



AKTIVITAS LIGNINOLISIS DARI BASIDIOMYCETES YANG DAPAT DIPAKAI UNTUK BIODEGRADASI DIOKsin

Ligninolytic Activity of Basidiomycetes Applicable for Dioxin Biodegradation

Nuki Bambang Nugroho

Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT

Gedung 630 Kawasan PUSPIPTEK, Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

E-mail: nuki.bambang@bppt.go.id

ABSTRACT

Chemical compounds belonging to dioxin group are known to be highly toxic environmental pollutant. Polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofuran are produced during organic materials burning process. Pentachlorophenol, a compound similar to dioxin, is widely used as wood preservative, fungicide, bactericide, herbicide, algicide and insecticide. Some white-rot fungi have potential to produce lignin degrading enzyme and degrade dioxin compounds. The diversity of white-rot fungi in Indonesia provides potential source for environmental pollutant-degrading microorganisms. In this study, basidiomycetes were isolated from fruiting body and rotted wood samples which were collected from seven provinces in Indonesia. Three hundred seventy basidiomycete isolates were screened for dioxin degrading activity using dye-decolorization method. The result indicated that sixty isolates had dioxin degrading activity, three of which showed significant activity.

Keywords: *Ligninolytic, basidiomycetes, biodegradation, dioxin, fungus*

ABSTRAK

Senyawa-senyawa kimia dalam kelompok dioksin telah diketahui sebagai polutan lingkungan yang sangat beracun. Dibenzo-p-dioksin terpoliklorinasi dan *dibenzofuran* terpoliklorinasi dihasilkan selama proses pembakaran bahan-bahan organik. Pentaklorofenol, suatu senyawa mirip dioksin, banyak digunakan sebagai pengawet kayu, fungisida, bakterisida, herbisida, algisida dan insektisida. Beberapa jamur pelapuk putih memiliki potensi untuk menghasilkan enzim pengurai lignin dan mendegradasi senyawa-senyawa dioksin. Keanekaragaman jamur pelapuk putih di Indonesia yang tinggi merupakan sumber potensial mikroorganisme pengurai polutan lingkungan. Pada kajian ini, basidiomisetes diisolasi dari sampel-sampel tubuh buah dan kayu lapuk yang diambil dari tujuh provinsi di Indonesia. Tiga ratus tujuh puluh isolat basidiomisetes telah diseleksi aktivitasnya sebagai pendegradasi dioksin. Metode *dye-decolorization* digunakan pada seleksi ini. Hasil seleksi menunjukkan bahwa enam puluh isolat basidiomisetes memiliki aktivitas sebagai pendegradasi dioksin, tiga isolat di antaranya menunjukkan aktivitas tertinggi.

Kata kunci: Ligninolisis, basidiomisetes, biodegradasi, dioksin, jamur

PENDAHULUAN

Jaringan kayu terdiri atas tiga biopolimer utama; selulosa, hemiselulosa dan lignin. Lignin merupakan polimer aromatik sangat tidak beraturan yang disintesis pada tanaman oleh reaksi polimerisasi *p*-hidroksisinasamil alkohol tersubstitusi. Reaksi polimerisasi ini dikatalisis oleh enzim peroksidase. Beberapa mikroorganisme, khususnya jamur pelapuk putih, dapat mendegradasi polimer lignin yang kompleks. *Phanerochaete chrysosporium* merupakan jamur pelapuk putih yang sering dipakai pada penelitian biodegradasi lignin (ligninolis). Ligninolis hanya terjadi jika ada substrat lain yang dapat didegradasi (Field et al. 1993). Setelah pertumbuhan awal *P. chrysosporium* berhenti karena keterbatasan karbon, nitrogen atau belerang, ligninolis mulai terjadi.

Ligninolis merupakan proses tidak spesifik. Senyawa yang memiliki struktur aromatik (seperti senyawa *xenobiotic*) sangat mudah didegradasi oleh enzim ligninolis. Senyawa-senyawa kimia dalam kelompok dioksin telah diketahui sebagai polutan lingkungan yang sangat beracun. Dibenzop-dioksin terpoliklorinasi (*polychlorinated dibenzo-p-dioxin* / PCDD) dan dibenzofuran terpoliklorinasi (*polychlorinated dibenzofuran* / PCDF) dihasilkan pada proses pembakaran bahan-bahan organik (Valli et al. 1992; Wittich 1998). Pentaklorofenol (*pentachloro-phenol* / PCP), suatu senyawa mirip dioksin, banyak digunakan sebagai pengawet kayu, fungisida, bakterisida, herbisida, algisida dan insektisida. Banyak senyawa *xenobiotic*, seperti PCDD, PCDF, *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH), fenol terklorinasi, *polychlorinated biphenyl* (PCB), pestisida dan senyawa-senyawa pewarna, dapat dioksidasi pada kultur jamur pelapuk putih (Kamei dan Kondo 2005; Mori dan Kondo 2002a, 2002b, 2002c, Field dan Sierra-Alvarez 2008). Jamur dapat mendegradasi PCDD/PCDF pada kondisi aerob. Jamur menggunakan enzim (lignin peroksidase atau mangan peroksidase) untuk mengoksidasi molekul dari senyawa PCDD / PCDF (Urbaniak 2013). Selain jamur, bakteri yang diisolasi dari tanah terkontaminasi dioksin dapat mendegradasi fenol, dan hal ini menunjukkan juga kemampuan mendegradasi PCDD/PCDF (Bui et al. 2012).

Beberapa enzim terlibat pada

ligninolis terutama lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP). Beberapa jamur pelapuk putih (*white-rot fungi*) diketahui menghasilkan enzim LiP, salah satu enzim pengurai lignin (Buckley et al. 1998). Enzim LiP yang dimurnikan dapat mengoksidasi beberapa senyawa PAH menjadi PAH kinon, PCP menjadi tetrakloro-*p*-benzokinon, dan memecah diklorodibenzo-*p*-dioksin (*dichlorodibenzo-p-dioxin* / DCDD). Proses penguraian dioksin tidak hanya dilakukan oleh LiP, tetapi juga dibantu oleh MnP dan *laccase* (Lac). Beberapa jamur pelapuk putih, tetapi bukan *P. Chrysosporium*, juga menghasilkan enzim Lac. Enzim ini merupakan enzim yang bekerja pada *o*-kinol, *p*-kinol dan amino fenol. Lac berperan pada polimerisasi fenol dan oksidasi senyawa aromatik bukan fenol. Enzim dehalogenase dapat mendegradasi PCDD yang memiliki lebih dari empat substituen klorin (Sakaki dan Munetsuna 2010).

Metode seleksi enzim oksidase, khususnya Lac dan peroksidase, biasanya berdasarkan reaksi pembentukan atau penghilangan warna sehingga pendeteksian mudah dilakukan. Penghilangan warna pada senyawa pewarna merupakan indikator terjadinya oksidasi awal senyawa-senyawa *xenobiotic* dan lignin (Pasti dan Crawford 1991). Jamur pelapuk putih dapat mendegradasi senyawa-senyawa dioksin karena struktur kimia dioksin mirip dengan sebagian struktur lignin. Enzim peroksidase dihasilkan oleh jamur pelapuk putih mengkatalisis oksidasi lignin dan senyawa aromatik menyerupai lignin. Senyawa pewarna seperti Remazol Brilliant Blue R, Poly B-411, Poly R-478, Poly R-481, Poly S-119, Poly T-128 dan Poly Y-606 dapat mengalami penghilangan warna oleh jamur pendegradasi lignin (Glenn dan Gold 1983; Platt et al. 1985; Pasti dan Crawford 1991; Ollikka et al. 1993).

BAHAN DAN METODE

Sampel

Sampel kayu lapuk dan tubuh buah basidiomisetes diambil dari 7 provinsi di Indonesia, yaitu Sumatera Barat, Jawa Barat, Kalimantan Timur, Sulawesi Selatan, Sulawesi Utara, Bali dan Lombok. Sampel untuk isolasi basidiomisetes adalah kayu lapuk dan tubuh buah basidiomisetes.

Seleksi Basidiomisetes sebagai pengurai dioksin dilakukan dengan metode *dye decolorization*. Basidiomisetes yang menunjukkan aktivitas pengurai dioksin selanjutnya diisolasi dengan metode *single mycelium transfer*.

Metode seleksi

Metode seleksi awal (*primary screening method*) mengadopsi metode *dye decolorization* sebagaimana diuraikan oleh Sato et al. (2002). Senyawa pewarna Remazol brilliant blue R (RBBR) mengalami pengurangan / penghilangan warna oleh jamur pendegradasi lignin, sehingga penghilangan warna ini merupakan indikator yang baik untuk mengetahui oksidasi awal senyawa *xenobiotic* dan lignin (Pasti dan Crawford 1991). Seleksi awal dilakukan dengan menginokulasikan sampel langsung ke permukaan media pewarna yang terdiri atas dua lapis. Lapis atas: 0,5% malt extract (Difco Laboratories, detroit, MI, USA), 1% agar dan 1% RBBR. Lapis bawah: Czapek Dox agar (Difco Laboratories, detroit, MI, USA). Benomyl 20 mg/L (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI, USA) ditambahkan ke lapis atas media untuk menghambat pertumbuhan jamur-jamur yang tidak diinginkan.

Isolat yang terseleksi dengan *dye decolorization* diseleksi lanjut mengikuti *secondary screening method* (Gambar 1) (Sato et al. 2002). Setiap isolat yang terseleksi dengan *dye decolorization* ditransfer ke dalam empat labu Erlenmeyer 50 mL bertutup gelas berisi 5 mL medium rendah nitrogen (Tien dan Kirk 1988), dan dipreinkubasi pada 25°C selama 10 hari. Setelah preinkubasi, 20 µl 2,7-DCDD (AccuStandard Inc., New Haven, CT, USA. dilarutkan dalam *N,N*-dimethylformamide / DMF) ditambahkan ke dalam dua labu sampai konsentrasi akhir 2,7-DCDD 10 µM (kultur inkubasi 15 hari: **A**). Tutup labu Erlenmeyer dilapis rekat dengan pita Teflon setelah penambahan 2,7-DCDD. Selama 15 hari inkubasi pada 25°C, 250 µl larutan glukosa 20% (konsentrasi akhir 1%) ditambahkan dua kali dan oksigen ditambahkan empat kali ke dalam kultur (Gambar 1). Dua puluh mikroliter DMF (tanpa 2,7-DCDD) ditambahkan ke dalam dua labu lainnya (kultur kontrol: **B**), kemudian diperlakukan (inkubasi, penambahan glukosa

dan penambahan oksigen) seperti kultur **A**. Satu hari sebelum akhir masa inkubasi, 2,7-DCDD ditambahkan ke dalam kultur **B**, DMF ditambahkan ke dalam kultur **A**. Setelah inkubasi selesai, dilakukan perbandingan jumlah 2,7-DCDD tersisa dalam kultur **A** dan **B**.

Untuk mengambil 2,7-DCDD yang tersisa dalam kultur, dilakukan mengikuti Sato et al. (2002). Asam sulfat pekat sebanyak 5 mL ditambahkan sebelum ekstraksi dengan *n*-heksana (tiga bagian masing-masing 10 mL) (Takada et al. 1996). Fraksi *n*-heksana dikumpulkan dan dicuci dengan aquades. Fraksi dikeringkan dalam desikator dengan penyerap air natrium sulfat kemudian dipekatkan sampai 0,1 mL. Konsentrasi 2,7-DCDD ditentukan dengan GC-MS mengikuti kondisi yang dijelaskan oleh Sato et al. (2002). Antrasena digunakan sebagai internal standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari isolasi ini diperoleh 370 isolat basidiomisetes, 60 di antaranya menunjukkan aktivitas penghilangan warna senyawa RBBR (Tabel 1). Perbandingan jumlah isolat aktif penghilang warna RBBR terhadap total isolat pada setiap lokasi sampel berkisar dari 6% sampai 38%. Isolat-isolat aktif penghilang warna RBBR diseleksi lebih lanjut menggunakan *secondary screening method*.

Persentase 2,7-DCDD yang tersisa dalam kultur **A** dan **B** ditunjukkan pada Tabel 2 dan Gambar 2. Dari 60 isolat yang diseleksi menggunakan *secondary screening method* diperoleh 12 isolat dengan kemampuan degradasi dioksin. Sebagian besar isolat ini menunjukkan laju *recovery* 2,7-DCDD yang mirip untuk kedua perlakuan

Tabel 1. Aktivitas penghilangan warna RBBR oleh isolat basidiomisetes

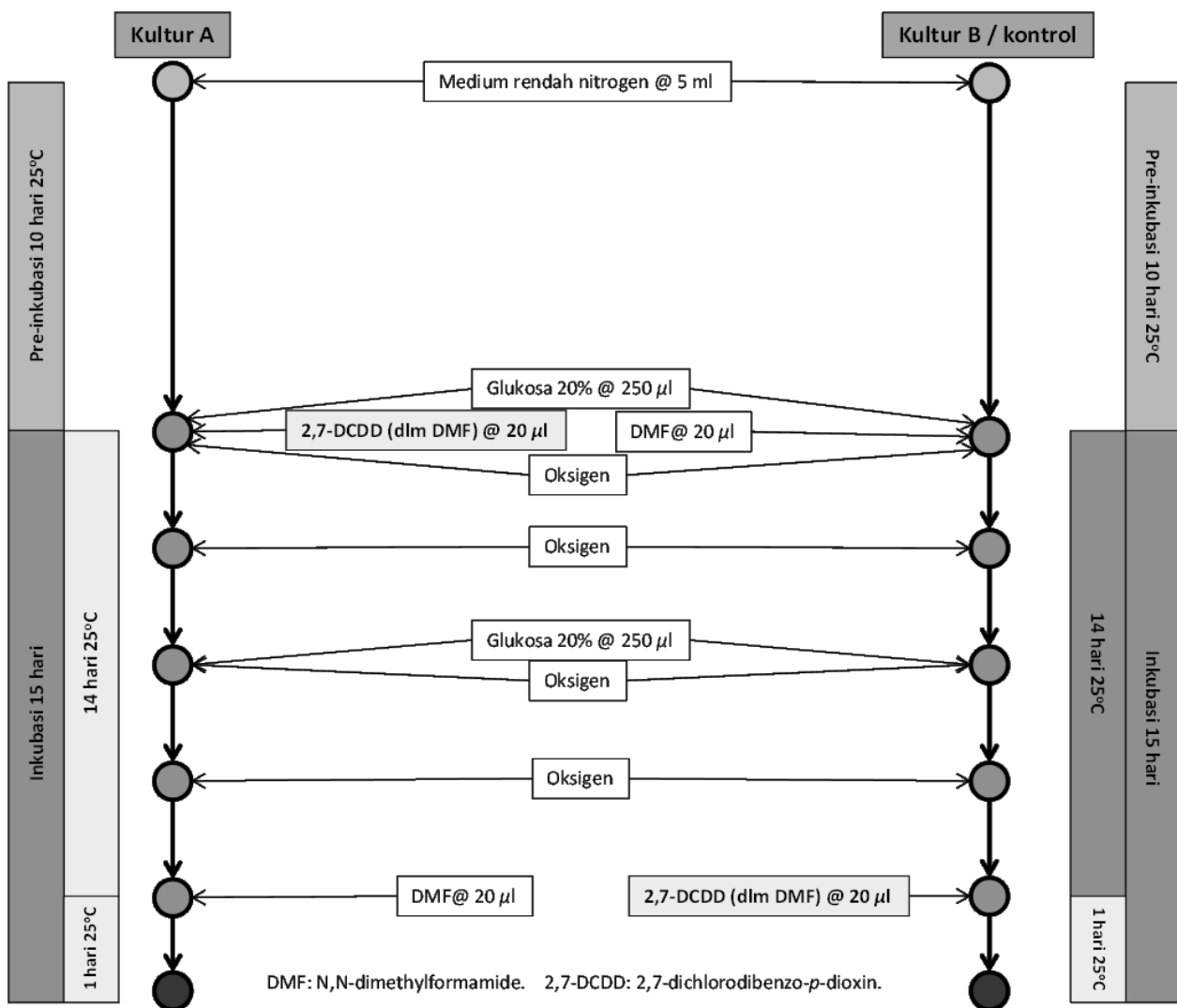
Lokasi peng-ambilan sampel	Jumlah isolat basidiomisetes		
	isolat dikoleksi	isolat aktif	persentase isolat aktif
Sumatera Barat	62	15	24%
Jawa Barat	34	2	6%
Kalimantan Timur	71	6	8%
Sulawesi Selatan	105	11	10%
Sulawesi Utara	39	11	28%
Bali	26	10	38%
Lombok	33	5	15%
Total	370	60	16%

(A dan B). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar isolat hanya memiliki kemampuan kecil dalam mendegradasi dioksin, kecuali isolat KT-BS, KT-BB dan SS-MN. Isolat KT-BS dan KT-BB diisolasi dari sampel asal Bukit Suharto dan Bukit Bangkirai Kalimantan Timur, sedangkan isolat SS-MN berasal dari sampel Malino Sulawesi Selatan. Perbedaan *recovery* 2,7-DCDD ditunjukkan isolat KT-BS (23%), KT-BB (27%) dan SS-MN (18%). Perbedaan *recovery* 2,7-DCDD oleh ketiga isolat ini menunjukkan kemampuan degradasi dioksin yang nyata. Kemampuan ketiga isolat pendegradasi dioksin ini lebih besar dibandingkan galur pendegradasi dioksin, *Phanerochaete sordida* YK-624 (5%) (Sato et al. 2002).

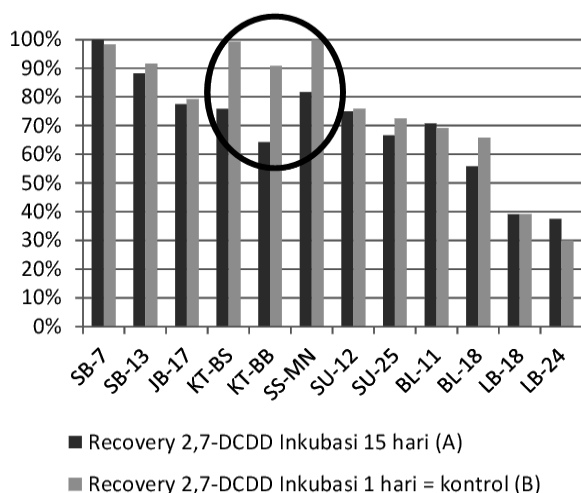
Tabel 2. *Recovery* 2,7-DCDD dari kultur inkubasi 15 hari dan 1 hari (kontrol)

Isolat	<i>Recovery</i> 2,7-DCDD		
	inkubasi 15 hari (A)	inkubasi 1 hari = kontrol (B)	perbedaan (B-A)
SB-7	100%	98%	-2%
SB-13	88%	92%	3%
JB-17	78%	79%	2%
KT-BS	76%	99%	23%
KT-BB2	64%	91%	27%
SS-MN	82%	100%	18%
SU-12	75%	76%	1%
SU25	67%	73%	6%
BL-11	71%	69%	-2%
BL-18	56%	66%	10%
LB-18	39%	39%	0%
LB-24	38%	30%	-8%
YK-624*			5%

*data dari Sato et al. (2002)



Gambar 1. Seleksi lanjutan (*secondary screening method*)



Gambar 2. Recovery 2,7-DCDD dari kultur inkubasi 15 hari dan 1 hari (kontrol)

KESIMPULAN

Metode *dye-decolorization* dapat digunakan pada seleksi basidiomisetes pendegradasi dioksin. Seleksi dengan metode *dye-decolorization* menunjukkan 60 isolat basidiomisetes yang menunjukkan aktivitas sebagai pendegradasi dioksin. Seleksi lanjutan dengan metode perbandingan degradasi dioksin pada kultur lima belas hari dengan kontrol menunjukkan ada 3 isolat yang menunjukkan aktivitas degradasi dioksin yang nyata.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckley KF, Dobson DW (1998) Extracellular lignolytic enzyme production and polymeric dye decolorization in immobilized cultures of *Chrysosporium lignorum* CL1. *Biotechnol Lett* 20:301-306
- Bui HB, Nguyen LT, Dang LD (2012) Biodegradation of Phenol by Native Bacteria Isolated From Dioxin Contaminated Soils. *J Bioremed Biodeg* 3:1-6. doi:10.4172/2155-6199.1000168
- Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont JA (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11:44-49
- Field JA, Sierra-Alvarez R (2008) Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environ Pollut* 155:1-12
- Glenn JK, Gold MH (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 45:1741-1747
- Ollikka P, Alhonmäki K, Leppänen V, Glumoff T, Rajola T, Suominen I (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:4010-4016
- Kamei I, Kondo R (2005) Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-p-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:560-566
- Mori T, Kondo R (2002a) Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability. *FEMS Microbiol Lett* 213:127-131
- Mori T, Kondo R (2002b) Oxidation of chlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*. *FEMS Microbiol Lett* 216:223-227
- Mori T, Kondo R (2002c) Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:200-205
- Pasti MB, Crawford DL (1991) Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose. *Can J Microbiol* 37:902-907
- Platt MW, Hadar Y, Chet I (1985) The decolorization of the polymeric dye Poly-Blue (polyvinylamine sulfonate-anthroquinone) by lignin degrading fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 21:394-396
- Sakaki T, Munetsuna E (2010) Enzyme systems for biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:23-30
- Sato A, Watanabe T, Watanabe Y, Harazono K, Fukatsu T (2002) Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiol Lett* 213:213-217
- Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the

- white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl Environ Microbiol 62:4323-4328
- Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* YK-624. Methods Enzymol 161:238-249
- Urbaniak M (2013) Biodegradation of PCDDs/PCDFs and PCBs. Di dalam: R Chamy and F Rosenkranz (Ed.) (2013) Biodegradation-Engineering and Technology, Intech Publisher.
- Valli K, Wariishi H, Gold MH (1992) Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J Bacteriol 174:2131-2137
- Wittich RM (1998) Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. App Microbiol Biotechnol 49:489-499