melaporkan bahwa lakase dari daun pepaya (*Carica papaya*) telah berhasil dipurifikasi dengan aktivitas spesifik sebesar 41,3 U/mg. Namun demikian, perlu penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi dan mempurifikasi enzim ligninolitik, khususnya lakase yang terkandung setelah penambahan ekstrak daun jati.

## SIMPULAN

Isolat baru *C. dendriticum* WM01 mampu tumbuh baik pada *Malt Extract Agar* (MEA) dan media mengandung pewarna sintetik *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR). Uji dekolorisasi pada media cair menunjukkan bahwa strain WM01 mampu mendekolorisasi pewarna sintetik golongan anthraquinone, yaitu AB129 dan RBBR masing-masing sebesar 81,9% dan 22,6%, serta pewarna diazo, yaitu RB5 dengan aktivitas sebesar 12,1%. Uji aktivitas ligninolitik menunjukkan bahwa



hanya mangan peroksidase (MnP) yang dihasilkan oleh strain WM01. Penambahan ekstrak daun jati sebesar 50 mg/20 mL mampu menginduksi aktivitas enzim MnP dari 0,3 U/L menjadi 37,6 U/L serta mampu menginduksi aktivitas lakase dari yang sebelumnya tidak ada menjadi 208,1 U/L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat baru *C. dendriticum* WM01 berpotensi untuk digunakan sebagai agen bioremediasi pewarna tekstil di lingkungan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan ini didanai dari Kegiatan Unggulan LIPI tahun 2016 dan Kegiatan *Indonesian Biodiversity Strategic Action Plan* (IBSAP) LIPI tahun 2016. Penelitian ini didukung oleh fasilitas riset, dan dukungan ilmiah secara teknis dari Laboratorium Bioproduk Terintegrasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

#### REFERENSI

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-paulo, A., & Gubitzi, G. M. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Society*, 66(8), 3357-3362. doi: 10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000.
- Acevedo, F., Pizzul, L., Castillo, M. del P., Rubilar, O., Lienqueo, M. E., Tortella, G., & Diez, M. C. (2011). A practical culture technique for enhanced production of manganese peroxidase by *Anthracophyllum discolor* Sp4. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1175-1186. doi: 10.1590/S1516-89132011000600013.
- Akpinar, M., & Ozturk, U. R. (2017). Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. *3 Biotech*, 7(2), 1-10. doi: 10.1007/s13205-017-0742-5.
- Anita, S. H., Yanto, D. H. Y., & Fatriasari, W. (2011). Pemanfaatan lignin hasil isolasi dari lindi hitam proses biopulping bambu betung (*Dendrocalamus asper*) sebagai media selektif jamur pelapuk putih. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 29(4), 312-321.
- Anita, S. H., Sari, F. P., & Yanto, D. H. Y. (2019). Decolorization of synthetic dyes by ligninolytic enzymes from *Trametes hirsuta* D7. *Makara Journal of Science*, 23(1), 44-50. doi: 10.7454/mss.v23i1.10803.
- Ardiati, F. C., Yanto, D. H. Y., Anita, S. H., & Watanabe, T. (2019). Immobilization of *Trametes hirsuta* D7 in light expanded clay aggregate for decolorization of synthetic dye. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1). doi: 10.1088/1755-1315/308/1/012002.
- Ayed, L., Mahdhi, A., Cheref, A., & Bakhrouf, A. (2011). Decolorization and degradation of azo dye methyl red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization. *Desalination*, 274(1-3), 272-277. doi: 10.1016/j.desal.2011.02.024.
- Badan Koordinasi Penanaman Modal (BKPM). (2014). Textile investment. (2014, July 30). Retrieved from [https://www.bkpm.go.id/images/uploads/printing/150806\\_BKPM\\_Brosur\\_Textile.pdf](https://www.bkpm.go.id/images/uploads/printing/150806_BKPM_Brosur_Textile.pdf).
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.007>
- Dewi, R. S., Ilyas, M., & Sari, A. A. (2019). Ligninolytic enzyme immobilization from *Pleurotus ostreatus* for dye and batik wastewater decolorization. *Jurnal Pendidikan IPA Indonesia*, 8(2), 220-229. doi: 10.15294/jpii.v8i2.19372.
- Dimawarnita, F., & Panji, T. (2019). Aktivitas enzim ligninolitik *Pleurotus ostreatus* pada media yang mengandung TKKS dan aplikasinya untuk dekolonisasi zat warna (Activity of ligninolytic enzyme of *Pleurotus ostreatus* on media containing OPEFB and their application for dyes decolorization). *E-Journal Menara Perkebunan*, 87(1), 31-40. doi: 10.22302/iribb.jur.mp.v87i1.328.
- Hu, M. R., Chao, Y. P., Zhang, G. Q., Xue, Z. Q., & Qian, S. (2009). Laccase-mediator

- system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 45-51. doi: 10.1007/s10295-008-0471-1.
- Jaiswal, N., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2014). Purification of a thermostable laccase from *Leucaena leucocephala* using a copper alginate entrapment approach and the application of the laccase in dye decolorization. *Process Biochemistry*, 49(7), 1196-1204. doi: 10.1016/j.procbio.2014.04.002.
- Jaiswal, N., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2015). Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Carica papaya*) using affinity chromatography. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 326-332. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.032.
- Januarti, I. B., Santoso, A., & Razak, A. S. (2017). Flavonoid extraction of teak leaf (*Tectona grandis* L.) with ultrasonic method (Study of material: Solvent ratio and extraction time). *Media Farmasi Indonesia*, 12(2), 1263-1270.
- Kabbout, R., & Taha, S. (2014). Biodecolorization of textile dye effluent by biosorption on fungal biomass materials. *Physics Procedia*, 55, 437-444. doi: 10.1016/j.phpro.2014.07.063.
- Kahraman, S. S., & Gurdal, I. H. (2002). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, 82(3), 215-217. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00193-6.
- Kariminiaae-Hamedani, H. R., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2007). Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and Pigments*, 72(2), 157-162. doi: 10.1016/j.dyepig.2005.08.010.
- Kaushik, P., & Malik, A. (2009). Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*, 35(1), 127-141. doi: 10.1016/j.envint.2008.05.010.
- Liu, N., Xie, X., Yang, B., Zhang, Q., Yu, C., Zheng, X., ... Liu, J. (2017). Performance and microbial community structures of hydrolysis acidification process treating azo and anthraquinone dyes in different stages. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 252-263. doi: 10.1007/s11356-016-7705-y.
- Martina, A., Roza, R. M., & Sirait, J. R. (2015, Mei 5-7). *Biodegradasi pewarna azo mordant black 17 oleh Ganoderma sp. Bta1 isolat lokal*. Paper presented at Seminar dan Rapat Tahunan (SEMIRATA) Bidang MIPA BKS-PTN Barat, Prosiding Semirata bidang MIPA BKS-PTN Barat 2015, Universitas Tanjung Pura, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia. Retrieved from <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/semirata2015/article/download/13644/12241>.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00171-1.
- Minussi, R. C., De Moraes, S. G., Pastore, G. M., & Durán, N. (2001). Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: Possible role of siderophores. *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), 21-25. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00943.x.
- Niladevi, K. N. (2009). Ligninolytic enzymes. In P. N. S. Nigam, & A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 1-466). Berlin, Germany: Springer Science+Business Media.
- Oktaviani, M., & Yanto, D. H. Y. (2016). *Biodecolorization of textile dye by isolated tropical fungi*. Paper presented at The International Conference of Indonesia Forestry Researchers III (INAFOR), Proceeding of International Conference of Indonesia Forestry Researchers III 2015, Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Retrieved from [https://www.fordamof.org/files/Prosiding\\_INAFOR\\_III\\_2015.pdf](https://www.fordamof.org/files/Prosiding_INAFOR_III_2015.pdf).
- Pertiwi, S., Dewi, R. S., & Sari, A. A. (2020). Decolorization of indigosol blue dye using *Trametes versicolor* F200 and *Aspergillus sp.* *BioEksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(2), 222. doi: 10.20884/1.bioe.2020.2.2.1835.

- Pratiwi, D., Indrianingsih, A. W., Darsih, C., & Hernawan. (2017). Decolorization and degradation of batik dye effluent using *Ganoderma lucidum*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 101(1), 0-7. doi: 10.1088/1755-1315/101/1/012034.
- Qiu, W., Zhang, W., & Chen, H. (2014). Flavonoid-rich plants used as sole substrate to induce the solid-state fermentation of laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3583-3592. doi: 10.1007/s12010-014-0774-9.
- Rao, R. G., Ravichandran, A., Kandalam, G., Kumar, S. A., Swaraj, S., & Sridhar, M. (2019). Screening of wild basidiomycetes and evaluation of the biodegradation potential of dyes and lignin by manganese peroxidases. *BioResources*, 14(3), 6558-6576. doi: 10.15376/biores.14.3.6558-6576.
- Risdianto, H., Setiadi, T., Suhardi, S. H., Niloperbowo, W., Besar, B., & Dayeuhkolot, J. R. (2007, July 25-26). *Pemilihan spesies jamur dan media imobilisasi untuk produksi enzim ligninolitik*. Paper presented at Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/343057619\\_PEMILIHAN\\_SPESIES\\_JAMUR\\_DAN\\_MEDIA\\_IMOBILISASI\\_UNTUK\\_PRODUKSI\\_ENZIM\\_LIGNINOLITIK](https://www.researchgate.net/publication/343057619_PEMILIHAN_SPESIES_JAMUR_DAN_MEDIA_IMOBILISASI_UNTUK_PRODUKSI_ENZIM_LIGNINOLITIK).
- Sari, F. P., Tahar, M., Mardiyanti, R., Oktaviani, M., Sita, H. A., Laksana, R. P. B., & Yanto, D. H. Y. (2018, September 19). *Enzim ligninolitik sebagai agen biodekolorisasi dari jamur pelapuk putih dengan biomassa lignoselulosa sebagai media tumbuh*. Paper presented at Prosiding Seminar Lignoselulosa, Cibinong, Bogor, Indonesia. Retrieved from <http://lipi.go.id/publikasi/enzim-ligninolitik-sebagai-agen-biodekolorisasi-dari-jamur-pelapuk-putih-dengan-biomassa-lignoselulosa-sebagai-media-tumbuh/26198>
- Simões, M. F., Maiorano, A. E., dos Santos, J. G., Peixoto, L., de Souza, R. F. B., Neto, A. O., ... Ottoni, C. A. (2019). Microbial fuel cell-induced production of fungal laccase to degrade the anthraquinone dye Remazol Brilliant Blue R. *Environmental Chemistry Letters*, 17(3), 1413-1420. doi: 10.1007/s10311-019-00876-y.
- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 21-31. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.04.027.
- Siswanto., Suharyanto., & Fitria, R. (2007). Produksi dan karakterisasi lakase *Omphalina* sp. *Menara Perkebunan*, 75(2), 106-115.
- Sumandono, T., Saragih, H., Watanabe, T., & Amirta, R. (2015). Decolorization of remazol brilliant blue r by new isolated white rot fungus collected from tropical rain forest in East Kalimantan and its ligninolytic enzymes activity. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 45-51. doi: 10.1016/j.proenv.2015.07.007.
- Sun, J., Guo, N., Niu, L. L., Wang, Q. F., Zang, Y. P., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2017). Production of laccase by a new *Myrothecium verrucaria* MD-R-16 isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and its application on dye decolorization. *Molecules*, 22(4), 1-16. doi: 10.3390/molecules22040673.
- Tavares, M. F., Avelino, K. V., Araújo, N. L., Marim, R. A., Linde, G. A., Colauto, N. B., & do Valle, J. S. (2020). Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 99-106. doi: 10.1007/s42770-019-00189-w.
- Vaithanomsat, P., Apiwatanapiwat, W., Petchoy, O., & Chedchant, J. (2010). Decolorization of reactive dye by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039. *Kasetsart Journal-Natural Science*, 44(5), 879-890.
- Vrsanska, M., Buresova, A., Damborsky, P., & Adam, V. (2015). Influence of different inducers on ligninolytic enzyme activities. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 2(3), 64-70.

- Wang, F., Terry, N., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., & Ma, H. (2019). Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: A review. *Microorganisms*, 7(665), 1-25. doi: 10.3390/microorganisms7120665.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 161-187. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.08.011.
- Yanto, D. H. Y., Auliana, N., Anita, S. H., & Watanabe, T. (2019). Decolorization of synthetic textile dyes by laccase from newly isolated *Trametes hirsuta* EDN084 mediated by violuric acid. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 374(1), 0-7. doi: 10.1088/1755-1315/374/1/012005.
- Yanto, D. H. Y., Tachibana, S., & Itoh, K. (2014). Biodecolorization of textile dyes by immobilized enzymes in a vertical bioreactor system. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 235-244. doi: 10.1016/j.proenv.2014.03.030.
- Zeng, X., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Luo, S., & Zhang, D. (2012). Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase. *Process Biochemistry*, 47(1), 160-163. doi: 10.1016/j.procbio.2011.10.019.