



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENINGKATAN AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE
PADA *Penicillium* sp. ID10-T065 DENGAN MUTASI MENGGUNAKAN
SINAR ULTRAVIOLET DAN ETIL METIL SULFONAT SERTA
ANALISIS GEN β -GLUKOSIDASE 1 (*bgl/1*) PADA MUTAN**

TESIS

VILYA SYAFRIANA

1206180121

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI PASCASARJANA BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2015**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENINGKATAN AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE
PADA *Penicillium* sp. ID10-T065 DENGAN MUTASI MENGGUNAKAN
SINAR ULTRAVIOLET DAN ETIL METIL SULFONAT SERTA
ANALISIS GEN β -GLUKOSIDASE 1 (*bgl/1*) PADA MUTAN**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains

Oleh:

VILYA SYAFRIANA

1206180121

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI PASCASARJANA BIOLOGI

DEPOK

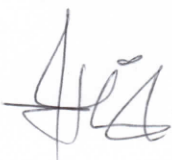
JANUARI 2015

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : VILYA SYAFRIANA

NPM : 1206180121

Tanda Tangan : 

Tanggal : 7 Januari 2015

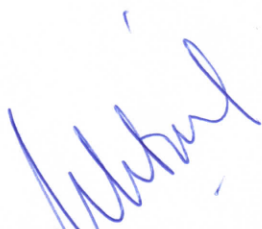
JUDUL : PENINGKATAN AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE
PADA *Penicillium* sp. ID10-T065 DENGAN MUTASI
MENGUNAKAN SINAR ULTRAVIOLET DAN
ETIL METIL SULFONAT SERTA ANALISIS GEN
 β -GLUKOSIDASE 1 (*bgl1*) PADA MUTAN

NAMA : VILYA SYAFRIANA

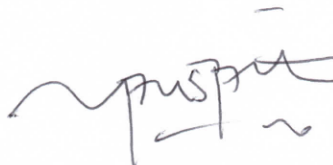
NPM : 1206180121

Menyetujui:

1. Komisi Pembimbing

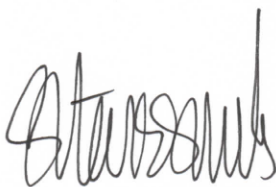


Dr. Wibowo Mangunwardoyo
Pembimbing I



Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem.
Pembimbing II

2. Penguji



Dra. Sitaresmi, M.Sc.
Penguji I



Dr. Abinawanto
Penguji II

**3. Ketua Program Studi
Pascasarjana Biologi FMIPA UI**



Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed
NIP.196504651991032001

4. Dekan FMIPA UI



Dr. rer. nat. Abdul Haris
NIP. 197009211994031001

Tanggal Lulus: 7 Januari 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Vilya Syafriana
NPM : 1206180121
Program studi : Biologi
Judul Tesis : Peningkatan Aktivitas β -Glukosidase pada *Penicillium* sp. ID10-T065 dengan Mutasi menggunakan Sinar Ultraviolet dan Etil Metil Sulfonat serta Analisis Gen β -Glukosidase 1 (*bgl1*) pada Mutan

Telah berhasil saya pertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Pengetahuan Ilmu Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo
Pembimbing II : Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem.
Penguji I : Dra. Sitaresmi, M.Sc.
Penguji II : Dr. Abinawanto

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 7 januari 2015

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vilya Syafriana
NPM : 1206180121
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Spesies Karya : Tesis

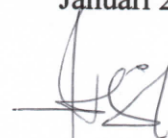
Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**PENINGKATAN AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE
PADA *Penicillium* sp. ID10-T065 DENGAN MUTASI MENGGUNAKAN
SINAR ULTRAVIOLET DAN ETIL METIL SULFONAT SERTA
ANALISIS GEN β -GLUKOSIDASE 1 (*bgl1*) PADA MUTAN**

Beserta perangkatnya yang ada jika diperlukan. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Depok
Januari 2015



(Vilya Syafriana)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah S.W.T. atas segala rahmat-Nya yang diberikan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan tesis ini. Salam dan shalawat bagi junjungan nabi Muhammad Rasulullah SAW.

Penulis pertama kali mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo, Ibu Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem, dan Bapak Dr. Sukma Nuswantara selaku pembimbing, yang telah begitu sabar memberikan pengetahuan, bimbingan, perhatian, bantuan, dukungan, kritik, dan saran selama penelitian hingga tersusunnya tesis ini.

Terima kasih kepada Ibu Dra. Sitaresmi M.Sc. dan Bapak Dr. Abinawanto selaku penguji yang telah banyak memberikan masukan dalam penelitian ini. Terima kasih kepada Ibu Dr. Luthfiralda Sjafirdi, M.Biomed. dan Ibu Dr. Nisyawati selaku Koordinator Pasca Biologi yang banyak memberikan masukan dan semangat kepada penulis. Terima kasih untuk Mba Evi dan Mba Fenti atas bantuan dan dukungan selama penulisan.

Terima kasih kepada tim laboratorium mikrobiologi Biotek LIPI atas dukungan dan bantuannya selama penelitian, terutama Mba Miranti Nurindah Sari yang selalu bersedia mendampingi dan mendukung kami selama penelitian, serta Mba Pamela Apriliana atas bantuan dan semangatnya kepada penulis.

Terima kasih yang tak terhingga untuk sahabat-sahabat BIRU dan PASCA 2012 yang selalu memberi dukungan moral dan semangat kepada penulis. Terimakasih terutama kepada Nany selaku rekan kerja yang banyak memberi bantuan, semangat serta masukan hingga selesainya tesis ini. Terimakasih juga kepada Sita dan Mariana atas bantuan, masukan serta berbagi ilmu dan pengetahuan kepada penulis. Terimakasih untuk Windri dan Fitri atas bantuan dan masukannya selama penelitian dan penulisan.

Terima kasih paling besar untuk keluarga tercinta. Teruntuk suami tercinta, Opik Freeli, atas segala pengorbanan dan pengertiannya; anak-anak terkasih, Khalisha dan Ezan, atas pengertian dan kesabarannya; orangtua tersayang, papa, mama Mar, bapak, dan mama Ijah, atas pengertian dan

toleransinya terhadap penulis; adik-adik tersayang, Alfi, Iyan dan Ika atas bantuannya selama ini.

Akhirnya, penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, meskipun masih jauh dari sempurna.

Penulis

2015

ABSTRAK

Nama : Vilya Syafriana
Program Studi : Pascasarjana Biologi
Judul : Peningkatan Aktivitas β -Glukosidase *Penicillium* sp. ID10-T065 dengan Mutasi Menggunakan Sinar Ultraviolet dan Etil Metil Sulfonat serta Analisis Gen β -Glukosidase 1 (*bgl1*) pada Mutan

Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 dimutasi menggunakan sinar Ultraviolet (UV), Etil Metil Sulfonat (EMS), dan kombinasi UV-EMS. Hasil mutasi menunjukkan bahwa aktivitas enzim β -glukosidase pada mutan lebih tinggi dibandingkan *wild-type* (1,78 U/ml), kecuali pada mutan UM₂₃. Mutan UV₁₃ mengalami peningkatan aktivitas β -glukosidase tertinggi (1,88 U/ml pada selobiosa 0,1% dan 5,53 U/ml pada selobiosa 1%), sedangkan mutan UM₂₃ menunjukkan aktivitas terendah (1,80 U/ml pada selobiosa 0,1% dan 1,75 U/ml pada selobiosa 1%). Aktivitas β -glukosidase pada mutan EM₃₁ sebesar 1,86 U/ml pada selobiosa 0,1% dan 4,26 U/ml pada selobiosa 1%. Hasil analisis sekuen gen β -glukosidase 1 (*bgl1*) menunjukkan bahwa seluruh mutan mengalami mutasi substitusi ketika dibandingkan dengan sekuen *wild-type*. Mutan UV₁₃ mengalami perubahan basa nukleotida paling banyak (7 basa) dibandingkan mutan EM₃₁ (5 basa) dan UM₂₃ (2 basa). Perubahan basa juga mengakibatkan gen mengalami *missense mutation* sehingga terjadi kesalahan dalam penerjemahan kode asam amino, kecuali pada basa ke-2037 dari mutan UV₁₃ dan basa ke-2034 serta 2037 mutan EM₃₁. Perubahan basa pada posisi tersebut tidak mengubah translasi asam amino (*silent mutation*). Hasil analisis sekuen gen *bgl1* dan aktivitas enzim menunjukkan bahwa sinar UV merupakan mutagen efektif untuk peningkatan aktivitas β -glukosidase pada isolat *Penicillium* sp. ID10-T065. Hasil identifikasi secara molekuler dan analisis pohon filogenetik, isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 memiliki kemiripan dan kekerabatan terdekat dengan spesies *Penicillium oxalicum*.

Keywords: β -glukosidase, EMS, mutasi, *Penicillium*, UV

ABSTRACT

Name : Vilya Syafriana
Study Program : Biology
Title : Enhancement of β -Glucosidase Activity in *Penicillium* sp. ID10-T065 through Mutation Using Ultraviolet Irradiation and Ethyl Methyl Sulfonate and Analysis of β -Glucosidase 1 Gene (*bgl1*) in Mutant

The *Penicillium* sp. isolate ID10-T065 was mutated using Ultraviolet irradiation (UV), Ethyl Methyl Sulfonate (EMS), and combination of UV -EMS. The results showed that β -glucosidase activity in the mutant was higher than that of wild-type (1,78 U/ml), except for the mutant UM₂₃. The β -glucosidase activity in mutant UV₁₃ showed the highest activity (1,88 U/ml at cellobiose 0,1% and 5,53 U/ml at cellobiose 1%), while mutant UM₂₃ showed the lowest activity (1,80 U/ml at cellobiose 0,1% and 1,75 U/ml at cellobiose 1%). The β -glucosidase activity of EM₃₁ was 1,86 U/ml at cellobiose 0,1% and 4,26 U/ml at cellobiose 1%. The results of the DNA sequence analysis of β -glucosidase 1 (*bgl1*) showed that all mutants had substitution mutations when compared to the wild-type sequences. Mutant UV₁₃ had the most base alteration (7 bases) compared to the mutant EM₃₁ (5 bases) and UM₂₃ (2 bases). The bases alteration was leading to missense mutation, except for the sequence of mutant UV₁₃ at position 2037 and mutant EM₃₁ at position 2034 and 2037. The base alteration of the sequence did not change the amino acid translation (silent mutation). The results of the DNA sequences analysis of *bgl1* and enzyme activities showed that UV light is an effective mutagen to increase β -glucosidase activity in *Penicillium* sp. ID10-T065. The molecular identification and phylogenetic analysis showed that *Penicillium* sp. ID10-T065 was closely related with *Penicillium oxalicum*.

Keywords: β -glucosidase, EMS, mutation, *Penicillium*, UV

xix + 93 pp; 14 plates; 9 tables; 5 appendices.

Bibl.: 123 (1959--2014)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
PENGANTAR PARIPURNA.....	1
MAKALAH I: PEMAPARAN SINAR ULTRAVIOLET DAN ETIL METIL SULFONAT TERHADAP AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	8
Abstrak.....	8
Pendahuluan.....	9
Alat, Bahan, dan Cara Kerja	11
A. Alat.....	11
B. Bahan.....	12
1. Isolat fungi.....	12
2. Medium.....	12
3. Bahan kimia.....	12
C. Cara Kerja.....	13
1. Pembuatan Medium.....	13
a. Potato Dextrose Agar (PDA).....	13
b. Medium CMC 1% agar.....	13
c. Medium <i>starter</i> dan produksi enzim β -glukosidase (BGL).....	13
2. Penapisan aktivitas selulase isolat-isolat <i>Penicillium</i> sp. pada medium CMC 1% agar.....	13
3. Persiapan mutan dan mutasi isolat terpilih.....	14
a. Persiapan mutan.....	14
b. Mutasi menggunakan sinar ultraviolet (UV).....	14
c. Mutasi menggunakan larutan etil metil sulfonat (EMS).....	15
d. Mutasi kombinasi sinar ultraviolet (UV) dan larutan etil metil sulfonat (EMS).....	15
e. Penapisan aktivitas selulolitik isolat-isolat mutan..	16
4. Produksi dan pengukuran aktivitas BGL isolat mutan dan <i>wild-type Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	16
a. Persiapan starter.....	16
b. Produksi enzim β -glukosidase.....	16

c. Pengukuran aktivitas β -glukosidase.....	16
d. Pembuatan kurva standar glukosa.....	17
Hasil dan Pembahasan.....	18
1. Penapisan aktivitas selulase isolat isolat <i>Penicillium</i> sp.	18
2. Mutagenesis.....	21
a. Hasil <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	21
b. Perolehan koloni mutan.....	22
3. Penapisan aktivitas selulase mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	25
4. Aktivitas β -glukosidase mutan terpilih dan <i>wild-type</i>	27
a. Konsentrasi substrat.....	28
b. Perbandingan aktivitas β -glukosidase (BGL) mutan dan <i>wild-type</i>	30
Kesimpulan.....	34
Daftar Acuan.....	34
MAKALAH II: ANALISIS GEN β -GLUKOSIDASE 1 (<i>bgl1</i>) PADA MUTAN <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	41
Abstrak.....	41
Pendahuluan.....	42
Alat, Bahan, dan Cara Kerja	44
A. Alat.....	44
B. Bahan.....	44
1. Sampel.....	44
2. Medium.....	44
3. Bahan kimia.....	45
4. Primer.....	45
C. Cara Kerja.....	45
1. Analisis gen <i>bgl1</i>	45
a. Perancangan primer BG.....	45
b. Ekstraksi DNA.....	45
c. Optimasi PCR.....	46
d. Penyejajaran sekuen DNA gen <i>bgl1</i> mutan dan <i>wild-type</i>	47
2. Identifikasi isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	47
a. Karakter morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	47
b. Analisis molekuler isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	47
c. Ekstraksi DNA.....	48
d. Amplifikasi DNA dengan PCR.....	48
Hasil dan Pembahasan.....	49
1. Analisis gen <i>bgl1</i> mutan dan <i>wild-type</i> <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	49
a. Perancangan primer <i>bgl1</i>	49
b. Optimasi PCR.....	50
c. Penyejajaran sekuen DNA.....	54
2. Identifikasi Isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	59
Kesimpulan.....	62

Daftar Acuan.....	62
Lampiran.....	68
DISKUSI PARIPURNA.....	78
Hasil mutasi <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	79
Aktivitas β -glukosidase mutan dan <i>wild-type</i> <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	81
Analisis gen <i>bgl1</i>	82
Identifikasi Isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	85
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN.....	86
DAFTAR ACUAN.....	87

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	HALAMAN
1 Hidrolisis selulosa oleh sistem selulase.....	2
I.1 Pembentukan zona bening pada isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 pada medium CMC agar 1% ditambah <i>Congo Red</i> 0,5%.....	20
I.2 Tingkat kematian spora mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	24
I.3 Morfologi koloni isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 <i>wild-type</i> beserta mutan yang ditumbuhkan pada medium PDA selama 4 hari pada suhu 30° C.....	25
I.4 Model induksi selulase pada <i>Penicillium purpurogenum</i> ..	30
I.5 Perbandingan aktivitas BGL mutan dan <i>wild-type</i> pada konsentrasi substrat selobiosa 0,1% dan 1%.....	31
II.1 Hasil amplifikasi gen <i>bgl1</i> dengan optimasi suhu <i>annealing</i> isolat <i>wild-type</i> <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 menggunakan primer BG ₁ , BG ₂ , dan BG ₃	51
II.2 Hasil amplifikasi isolat <i>wild-type</i> dan mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	52
a. Primer BG ₄ , suhu <i>annealing</i> 56° C, suhu denaturasi 94° C	
b. Primer BG ₅ , suhu <i>annealing</i> 52° C	
II.3 Hasil amplifikasi isolat <i>wild-type</i> dan mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 menggunakan primer BG ₂ dengan suhu <i>annealing</i> 54,9° C.....	53
II.4 Pembentukan dimer primidin akibat induksi sinar UV....	57
II.5 Mekanisme penambahan gugus alkil pada basa guanin dan timin.....	58
II.6 Hasil amplifikasi isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 menggunakan primer 18S.....	60
II.7 Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	60
II.8 Hasil analisis Pokok Filogenetik isolat <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 menggunakan model Neighbor-Joining dengan metode Kimura dua-parameter.....	61

DAFTAR TABEL

TABEL	HALAMAN
I.1 Hasil Penapisan isolat-isolat <i>Penicillium</i> sp. menggunakan metode <i>Plate Agar Assay</i> dengan substrat CMC Agar 1%	18
I.2 Hasil <i>Total Plate Count</i> (TPC) spora <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065 pada medium PDA, berumur 4 hari, suhu inkubasi 30° C	22
I.3 Perolehan koloni hasil mutasi UV, EMS, dan kombinasi UV-EMS pada <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	23
I.4 Nilai Indeks Enzimatik (IE) Isolat <i>wild-type</i> dan mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	26
I.5 Aktivitas BGL mutan dan <i>wild-type</i> pada dua konsentrasi substrat.....	28
I.6 Perbandingan aktivitas β -glukosidase (BGL) mutan dan <i>wild-type Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	31
II.1 Hasil rancangan primer gen <i>bgl1</i>	49
II.2 Suhu <i>annealing</i> primer berdasarkan titik leleh (T_m) primer <i>Forward</i> (F) dan <i>Reverse</i> (R)	50
II.3 Perubahan urutan basa pada mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	HALAMAN
II.1 Perancangan primer BG.....	68
II.2 Data kuantifikasi DNA isolat <i>wild-type</i> dan mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	70
II.3 Hasil penyejajaran sekuen strain referensi dengan isolat <i>wild-type</i> dan mutan <i>Penicillium</i> sp. ID10-T065.....	70
II.4 Tabel kodon asam amino.....	77
II.5 Hasil analisis NCBI BLAST <i>Penicillium</i> sp. ID10- T065pada situs http://blast.ncbi.nlm.nih.gov	77

Name : Vilya Syafriana Date: 7 Januari 2015
Title : Enhancement of β -Glucosidase Activity in *Penicillium* sp.
ID10-T065 through Mutation Using Ultraviolet Irradiation
and Ethyl Methyl Sulfonate and Analysis of β -Glucosidase 1
Gene (*bgl1*) in Mutant
Thesis Supervisors: Dr. Wibowo Mangunwardoyo;
Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem.

SUMMARY

β -glucosidases (BGL) together with endoglucanase (EG) and cellobiohydrolases (CBH) forms a cellulase complex. All three enzymes work in a synergistic manner to hydrolyze cellulose into glucose. BGL plays a key role for efficient hydrolysis of cellulosic biomass as it relieves the inhibition of the CBH and EG by reducing cellobiose accumulation. BGL works at final step in the cellulose hydrolysis by catalyzes the conversion of cellobiose into two glucose molecules. BGL productivity from bacterial and fungal cultures is considered low for industrial scale, thus the higher production of BGL is needed. One of the ways is by mutation of regulator and promoter genes that are responsible for the biosynthesis of BGL enzyme. Study about the location and number of genes are also needed for understanding BGL role in gene regulation and cellulose hydrolysis.

The improvement of extracellular enzymes secretion through the application of random mutagenesis and screening has been successfully performed in various filamentous fungi. Random mutation in filamentous fungi can be performed using physical agent, chemical agent or combination of both agents called mutagens. Mutagens that has been reported can increase the BGL activity are: proton radiation, Ultraviolet (UV) radiation , nitrous acid (HNO_2), Ethidium Bromide (EtBr), N-nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG), and Ethyl Methyl Sulfonate (EMS).

UV light is known as one of the best physical agent in fungal mutation. UV light has strong genotoxic effect to generate DNA damage and induce

mutations. EMS is known as an alkylating agent that acts by alkylating guanine or thymine at the oxygen atom involved in hydrogen bonding. This leads to an impairment of the normal base-pairing. EMS has been used in mutational studies in a wide variety of biological test systems. One of them is in fungal mutation. The mutational combination of UV and EMS can induce wide genetic variability. Many research has been performed using this combinational mutagens and has shown an increased production of commercial enzyme, such as in lipase production, α -amylase, phosphatase, and ligninase.

Trichoderma reesei is known as the best producer for cellulase in industrial enzymes. However, this strain lacks the BGL enzyme. *Penicillium* genera are known have complete cellulase system, including high BGL activity compared to *Trichoderma*. Laboratory of Applied Microbiology, Research Center for Biotechnology (P2 Biotek), Indonesian Institute of Sciences (LIPI) has a collection of cellulolytic *Penicillium* isolates. The aim of this study was to obtain the most potential *Penicillium* sp. mutant as BGL producer through mutation using UV and EMS exposure, to provide the information about BGL activity and to analyze the base alteration in *bgl1* gene sequences before and after the treatment. This information has not yet been reported so far.

The mutation resulted in five *Penicillium* sp. mutants from UV exposures, three mutants from EMS exposures, and six mutants from UV-EMS treatment. These mutants were screened based on its ability to form halozone in agar media (*Plate Agar Assay*). Mutant with the largest halozone from each treatment was selected to be analyzed its BGL activity. The BGL activity of mutant and wild-type strains was compared to each other. The result showed that mutant from UV exposure (UV₁₃) had the highest activity compared to the wild-type and other mutant strains (EM₃₁ and UM₂₃). Mutant UV₁₃ also had the highest enhancement of BGL activity (1,06--3,11 fold) compared to other mutants.

Sequence analysis of *bgl1* genes was performed in both mutant and wild-type strains by using BIOEDIT program. Sequence analysis showed that there were base alterations at base position 2015 until 2040. All bases alteration revealed a substitution mutation (transition or transversion). Mutant UV₁₃ showed the highest base alteration (seven bases), mutant EM₃₁ showed five bases

alteration and mutant UM₂₃ showed two bases alteration. Most bases alteration in UV₁₃, EM₃₁ and UM₂₃ caused a missense mutation at amino acid translation and silent mutation (at base position 2037 of mutant UV₁₃ and base position 2034 and 2037 of mutant EM₃₁).

The results of gene analysis showed that the base alteration due to mutations affected the enhancement of BGL activity. Mutant UV₁₃ showed higher bases alterations and BGL activity compared to EM₃₁ and UM₂₃. This result indicated that mutation with UV light was more effective to increase the BGL activity than EMS or a combination of UV and EMS.

The objective of this study is to find a potential mutant which has higher BGL activity than the wild-type. The enzyme from the mutant strain is expected can be useful for effective hydrolysis of cellulose in industrial application based on cellulosic biomass. Besides that, information of gene mutations can be used as a reference to study the mechanisms of gene mutation and its effects to enzyme activity in *Penicillium* strain.

xix + 93 pp; 14 plates; 9 tables; 5 appendices.
Bibl.: 123 (1959--2014)

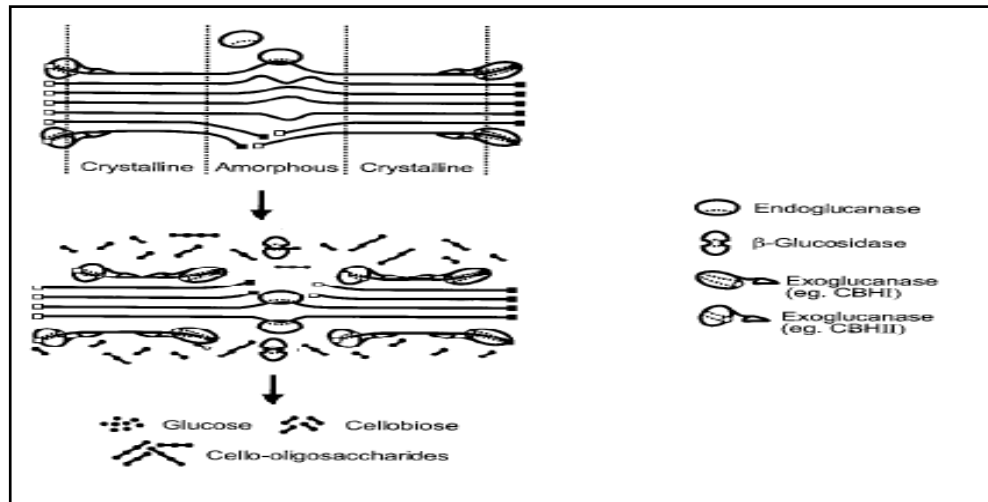
PENGANTAR PARIPURNA

Kemajuan industrialisasi secara tidak langsung telah menimbulkan permasalahan lingkungan yang salah satunya disebabkan oleh kenaikan konsentrasi karbon dioksida di bumi. Beberapa usaha untuk mengurangi permasalahan tersebut telah banyak dilakukan beberapa tahun terakhir. Salah satu usaha adalah dengan penggunaan bahan baku biomassa berselulosa yang berasal dari limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan untuk kepentingan industri komersil (Pérez dkk. 2002; Li dkk. 2010). Biomassa berselulosa dianggap sebagai materi karbon netral sehingga tidak menyebabkan peningkatan karbon dioksida di udara (Lin & Tanaka 2006; Omojasola dkk. 2008). Biomassa tersebut juga merupakan sumber karbon yang dapat diperbaharui dan tersedia melimpah di alam, sehingga akan menguntungkan dari segi ekonomi, sosial, dan ekosistem (Bon & Ferrara 2007; Omojasola dkk. 2008; Jun dkk. 2009; Vu dkk. 2009). Biomassa berselulosa harus dihidrolisis menjadi unit monomernya, yaitu glukosa, untuk dapat digunakan dalam aplikasi industri (Li dkk. 2010). Proses hidrolisis melibatkan serangkaian enzim yang bekerja secara sinergis yang dikenal dengan enzim selulolitik atau selulase (Jun dkk. 2009; Ike dkk. 2010; Li dkk. 2010).

Selulase merupakan sekelompok enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 pada rantai selulosa (Jung dkk. 2012). Hidrolisis selulosa oleh selulase menghasilkan produk utama seperti: glukosa, selobiosa, dan selo-oligosakarida (Sukumaran dkk. 2005). Mekanisme hidrolisis enzimatik selulosa melibatkan tiga tipe enzim selulolitik yang bekerja secara berkesinambungan dan sinergis, yaitu: endoglukanase (EG) [EC. 3.2.1.4], eksoglukanase atau selobiohidrolase (CBH) [EC. 3.2.1.91], dan β -glukosidase atau selobiase (BGL) [EC. 3.2.1.21] (Lynd dkk. 2002; Sukumaran dkk. 2005).

Enzim yang bekerja pertama kali adalah EG yang memotong bagian internal rantai polimer selulosa secara acak menghasilkan ujung rantai pereduksi dan non-pereduksi. Endoglukanase bekerja aktif terutama pada ikatan selulosa yang amorf seperti karboksil metil selulosa (CMC). Eksoglukanase memotong rantai paling ujung dari hasil EG hingga terbentuk rantai-rantai oligosakarida atau disakarida seperti selobiosa. Eksoglukanase memiliki aktivitas yang tinggi pada

bagian kristal dari rantai selulosa. β -glukosidase bekerja pada tahap akhir hidrolisis, yaitu menyempurnakan kerja EG dan CBH dengan menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida lainnya menjadi glukosa (Gambar 1) (Lynd dkk. 2002; Zhang dkk. 2006; Taherzadeh & Karimi 2007; Singhania dkk. 2013; Sørensen dkk. 2013).



Gambar 1. Hidrolisis selulosa oleh sistem selulase
[Sumber: Lynd dkk. 2002]

Selulase memiliki peran penting di alam karena mampu mendegradasi materi berselulosa, terutama limbah tumbuhan di hutan atau pertanian (Kader dkk. 1999). Kemampuan tersebut memicu pemanfaatan selulase dalam bidang industri berbahan dasar selulosa, seperti industri makanan dan minuman, pakan ternak, detergen, tekstil, serta industri bubuk kayu dan kertas (Sukumaran dkk. 2005; Fawzi & Hamdy 2011). Industri lain yang melibatkan selulase dan saat ini sedang dikembangkan adalah produksi bioetanol. Selama satu dekade terakhir, perhatian dunia tertumpu pada pengembangan selulase untuk produksi bioetanol dari limbah pertanian berselulosa (Sukumaran dkk. 2005; Jun dkk. 2009; Abo-State dkk. 2010).

Selulase merupakan enzim dengan biaya produksi tinggi, namun hasil yang diperoleh sedikit. Hal tersebut menjadi salah satu masalah besar dalam industri, khususnya industri skala besar seperti produksi bioetanol (Jun dkk. 2009; Abo-State 2010; Fawzi & Hamdy 2011). Oleh sebab itu, beberapa strategi untuk mengurangi biaya produksi enzim perlu dikembangkan seperti peningkatan total

volume enzim, produksi enzim menggunakan substrat yang murah, serta produksi enzim yang memiliki aktivitas dan spesifitas yang tinggi (Zhang dkk. 2006).

β -glukosidase sebagai salah satu komponen selulase memiliki peran penting dalam proses hidrolisis materi selulosa, yaitu menghidrolisis molekul selobiosa menjadi glukosa. Proses tersebut akan mengurangi akumulasi selobiosa yang merupakan inhibitor sekresi EG dan CBH (Singhania dkk. 2013; Sørensen dkk. 2013). Aktivitas BGL sendiri juga sering terhambat oleh produk yang dihasilkan, yaitu glukosa. aktivitas BGL akan menurun seiring peningkatan rantai glukosa. Oleh sebab itu, untuk memperoleh tingkat hidrolisis selulosa yang tinggi, maka diperlukan BGL yang toleran terhadap kadar glukosa yang tinggi (Bhatia dkk. 2002; Sørensen dkk. 2013).

β -glukosidase dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, hewan, dan tumbuhan. Enzim tersebut dihasilkan baik secara ekstraseluler maupun intraseluler tergantung dari kondisi pertumbuhan (Bai dkk. 2013). β -glukosidase yang dihasilkan oleh fungi lebih disukai oleh industri karena proses pemulihan yang mudah, memiliki aktivitas yang tinggi, serta stabil dalam kisaran pH dan suhu yang luas (Lis & Sharon 1993). Spesies-spesies dari *Trichoderma* merupakan spesies fungi yang diketahui memiliki aktivitas selulolitik terbaik, stabil dalam kondisi hidrolisis dan resisten terhadap inhibitor kimia; akan tetapi aktivitas BGL yang dihasilkan rendah (Taherzadeh & Karimi 2007; Amore & Faraco 2012; Jung dkk. 2012).

Genus lain yang banyak dikembangkan untuk mengatasi aktivitas BGL yang rendah pada *Trichoderma* adalah *Penicillium*. Fungi dari genus *Penicillium* diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder dan enzim-enzim ekstraseluler yang memiliki nilai jual tinggi (Pereira dkk. 2002; Tiwari dkk. 2011). Doolotkeldieva & Bobusheva (2011) menyatakan bahwa aktivitas selulase dari *Penicillium* lebih tinggi dibandingkan strain *Trichoderma*. Hal tersebut dikarenakan aktivitas BGL pada *Penicillium* lebih tinggi dan memiliki gen pengode enzim selulolitik yang lebih banyak dibandingkan *Trichoderma* (Liu dkk. 2013). Syed dkk. (2013) melaporkan bahwa strain *Penicillium* sp. CPF2 memiliki aktivitas BGL sebesar 2,8 IU/ml. Nilai tersebut lebih besar sembilan kali lipat

dari strain Rut C30 (mutan *Trichoderma reesei*), yaitu 0,3 IU/ml (Peterson & Nevalainen 2012).

Produktivitas BGL dari kultur fungi dianggap rendah bagi skala industri sehingga diperlukan pengembangan hiperproduksi BGL (Lynd dkk. 2002; Maki dkk. 2009). Berdasarkan Vu dkk. (2011), proses mutasi dan seleksi merupakan salah satu contoh keberhasilan peningkatan strain dalam industri. Peningkatan strain dengan cara demikian dapat mengurangi biaya produksi, namun mampu meningkatkan produktivitas strain. Mutasi buatan secara acak diketahui berhasil meningkatkan sekresi enzim pada fungi seperti glukamilase, lipase dan selulase (Chandra dkk. 2009; Seiboth dkk. 2011; Ribeiro dkk. 2013).

Mutasi merupakan proses terjadinya perubahan struktur suatu gen (mutasi gen) atau kromosom (mutasi kromosom) yang dapat terjadi secara spontan (tidak disengaja) ataupun buatan (disengaja) (Tamarin 2001; Purves dkk. 2003; Adrio & Demain 2006). Mutasi spontan terjadi secara alami dengan frekuensi perubahan yang rendah, sedangkan mutasi buatan dapat diinduksi secara fisika dan kimia dengan menggunakan agen yang dapat mengubah sekuen DNA atau dikenal sebagai mutagen (Lodish dkk. 2004; Hogg 2005). Proses perubahan tersebut dapat menguntungkan bagi organisme karena memunculkan individu yang mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada lingkungan tertentu (Hogg 2005; Adrio & Demain 2006).

Mutagen pada mutasi induksi dapat mengubah DNA melalui beberapa mekanisme, yaitu: (1) mutagen kimia dapat mengubah basa nukleotida secara kovalen, seperti HNO_2 dapat menyebabkan deaminasi pada sitosin sehingga berubah menjadi urasil; (2) mutagen kimia juga dapat menyebabkan penambahan gugus kimia pada basa, sebagai contoh penambahan gugus alkil oleh agen alkilasi seperti etil metil sulfonat (EMS); (3) agen interkalasi seperti etidium bromida (EtBr) akan menyisipkan diri di antara nukleotida-nukleotida berdekatan dalam rantai tunggal DNA sehingga dapat terjadi delesi atau adisi nukleotida; (4) merusak materi genetik akibat radiasi. Radiasi sinar ultraviolet (UV) menyebabkan terjadi dimer pirimidin pada dua basa pirimidin yang berdekatan, sedangkan radiasi sinar X dapat mengakibatkan pembentukan radikal bebas yang dapat merusak ikatan gula-fosfat pada nukleotida atau basa dirusak sehingga tidak

dikenali oleh DNA polimerase ketika replikasi berlangsung (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Mutasi fungi untuk peningkatan BGL dapat dilakukan menggunakan mutagen fisika, kimia atau kombinasi keduanya. Mutagen-mutagen yang diketahui dapat meningkatkan aktivitas BGL pada fungi, antara lain: sinar proton (Jung dkk. 2012), sinar Ultraviolet (UV) (Dillon dkk. 1992; Kuhad dkk. 1994; Ike dkk. 2010; Javed dkk. 2011), Asam Nitrat (HNO_2) (Javed dkk. 2011), Etidium Bromida (EtBr) (Chand dkk. 2005; Javed dkk. 2011; Pradeep dkk. 2012), N-metil-N-nitro-N-Nitrosoguanidin (NTG) (Brown dkk. 1987; Kuhad dkk. 1994; Kovacs dkk. 2008), dan Etil Metil Sulfonat (EMS) (Chandra dkk. 2009; Javed dkk. 2011).

Mutagen fisika yang umum digunakan dalam mutasi fungi adalah sinar UV. Sinar UV merupakan mutagen yang efektif karena memiliki spektrum yang luas dan dapat menghasilkan proporsi dimer pirimidin yang tinggi (Pfeifer dkk. 2005). Mutasi fungi menggunakan UV dilaporkan mampu meningkatkan aktivitas BGL sebesar 1--1,75 kali lipat dari *wild-type* (Dillon dkk. 1992).

Salah satu mutagen kimia yang banyak digunakan dalam penelitian adalah EMS (Hogg 2005). EMS merupakan agen alkilasi yang akan mengalkilasi basa guanin sehingga menyebabkan terjadinya transisi pasangan basa. Chandra dkk. (2009) telah memutasi *Trichoderma citrinoviride* menggunakan EMS. Mutan dari isolat tersebut diketahui mengalami peningkatan aktivitas BGL sebesar 4,09 kali dari *wild-type* (2,01 IU/ml menjadi 8,22 IU/ml).

Kombinasi UV dan EMS dapat menginduksi variabilitas genetik yang besar (El-Bondkly & Keera 2007). Beberapa penelitian menggunakan kombinasi sinar UV dan EMS telah membuktikan terjadinya peningkatan produksi enzim-enzim komersil, seperti lipase (El-Bondkly & Keera 2007); α -amilase (Shafique dkk. 2009); fosfatase (Rajeshkumar & Ilyas 2011); dan ligninase (Ramzan dkk. 2013).

Hasil mutasi yang diperoleh selain dipelajari perbedaan aktivitas enzim, sebaiknya juga dilakukan analisis gen untuk lebih memahami perbedaan aktivitas antara mutan dan *wild-type* (Li dkk. 2010). Salah satu cara untuk deteksi mutasi adalah dengan melakukan DNA sekuensing (Cotton 1993). Analisis sekuen

dilakukan untuk memeriksa basa yang terdapat dalam gen (Hjelm dkk. 2010). DNA sekuensing dianggap sebagai metode dasar dan pasti untuk menentukan mutasi (Nollau & Wagener 1997). DNA sekuensing menyediakan analisis gen pada tingkat nukleotida. Tujuan utama sekuensing adalah menentukan sekuen pada daerah target menggunakan produk amplifikasi sebagai cetakan. DNA sekuensing dapat digunakan untuk memeriksa variasi pada DNA, baik yang diketahui ataupun tidak diketahui (Mahdiah & Rabbani 2013).

Laboratorium Mikrobiologi Terapan, Pusat Penelitian Bioteknologi (P2 Biotek), LIPI memiliki koleksi isolat-isolat *Penicillium* selulolitik. Berdasarkan uraian di atas, peneliti berkeinginan melakukan mutasi pada isolat *Penicillium* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi Terapan, P2 Biotek, LIPI menggunakan senyawa EMS dan sinar UV untuk mengetahui perbedaan aktivitas BGL sebelum dan sesudah mutasi. Informasi mengenai perubahan lokasi yang terjadi setelah mutasi pada gen pengode BGL mutan dengan *wild-type* belum pernah dilaporkan. Analisis gen baru dilakukan pada enzim EG saja (Li dkk. 2010). Oleh sebab itu, peneliti juga berkeinginan menganalisis secara molekuler apakah terjadi perubahan pada gen penyandi BGL (*bgl*) sebelum dan sesudah mutasi.

Hasil penelitian tentang aktivitas BGL pada mutan dan *wild-type* dari tiga perlakuan mutasi (UV, EMS, dan kombinasi UV-EMS), serta analisis sekuen DNA akan disusun menjadi dua makalah.

Makalah I berjudul: Pemaparan Sinar Ultraviolet dan Etil Metil Sulfonat untuk Peningkatan Aktivitas β -glukosidase *Penicillium* sp. ID10-T065. Tujuan penelitian adalah untuk memperoleh mutan potensial yang memiliki aktivitas BGL lebih besar dari *wild-type*. Mutan diperoleh dengan metode penapisan berdasarkan pembentukan zona bening. Aktivitas BGL diukur dengan mengonversi nilai absorbansi ke dalam kurva standar gula pereduksi glukosa. Isolat mutan potensial dari setiap perlakuan mutasi digunakan dalam penelitian makalah II.

Makalah II berjudul: Analisis Gen β -glukosidase 1 (*bgl1*) pada Mutan *Penicillium* sp. ID10-T065. Penelitian bertujuan mengetahui perbedaan urutan basa nukleotida dari hasil sekuen mutan dan *wild-type*. Hasil sekuen dapat menunjukkan mutasi yang terjadi pada setiap perlakuan.

Data hasil mutasi dan aktivitas BGL diharapkan dapat menambah informasi tentang aktivitas BGL dari mutan *Penicillium* sp., serta dapat menjadi referensi tentang metode mutasi yang efektif dalam peningkatan aktivitas BGL. Enzim yang diperoleh dari strain mutan diharapkan dapat terus dikembangkan untuk digunakan dalam aplikasi industri biomassa berbasis selulosa. Selain itu, informasi mengenai mutasi gen dapat digunakan sebagai referensi untuk mempelajari mekanisme mutasi gen dan pengaruhnya terhadap aktivitas enzim.

MAKALAH I

PEMAPARAN SINAR ULTRAVIOLET DAN ETIL METIL SULFONAT UNTUK PENINGKATAN AKTIVITAS β -GLUKOSIDASE

Penicillium sp. ID10-T065

Vilya Syafriana^{1*}, Sukma Nuswantara², Wibowo Mangunwardoyo¹, and
Puspita Lisdiyanti²

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
University of Indonesia (UI), Indonesia

²Research Centre for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI),
Indonesia

*v.syafriana@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to improve the β -glucosidase activity of *Penicillium* sp. ID10-T065 with physical (UV), chemical (EMS), and combined mutation (UV-EMS). The spores of *Penicillium* sp. ID10-T065 were exposed to UV irradiation for 3 minutes with dose of 0,1 J/cm² and 13 cm distances. Chemical mutation was done by treating the spores in 1--3% of EMS solution for an hour. Combined mutation of UV and EMS also performed by UV for 3 minutes (0,1 J/cm², 13 cm) and continued by soaking into 2--3% of EMS solution. β -glucosidase was produced in 0,1% and 1% cellobiose as a substrate. The result revealed that β -glucosidase activities of the mutant UV₁₃ and EM₃₁ were higher in 1% cellobiose than 0,1%, except for mutant UM₂₃. The enzyme activity of UV₁₃ from 0,1% to 1% cellobiose was increased 2,94 fold (1,88 U/ml to 5,53 U/ml) and mutant EM₃₁ increased 2,30 fold (1,86 U/ml to 4,26 U/ml). On the other hand, β -glucosidase activity mutant UM₂₃ was declined 0,05 U/ml (1,80 U/ml to 1,75 U/ml). Comparison of enzyme activities with the wild- type (1,78 U/ml), mutant UV₁₃ were increased 1,06 fold (1,88 U/ml) in cellobiose 0,1% and 3,11 fold (5,53 U/ml) in cellobiose 1%. Mutant EM₃₁ demonstrated an increase of 1,04 fold (1,86 U/ml) in cellobiose 0,1% and 2,39 fold (4,26 U/ml) in cellobiose 1%; while mutant UM₂₃ showed unstable activities (decreased 0,03 U/ml in cellobiose 1% and increased 0,02 U/ml in cellobiose 0,1%). Mutant UV₁₃ showed the best enzyme activity and should be considered as a potential strain for β -glucosidase producer.

Keywords: β -glucosidase, EMS, mutation, *Penicillium*, UV

PENDAHULUAN

β -glukosidase (BGL) sebagai salah satu komponen enzim selulase memiliki peran penting dalam proses hidrolisis materi selulosa (Sørensen dkk. 2013). β -glukosidase berperan menyempurnakan proses hidrolisis dengan menyederhanakan molekul selobiosa menjadi glukosa (Singhania dkk. 2013). Proses tersebut akan mengurangi akumulasi selobiosa yang dapat menghambat sekresi endoglukanase (EG) dan selobiohidrolase (CBH) (Sørensen dkk. 2013). Produktivitas BGL dari kultur bakteri dan fungi dianggap rendah bagi skala industri sehingga diperlukan pengembangan hiperproduksi BGL (Lynd dkk. 2002; Maki dkk. 2009). Salah satu usaha untuk peningkatan produksi enzim adalah dengan melakukan mutasi (Chandra dkk. 2009; Seiboth dkk. 2011).

Mutasi dapat terjadi secara spontan atau buatan. Mutasi buatan melibatkan suatu agen yang dikenal dengan mutagen (Hogg 2005). Sinar UV merupakan salah satu mutagen fisika yang efektif karena memiliki spektrum yang luas (200--400 nm) dan dapat menghasilkan proporsi dimer pirimidin yang tinggi (Pfeifer dkk. 2005). Dillon dkk. (1992) memaparkan isolat *Penicillium* sp. berasal dari usus *Coleoptera* dengan radiasi sinar UV. Mutasi dilakukan sebanyak tiga tahap. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada setiap tahapan mutasi terjadi peningkatan aktivitas selulase sebesar 1--1,75 kali dari *wild-type*.

Salah satu mutagen kimia yang banyak digunakan dalam penelitian adalah EMS (Hogg 2005). EMS merupakan agen alkilasi yang dapat menambahkan gugus alkil pada basa guanin sehingga menyebabkan terjadinya transisi pasangan basa. Chandra dkk. (2009) telah memutasi *Trichoderma citrinoviride* menggunakan EMS. Produksi BGL mutan dari spesies tersebut diketahui lebih tinggi dari strain *wild-type*, yaitu terjadi peningkatan sebesar 1,73 kali lipat (1,12 IU/ml menjadi 1,94 IU/ml) menggunakan substrat selobiosa.

Beberapa penelitian menggunakan kombinasi sinar UV dan EMS telah membuktikan terjadi peningkatan produksi enzim-enzim komersial, termasuk selulase (El-Bondkly & Keera 2007; Rajeshkumar & Ilyas 2011; Ramzan dkk. 2013). Mutasi strain *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 menggunakan EMS dilanjutkan dengan radiasi sinar UV menghasilkan tujuh mutan selulolitik potensial. Aktivitas selulolitik seluruh isolat mutan menunjukkan peningkatan

sebesar 1--1,5 kali dari *wild-type* (Adsul dkk. 2009). Liu dkk. (2011) juga melaporkan, bahwa mutasi *Penicillium decumbens* strain ML-017 menggunakan EMS dan UV mampu meningkatkan aktivitas selulase isolat tersebut sebesar 44,12% dari strain *wild-type*.

Salah satu metode pengujian yang umum digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu mikroorganisme dalam menghasilkan selulase adalah metode *Agar Plate Assay*. Metode tersebut dilakukan dengan menumbuhkan mikroorganisme pada medium agar yang mengandung substrat selulosa sebagai sumber karbon, seperti Avicel dan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Florencio dkk. 2012). Metode *Agar Plate Assay* melibatkan zat pewarna kromogenik untuk menampilkan zona bening di sekeliling koloni mikroorganisme (Yoon dkk. 2007). Castro dkk. (1995) menyatakan bahwa hidrolisis yang terjadi pada ikatan polisakarida akan menyebabkan pewarna terlepas dari polimer sehingga memunculkan zona bening pada medium. Beberapa pewarna yang umum digunakan dalam metode *Agar Plate Assay*, antara lain: *Congo Red*, *Phenol Red*, *Remazol Brilliant Blue* dan *Tryphan Blue* (Yoon dkk. 2007; Florencio dkk. 2012).

Penapisan mikroorganisme selulolitik umumnya dilakukan menggunakan medium CMC yang ditambahkan pewarna *Congo Red* (Kasana dkk. 2008). Isolat yang memiliki kemampuan selulolitik akan membentuk zona bening di sekeliling koloni setelah ditetesi *Congo Red* diikuti dengan pembilasan menggunakan NaCl (Kasana dkk. 2008; Fahrurrozi dkk. 2010). *Congo Red* merupakan pewarna yang dapat berikatan secara spesifik dengan polimer β -1,4 glikosida. Degradasi pada ikatan β -1,4 akan menyebabkan pewarna terlepas dari polimer sehingga memunculkan zona bening pada medium (Florencio dkk. 2012). Zhang dkk. (2006) menyatakan bahwa zona bening dapat diamati setelah terjadi hidrolisis, pewarnaan, dan pembilasan.

Analisis aktivitas BGL dapat diukur menggunakan berbagai substrat, baik substrat kromogenik maupun substrat non-kromogenik (Dashtban dkk. 2010). Salah satu substrat kromogenik yang umum digunakan adalah *p-nitrophenol- β -glucoside* (pNPG) (Chandra dkk. 2009). Substrat nonkromogenik yang dapat digunakan untuk analisis aktivitas BGL dapat berupa polisakarida, oligosakarida, ataupun disakarida (Dasthban dkk. 2010). Selobiosa merupakan salah satu

substrat disakarida yang umum digunakan dalam analisis aktivitas BGL karena tidak melibatkan EG maupun CBH selama proses hidrolisis (Zhang dkk. 2006). Breuil dkk. (1986) merekomendasikan penggunaan selobiosa sebagai substrat untuk mengukur aktivitas BGL dikarenakan selobiosa merupakan substrat alami BGL, sehingga merepresentasikan kerja BGL pada lingkungan alami.

Dashtban dkk. (2010) menyatakan bahwa analisis aktivitas selulase memerlukan reagen DNS pada tahap akhir pengujian. Reagen DNS digunakan sebagai metode kolorimeter untuk menentukan kadar gula pereduksi (glukosa). Reagen DNS mengandung sodium potasium tartrat, fenol, dan sodium bisulfit. Sodium potasium tartrat berperan menurunkan kecenderungan memecah oksigen dengan meningkatkan konsentrasi ion dalam larutan. Fenol dapat meningkatkan warna yang dihasilkan selama reaksi pemanasan. Sodium bisulfit berperan sebagai stabilisator warna dan reaksi dengan oksigen yang terdapat dalam bufer. Bufer basa diperlukan untuk reaksi redoks antara DNS dan glukosa, atau gula pereduksi lainnya. Reagen DNS akan ditambahkan pada tahap akhir pengujian selulase untuk menghentikan reaksi enzimatik pada substrat. Sampel perlu dipanaskan untuk meningkatkan warna sehingga absorbansi dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer (Zhang dkk. 2009).

Laboratorium Mikrobiologi Terapan, Pusat Penelitian Bioteknologi (P2 Biotek), LIPI memiliki koleksi isolat-isolat *Penicillium* selulolitik, akan tetapi aktivitas BGL isolat-isolat tersebut belum pernah diteliti. Oleh sebab itu, peneliti hendak menganalisis aktivitas BGL pada isolat *Penicillium* sp., serta memutasi isolat tersebut menggunakan sinar UV, larutan EMS, dan kombinasi kedua mutagen. Penelitian bertujuan untuk membandingkan aktivitas BGL pada isolat *wild-type* dan mutan. Perlakuan mutasi diharapkan dapat meningkatkan aktivitas BGL isolat *Penicillium* sp.

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi seperangkat alat gelas [Pyrex; Iwaki; Duran; Schott], timbangan analitik [AND dan Kern], autoklaf [Raypa], inkubator statis [Bioconcept], inkubator *waterbath* 30° C [Memmert],

inkubator *waterbath* 100° C [Grant], vortex [Whirlmixer dan Nissin Mixer (molekuler)], jangka sorong [Krisbow], *laminar air flow* [Telstar BH-100], *hot plate* [Raypa], *magnetic stirrer plate* [Thermoscientific], mikropipet berukuran 0,1--10 µL dan 10--100 µL [Gilson dan Eppendorf], lemari pendingin sampel [Polytron], lemari pendingin medium [Modena], *Freezer* [Sanyo], pH meter [Eutech instruments], spektrofotometer [Shimadzu], sentrifuga [Eppendorf & Hermle], mesin *thermo cycler* [Techne], elektroforesis [Mupid-exu], UV *Transilluminator* [Major Science], UV *Crosslinker* [Hoefer], *rotary shaker*, spatula, tusuk gigi steril, tusuk sate steril, dan aluminium foil.

B. Bahan

1. Isolat fungi

Isolat fungi yang digunakan dalam penelitian adalah 12 isolat *Penicillium* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi Terapan P2 Biotek LIPI, yaitu: ID10-T001, ID10-T006, ID10-T009, ID10-T017, ID10-T018, ID10-T035, ID10-T043, ID10-T045, ID10-T047, ID10-T051, ID10-T058, dan ID10-T065.

2. Medium

Medium yang digunakan adalah *Potato Dextrosa Agar* (PDA) [Difco], *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) Agar [Sigma], serta medium basal cair yang berisi substrat selobiosa 0,1% dan 1% [Merck].

3. Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian, antara lain: MgSO₄.7H₂O [Merck]; KNO₃ [Merck]; K₂HPO₄ [Merck]; FeSO₄.7H₂O [Merck]; CaCl₂ [Merck]; *yeast extract* [Oxoid]; glukosa [Merck]; CMC [Sigma]; Selobiosa [Merck]; bufer fosfat (20 mM pH 7,0); DNS [Sigma]; NaOH [Merck]; KNa.Tartat [Merck]; Sodium metabisulfid [Sigma-aldrich], fenol [Sigma] EMS [Aldrich Chem. Co.]; Tween-80 [Merck] dan *pure agar* [Difco].

C. Cara Kerja

1. Pembuatan Medium

a) Potato Dextrose Agar (PDA)

Medium PDA dibuat berdasarkan petunjuk pada kemasan.

b) Medium CMC 1% agar

Medium CMC 1% agar dibuat berdasarkan Fahrurrozi dkk. (2010) dengan modifikasi. Medium berisi 10 g CMC; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,75 g KNO_3 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g CaCl_2 ; 2 g *yeast extract*; 1 g glukosa; dan 18 g agar dalam 1.000 ml akuades.

c) Medium *starter* & produksi enzim β -glukosidase (BGL)

Persiapan *starter* dan produksi enzim BGL menggunakan medium basal cair berisi substrat selobiosa 0,1% dan 1%. Komposisi medium dibuat berdasarkan Mandels & Weber (1969) dengan modifikasi, terdiri dari: 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,75 g KNO_3 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g CaCl_2 ; 2 g *yeast extract*; 1 g glukosa; 1g dan 10 g selobiosa dalam 1.000 ml akuades.

2. Penapisan Aktivitas Selulase Isolat-isolat *Penicillium* sp. pada Medium CMC 1% Agar

Penapisan aktivitas selulase pada medium CMC 1% agar dilakukan berdasarkan metode Teather & Wood (1982). Isolat-isolat *Penicillium* sp. berumur 5--7 hari dalam medium PDA diinokulasi ke dalam medium padat berisi CMC 1% agar dan diinkubasi selama 2--5 hari pada suhu 30° C. Isolat-isolat yang telah bersporulasi ditetesi *Congo Red* 0,5% dan diinkubasi selama 30 menit, kemudian dibilas 3 kali dengan NaCl 2% selama 15 menit. Isolat disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama 2 jam. Diameter koloni yang tumbuh serta diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui Indeks Enzimatik (IE) isolat. Indeks Enzimatik diperoleh dengan membandingkan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni yang tumbuh.

Nilai IE diperoleh dengan rumus sebagai berikut (Florencio dkk. 2012):

$$IE = \frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}}$$

Nilai IE >1,5 dinyatakan sebagai penghasil selulase potensial.

3. Persiapan Mutan dan Mutasi Isolat Terpilih

Mutasi dilakukan secara fisika menggunakan sinar UV, secara kimia dengan larutan EMS, serta kombinasi kedua mutagen (UV dan EMS).

a) Persiapan mutan

Persiapan mutan dilakukan berdasarkan Adsul dkk. (2007) dengan modifikasi. Sebanyak 10 ml akuades steril yang telah ditambahkan 0,01 ml Tween-80 dituang ke dalam medium PDA miring yang berisi isolat terpilih berumur 7 hari (sudah bersporulasi). Suspensi spora divorteks dan diencerkan hingga 10^{-4} . Sebanyak 100 μ l dari masing-masing pengenceran disebar ke dalam cawan petri berisi medium PDA dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30° C. Setiap koloni yang tumbuh dihitung dan dikonversi ke dalam persamaan Hogg (2005).

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni yang tumbuh}}{\text{volume inokulum} \times \text{faktor pengenceran}}$$

b) Mutasi menggunakan sinar ultraviolet (UV)

Mutasi dengan sinar UV berdasarkan modifikasi dari metode Rajeshkumar & Ilyas (2011), serta Radha dkk. (2012). Sebanyak 1 ml suspensi spora (10^4 CFU/ml) disebar ke dalam cawan petri kaca steril untuk diberi perlakuan menggunakan sinar UV.

Suspensi spora dipaparkan pada sinar UV dengan dosis 0,1 J/cm² dan berjarak 13 cm pada panjang gelombang 254 nm. Rentang waktu perlakuan dilakukan per 3 menit, dimulai dari 0, 3, 6, 9, 12, dan 15 menit hingga diperoleh tingkat kematian 90--99%.

Spora yang telah terpapar sinar UV selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 100 µl pellet hasil sentrifugasi disebar ke dalam cawan petri berisi medium PDA lalu diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30° C untuk diamati pertumbuhannya.

c) Mutasi menggunakan larutan etil metil sulfonat (EMS)

Mutasi dengan EMS dilakukan berdasarkan Radha dkk. (2012) dengan modifikasi. Sebanyak 100 µl sel spora (10^4 CFU/ml) diinokulasikan ke dalam 6 tabung Eppendorf. Setiap tabung selanjutnya ditambahkan larutan EMS dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Suspensi spora dan larutan EMS kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks untuk kemudian diinkubasi selama 1 jam dalam *rotary shaker* (60 stroke/menit) pada suhu 26--28° C.

Spora yang telah dimutasi selanjutnya dibilas dengan akuades steril 500 µl dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit. Proses pembilasan dilakukan sebanyak 2 kali. Sebanyak 100 µl pellet disebar ke dalam medium PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30° C untuk diamati pertumbuhannya.

d) Mutasi kombinasi sinar ultraviolet (UV) dan larutan etil metil sulfonat (EMS)

Sebanyak 1 ml (10^4 CFU/ml) suspensi spora dipaparkan pada sinar UV selama 3 menit (waktu optimum hasil pengujian menggunakan sinar UV) dengan dosis $0,1 \text{ J/cm}^2$ dan berjarak 13 cm pada panjang gelombang 254 nm. Suspensi spora 100 µl dalam Eppendorf yang telah dipaparkan dengan sinar UV selanjutnya ditambahkan 2 dan 3 µl EMS (konsentrasi optimum hasil pengujian dengan EMS) dan diinkubasi selama 1 jam di *rotary shaker* (60 stroke/menit) pada suhu 26--28° C. Suspensi spora dibilas 2 kali dengan akuades steril 500 µl dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 100 µl pellet disebar ke dalam medium PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30° C untuk diamati pertumbuhannya.

e) Penapisan aktivitas selulolitik isolat-isolat mutan

Penapisan selulolitik isolat-isolat mutan dilakukan dengan menumbuhkan spora mutan pada medium CMC 1% agar (Teather & Wood 1982).

Koloni-koloni mutan yang tumbuh pada medium PDA diinokulasikan ke dalam medium CMC 1% agar selama 3--7 hari (hingga bersporulasi) pada suhu 30° C. Koloni mutan kemudian ditetesi *Congo Red* 0,5% sebagai indikator pewarna. Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni diukur dan ditentukan nilai IE berdasarkan metode Florencio dkk. (2012). Koloni-koloni mutan yang menunjukkan IE lebih besar dari 1,5 dipilih untuk analisis aktivitas BGL.

4. Produksi dan Pengukuran Aktivitas BGL Isolat-isolat Mutan dan *Wild-type Penicillium* sp. ID10-T065

a) Persiapan starter

Persiapan *starter* berdasarkan Camassola & Dillon (2012). Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 berumur 7--14 hari diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam 10 ml medium basal cair berisi substrat selobiosa 0,1% dan 1% untuk menginduksi aktivitas BGL. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 60 stroke/menit selama 3--5 hari pada suhu 26--28° C.

b) Produksi enzim β -glukosidase (BGL)

Produksi enzim BGL berdasarkan Camassola & Dillon (2012). Sebanyak 2 ml hasil *starter* dituang ke dalam 100 ml medium produksi di dalam Erlenmeyer 250 ml. Kultur diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 60 stroke/menit selama 5 hari pada suhu 26--28° C. Hasil inkubasi kultur disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 20 menit untuk memperoleh supernatan yang akan digunakan sebagai enzim kasar.

c) Pengukuran aktivitas β -glukosidase

Metode pengukuran aktivitas BGL dilakukan berdasarkan Hagget dkk. (1979) dan Zhang dkk. (2009) dengan modifikasi. Sebanyak 0,5 ml enzim kasar ditambahkan dengan 0,5 ml substrat selobiosa 0,1% atau 1% (dalam bufer fosfat

20 mM, pH 7,0) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30° C. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan 1 ml reagen DNS. Larutan kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 15 menit untuk meningkatkan pewarnaan agar absorbansi dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer (Miller 1959). Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan yang terdapat pada kurva standar glukosa.

d) Pembuatan kurva standar glukosa

Glukosa merupakan gula pereduksi yang dilepaskan dalam hidrolisis selobiosa. Penelitian menggunakan kurva standar glukosa untuk mengonversi nilai absorbansi hasil spektrofotometri menjadi nilai gula pereduksi yang dilepaskan. Pembuatan kurva standar glukosa berdasarkan Jurick dkk. (2012) dengan modifikasi.

Kurva standar glukosa dibuat berdasarkan konsentrasi substrat yang digunakan, yaitu kurva standar 0,1% dan 1%. Kurva standar 0,1% dibuat dengan melarutkan 0,05 g glukosa ke dalam 100 ml akuades (500 ppm); sedangkan kurva standar 1% dibuat dengan melarutkan 0,1 g glukosa ke dalam 100 ml akuades (1.000 ppm). Larutan glukosa dipipet ke dalam tabung reaksi secara berseri dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi larutan glukosa (500 ppm) antara lain: 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; dan 500 ppm. Konsentrasi larutan glukosa (1.000 ppm) dimulai dari: 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; dan 1.000 ppm. Setiap konsentrasi larutan glukosa ditambahkan DNS sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 100° C. Larutan didinginkan pada suhu 26--28° C dan nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penapisan Aktivitas Selulase Isolat-isolat *Penicillium* sp.

Penapisan aktivitas selulase isolat-isolat *Penicillium* sp. dilakukan berdasarkan nilai IE. Hasil pengujian penapisan pada 12 isolat *Penicillium* sp. menunjukkan bahwa nilai IE ke-12 isolat bervariasi (Tabel I.1). Nilai IE ke-12 isolat dari yang terkecil hingga terbesar adalah sebagai berikut: 0,17 (ID10-T043); 0,26 (ID10-T017); 0,31 (ID10-T045); 0,50 (ID10-T058); 0,53 (ID10-T035); 1,10 (ID10-T006); 1,11 (ID10-T047); 1,87 (ID10-T009); 3,00 (ID10-T018); dan 4,88 (ID10-T065)); sedangkan dua isolat ID10-T001 dan ID10-T051 nilai IE tidak dapat diukur karena pertumbuhan koloni memenuhi cawan Petri, sehingga zona bening yang dihasilkan tidak dapat diukur. Data menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat yang memiliki nilai IE lebih dari 1,5 cm, yaitu ID10-T009 (1,87), ID10-T018 (3,00) dan ID10-T065 (4,88) (Tabel I.1).

Tabel I.1. Hasil penapisan isolat-isolat *Penicillium* sp. menggunakan metode *Plate Agar Assay* dengan substrat CMC agar 1%

NO.	Kode Isolat	Diameter koloni (d_k) (cm)	Diameter zona bening (d_{zb}) (cm)	IE = $\frac{d_{zb}-d_k}{d_k}$
1.	ID10-T001	-	-	-
2.	ID10-T006	0,62	1,32	1,10
3.	ID10-T009	0,45	1,29	1,87
4.	ID10-T017	0,76	0,95	0,26
5.	ID10-T018	0,75	3,00	3,00
6.	ID10-T035	1,50	2,30	0,53
7.	ID10-T043	1,80	2,10	0,17
8.	ID10-T045	1,90	2,50	0,31
9.	ID10-T047	0,80	1,69	1,11
10.	ID10-T051	-	-	-
11.	ID10-T058	1,00	1,50	0,50
12.	ID10-T065	0,34	2,00	4,88

Keterangan

- : zona bening tidak dapat ditentukan karena pertumbuhan koloni menutupi seluruh permukaan cawan Petri

Nilai IE yang diperoleh menunjukkan tingkat aktivitas hidrolisis selulase. Isolat-isolat yang memiliki nilai IE lebih besar dari 1,5 merupakan isolat potensial penghasil selulase (Florencio dkk. 2012). Variasi nilai IE menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi substrat

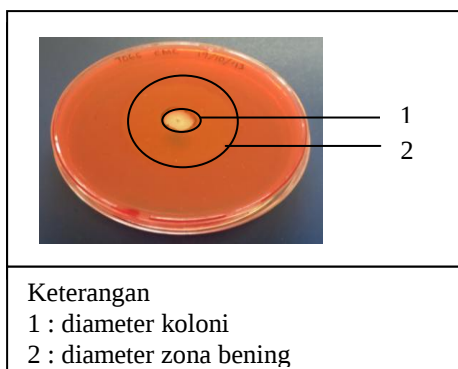
berselulosa dan menghasilkan enzim selulolitik yang bervariasi (Mangunwardoyo dkk. 2011).

Penapisan ke-12 isolat *Penicillium* sp. bertujuan memilih satu isolat potensial penghasil selulase untuk dimutasi dan dianalisis aktivitas BGL-nya. Metode penapisan berdasarkan nilai IE merupakan metode yang sesuai untuk seleksi isolat selulolitik dari genus yang sama (Florencio dkk. 2012). Isolat ID10-T065 memiliki nilai IE tertinggi, yaitu 4,88. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat ID10-T065 menghasilkan serangkaian enzim selulase terbanyak jika dibandingkan dengan ke-11 isolat *Penicillium* sp. lainnya, sehingga isolat tersebut mampu menghidrolisis substrat CMC secara efektif.

Isolat ID10-T001 dan ID10-T051 tidak dapat diukur zona bening yang dihasilkannya dikarenakan pertumbuhan koloni yang cepat hingga memenuhi permukaan Petri. Pertumbuhan yang cepat pada mikroorganisme menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut mampu menggunakan substrat yang digunakan sebagai sumber makanan. Aktivitas hidrolisis suatu mikroorganisme terhadap substrat selulosa pada awalnya berlangsung lambat dikarenakan konsentrasi enzim masih sedikit. Akan tetapi, ketika selulosa telah dihidrolisis akan menginduksi sekresi enzim sehingga enzim yang disekresikan ke substrat meningkat dan hidrolisis substrat berlangsung makin cepat (Jørgensen & Olsson 2006). Pertumbuhan isolat ID10-T001 dan ID10-T051 yang cepat pada substrat CMC menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut telah memiliki serangkaian enzim CMCase (= EG), sehingga ketika ditumbuhkan dalam substrat CMC sel langsung mengenali substrat dan menyekresikan enzim tanpa proses adaptasi induksi enzim.

Proses penapisan menggunakan metode *Plate Agar Assay*, yaitu menumbuhkan mikroorganisme pada medium agar berisi substrat yang sesuai dengan kerja enzim (Castro dkk. 1995; Ranoa dkk. 2005). Penelitian menggunakan medium padat dengan CMC 1% sebagai substrat, serta *Congo Red* 0,5% sebagai pewarna kromogenik (Gambar I.1). Metode penapisan menggunakan medium padat merupakan metode yang efektif, sederhana, dan cepat karena habitat alami fungi adalah berupa substrat padat (Castro dkk. 1995; Yoon dkk. 2007; Doolotkeldieva & Bobusheva 2011). Penapisan dilakukan

dengan menganalisis pembentukan zona bening pada tiap isolat. Zona bening yang terbentuk menandakan isolat mampu menggunakan substrat sebagai sumber karbon dengan menghasilkan enzim ekstraseluler untuk hidrolisis substrat menjadi unit lebih sederhana (Castro dkk. 1995; Ranoa dkk. 2005).



Gambar I.1. Pembentukan zona bening pada isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 pada medium CMC agar 1% ditambah *Congo Red* 0,5%

Penapisan menggunakan substrat CMC dan pewarna *Congo Red* merupakan metode umum dalam penapisan mikroorganisme selulolitik, seperti yang dilakukan Doolotkeldieva & Bobusheva (2011) dalam menganalisis isolat-isolat *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Trichoderma* (CMC 0,1% + *Congo Red* 0,1%); serta Kwon dkk. (2007) dalam menganalisis isolat-isolat *Fusarium* (CMC 0,5% + *Congo Red* 0,5%). Selain CMC, substrat yang dapat digunakan untuk penapisan selulase pada medium padat adalah selobiosa dan avicel. Sebagai contoh, Yoon dkk. (2007) menganalisis isolat-isolat *Penicillium* menggunakan 0,5% selobiosa + *Congo Red* 0,5%; serta Florencio dkk. (2012) yang menganalisis kemampuan selulolase isolat-isolat *Trichoderma* menggunakan substrat Avicel 0,5% + *Congo Red* 0,25%.

Kwon dkk. (2007) mengajukan indikator zona bening yang terbentuk sebagai penanda efektivitas kemampuan hidrolisis enzim. Berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk, aktivitas hidrolisis enzim dibagi menjadi tiga, yaitu: (1) kategori kuat dengan zona bening sebesar 2,5--4 cm; (2) kategori sedang dengan zona bening sebesar 1--2,4 cm; dan (3) kategori lemah atau tidak memiliki aktivitas apabila zona bening kurang dari 1 cm. Berdasarkan ke-tiga kategori tersebut, maka isolat ID10-T065 masuk dalam kategori kuat, ID10-T018 masuk dalam kategori sedang, dan 8 isolat lainnya (ID10-T009, ID10-T017, ID10-T035,

ID10-T043, ID10-T045, ID10-T047, dan ID10-T058) memiliki aktivitas yang lemah (Tabel I.1).

Metode penghitungan aktivitas enzim berdasarkan zona bening sebagai indikator juga dilaporkan oleh Yoon dkk. (2007), akan tetapi dengan kisaran nilai zona bening yang berbeda. Aktivitas hidrolisis enzim dinyatakan kuat jika ukuran zona bening lebih dari 0,5 cm; aktivitas sedang jika zona bening berkisar 0,1--0,4 cm; dan aktivitas lemah jika ukuran zona bening kurang dari 0,1 cm. Berdasarkan hal tersebut, maka ke-10 isolat yang menghasilkan zona bening memiliki aktivitas hidrolisis enzim yang kuat karena zona bening yang dihasilkan lebih dari 0,5 cm.

Metode alternatif penapisan mikroorganisme yang mampu mendegradasi polisakarida adalah dengan melakukan presipitasi polisakarida ke permukaan medium padat pada suhu rendah 5° C (Castro dkk. 1995). Selain itu, dapat juga dilakukan dengan menggunakan medium padat berisi selulosa-azur pada tabung reaksi seperti yang dilaporkan Mangunwardoyo dkk. (2011). Aktivitas selulase ditunjukkan dengan berdifusinya zat warna azur ke dalam medium. Semakin tinggi intensitas difusi azur menunjukkan semakin tinggi kemampuan suatu isolat menghasilkan selulase (Smith 1977).

2. Mutagenesis

a) Hasil *Total Plate Count* (TPC)

Total Plate Count (TPC) dilakukan sebelum dilakukan mutasi untuk menentukan tingkat pengenceran suspensi spora yang digunakan. Pengenceran dilakukan sebanyak tiga tingkatan, yaitu 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} . Pengenceran dilakukan sebanyak 4 ulangan. Hasil TPC pada pengenceran 10^{-4} diperoleh rerata koloni sebanyak $6,5 \times 10^{-5}$ CFU/ml; sedangkan rerata koloni pada pengenceran 10^{-5} adalah sebanyak 9×10^{-5} CFU/ml. Tingkat pengenceran 10^{-6} koloni hanya memiliki rerata 1×10^{-6} CFU/ml (Tabel I.2).

Tabel I.2. Hasil *Total Plate Count* (TPC) spora *Penicillium* sp. ID10-T065 pada medium PDA, berumur 4 hari, suhu inkubasi 30° C

Pengenceran	Jumlah Koloni (CFU/ml)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Rerata
10^{-4}	66	53	61	80	65
10^{-5}	9	7	9	11	9
10^{-6}	0	2	-	-	1

Total koloni isolat sebelum mutasi dihitung untuk mengetahui total koloni pada lingkungan alami. Proses mutasi fungi umumnya dilakukan pada total koloni berkisar 10^6 spora/ml (Rajeshkumar & Ilyas 2011; Afifi dkk. 2013); 10^7 spora/ml (Dillon dkk. 1992; Adsul dkk. 2007; Ramzan dkk. 2013); serta 10^8 spora/ml (Winston 2008; Liu dkk. 2011; Radha dkk. 2012). Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 memiliki total koloni kurang dari 30 CFU/ml pada tingkat pengenceran 10^{-6} . Oleh sebab itu, tingkat pengenceran diturunkan dengan menghitung CFU pada 10^{-4} serta 10^{-5} . Hasil TPC menunjukkan bahwa tingkat pengenceran yang memenuhi syarat adalah pengenceran 10^{-4} karena memiliki kisaran koloni di antara 30--300 CFU/ml (Tabel I.2). Pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} tidak dapat digunakan karena total koloni terlalu sedikit, yaitu di bawah 30 CFU/ml (Gandjar dkk. 1992; Hogg 2005). Berdasarkan data yang diperoleh, maka tingkat pengenceran yang digunakan dalam proses mutasi spora *Penicillium* sp. ID10-T065 adalah 10^{-4} .

b) Perolehan koloni mutan

Koloni mutan yang tumbuh pada medium PDA dihitung dan dibandingkan dengan koloni kontrol (*wild-type*). Jumlah koloni isolat kontrol (perlakuan ke-0) pada pemaparan sinar UV adalah sebanyak 175 koloni, sedangkan isolat mutan yang tumbuh sebanyak 7 koloni pada perlakuan ke-1 (waktu pemaparan 3 menit). Koloni mutan pada pemaparan di atas 3 menit menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni (0 koloni). Perlakuan menggunakan EMS menghasilkan koloni kontrol sebanyak 76 koloni; perlakuan ke-1 menghasilkan 6 koloni; perlakuan ke-2 sebanyak 2 koloni; dan perlakuan ke-3 sebanyak 1 koloni. Pertumbuhan mutan tidak terjadi pada perlakuan ke-4 dan ke-5. Perlakuan mutasi kombinasi menghasilkan total koloni kontrol sebanyak 37 koloni dan mutan

sebanyak 31 koloni (3 menit UV dan 1% EMS), 10 koloni (3 menit UV dan 2% EMS), serta 8 koloni (3 menit UV dan 3% EMS) (Tabel I.3).

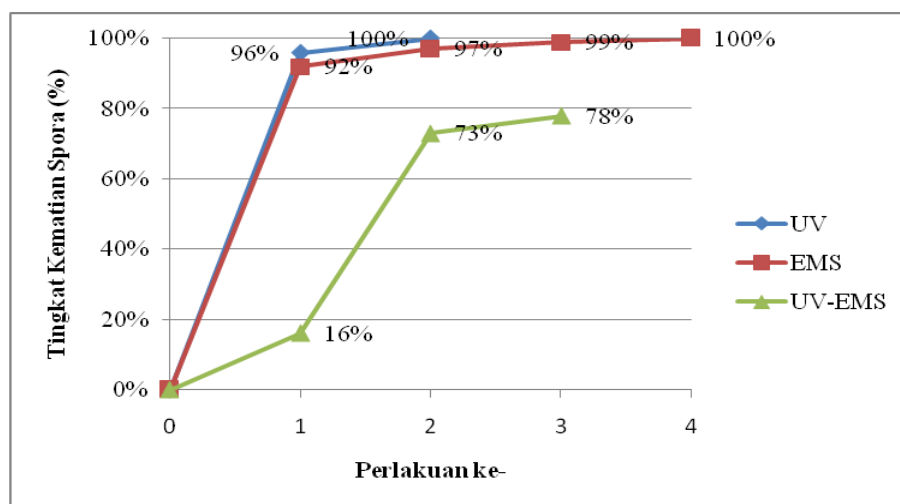
Tabel I.3. Perolehan koloni hasil mutasi UV, EMS, dan kombinasi UV-EMS pada *Penicillium* sp. ID10-T065

Perlakuan ke-	UV		EMS		UV-EMS	
	Perlakuan (menit)	Jumlah koloni (CFU/ml)	Perlakuan (%)	Jumlah koloni (CFU/ml)	Perlakuan (menit ke- & konsentrasi EMS %)	Jumlah koloni (CFU/ml)
0	0	175	0	76	0	37
1	3	7	1	6	3--1%	31
2	6	0	2	2	3--2%	10
3	9	0	3	1	3--3%	8
4	12	0	4	0		
5	15	0	5	0		

Penghitungan koloni mutan dan kontrol dilakukan untuk mengetahui tingkat kematian yang terjadi pada setiap perlakuan. Berdasarkan Solov'eva dkk. (2005), tingkat kematian sebesar 95--99% merupakan kisaran umum untuk mendapatkan mutan potensial. Hasil pemaparan sinar UV menunjukkan bahwa pada menit ke-3 (perlakuan ke-1) tingkat kematian spora telah mencapai 96% (7 koloni) dan mencapai 100% (0 koloni) pada menit ke-6 (perlakuan ke-2) (Gambar I.2).

Tingkat kematian spora pada mutan hasil pemaparan EMS pada perlakuan ke-1 (konsentrasi EMS 1%) mencapai 92% (6 koloni); pada perlakuan ke-2 (konsentrasi EMS 2%) mencapai 97% (2 koloni); dan pada perlakuan ke-3 (konsentrasi EMS 3%) telah mencapai 99% (1 koloni). Tingkat kematian spora 100% (0 koloni) terjadi pada perlakuan ke-4 (konsentrasi EMS 4%) (Gambar I.2).

Perlakuan mutasi kombinasi UV-EMS (radiasi UV selama 3 menit dilanjutkan pemaparan EMS 1--3% selama 1 jam) menunjukkan bahwa kematian spora mencapai 16% (UV 3 menit, EMS 1%), 73% (UV 3 menit, EMS 2%), serta 78% (8 koloni) (Gambar I.2).



Gambar I.2. Tingkat kematian spora mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

Tingkat kematian spora dihitung untuk mengetahui daya bertahan hidup mutan pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Mikroorganisme yang mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan menandakan bahwa mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan memodifikasi gen sehingga sel dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru (Chand dkk. 2005; Adrio & Demain 2006; Kovacs dkk. 2008; Pradeep dkk. 2012). Semakin tinggi tingkat kematian, maka kemungkinan modifikasi gen yang terjadi juga semakin tinggi.

Data hasil mutasi menunjukkan bahwa dosis sinar UV optimum dalam memutasi spora *Penicillium* sp. ID10-T065 adalah $0,1 \text{ J/cm}^2$, berjarak 13 cm dengan panjang gelombang 254 nm selama 3 menit. Konsentrasi EMS optimum adalah sebanyak 3% (perlakuan ke-3) karena menghasilkan tingkat kematian spora sebesar 99%.

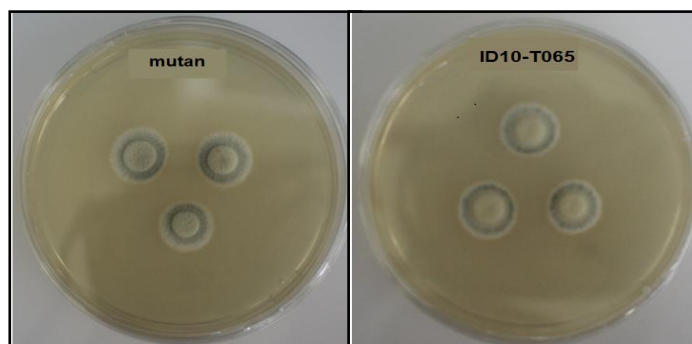
Pertumbuhan koloni mutan dari perlakuan kombinasi, ternyata tidak mencapai tingkat kematian yang diharapkan, yaitu sebesar 95--99%. Tingkat kematian maksimum hanya mencapai 78% (Gambar I.2). Berdasarkan Solov'eva dkk. (2005), tingkat kematian sebesar 95--99% menunjukkan mutan tersebut sebagai mutan potensial.

Salah satu hal yang sebaiknya diperhatikan dalam menganalisis koloni mutan adalah mengamati perubahan morfologi yang terjadi, seperti perubahan warna koloni. Warna koloni merupakan karakter penting bagi mikroorganisme

penghasil pigmen karena menentukan perubahan pigmen yang dihasilkan (Adrio & Demain 2006).

Seluruh koloni mutan *Penicillium* sp. menunjukkan karakter morfologi sama dengan morfologi *wild-type*, yaitu spora berwarna hijau dengan tekstur seperti beludru dan tepi koloni rata dengan diameter koloni sekitar 0,5--1 cm. Permukaan koloni isolat berwarna hijau dengan miselium berwarna putih (Gambar I.3) (Zhao dkk. 2010).

Keberhasilan mutasi tidak selalu diukur berdasarkan perbedaan karakter fenotipe atau pertumbuhan mutan yang dihasilkan, akan tetapi lebih kepada peningkatan produksi dan sekresi enzim. Pertumbuhan dan karakter fenotipe mutan *Ashbya gossypii* tidak menunjukkan perbedaan dengan *wild-type*, namun aktivitas enzim ekstraseluler isolat tersebut menunjukkan peningkatan hingga 3 kali lipat dari *wild-type* (Ribeiro dkk. 2013).



Gambar I. 3. Morfologi koloni isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 *wild-type* beserta mutan yang ditumbuhkan pada medium PDA selama 4 hari pada suhu 30° C

3. Penapisan Aktivitas Selulase Mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

Hasil pengujian penapisan aktivitas selulase mutan *Penicillium* sp. ID10-T065 dapat dilihat pada Tabel I.4. Sebanyak 15 isolat (14 isolat mutan + 1 isolat *wild-type*) diuji kemampuan menghasilkan zona bening menggunakan metode Teather & Wood (1982). Isolat mutan yang memiliki nilai IE tertinggi dari masing-masing perlakuan mutasi akan dipilih untuk dianalisis aktivitas BGL-nya.

Tabel I.4. Nilai Indeks Enzimatis (IE) isolat *wild-type* dan mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

No.	Kode Isolat	Diameter koloni (d_k) (cm)	Diameter zona bening (d_{zb}) (cm)	IE = $\frac{d_{zb}-d_k}{d_k}$
1.	<i>Wild-type</i>	0,80	2,50	2,13
2.	UV ₁₁	0,48	1,53	2,21
3.	UV ₁₂	0,49	1,63	2,32
4.	UV ₁₃	1,00	3,40	2,40
5.	UV ₁₄	0,53	1,73	2,30
6.	UV ₁₅	0,54	1,77	2,27
7.	EM ₂₁	0,65	2,20	2,38
8.	EM ₂₂	0,56	1,93	2,45
9.	EM ₃₁	0,45	1,70	2,73
10.	UM ₂₁	0,65	2,29	2,52
11.	UM ₂₂	0,90	2,15	1,39
12.	UM ₂₃	0,88	3,30	2,66
13.	UM ₃₁	0,81	2,93	2,62
14.	UM ₃₂	0,50	1,76	2,52
15.	UM ₃₃	0,90	1,70	0,89

Penapisan aktivitas selulase pada mutan hasil paparan sinar UV dilakukan pada lima isolat, yaitu UV₁₁, UV₁₂, UV₁₃, UV₁₄ dan UV₁₅. Nilai IE dari mutan UV memiliki kisaran mulai dari 2,2 hingga 2,4. Mutan UV₁₃ memiliki nilai IE tertinggi (2,40) jika dibandingkan dengan UV₁₁ (2,21), UV₁₂ (2,32), UV₁₄ (2,30) dan UV₁₅ (2,27) (Tabel I.4).

Penapisan aktivitas selulase pada mutan hasil paparan EMS dilakukan pada tiga isolat yang berasal dari konsentrasi EMS 2% (EM₂₁ dan EM₂₂), serta konsentrasi 3% (EM₃₁). Kisaran nilai IE yang diperoleh pada mutan EMS sekitar 2,3--2,7. Nilai IE EM₃₁ (2,73) menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan EM₂₁ (2,38) dan EM₂₂ (2,45) (Tabel I.4).

Sebanyak enam mutan hasil mutasi kombinasi (UV-EMS) diukur nilai IE nya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa mutan UM₂₃ memiliki IE tertinggi (2,66) dibandingkan nilai IE UM₂₁ (2,52), UM₂₂ (1,39), UM₃₁ (2,62), UM₃₂ (2,52) dan UM₃₃ (0,89) (Tabel I.4).

Nilai IE ke-3 mutan EMS memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan ke-5 mutan UV. Hasil tersebut menunjukkan bahwa mutan hasil induksi EMS memiliki kemampuan menghidrolisis CMC lebih efektif dibandingkan mutan UV. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Radha dkk. (2012), yaitu mutan hasil

induksi EMS lebih efektif dibandingkan mutan UV ketika dilakukan penapisan menggunakan metode *Plate Agar Assay*. Radha dkk. melaporkan bahwa aktivitas proteolitik mutan EMS (85 mm) *Aspergillus niger* lebih efektif menghidrolisis substrat dibandingkan mutan UV (75 mm) ketika ditumbuhkan pada medium padat berisi kasein.

Nilai IE pada mutan UV-EMS (UM₂₁--UM₃₃) menunjukkan nilai yang tidak stabil. Data menunjukkan bahwa empat isolat mutan (UM₂₁, UM₂₃, UM₃₁, dan UM₃₂) memiliki nilai IE yang lebih besar dari 1,5, yaitu sekitar 2,5--2,6. Akan tetapi, ada dua isolat yang mengalami penurunan nilai IE jika dibandingkan dengan *wild-type* (2,13), yaitu 1,39 pada mutan UM₂₂ dan 0,89 pada mutan UM₃₃. Variasi nilai IE pada mutan kombinasi UV-EMS menunjukkan bahwa kemampuan mutan-mutan tersebut dalam menghidrolisis substrat masih belum stabil. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan El-Bondkly & Keera (2007), yaitu mutasi kombinasi UV dan EMS dapat menginduksi variabilitas genetik, namun aktivitas enzim yang dihasilkan terkadang kurang stabil.

Berdasarkan parameter Florencio dkk. (2012), maka 12 mutan (UV₁₁, UV₁₂, UV₁₃, UV₁₄, UV₁₅, EM₂₁, EM₂₂, EM₃₁, UM₂₁, UM₂₃, UM₃₁, dan UM₃₂) merupakan isolat potensial penghasil selulase karena memiliki nilai IE lebih besar dari 1,5; sedangkan mutan UM₂₂ dan UM₃₃ memiliki nilai IE lebih kecil dari 1,5. Tiga mutan yang memiliki nilai IE tertinggi dari setiap perlakuan mutasi selanjutnya dianalisis aktivitas BGL-nya untuk dibandingkan dengan aktivitas *wild-type*.

4. Aktivitas β -glukosidase Mutan Terpilih dan *Wild-type*

Berdasarkan data penapisan, maka dipilih masing-masing satu mutan dengan nilai IE tertinggi dari tiap perlakuan. Mutan-mutan tersebut, antara lain: UV₁₃ (2,40), EM₃₁ (2,73), dan UM₂₃ (2,66). Analisis aktivitas BGL dilakukan menggunakan substrat selobiosa yang diketahui sebagai induser alami BGL (Mandels & Reese 1960; Zhang dkk. 2006). Analisis dilakukan dengan mengukur aktivitas BGL pada dua konsentrasi substrat yang berbeda, yaitu 0,1% dan 1%.

a) Konsentrasi substrat

Aktivitas BGL diproduksi pada medium basal cair berisi selobiosa 0,1% dan 1%. Data aktivitas BGL dapat dilihat pada Tabel I.5.

Tabel I.5. Aktivitas BGL mutan dan *wild-type* pada dua konsentrasi substrat

Kode Isolat	Aktivitas BGL (U/ml)		Peningkatan aktivitas BGL (U/ml)	Peningkatan aktivitas BGL (kali lipat)
	Selobiosa 0,1%	Selobiosa 1%		
<i>Wild-type</i>	1,78	1,78	0,00	-
UV ₁₃	1,88	5,53	3,65	2,94
EM ₃₁	1,86	4,26	2,41	2,30
UM ₂₃	1,80	1,75	-0,05	-

Hasil pengukuran aktivitas enzim menunjukkan bahwa aktivitas BGL pada konsentrasi substrat 1% lebih tinggi dibandingkan aktivitas BGL pada konsentrasi substrat 0,1%, kecuali pada mutan UM₂₃. Peningkatan aktivitas BGL tertinggi terdapat pada mutan UV₁₃, yaitu sebesar 3,65 U/ml (2,94 kali), sedangkan mutan EM₃₁ memiliki kenaikan sebesar 2,41 U/ml (2,30 kali) dari *wild-type*. Aktivitas BGL mutan UM₂₃ menunjukkan penurunan sebesar 0,05 U/ml. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa selobiosa dapat menginduksi peningkatan aktivitas BGL pada mutan. Peningkatan aktivitas BGL pada mutan *Penicillium* sp. ID10-T065 memiliki pola yang sama dengan mutan *Trichoderma reesei* ATCC66589. Ike dkk. (2010) melaporkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas BGL pada mutan *T. reesei* ATCC66589 sebesar 1,85 kali (M3-1) dan 4,65 kali (M2-1) dibandingkan aktivitas BGL *wild-type* ketika ditumbuhkan pada medium produksi yang berisi substrat selobiosa.

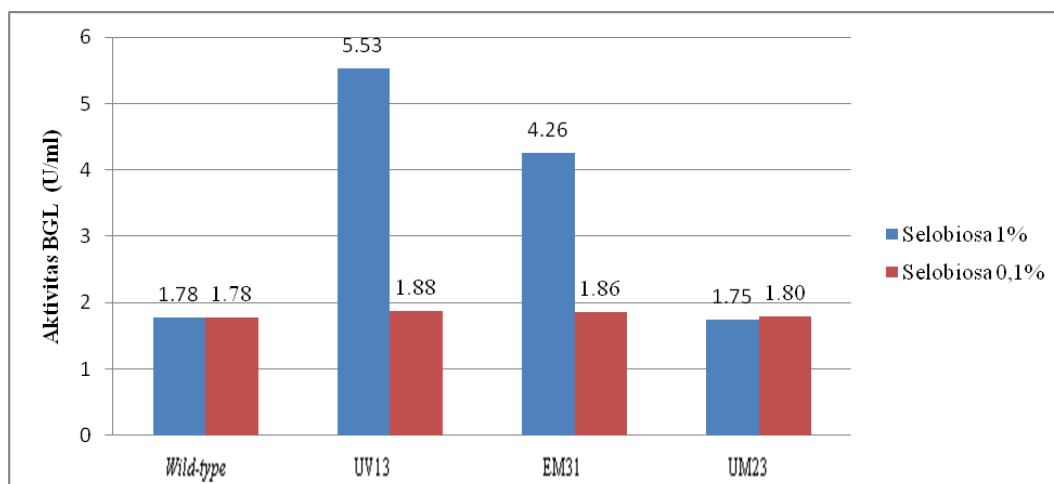
Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi selobiosa yang digunakan, maka akan semakin meningkatkan aktivitas BGL yang dihasilkan. Peningkatan aktivitas BGL pada mutan UV₁₃ dan EM₃₁ lebih tinggi ketika ditumbuhkan dalam medium berisi selobiosa 1% dibandingkan medium selobiosa 0,1%. Roy dkk. (1988) melaporkan bahwa peningkatan aktivitas BGL pada fungi *Myceliophthora thermophila* berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi induser. Aktivitas BGL pada fungi *M. thermophila* yang ditumbuhkan pada medium produksi berisi selobiosa mencapai maksimum pada konsentrasi 0,25%. Aktivitas BGL akan menurun apabila konsentrasi selobiosa terus dinaikkan (lebih besar dari 0,25%).

Glukosa dianggap sebagai represor dari sistem selulase atau disebut sebagai *carbon catabolite repression* (CCR) (Ike dkk. 2010; Seiboth dkk. 2011). Hal tersebut dibuktikan dengan tidak terbentuknya selulase selama mikroorganisme selulolitik ditumbuhkan pada glukosa (Bhat & Bhat 1997). Glukosa dengan konsentrasi tinggi dapat menghalangi situs aktif substrat sehingga reaksi enzimatik tidak bekerja (Krogh dkk. 2010). Oleh sebab itu, konsentrasi selobiosa sebagai substrat memiliki batas maksimum untuk membatasi jumlah glukosa di lingkungan sel.

Kenaikan aktivitas BGL juga menunjukkan bahwa BGL bekerja efektif menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa, sehingga tidak terjadi akumulasi selobiosa di luar atau di dalam sel. Akumulasi selobiosa di dalam atau luar sel dapat menghambat sekresi EG dan CBH (Mfombep dkk. 2013; Sørensen dkk. 2013). Glukosa yang dihasilkan akan langsung digunakan oleh sel sebagai sumber karbon untuk proses asimilasi sehingga tidak terjadi penghambatan sintesis selulase (Fowler & Brown 1992; Suto & Tomita 2001).

Regulasi dalam produksi selulase dikendalikan oleh mekanisme aktivasi/induksi dan represi yang terjadi pada tingkat transkripsi (Lynd dkk. 2002; Sukumaran dkk. 2005). Produksi selulase oleh fungi dikontrol oleh keseimbangan molekul induser dan represor yang keduanya diperoleh dari selulosa (Ike dkk. 2010). Produksi enzim selulolitik akan terinduksi jika ada substrat selulosa, dan akan terhambat jika ada sumber gula yang mudah digunakan (unit monomer selulosa) (Sukumaran dkk. 2005; Ike dkk. 2010). Proses induksi selulase pada *Penicillium* dapat dipelajari dari spesies *Penicillium purpurogenum* (Suto & Tomita 2001). Beberapa contoh induser yang sering digunakan dalam produksi selulase, antara lain: soforosa, gentiobiosa, selobiosa, dan laktosa (Suto & Tomita 2001; Sukumaran dkk. 2005; Seiboth 2011).

Soforosa mampu menginduksi selulase hingga 2.500 kali dari selobiosa pada *T. reesei*, sedangkan gentiobiosa mampu menginduksi selulase hingga 50 kali dari selobiosa pada *P. purpurogenum* (Mandels dkk. 1962; Kurasawa dkk. 1992; Suto & Tomita 2001). Gentiobiosa bukan merupakan sakarida alami, melainkan dihasilkan melalui transglukosilasi selobiosa oleh BGL intraseluler. Gentiobiosa yang dihasilkan menginduksi sintesis selulase. Selulase disekresikan



Gambar I.5. Perbandingan aktivitas BGL mutan dan *wild-type* pada konsentrasi substrat selobiosa 0,1% dan 1%

Table I.6. Perbandingan aktivitas β -glukosidase (BGL) mutan dan *wild-type* *Penicillium* sp. ID10-T065

Kode isolat	Aktivitas BGL (U/ml)	Peningkatan aktivitas mutan dari <i>wild-type</i> (U/ml)	Peningkatan aktivitas mutan dari <i>wild-type</i> (kali lipat)
Selobiosa 0,1%			
<i>Wild-type</i>	1,78	-	-
UV13	1,88	0,10	1,06
EM31	1,86	0,08	1,04
UM23	1,80	0,02	1,01
Selobiosa 1%			
<i>Wild-type</i>	1,78	-	-
UV13	5,53	3,75	3,11
EM31	4,26	2,48	2,39
UM23	1,75	-0,03	-

Aktivitas BGL mutan UV₁₃ pada substrat 0,1% (1,88 U/ml) menunjukkan peningkatan sebesar 1,06 kali dibandingkan *wild-type* (1,78 U/ml) dan ketika substrat dinaikkan menjadi 1% aktivitas BGL meningkat 3,11 kali (5,53 U/ml) dari *wild-type*. Peningkatan aktivitas BGL pada mutan UV₁₃ menunjukkan peningkatan terbesar dibandingkan dua mutan lainnya (EM₃₁ dan UM₂₃) (Tabel I.6). Hal tersebut menunjukkan bahwa mutasi menggunakan sinar UV lebih efektif untuk meningkatkan aktivitas BGL pada *Penicillium* sp. ID10-T065 dibandingkan EMS atau kombinasi UV-EMS. Pernyataan tersebut sesuai dengan referensi yang menyatakan bahwa sinar UV merupakan mutagen potensial dan

efektif jika dibandingkan dengan EMS untuk meningkatkan aktivitas enzim-enzim komersial (Ager & Haynes 1990; Agrawal dkk. 1999; Pfeifer dkk. 2005).

Peningkatan aktivitas BGL pada mutan fungi setelah terpapar sinar UV telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Dillon dkk. (1992) melaporkan bahwa pemaparan sinar UV pada strain *Penicillium* sp. dapat meningkatkan aktivitas BGL sebesar 1--1,75 kali dari *wild-type*. Kuhad dkk. (1994) melaporkan peningkatan BGL oleh mutan *Fusarium oxysporum* (UV-11) sebesar 1,25 kali dari *wild-type*. Ike dkk. (2010) melaporkan bahwa pemaparan sinar UV selama lima menit pada strain *T. reesei* ATCC66589 menghasilkan dua mutan potensial, yaitu M2-1 dan M3-1. Peningkatan aktivitas BGL pada kedua mutan menunjukkan kenaikan sebesar 4,65 kali (M2-1) dan 1,85 kali (M3-1) dari strain *wild-type*. Javed dkk. (2011) melaporkan peningkatan aktivitas BGL pada mutan *Humicola insolens* TAS-13, TAS-13_{UV-4}, meningkat sebesar 19% dari *wild-type* setelah dipaparkan UV.

Sinar UV dapat mengakibatkan kerusakan DNA serta menginduksi mutasi (Ikehata & Ono 2011). Salah satu efek utama dari mutasi dengan sinar UV, yaitu dapat mengakibatkan perubahan struktur pirimidin (sitosin ataupun timin) sehingga akan mengakibatkan terjadinya dimer pirimidin. Dimer pirimidin dapat merusak struktur heliks DNA dan menghambat proses replikasi lebih lanjut (Pfeifer dkk. 2005; Irfan dkk. 2011). Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan terjadi peningkatan gen pengode enzim pada DNA serta peningkatan ekspresi gen sehingga aktivitas enzim juga mengalami peningkatan (Shafique dkk. 2009).

Etil metil sulfonat (EMS) diketahui sebagai agen alkilasi yang bersifat mutagenik, dapat menginduksi perubahan struktur DNA secara permanen (Sega 1984; Hogg 2005; Elakkiya & Muralikrishnan 2014). Aktivitas BGL oleh mutan EMS, EM₃₁ (1,86 U/ml), ketika ditumbuhkan pada konsentrasi substrat 0,1% menunjukkan peningkatan sebesar 0,08 U/ml atau sekitar 1,04 kali dari *wild-type* (1,78 U/ml). Peningkatan yang lebih besar terjadi ketika isolat EM₃₁ ditumbuhkan pada konsentrasi substrat 1%, yaitu terjadi kenaikan hingga 2,48 U/ml (2,39 kali dari *wild-type*) (Tabel I.6).

Chandra dkk. (2009) melaporkan bahwa aktivitas BGL pada mutan *Trichoderma citrinoviride* hasil mutasi EMS-EtBr menunjukkan peningkatan

sebesar 1,73 kali pada medium berisi substrat selobiosa. Perlakuan mutasi menggunakan EMS pada *Ashbya gossypii* dapat meningkatkan aktivitas enzim ekstraseluler seperti endoglukanase, α -amilase, dan β -glukosidase hingga 3 kali lipat dari *wild-type* (Ribeiro dkk. 2013). Ramzan dkk. (2013) melaporkan bahwa aktivitas enzim ligninase dari mutan *Trametes versicolor* oleh EMS meningkat sebanyak 3,2 kali lipat dari *wild-type*. Perlakuan mutasi dengan EMS juga dapat meningkatkan keratinase serta peptidase lain pada *Candida parapsilopsis* (Duarte dkk. 2011).

Perlakuan mutasi kombinasi UV-EMS bertujuan untuk menghasilkan mutan dengan aktivitas enzim lebih tinggi dari mutan UV atau EMS. Kombinasi UV dan EMS dapat menginduksi variabilitas genetik yang besar sehingga diharapkan dapat menghasilkan aktivitas enzim lebih besar (El-Bondkly & Keera 2007). Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas BGL pada mutan kombinasi (UM₂₃) ternyata memiliki aktivitas enzim lebih rendah dari mutan-mutan UV atau EMS, yaitu sebesar 1,80 U/ml (substrat 0,1%) dan 1,75 U/ml (substrat 1%) (Tabel I.6). Ager & Haynes (1990) menyatakan bahwa penambahan EMS setelah mutasi UV dapat mengarah pada terhambatnya proses perbaikan sel. Penurunan aktivitas dapat terjadi akibat adanya alkilasi sehingga menghambat proses perbaikan sel yang menyebabkan aktivitas enzim menurun.

Mutan UM₂₃ selain menunjukkan aktivitas enzim yang rendah dibandingkan mutan lainnya, juga menunjukkan ketidakstabilan aktivitas BGL. Ketidakstabilan tersebut ditunjukkan oleh nilai aktivitas BGL yang berfluktuasi, kadang lebih tinggi dan terkadang lebih rendah dari *wild-type*. Hal tersebut kemungkinan terjadi akibat mutan yang diperoleh tidak mencapai tingkat kematian 95--99%, sedangkan mutan dari UV dan EMS tingkat kematiannya mencapai 96--99%. Tingkat kematian yang mendekati konsentrasi subletal dapat meningkatkan aktivitas enzim pada mutan (Chand dkk. 2005). Penurunan aktivitas BGL setelah dilakukan mutasi kombinasi pernah dilaporkan oleh Adsul dkk. (2007). Aktivitas BGL mutan *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 yang diperoleh dari paparan EMS-UV, mengalami penurunan (dari 7,0 U/ml menjadi 6,0 U/ml).

KESIMPULAN

Mutasi dengan paparan sinar UV lebih efektif dalam meningkatkan aktivitas BGL pada isolat mutan dan *wild-type Penicillium* sp. ID10-T065 dibandingkan dengan EMS atau kombinasi UV-EMS. Mutasi dengan sinar UV dapat meningkatkan aktivitas BGL sebesar 1--3,11 kali; sedangkan dengan EMS sebesar 1--2,39 kali dari *wild-type*. Mutan hasil kombinasi UV-EMS menunjukkan ketidakstabilan aktivitas BGL.

DAFTAR ACUAN

- Adrio, J.L. & A.L. Demain. 2006. Genetic improvement of process yielding microbial products. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **30**: 187--214
- Adsul, M.G., A.P. Terwadkar, A.J. Varma & D.V. Gokhale. 2009. Cellulase from *Penicillium janthinellum* mutants: Solid-state production and their stability in ionic liquids. *BioResources* **4**(4): 1670--1681.
- Adsul, M.G., K.B. Bastawde, A.J. Varma & D.V. Gokhale. 2007. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology* **98**: 1467--1473.
- Afifi, A.F., H.I. Abo-Elmagd & M.M. Housseiny. 2014. Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL 792 through physical and chemical mutation, optimization, characterization and genetic variation between mutant and wild-type strains. *Annals of Microbiology* **64**: 521--530.
- Ager, D. D. & R. H. Haynes. 1990. Analysis of interactions between mutagens, II. Ethyl methanesulfonate and ultraviolet light in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **232**: 327--336.
- Agrawal, R., A. Satlewal & A. K. Verma. 2013. Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *3 Biotech*: 381--388.
- Bhat, M. K. & S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. *Biotechnology Advances* **15**(3): 583--620.

- Breuil, C., P. Mayers & J.N. Saddler. 1986. Substrate conditions that influence the assays used for determining the β -glucosidase activity of cellulolytic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* **28**: 1653--1656.
- Camassola, M. & A.J.P. Dillon. 2012. Steam exploded sugarcane bagasse for on site production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Energy Fuels* (26): 5316--5320.
- Castro, G.R., M.D. Baigori & F. Sineriz. 1995. A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **22**: 51--56.
- Chand, P., A. Aruna, A.M. Maqsood & L.V. Rao. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 318--323.
- Chandra, M., A. Kalra, N.S. Sangwan, S.S. Gaurav, M.P. Darokar & R. S. Sangwan. 2009. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology* **100**: 1659-1662.
- Dasthban, M., M. Maki, K.T. Leung, C. Mao & W. Qin. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*: 1--8.
- Dillon, A.J.P., S.O. Paesi-Toresan & L.P. Barp. 1992. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp. strain denominated 3MUV24. *Brazilian Journal of Genetics* **15**(3): 491--498.
- Doolotkeldieva, T.D. & S.T. Bobusheva. 2011. Screening of wild-type fungal isolates for cellulolytic activity. *Microbiology Insights* **4**: 1--10.
- Duarte, T.R., S.S. Oliveira, A. Macrae, S.M.L. Cedrola, A.M. Mazotto, E.P. Souza, C.A.N. Melo & A.B. Vermelho. 2011. Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parasilopsis* mutants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **44**(3): 212--216.
- Elakkiya, P. & V. Muralikrishnan. 2014. Physical and chemical mutation of cellulase producing fungi *Trichoderma viride*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* **1**(6):1--6.

- EL-Bondkly, A.M. & A.A. Keera. 2007. UV- and EMS- induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii*. *Arab Journal of Biotechnology* **10**(2): 241--248.
- Fahrurrozi, S. Ratnakomala, T. Anindyawati, P. Lisdiyanti & E. Sukara. 2010. Rapid assesment of diverse Trichoderma isolates of Indonesian origin for cellulase production. *Annales Bogorienses* **14**(1): 39--44.
- Florencio, C., S. Couri & C.S. Farinas. 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*: 1--7.
- Fowler, T. & R.D. Brown. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Molecular Microbiology* **6**(21): 3225--3235.
- Gandjar, I., I.M. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Jakarta: vii + 87 hlm.
- Haggett, K.D., P.P. Gray & N.W. Dunn. 1979. Crystalline cellulose degradation by a strain of *Cellulomonas* and its mutants derivatives. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **8**: 183--190.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: xi+ 468 hlm.
- Ike, M., J.Y. Park, M. Tabuse & K. Tokuyasu. 2010. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 2059--2066.
- Ikehata, H. & T. Ono. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* **52**: 115--125.
- Irfan, M., J. Javed & Q. Syed. 2011. UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for enzyme production in submerged fermentation. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **44**(4): 137--140.
- Javed, M.M., Ikram-Ul-Haq & I. Mariyam. 2011. Multistep mutagenesis for the over-expression of cellulase in *Humicola insolens*. *Pakistan Journal of Botany* **43**(1): 669--677.

- Jørgensen, H. & L. Olsson. 2006. Production of cellulase by *Penicillium brasilianum* IBT 20888—Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 381--390.
- Jurick, W.M., I. Vico, B.D. Whitaker, V.L. Gaskins & W.J. Janisiewicz. 2012. Application of the 2-cyanocetamide method for spectrophotometric assay of cellulase enzyme activity. *Plant Pathology Journal* **11**(1): 38--41.
- Kasana, R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt & A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's Iodine. *Current Microbiology* **57**: 503--507.
- Kovács, K., L. Megyeri, G. Szakacs, C. P.Kubicek, M.Galbe & G. Zacchi. 2008. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology* **43**: 48--55.
- Krogh, K.B.R.M., P.V. Harris, C.L. Olsen, K.S. Johansen, J. Hojer-Pedersen, J. Borjesson & L. Olsson. 2010. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:143--154.
- Kuhad, R.C., M. Kumar & A. Singh. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Letters in Applied Microbiology* **19**: 397--400.
- Kurasawa, T., M. Yachi, M. Suto, Y. Kamagata, S. Takao & F. Tomita. 1992. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(1): 106--110.
- Kwon, H.W., J.H. Yoon, S.H. Kim, S.B. Hong, Y. Cheon & S.J. Ko. 2007. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology* **35**(3): 162--165.
- Liu Y-T., Z-Y. Luo, C.N. Long, H-D. Wang, M-N. Long & Z. Hu. 2011. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnology* **28**(6): 733--737.

- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl & I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(3): 506--577.
- Maki, M., K.T. Leung & W. Qin. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences* **5**(5): 500--516.
- Mandels, M. & E. T. Reese. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology* **79**(6): 816--826.
- Mandels, M. & J. Weber. 1969. Production of cellulases. *Advances in Chemistry*: 391--414.
- Mandels, M., F.W. Parrish & E.T. Reese. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *Journal of Bacteriology* **83**(2): 400--408.
- Mangunwardoyo, W., Aprilismulan, A. Oetari & W. Sjamsuridzal. 2011. Screening cellulose activity of yeast isolated from soil, sediment and water river from Taman Nasional Gunung Halimun, West Java, Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology* **7**(4): 210--216.
- Mfombep, P.M., Z.N. Senwo & O.S. Isikhuemhen. 2013. Enzymatic activities and kinetic properties of β -glucosidase from selected white rot fungi. *Advances in Biological Chemistry* **3**: 189--207.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**: 426--428.
- Pfeifer, G.P., Y.H. You & A. Besaratinia. 2005. Mutation induced by ultraviolet. *Mutation Research* **571**: 19--31.
- Pradeep, M.R., A. Janardhan, A.P. Kumar & G. Narasimha. 2012. Induction of chemical mutations in *Aspergillus niger* to enhanced cellulose production. *International Journal of Environmental Biology* **2**(3): 129--132.
- Radha, S., R. H. Babul, A. Sridevi, N. B. L. Prasad & G. Narasimha. 2012. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology* **2**(5): 1517--1528.

- Rajeshkumar, J. & M.H.M. Ilyas. 2011. Production of phosphatase by mutated fungal strains. *International Multidisciplinary Research Journal* **1**(5): 23--29.
- Ramzan, M., M. Asgher, M.A. Sheikh & H. Nawaz. 2013. Hyperproduction of manganese peroxidase through chemical mutagenesis of *Trametes versicolor* IBL-04 and optimization of process parameters. *BioResources* **8**(3): 3953--3966.
- Ranoa, D.R.E., C.Y. Lumibao, J.L. Roxas, B.B. San Luis & C.T. Hedreyda. 2005. Comparison of conventional plate assays with DNA-based screening protocols for protease and cellulase production from Putative *Bacillus* Isolates. *Science Diliman* **17**(1): 31--36.
- Ribeiro, O., F. Magalhaes, T.Q. Aguiar, M.G. Wiebe, M. Pentilla & L. Domingues. 2013. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered* **4**: 322--331.
- Roy, S.K., S.K. Raha, S.K. Dey & S.L. Chakrabarty. 1988. Induction and catabolite repression of β -Glucosidase synthesis in *Myceliophthora thermophila* D-14 (= ATCC 48104). *Applied and Environmental Microbiology* **54**(8): 2152--2153.
- Sega, G. A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* **134**: 113--142.
- Seiboth, B., C. Ivanova & V. Seidl-Seiboth. 2011. *Trichoderma reesei*: A fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. In M. A. Bernardes, *Biofuel production-recent developments and prospects*. In Tech: 311--340.
- Shafique, S., R. Bajwa & S. Shafique. 2009. Mutation of *Alternaria tenuissima* FCBP-252 for hyper-active α -amylase. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**: 591--596.
- Singhania, R.R., A.K. Patel, R.K. Sukumaran, C. Larroche & A. Pandey. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* **127**: 500--507.
- Smith, R.E. 1977. Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology* **33**(4): 980--981.

- Solov'eva, I.V., O.N. Okunev, V.V. Vel'kov, A.V. Koshelev, T.V. Bubnova, E.G. Kondrat'eva, A.A. Skomarovskii & A.P. Sinitsyn. 2005. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. *Microbiology* **74**(2): 141--146.
- Sørensen, A., M. Lübeck, P.S. Lübeck & B.K. Ahring. 2013. Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* **3**: 612--631.
- Sukumaran, R.K., R.R. Singhanian & A. Pandey. 2005. Microbial cellulases: Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* **64**: 832--844.
- Suto, M. & F. Tomita. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**(4): 305--311.
- Teather, R.M. & P.J. Wood. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **43**(4): 777--780.
- Winston, F. 2008. EMS and UV mutagenesis in Yeast. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.: unit 13.3B.1-13.3B.5.
- Yoon, J.H., S.B. Hong, S.J. Ko & S.H. Kim. 2007. Detection of extracellular enzyme activity in *Penicillium* using chromogenic media. *Mycobiology* **35**(3): 166--169.
- Zhang, Y-H.P, Jiong Hong & Xinhao Ye. 2009. Cellulase assays. *Dalam: Mielenz, J.R. (Ed.). 2009. Biofuels: Methods and protocols, methods in molecular biology*. Humana Press: 213--231.
- Zhang, Y-H.P, M.E. Himmel & J.R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* **24**: 452--481.
- Zhao, R-b., Bao H-y & Liu Y-x. 2010. Isolation and characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for biodegradation of methamidophos. *Agricultural Sciences in China* **9**(5): 695--703.

MAKALAH II

ANALISIS GEN β -GLUKOSIDASE 1 (*bgl1*) PADA

MUTAN *Penicillium* sp. ID10-T065

Vilya Syafriana^{1*}, Sukma Nuswantara², Wibowo Mangunwardoyo¹, and
Puspita Lisdiyanti²

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
University of Indonesia (UI), Indonesia

²Research Centre for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI),
Indonesia

*v.syafriana@gmail.com

ABSTRACT

In previous study, *Penicillium* sp. ID10-T065 has been mutated using ultraviolet (UV), ethyl methyl sulfonate (EMS) and combination of UV-EMS to increase β -glucosidase activity. There were three mutants selected, UV₁₃ (UV mutant), EM₃₁ (EMS mutant) and UM₂₃ (UV-EMS mutant). In this study, gene analysis was performed by PCR amplification and sequencing. The Result of *bgl1* gene sequences (600 bp) from mutants was aligned with the *wild-type* and sequence *bgl1* gene analysis from three mutants showed that there were base alterations at position 2015 until 2040. Mutant UV₁₃ showed the highest base alteration (7 bases) which occurred at position 2017 (T→C); 2026 (T→G); 2030 (T→G); 2037 (G→C); and 2038--2040 (TTG→GGA). The alteration caused a transition (at base position 2017 and 2040) and transversion (at position 2026, 2030, 2037, 2038, and 2039) mutation. Mutant EM₃₁ showed alteration in five bases at position 2024 (G→A), 2026 (T→G), 2027 (G→C), 2034 (G→C), and 2037 (G→T). The alteration also caused a transition (at base position 2024) and transversion (at position 2026, 2027, 2034 and 2037) mutation. Mutant UM₂₃ showed only a transversion mutation at base position 2015 (T→A) and 2027 (G→C). The base alterations which occurred in mutant UV₁₃ and EM₃₁ caused a *missense mutation* and *silent mutation* at amino acid translation, while in mutant UM₂₃ showed only a *missense mutation*. The *bgl1* gene analysis showed that mutation using UV light was more effective than using EMS or a combination of UV-EMS in *Penicillium* sp. ID10-T065. The wild-type isolate was identified based on morphology and molecular characteristics. Based on molecular identification using 18S rDNA region and phylogenetic analysis showed that the strain was closely related with *Penicillium oxalicum* (99% similarity). Morphology characteristics also showed similar character with *P. oxalicum* strain.

Keywords: β -glucosidase, gene analysis, mutation, *Penicillium*,

PENDAHULUAN

β -glukosidase (BGL) sebagai salah satu komponen enzim selulase memiliki peran penting dalam proses hidrolisis selulosa (Sørensen dkk. 2013). β -glukosidase berperan menyempurnakan proses hidrolisis selulosa dengan memecah molekul selobiosa menjadi glukosa (Singhania dkk. 2013). Proses tersebut akan mengurangi akumulasi selobiosa yang dapat menghambat sekresi endoglukanase (EG) dan selobiohidrolase (CBH) (Sørensen dkk. 2013). Produktivitas BGL dari kultur bakteri dan fungi dianggap rendah dalam skala industri sehingga diperlukan pengembangan hiperproduksi BGL (Lynd dkk. 2002; Maki dkk. 2009). Salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas BGL adalah dengan memutasi gen regulator dan promotor pada enzim tersebut (Fowler & Brown 1992). Peningkatan strain melalui mutasi dapat menurunkan biaya proses industri, meningkatkan produktivitas, dan menghasilkan beberapa karakter khusus yang diinginkan (Afifi dkk. 2013).

Mutasi merupakan proses terjadinya perubahan struktur suatu gen atau kromosom yang dapat terjadi secara spontan (tidak disengaja) ataupun buatan (disengaja) (Tamarin 2001; Adrio & Demain 2006). Mutasi dapat menghasilkan organisme yang memiliki kemampuan beradaptasi terhadap lingkungan lebih baik dari sifat asal. Kemampuan adaptasi tersebut ditunjukkan dengan peningkatan hasil biokatalitik. Mikroorganisme yang memiliki kemampuan memodifikasi materi genetik berpotensi menghasilkan variasi-variasi baru dalam *gene pool* (Nicolás-Santiago dkk. 2006).

Peningkatan aktivitas BGL melalui mutasi acak dan penapisan telah dilaporkan berhasil pada beberapa fungi. Mutasi acak pada fungi dapat dilakukan menggunakan mutagen kimia, fisika atau kombinasi fisika-kimia (Tamarin 2001; Adrio & Demain 2006). Mutagen yang dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas BGL, antara lain: radiasi sinar proton, radiasi sinar Ultraviolet (UV), Asam Nitrat (HNO_3), Etidium Bromida (EtBr), N-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG), dan Etil Metil Sulfonat (EMS) (Purves dkk. 2003; Hogg 2005; Jung dkk. 2011).

Sinar UV merupakan salah satu mutagen fisika terbaik untuk mutasi fungi. Sinar UV dapat mengakibatkan kerusakan DNA dan menginduksi mutasi. Salah satu mutagen kimia yang banyak digunakan dalam penelitian adalah EMS. EMS

merupakan agen alkilasi yang akan mengalkilasi basa guanin atau timin sehingga menyebabkan terjadinya transisi pasangan basa (Hogg 2005). Mutasi kombinasi UV-EMS dapat menginduksi variabilitas genetik yang besar (El-Bondkly & Keera 2007). Beberapa penelitian menggunakan kombinasi sinar UV dan EMS telah membuktikan terjadinya peningkatan produksi enzim-enzim komersil, seperti lipase (El-Bondkly & Keera 2007); α -amilase (Shafique dkk. 2009); fosfatase (Rajeshkumar & Ilyas 2011); dan ligninase (Ramzan dkk. 2013).

Teknik genetika molekuler, seperti DNA hibridisasi, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing pada gen pengode enzim target, dapat digunakan untuk mempelajari perubahan sekuen basa yang terjadi akibat mutasi (Griffiths dkk. 2000; Ranoa dkk. 2005). Teknik PCR memerlukan fragmen kecil DNA dan primer. Primer yang digunakan dapat dirancang khusus sesuai target. Metode PCR bertujuan memberikan informasi variasi genetik di dalam DNA (Dale & von Schantz 2002; Ranoa dkk. 2005; Wolska & Szweda 2012; Afifi dkk. 2013). Metode sekuensing dapat membantu pemahaman penyebab mutasi dan menunjukkan situs-situs genetik yang rentan termutasi (Griffiths dkk. 2000).

Mutasi menggunakan sinar UV dan senyawa EMS pada fungi dilaporkan mampu meningkatkan aktivitas BGL (Dillon dkk. 1992; Chandra dkk. 2009; Ike dkk. 2010; Liu dkk. 2011). Akan tetapi, informasi mengenai perubahan basa yang terjadi setelah mutasi acak pada gen pengode BGL mutan dengan *wild-type* belum pernah dilaporkan. Analisis perubahan basa setelah mutasi acak yang pernah dilaporkan pada gen endoglukanase I (*egl*) *Trichoderma viride*. Li dkk. (2010) melaporkan hasil analisis sekuen gen *egl* pada strain *wild-type* dan mutan *T. viride* menunjukkan bahwa terjadi beberapa perubahan basa nukleotida yang menyebabkan terjadi mutasi asam amino. Perubahan tersebut memengaruhi peningkatan produksi selulase sebesar 0,5--7,7% dari *wild-type*.

Laboratorium Mikrobiologi Terapan, Pusat Penelitian Bioteknologi (P2 Biotek), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) telah melakukan mutasi pada isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 menggunakan sinar UV dan senyawa EMS serta kombinasi kedua mutagen (Makalah I). Hasil mutasi menunjukkan bahwa mutan-mutan yang diperoleh mengalami peningkatan aktivitas BGL. Penelitian

makalah II dilakukan untuk menganalisis perbedaan urutan basa gen *bgl1* sampel *wild-type* dan mutan isolat *Penicillium* sp. ID10-T065.

Selain analisis gen *bgl1*, penelitian juga bertujuan mengidentifikasi isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 sebagai induk dari mutan UV₁₃, EM₃₁ dan UM₂₃. Identifikasi *Penicillium* dilakukan dengan mengamati karakter morfologi, analisis molekuler berdasarkan sekuensing daerah 18S rDNA, serta analisis filogenetik (Frisvad & Samson 2004; Tiwari dkk. 2011).

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi seperangkat alat gelas [Pyrex; Iwaki; Duran; Schott], autoklaf [Raypa], vortex [Whirlmixer dan Nissin Mixer (molekuler)], *laminar air flow* [Telstar BH-100], mikropipet [Gilson dan Eppendorf], lemari pendingin sampel [Polytron], lemari pendingin medium [Modena], *Freezer* [Sanyo], sentrifuga [Eppendorf & Hermle], mesin *thermo cycler* [Techne], elektroforesis [Mupid-exu], UV *Transilluminator* [Major Science], UV *Crosslinker* [Hoefer], *sequencer*, *rotary shaker*, spatula, tusuk gigi steril, tusuk sate steril, dan aluminium foil.

B. Bahan

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah DNA mutan UV₁₃, EM₃₁ dan UM₂₃, serta *wild-type* dari strain *Penicillium* sp. ID10-T065 koleksi Laboratorium Mikrobiologi Terapan P2 Biotek LIPI

2. Medium

Medium yang digunakan adalah *Potato Dextrosa Agar* (PDA) [Difco] dan *Potato Dextrosa Broth* (PDB) [Difco].

3. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain: Bufer TE pH 8,0; sodium asetat; isopropanol; etanol 70%; ddH₂O; Go *Taq* Green Master Mix [Promega]; Etidium Bromida (EtBr); dan gel agarosa.

4. Primer

Primer untuk analisis gen *bgl1* dirancang berdasarkan strain referensi *Penicillium brasilianum* (Krogh dkk. 2010). Primer yang digunakan untuk identifikasi molekuler isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 adalah primer universal fungi daerah 18S yang terdiri dari: Forward 18F (5'- ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT- 3') dan Reverse 18R (5'- GAT CCT TTC GCA GGT TCA -3').

C. Cara Kerja

1. Analisis Gen *bgl1*

(a) Perancangan primer BG

Primer dirancang berdasarkan sekuen dari strain referensi *Penicillium brasilianum* (EF527403) yang diperoleh dari situs NCBI/Primer-BLAST (Krogh dkk. 2010). Perancangan diawali dengan memilih menu *nucleotide* pada situs NCBI, kemudian menuliskan kata kunci pada jendela *homepage*, yaitu *Penicillium* dan β -*glucosidase*. Berdasarkan referensi-referensi yang muncul, maka dipilih referensi dengan *complete sequences*. Intron isolat referensi dipotong kemudian ditentukan *start* dan *stop* kodon. Langkah selanjutnya, memilih menu *Open Reading Frame* (ORF), *pick primer* dan *get primer*. Primer kemudian disalin ke dalam program Microsoft Notepad lalu di edit dengan program BIOEDIT Sequence Alignment Editor dan DNA Star (Nuswantara 2014) (Lampiran II.1).

(b) Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA dilakukan menurut Cenis (1992) dengan modifikasi. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menumbuhkan isolat di dalam tabung reaksi berisi 5 ml PDB selama 3 hari. Isolat diinkubasi di *shaker* dengan kecepatan 60 *stroke*/menit pada suhu 26--28° C. Sebanyak 500 μ l miselium yang diperoleh, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit. Pelet dari hasil

sentrifugasi kemudian dicuci dengan 500 µl bufer TE (pH 8,0). Sebanyak 300 µl bufer ekstraksi ditambahkan ke dalam pelet yang telah dicuci dan digerus selama 5 menit. Pelet yang telah digerus selanjutnya ditambahkan sodium asetat (pH 5,2) sebanyak 150 µl dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu -20° C. Larutan dengan sodium asetat disentrifugasi selama 15 menit pada 13.000 rpm. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf baru. Supernatan kemudian ditambahkan isopropanol dengan perbandingan supernatan : isopropanol = 1 : 1. Tahap berikutnya adalah presipitasi DNA dengan cara disentrifugasi selama 10 menit pada 13.000 rpm. DNA selanjutnya dicuci dengan 500 µl etanol 70%, lalu disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 2 menit dan dikeringkan. DNA yang telah kering dilarutkan ke dalam 50 µl bufer TE, kemudian disimpan pada suhu -20° C hingga waktu akan digunakan.

(c) Optimasi PCR

Setiap sampel diamplifikasi menggunakan primer yang telah dirancang (Cara kerja C.1.a). Reaksi PCR setiap sampel dilakukan menggunakan mesin *thermo cycler* [Techne] dengan komposisi yang disesuaikan berdasarkan data kuantifikasi DNA (Lampiran II.2).

Amplifikasi DNA terdiri atas denaturasi, *annealing*, dan ekstensi DNA yang dilakukan pada mesin PCR. Kondisi *pre*-PCR pada 95° C selama 2 menit. Periode PCR dilakukan selama 30 siklus, meliputi: denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Program denaturasi pada 95° C selama 30 detik dan ekstensi pada 72° C selama 1 menit. Program suhu *annealing* ditentukan berdasarkan Titik Leleh (T_m) selama 30 detik. Suhu *annealing* ditentukan dengan mengurangi $\pm 5^\circ$ C dari titik leleh (T_m). Reaksi PCR diakhiri dengan ekstensi akhir pada 72° C selama 2 menit.

Hasil amplifikasi kemudian dideteksi dengan elektroforesis (100V/400A) pada gel agarosa 1% menggunakan bufer Tris Acetate EDTA (TAE) selama 30 menit dan diwarnai dengan EtBr (0,5 mg/ml) (Sambrook & Russel 2001). Pita DNA yang terbentuk divisualisasikan dengan UV transilluminator.

(d) Penyejajaran sekuen DNA gen *bgl1* mutan dan *wild-type*

Sampel DNA mutan dan *wild-type* sebelum disekuen, terlebih dahulu dipurifikasi dengan cara modifikasi *spin column* [Geneaid USA] (Nuswantara 2014). Sampel DNA yang berada di dalam potongan gel hasil elektroforesis dipisahkan dan dimasukkan ke dalam DF Column untuk disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit. Hasil suspensi diletakkan kembali ke dalam DF Column dan didiamkan selama 15 menit. Sampel disentrifugasi kembali setelah penyaringan selama 15 menit (suspensi sudah tersaring semua) pada 13.000 rpm selama 3 menit. Sampel DNA yang telah murni selanjutnya siap untuk disekuen.

Sekuensing dilakukan menggunakan jasa sekuensing [Geneaid Biotech Ltd.] untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Hasil sekuen mutan dan *wild-type* disejajarkan untuk membandingkan perbedaan urutan basa yang terjadi menggunakan program BIOEDIT Sequence Alignment Editor.

2. Identifikasi Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Identifikasi dilakukan dengan mengamati karakter morfologi, analisis molekuler, serta mempelajari hubungan kekerabatan isolat dengan spesies lain melalui analisis filogenetik.

a. Karakter morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Data makroskopik dan mikroskopik yang diperoleh dibandingkan dengan karakter pada monograf *Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium: A guide to identification of food and air-borne tervorticillate Penicillia in their mycotoxins* oleh Frisvad & Samson (2004).

b. Analisis molekuler Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan mengamati karakter genotipik berdasarkan hasil sekuen basa nukleotida dari segmen 18S rDNA (Wu dkk. 2003; Tiwari dkk. 2011; Syed dkk. 2013). Identifikasi molekuler dipelajari dengan mengamplifikasi segmen 18S. Hasil amplifikasi selanjutnya disekuen dan hasil sekuen akan disejajarkan dengan database yang terdapat pada GenBank

menggunakan program NCBI BLAST pada situs <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Zhao dkk. 2010; Tiwari dkk. 2011).

Analisis hubungan kekerabatan dilakukan dengan membuat pohon filogenetik *Neighbour Joining* (NJ) dibentuk dengan program MEGA6 menggunakan metode Kimura dengan dua parameter (Tateno dkk. 1994; Hall 2013; Tamura dkk. 2013)

c. Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA untuk identifikasi dilakukan menurut Ceniz (1992) dengan modifikasi (Cara kerja C.1.b).

d. Amplifikasi DNA dengan PCR

Amplifikasi DNA dilakukan pada daerahh 18S rDNA. Amplifikasi 18S menggunakan primer 18S fungi, yaitu primer Forward 18F (5'- ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT- 3') dan primer Reverse 18R (5'- GAT CCT TTC GCA GGT TCA -3').

Daerah sepanjang 1500 pasang basa (bp) pada daerah 18S diamplifikasi dengan menggunakan primer 18F dan 18R. Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin *thermo cycler* [Techne]. Setiap 25 µl reaktan amplifikasi mengandung 12,5 µl PCR Master mix [Promega], 1 µl primer 18F dan 18R (20 pmol), 1 µl DNA *template*, serta 9,5 µl ddH₂O.

Amplifikasi DNA terdiri atas denaturasi, *annealing*, dan ekstensi DNA yang dilakukan pada mesin PCR. Kondisi *pre*-PCR pada 96° C selama 5 menit. Periode PCR dilakukan selama 30 siklus, meliputi: denaturasi pada 96° C selama 30 detik, *annealing* pada 55° C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72° C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan ekstensi akhir pada 72° C selama 7 menit.

Hasil amplifikasi kemudian dideteksi dengan elektroforesis (100V/400A) pada gel agarosa 1% menggunakan bufer Tris Acetate EDTA (TAE) selama 30 menit dan diwarnai dengan EtBr (0,5 mg/ml) (Sambrook & Russel 2001). Pita DNA yang terbentuk divisualisasikan dengan UV transilluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisis gen *bgl1* mutan dan *wild-type Penicillium* sp. ID10-T065

(a) Perancangan primer *bgl1*

Primer yang diperoleh dari hasil perancangan sebanyak lima pasang primer dengan panjang basa berkisar 17--24 basa. Suhu T_m ke-5 pasang basa berkisar antara 56--63,3° C dan kadar G-C berkisar 45,8--65%. Urutan sekuen primer dan keterangan primer dirangkum dalam Tabel II.1.

Tabel II.1. Hasil rancangan primer gen *bgl1*

Nama Primer	T_m (Titik Leleh) (° C)	Sekuen 5'-3'	Jumlah basa	Kadar G-C (%)	Panjang (bp)
BG ₁ F1	61,4	5'-g c c a t t g c g c a g c c c a t a c a -3'	20	60	430
BG ₁ R1	59,3	5'-a a g c g g a g g a a t a a t c t g c g a a c c -3'	24	50	
BG ₂ F2	59,2	5'-t g g c c g c c g c a a c a t t t -3'	17	58,8	389
BG ₂ R2	63,3	5'-a c c a g c g c g a a c g g c a t c a g -3'	20	65	
BG ₃ F3	60,2	5'-t c g g c g c t a g c t g g a c t t g a t a -3'	22	54,5	947
BG ₃ R3	61	5'-c g a c t t t t g g c c c a g g t g a a c g -3'	22	59,1	
BG ₄ F4	61	5'-c g t t c a c c t g g g c c a a a a g t c g -3'	22	59,1	425
BG ₄ R4	61,4	5'-c g c g t g g g g t g g g a t a a a g t c t -3'	22	59,1	
BG ₅ F5	57,8	5'-t g a c c t c c g t g t t g t g a a g a a g t a -3'	24	45,8	453
BG ₅ R5	56,8	5'-t g a c c g g g c a g c a g a t a a a a -3'	20	50	

Hal yang perlu diperhatikan dalam merancang primer adalah kadar G-C atau A-T, panjang basa dan titik leleh (T_m) (Dieffenbach dkk. 1993; Dale & von Schantz 2002). Primer sebaiknya memiliki kadar G-C lebih banyak dibandingkan A-T karena ikatan G-C lebih kuat dibandingkan ikatan A-T, sehingga ketika dilakukan optimasi, suhu *annealing* ikatan basa DNA tersebut tidak mudah putus (Dale & von Schantz 2002). Kadar G-C pada primer ideal berkisar 40--60% (Borah 2011). Panjang basa ideal untuk perancangan primer adalah sekitar 18--24

basa dengan T_m 54° C atau lebih tinggi (Dieffenbach dkk. 1993). Berdasarkan Borah (2011), panjang primer ideal adalah sekitar 18--22 bp dengan T_m berkisar 52--58° C. Suhu T_m yang lebih tinggi dari 52--58° C memiliki kecenderungan terjadi *annealing* sekunder.

Panjang basa pada seluruh primer, kecuali BG₂ F2 (17 basa), sesuai dengan ketentuan literatur, yaitu berkisar 18--24 basa (Dieffenbach dkk. 1993; Borah 2011). Hal sebaliknya terjadi pada suhu T_m primer, yaitu melebihi batas suhu ideal (52--58° C) berdasarkan Borah (2011). Suhu T_m yang sesuai literatur ditunjukkan oleh primer BG₅ F5 (57,8° C) dan R5 (56,8°). Kadar G-C primer sesuai dengan pernyataan Borah (2011), yaitu berkisar 40--60%.

(b) Optimasi PCR

Optimasi PCR dilakukan untuk mengetahui primer optimum dalam amplifikasi DNA. Suhu *annealing* ditentukan dengan mengurangi $\pm 5^\circ$ C dari titik leleh (T_m) sebelum dilakukan PCR (Innis & Gelfand 1990).

Tabel II.2. Suhu *annealing* primer berdasarkan titik leleh (T_m) primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R)

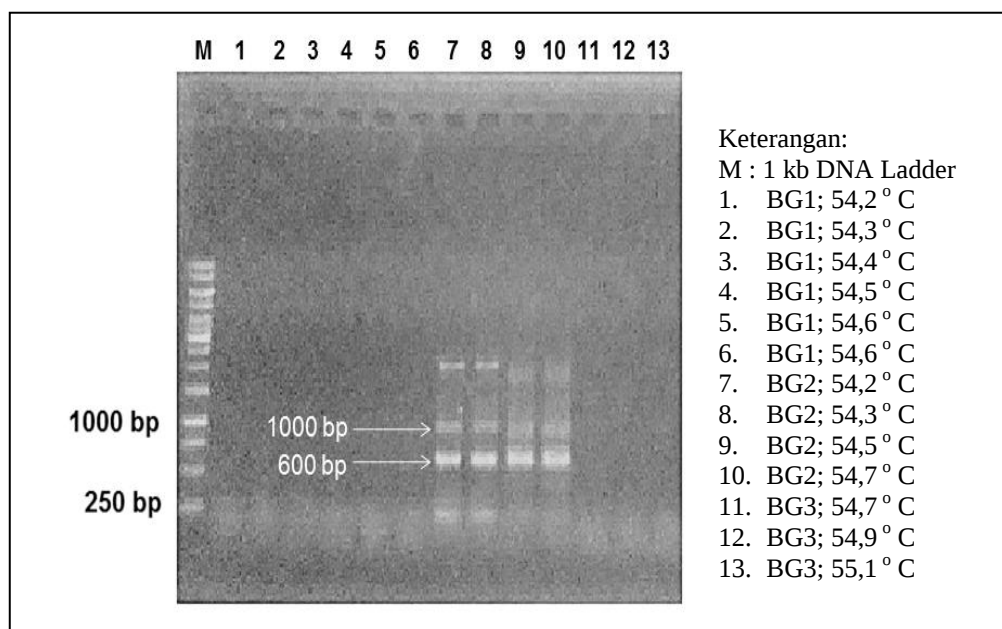
Suhu	BG ₁	BG ₂	BG ₃	BG ₄	BG ₅
T_m F (° C)	61,4	59,2	60,2	61	57,8
T_m R (° C)	59,3	63,3	61	61,4	56,8
Annealing (° C)	54,3	54,2	55,2	56	51,8

Suhu *annealing* merupakan suhu dalam PCR yang dapat divariasikan. Optimasi suhu *annealing* diperlukan agar primer terikat kuat pada cetakan yang sesuai dan meminimalisir terikatnya pada sekuen lain. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer terikat pada posisi yang salah, sehingga produk yang dihasilkan tidak spesifik. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan ikatan primer dengan target tidak stabil sehingga amplifikasi tidak dapat berjalan (Dale & von Schantz 2002).

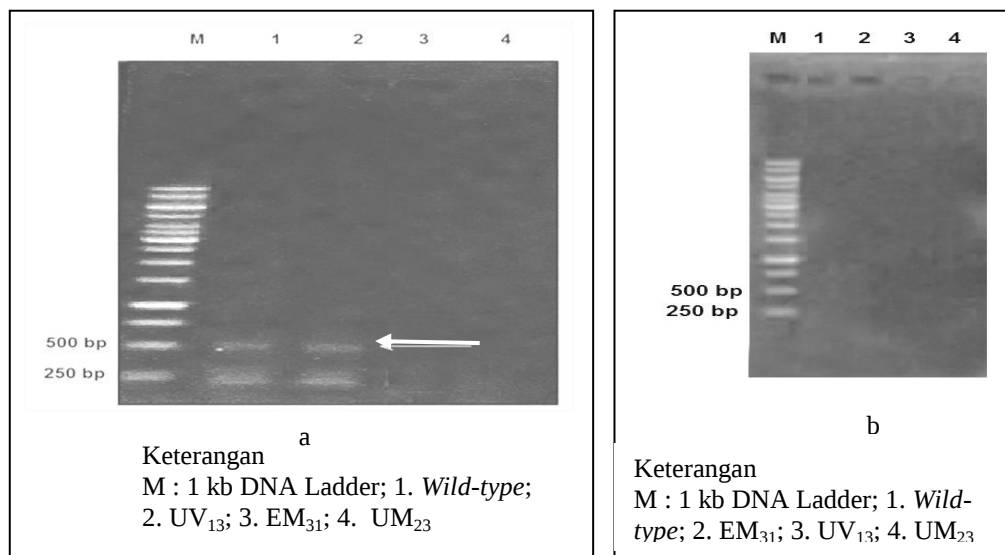
Berdasarkan data suhu *annealing* (Tabel II.2), maka diketahui bahwa setiap primer memiliki suhu *annealing* yang berbeda. Suhu tersebut digunakan untuk amplifikasi menggunakan mesin PCR. Hasil PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk memeriksa apakah gen berhasil diamplifikasi atau tidak.

Konsentrasi DNA tiap sampel dihitung menggunakan Genequant [Amersham, Biosciences] terlebih dahulu agar dapat ditentukan konsentrasi DNA yang diperlukan dalam tiap reaksi PCR.

Berikut adalah hasil optimasi PCR menggunakan primer BG₁, BG₂, dan BG₃ dengan menaikkan suhu sebesar 0,1--1° C (Gambar II.1), sedangkan BG₄ dan BG₅ menggunakan suhu yang tertera pada Tabel II.2 (Gambar II.2a dan II.2b).



Gambar II.1. Hasil amplifikasi gen *bgl1* dengan optimasi suhu *annealing* isolat *wild-type Penicillium* sp. ID10-T065 menggunakan primer BG₁, BG₂ dan BG₃



Gambar II.2. Hasil amplifikasi isolat *wild-type* dan mutan *Penicillium* sp. ID10-T065; a. primer BG₄, suhu *annealing* 56° C, suhu denaturasi 94° C; b. primer BG₅, suhu *annealing* 52° C

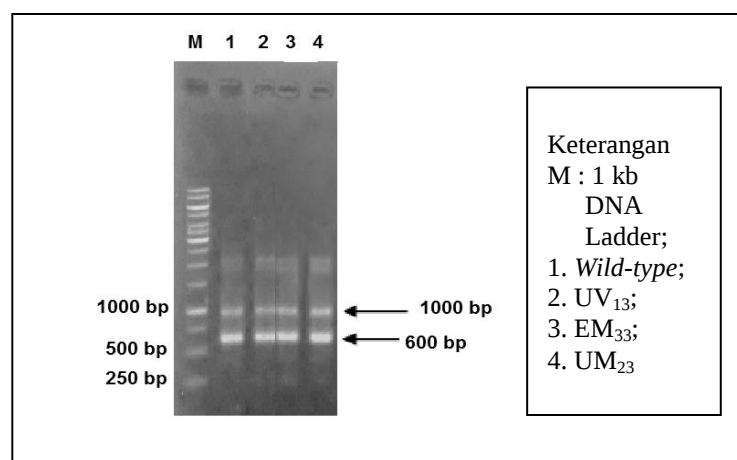
Gambar II.1 merupakan hasil amplifikasi dari isolat *wild-type* dengan menggunakan variasi suhu *annealing* mulai dari 54,2° C hingga 54,7° C untuk primer BG₁ dan BG₂; sedangkan untuk BG₃ mulai dari 54,7° C hingga 55,1° C. Data hasil elektroforesis menunjukkan bahwa amplifikasi DNA menggunakan primer rancangan BG₁ dan BG₃ tidak menghasilkan pita pada gel agarosa. Hasil amplifikasi hanya terdeteksi pada primer BG₂, akan tetapi tidak diperoleh pita tunggal (Gambar II.1).

Gambar II.2a dan II.2b menunjukkan hasil amplifikasi menggunakan primer BG₄ dan BG₅. Hasil deteksi produk amplifikasi menggunakan primer BG₄ pada gel agarosa menghasilkan pita yang tipis pada sampel *wild-type* dan UV₁₃; sedangkan pada EM₃₁ dan UM₂₃ pita tidak muncul (Gambar II.2.a). Panjang fragmen yang dihasilkan pada sampel *wild-type* dan UV₁₃ tidak sesuai dengan panjang fragmen yang diharapkan (425 bp), yaitu 250 dan 500 bp. Hasil deteksi produk amplifikasi menggunakan primer BG₅ pada gel agarosa menunjukkan tidak ada pita yang muncul, maka dapat disimpulkan tidak ada fragmen DNA yang diamplifikasi (Gambar II.2.b).

Berdasarkan Borah (2011), tidak terbentuknya produk amplifikasi atau hasil produk yang sangat sedikit (menghasilkan pita tipis ketika dideteksi di

bawah sinar UV pada gel agarosa) dapat disebabkan karena primer membentuk struktur sekunder. Keberadaan struktur sekunder berpengaruh pada proses *annealing* primer ke situs target sehingga memengaruhi amplifikasi. Struktur sekunder dapat terbentuk dikarenakan beberapa hal berikut: (i) *Hairpin*, yaitu terjadi interaksi intra-molekuler dalam primer sehingga primer membentuk *hairpin-loop* yang dapat menurunkan efisiensi reaksi dengan membatasi kemampuan primer berikatan dengan situs target (Singh dkk. 2000); (ii) *Self dimer*, yaitu struktur yang terbentuk karena terjadi interaksi intermolekuler antara dua primer homolog dalam satu rantai *sense*, sehingga panjang primer menjadi lebih panjang dari gen target; (iii) *Cross dimer*, yaitu struktur yang terbentuk akibat terjadi interaksi intermolekuler antara rantai *sense* dengan *anti-sense* yang sehomolog.

Amplifikasi PCR dikatakan berhasil apabila hasil elektroforesis menunjukkan pita tunggal sesuai dengan ukuran yang diharapkan, tanpa adanya pita nonspesifik ataupun *smear* (Innis dkk. 1988; Dale & Schantz 2002). Hasil amplifikasi dari primer BG₁, BG₂ dan BG₃ menunjukkan bahwa amplifikasi menggunakan primer BG₁ dan BG₃ tidak berhasil, meskipun sudah dilakukan variasi suhu *annealing*. Amplifikasi menggunakan primer BG₂ masih dapat dilakukan optimasi untuk memperoleh pita tunggal pada gel agarosa, yaitu dengan menaikkan suhu *annealing* menjadi 54,9° C.



Gambar II.3. Hasil amplifikasi isolat *wild-type* dan mutan *Penicillium* sp. ID10-T065 menggunakan primer BG₂ dengan suhu *annealing* 54,9° C

Hasil amplifikasi primer BG₂ pada suhu 54,9° C menunjukkan pita yang lebih tebal dibandingkan produk PCR pada suhu 54,2--54,7° C, akan tetapi pita yang dihasilkan tetap tidak tunggal (Gambar II.3). Fragmen DNA yang dihasilkan dari suhu tersebut menunjukkan ukuran yang lebih besar (600 bp dan 1.000 bp) dari ukuran yang diharapkan (389 bp). Berdasarkan Sambrook & Russel (2001), perbedaan ukuran yang diperoleh dengan yang diharapkan menandakan terjadi *nonspecific priming*. Hal tersebut dapat di atasi dengan menurunkan waktu *annealing* dan/atau meningkatkan suhu *annealing*.

Berdasarkan keseluruhan data hasil optimasi PCR, maka primer optimum untuk analisis perubahan gen *bgl1* mutan dan *wild-type* adalah primer BG₂ dengan suhu *annealing* 54,9° C.

(c) Penyejajaran Sekuen DNA

Fragmen DNA yang belum murni dari hasil PCR, tidak dapat langsung disekuen, oleh sebab itu perlu dilakukan purifikasi DNA untuk memastikan bahwa sampel yang diperoleh tidak terkontaminasi. Purifikasi DNA dilakukan menggunakan modifikasi *spin column*. Sampel DNA yang telah murni selanjutnya siap disekuen. Hasil sekuen DNA gen *bgl1* (600 bp) pada mutan dan *wild-type* disejajarkan dengan strain referensi *Penicillium brasilianum* (*accession number*: EF527403) untuk menentukan posisi *start* kodon. Data hasil penyejajaran sekuen dapat dilihat pada Lampiran II.3.

Hasil analisis mutan dengan *wild-type* menggunakan primer BG₂ menunjukkan bahwa terjadi perubahan urutan basa pada urutan basa 2014--2040 (Lampiran II.3). Hasil analisis menunjukkan bahwa mutan UV₁₃ memiliki perbedaan paling banyak (7 basa) dengan isolat *wild-type* dibandingkan EM₃₁ (5 basa) dan UM₂₃ (2 basa). Perubahan yang terjadi pada mutan UV₁₃ ditunjukkan pada basa ke-2017 (T → C); basa ke-2026 (T → G); basa ke-2030 (T → G); basa ke-2037 (G → C); basa ke-2038 (T → G); basa ke-2039; (T → G); basa ke-2040 (G → A). Mutan EM₃₁ menunjukkan perubahan 5 urutan basa, yaitu basa ke-2024 (G → A), basa ke- 2026 (T → G), basa ke-2027 (G → C), basa ke-2034 (G → C), dan basa ke-2037 (G → T). Mutan UM₂₃ mengalami 2 perubahan urutan basa,

yaitu basa ke-2015 (T → A) dan ke-2027 (G → C). Ringkasan hasil analisis perubahan basa nukleotida yang terjadi dapat dilihat pada Tabel II.3.

Tabel II.3. Perubahan urutan basa pada mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

Kode Mutan	Urutan basa ke-	Perubahan basa yang terjadi	Bentuk mutasi	Perubahan triplet	Perubahan asam amino
UV ₁₃	2017	T → C	Transisi	TTT → CTT	Phe → Leu
	2026	T → G	Transversi	TGC → GGC	Cys → Gly
	2030	T → G	Transversi	CTT → CGT	Leu → Arg
	2037	G → C	Transversi	CCG → CCC	Pro → Pro
	2038	T → G	Transversi	TTG → GGA	Leu → Lys
	2039	T → G	Transversi		
	2040	G → A	Transisi		
EM ₃₁	2024	G → A	Transisi	GGA → GAA	Gly → Glu
	2026	T → G	Transversi	TGC → GCC	Cys → Ala
	2027	G → C	Transversi		
	2034	G → C	Transversi	TCG → TCC	Ser → Ser
	2037	G → T	Transversi	CCG → CCT	Pro → Pro
UM ₂₃	2015	T → A	Transversi	ATA → AAA	Ile → Lys
	2027	G → C	Transversi	TGC → TCC	Cys → Ser

Keterangan

→ : menunjukkan perubahan basa/asam amino

A : adenin

Ala : alanin

Gly: glisin

Phe : fenil alanin

G : guanin

Arg : arginin

Ile : isoleusin

Pro : prolin

C : sitosin

Cys : sistein

Leu : leusin

Ser : serin

T : timin

Glu : glutamat

Lys : lisin

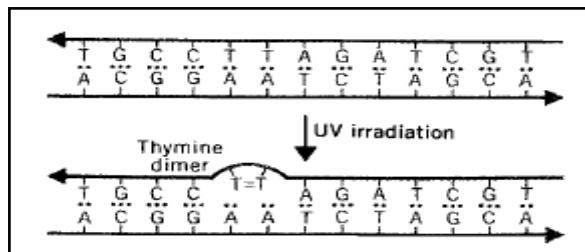
Hasil analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa seluruh isolat mutan mengalami mutasi substitusi, yaitu mutasi yang terjadi akibat penggantian satu basa oleh basa lainnya. Mutasi mutan UV₁₃ pada basa ke-2017 dan 2040 menunjukkan peristiwa substitusi transisi, yaitu penggantian basa purin oleh purin lainnya atau basa pirimidin oleh basa pirimidin lainnya. Substitusi pada basa ke-2017 merupakan transisi pirimidin karena basa timin diganti oleh basa sitosin. Substitusi pada basa ke-2040 menunjukkan peristiwa transisi purin, yaitu basa guanin diganti oleh basa adenin (Tabel II.3) (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Basa ke-2026, 2030, 2038, dan 2040 menunjukkan perubahan basa yang sama, yaitu timin berubah menjadi guanin; sedangkan pada basa ke-2037 terjadi perubahan dari basa guanin menjadi sitosin (Tabel II.3). Perubahan demikian dikenal dengan nama mutasi transversi, yaitu mutasi yang terjadi akibat basa purin diganti oleh pirimidin, atau sebaliknya (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Perubahan satu basa pada basa ke-2017, 2026 dan 2030 mengakibatkan terjadi perubahan asam amino yang diterjemahkan. Substitusi basa ke-2017 mengubah asam amino fenil alanin menjadi leusin; basa ke-2026 mengubah asam amino sistein menjadi glisin; sedangkan basa ke-2030 mengubah asam amino leusin menjadi arginin. Perubahan basa selanjutnya terdapat pada tiga urutan basa ke-2038--2040. Ketiga basa tersebut merupakan triplet kodon jika diterjemahkan ke dalam mRNA. Perubahan triplet tersebut menyebabkan perubahan asam amino leusin menjadi lisin (Tabel II.3). Mutasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino dikenal dengan *missense mutation* (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Perubahan basa pada posisi 2037 tidak mengubah asam amino yang disintesis, yaitu dari prolin tetap menjadi prolin (Tabel II.3). Mutasi demikian dikenal sebagai *silent mutation*, yaitu perubahan basa nukleotida tidak mengubah asam amino ketika diterjemahkan ke dalam mRNA. Hal tersebut terjadi karena satu asam amino dapat disintesis oleh beberapa kode genetik, seperti asam amino prolin dikode oleh triplet CCU, CCA, CCG, CCC (Lampiran II.4) (Purves dkk. 2003; Voet & Voet 2011).

Radiasi sinar UV merupakan salah satu induser mutasi yang berpengaruh terhadap struktur pirimidin (sitosin = C dan timin = T). Pirimidin bersifat sensitif terhadap sinar UV sehingga mudah termodifikasi apabila sinar UV terserap ke dalam sel. Penyerapan sinar UV dapat mengakibatkan pembentukan dimer pirimidin pada dua basa pirimidin yang berdekatan sehingga dapat merusak struktur rantai DNA atau menghambat berjalannya proses replikasi (Nicolás-Santiago dkk. 2006; Shafique dkk. 2009; Irfan dkk. 2011). Kerusakan tersebut terbentuk melalui reaksi fotokimia dan diikuti absorpsi energi UV pada basa DNA. Sinar UV yang masuk ke dalam DNA akan diabsorpsi oleh ikatan ganda pada basa pirimidin (timin dan sitosin) dan menyebabkan basa tersebut bereaksi dengan molekul pirimidin di sebelahnya (Gambar II.4) (Goodsell 2001; Ikehata & Ono 2011).



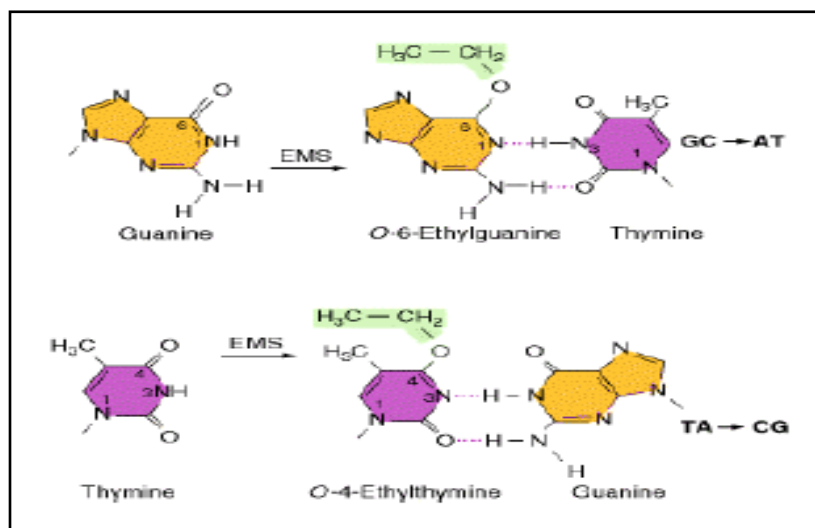
Gambar II.4. Pembentukan dimer pirimidin akibat induksi sinar UV
[Sumber: Hogg 2005]

Hasil sekuen menunjukkan hampir seluruh perubahan basa nukleotida yang terjadi pada mutan UV₁₃ merupakan posisi basa pirimidin yang saling berdekatan, yaitu TT (basa ke- 2017, 2038--2040); CT (basa ke-2030); dan CC (basa ke-2037), kecuali pada basa ke-2026 (T berdekatan dengan purin) (Lampiran II.3). Mutasi substitusi basa sitosin menjadi timin merupakan mutasi paling sering terjadi akibat radiasi sinar UV, meskipun ada kemungkinan terjadi transversi, *frameshift mutation*, duplikasi dan delesi (Livneh dkk. 1993; Ikehata & Ono 2011).

Mutasi pada mutan EM₃₁ menunjukkan mutasi substitusi (transisi dan transversi). Mutasi transisi terjadi pada basa ke-2024, yaitu basa guanin berubah menjadi adenin, sedangkan mutasi transversi terjadi pada basa ke-2026 (timin menjadi guanin), 2027 dan 2034 (guanin menjadi sitosin), serta basa ke-2037 (guanin menjadi timin) (Tabel II.3).

Mutasi yang terjadi menyebabkan perubahan penerjemahan asam amino (*missense mutation*), yaitu glisin menjadi glutamat (basa ke-2024), serta sistein menjadi alanin (basa ke-2026--2027). Peristiwa *silent mutation* juga ditemukan pada mutan EM₃₁, yaitu pada posisi basa ke-2034 (serin menjadi serin), serta pada posisi ke-2037 (prolin menjadi prolin) (Tabel II.3).

Agen alkilasi seperti EMS bekerja pada basa guanin atau timin dengan cara menambahkan gugus alkil pada atom oksigen yang terikat pada ikatan hidrogen (posisi 6). Penambahan gugus alkil akan membentuk molekul baru, yaitu alkilguanin atau alkiltimin (Gambar II.5). Alkilguanin akan berpasangan dengan timin (tidak dapat berpasangan dengan sitosin), sedangkan alkiltimin akan berpasangan dengan guanin (tidak dapat berpasangan dengan adenin) (Sega 1984; Hooley dkk. 1988; Hogg 2005). Hal tersebut mengakibatkan terjadi perubahan pasangan basa dari G-C menjadi A-T atau dari T-A menjadi C-G (Gambar II.5).



Gambar II.5. Mekanisme penambahan gugus alkil pada basa guanin dan timin
[Sumber: Griffiths dkk. 2000]

Mutasi yang terjadi pada mutan EM₃₁ menunjukkan pola bahwa EMS menyebabkan perubahan basa pada guanin (basa ke-2024, 2027, 2034 dan 2037), serta timin (2026) (Tabel II.3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa terjadi penambahan gugus etil pada kedua basa tersebut, sehingga terjadi kesalahan pasangan basa. EMS dalam jumlah sedikit juga dapat menginduksi transversi G/C menjadi C/G seperti pada basa ke-2027 atau transisi A/T menjadi G/C seperti pada basa ke-2026 (Sega 1984; Kim dkk. 2006).

Mutasi mutan kombinasi UV-EMS (UM₂₃) menunjukkan peristiwa mutasi transversi, yaitu timin diganti adenin (basa ke-2015) dan guanin diganti sitosin (basa ke-2027). Perubahan basa ke-2015 menyebabkan pembacaan asam amino isoleusin berubah menjadi lisin; dan basa ke-2027 menyebabkan asam amino sistein menjadi serin (*missense mutation*) (Tabel II.3).

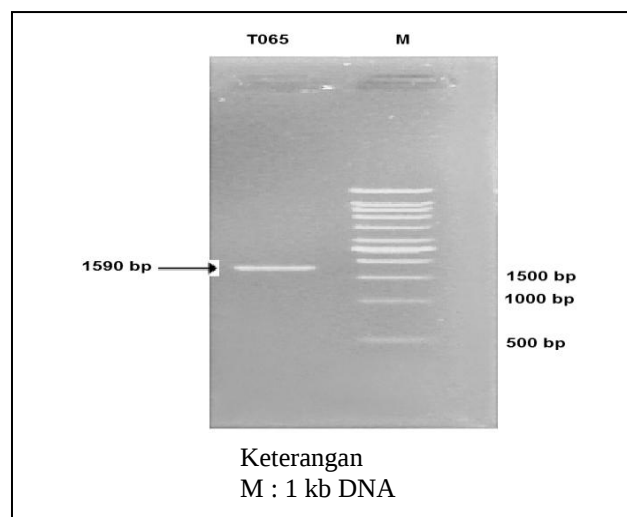
Interaksi yang terjadi antara UV dan EMS tidak berhubungan dengan peningkatan mutasi atau konversi pada gen, akan tetapi kombinasi kedua mutagen kemungkinan memengaruhi penghambatan proses perbaikan DNA. Alkilasi yang terjadi setelah mutasi UV dapat menghambat kerja enzim perbaikan (*repair enzymes*), sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim (Ager & Haynes 1990). Berdasarkan hasil aktivitas enzim mutan UM₂₃ (Makalah I), menunjukkan bahwa aktivitas enzim menurun pada mutasi kombinasi antara UV dan EMS. Hal

tersebut mengindikasikan bahwa terjadi penghambatan kerja enzim pada mutan UM₂₃.

Hasil analisis gen menunjukkan bahwa perubahan basa yang terjadi akibat mutasi berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas BGL. Mutan UV₁₃ merupakan mutan dengan jumlah basa terbanyak yang mengalami mutasi dibandingkan EM₃₁ dan UM₂₃. Hasil aktivitas BGL (makalah I) menunjukkan bahwa mutan UV₁₃ memiliki aktivitas BGL yang lebih tinggi dibandingkan EM₃₁ dan UM₂₃. Hal tersebut menandakan bahwa mutasi menggunakan sinar UV untuk peningkatan strain dalam menghasilkan BGL lebih efektif dibandingkan dengan EMS atau kombinasi UV dan EMS (Ager & Haynes 1990; Makalah I). Efektivitas UV sebagai mutagen juga dilaporkan oleh Nicolás-Santiago dkk. (2006) yang mendapatkan peningkatan aktivitas enzim mannanase, selulase dan xilanase pada mutan *Aspergillus niger* UAM-GS1 setelah dipaparkan sinar UV selama 3 menit. Peningkatan aktivitas enzim diperkirakan berhubungan dengan perubahan daerah promotor pada gen pengode enzim akibat paparan sinar UV sehingga memengaruhi mekanisme ekspresi enzim.

2. Identifikasi Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 ditumbuhkan pada medium PDB selama 3--5 hari. Miselium dipanen dan DNA diekstraksi menurut Cenis (1992). Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi menggunakan mesin PCR dan amplikon dikonfirmasi menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar II.6.



Gambar II.6. Hasil amplifikasi isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 menggunakan primer 18S

Hasil deteksi amplifikasi pada gel agarosa 1% menunjukkan pita tunggal. Hasil sekuen gen 18S rDNA *Penicillium* sp. ID10-T065 menunjukkan fragmen DNA berukuran 1590 bp yang berada pada posisi 804 sampai 2392 (Gambar II.6). Hasil analisis BLAST sekuen gen 18S rDNA pada database NCBI menunjukkan tingkat kesamaan (*similarity*) sebesar 99% dengan spesies *P. oxalicum*, *P. decumbens*, *P. chrysogenum*, dan *P. expansum*. Tingkat *similarity* terdekat isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 adalah dengan strain *Penicillium oxalicum* strain 114-2 (KF152942) (Lampiran II.5).

Penentuan identitas fungi selain secara molekuler harus didukung dengan analisis morfologi makroskopik dan mikroskopik (Frisvad & Samson2004; Tiwari dkk. 2011). Hasil analisis makroskopik dan mikroskopik dapat dilihat pada Gambar II.7.

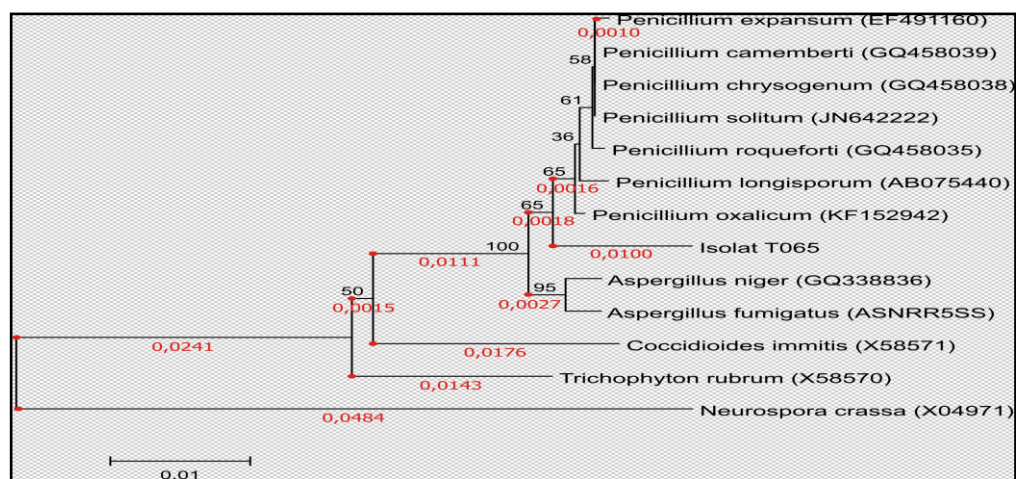


Gambar II.7. Morfologi makroskopik (a) dan mikroskopik (b) isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Pengamatan makroskopik isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 memiliki ciri-ciri spora berwarna hijau dengan tekstur seperti beludru dan tepi koloni rata dengan diameter koloni sekitar 0,5--1 cm. Permukaan koloni isolat berwarna hijau dengan miselium berwarna putih (Gambar II.7a). Data makroskopik menunjukkan kesamaan ciri dengan isolat *P. oxalicum* ZHJ6 (Zhao dkk. 2010)

Pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa isolat merupakan kelompok *Penicillium* dengan tipe konidiofor *biverticillate* (*one-staged branched*) (Gambar II.7b) (Frisvad & Samson 2004). Hal tersebut mirip dengan isolat *P. oxalicum* ZHJ6 (Zhao dkk. 2010) yang menunjukkan bahwa metula merupakan percabangan kedua setelah konidiofor dan menopang *phialide* yang berbentuk seperti botol. *Phialide* terbentuk pada bagian ujung dari konidiofor.

Analisis hubungan kekerabatan dilakukan untuk konfirmasi kekerabatan isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 dengan strain *Penicillium* lainnya. Analisis dilakukan dengan merancang pohon filogenetik menggunakan model Neighbor-Joining (NJ). Pohon filogenetik NJ dibuat menggunakan program MEGA6 dengan metode Kimura dua-parameter (Tateno dkk. 1994; Hall 2013; Tamura dkk. 2013). Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar II.8.



Keterangan:

- : nilai bootstrap
- : jarak genetik

Gambar II.8. Hasil analisis Pohon Filogenetik isolat *Penicillium* sp.ID10-T065 menggunakan model Neighbor-Joining dengan metode Kimura dua-parameter

Berdasarkan hasil analisis menggunakan NJ diketahui bahwa isolat ID10-T065 termasuk dalam genus *Penicillium* (Gambar II.8). Isolat ID10-T065 memiliki jarak terdekat dengan spesies *Penicillium oxalicum* meskipun tidak berada dalam satu cabang. Hal tersebut menunjukkan bahwa identitas isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 belum dapat dipastikan sebagai *P. oxalicum* meskipun tingkat *similarity* 99%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa masih harus dilakukan pendekatan molekuler ataupun fenotipik lainnya untuk konfirmasi karakter isolat. Salah satu usaha yang dapat dilakukan menurut Skouboe dkk. (2000) adalah dengan merancang primer spesifik pada posisi 1.650--1750. Hal tersebut dikarenakan fragmen DNA pada posisi 1.650--1750 diketahui merupakan posisi paling banyak mengalami evolusi.

KESIMPULAN

Mutan UV (UV₁₃) menunjukkan perubahan basa terbanyak dibandingkan dua mutan lainnya (EM₃₁ dan UM₂₃). Mutasi sinar UV dan EMS mengakibatkan DNA mengalami transisi dan transversi, sedangkan mutasi kombinasi UV-EMS mengakibatkan mutasi transversi. Perubahan basa mengakibatkan terjadi *missense mutation* pada mutan UV₁₃, EM₃₁ dan UM₂₃. Selain itu, peristiwa *silent mutation* ditemukan pada mutan UV₁₃ dan EM₃₁.

Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 diketahui memiliki kesamaan identitas sebesar 99% secara molekuler dan fenotipe morfologi yang mirip dengan isolat *Penicillium oxalicum*. Analisis filogenetik menunjukkan isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 merupakan genus *Penicillium*.

DAFTAR ACUAN

- Adrio, J.L. & A.L. Demain. 2006. Genetic improvement of process yielding microbial products. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **30**: 187--214
- Afifi, A.F., H.I. Abo-Elmagd & M.M. Housseiny. 2014. Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL 792 through physical and chemical mutation, optimization, characterization and genetic

- variation between mutant and wild-type strains. *Annals of Microbiology* **64**: 521--530.
- Ager, D. D. & R. H. Haynes. 1990. Analysis of interactions between mutagens, II. Ethyl methanesulfonate and ultraviolet light in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **232**: 327--336.
- Borah, P. 2011. Primer designing for PCR. *Science Vision* **11**(3): 134--136.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* **20**(9): 2380.
- Chandra, M., A. Kalra, N.S. Sangwan, S.S. Gaurav, M.P. Darokar & R. S. Sangwan. 2009. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology* **100**: 1659--1662.
- Dale, J.W. & M. von Schantz. 2002. *From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xii+360 hlm.
- Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe & G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Application* **3**(3): S30--S37.
- Dillon, A.J.P., S.O. Paesi-Toresan & L.P. Barp. 1992. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp. strain denominated 3MUV24. *Brazilian Journal of Genetics* **15**(3): 491--498.
- EL-Bondkly, A.M. & A.A. Keera. 2007. UV- and EMS- induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii*. *Arab Journal of Biotechnology* **10**(2): 241--248.
- Fowler, T. & R.D. Brown. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Molecular Microbiology* **6**(21): 3225--3235.
- Frisvad, J.C. & R.A. Samson. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* in their mycotoxins. *Studies in Mycology* **49**: 1--174.
- Goodsell, D.S. 2001. The molecular perspective: Ultraviolet light and pyrimidine dimmers. *The Oncologist* **6**: 298--299.

- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Leontin & W.M. Gelbart. 2000. *An introduction to genetic analysis*. 7th ed. W.H. Freeman, New York.
From <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21936>. 05-12-2014. 05:36 a.m.
- Hall, B.G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*: 1--7.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: xi+ 468 hlm.
- Hooley, P., S.G. Shawcross & P. Strike. 1988. An adaptive response to alkylating agents in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **14**: 445--449.
- Ike, M., J.Y. Park, M. Tabuse & K. Tokuyasu. 2010. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 2059--2066.
- Ikehata, H. & T. Ono. 2011. The Mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* **52**: 115--125.
- Innis, M.A. & D.H. Gelfand. 1990. Optimizations of PCRs. *Dalam*: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.) 1990. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, California: xvii + 461.
- Innis, M.A., K.B. Myanebo, D.H. Gelfand & M.A. Brow. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proceedings of The National Academy of Sciences* **85**: 9436--9440.
- Irfan, M., J. Javed, & Q. Syed. 2011. UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for enzyme production in submerged fermentation. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **44**(4): 137--140.
- Kim, Y.S., K.S. Schumaker, & J-K. Zhu. 2006. EMS Mutagenesis of *Arabidopsis*. *Dalam*: Salinas, J. & J.J. Sanchez-Serrano (eds.) 2006. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, Humana Press Inc.: 101--103.
- Krogh, K.B.R.M., P.V. Harris, C.L. Olsen, K.S. Johansen, J. Hojer-Pedersen, J. Borjesson & L. Olsson. 2010. Characterization and kinetic analysis of a

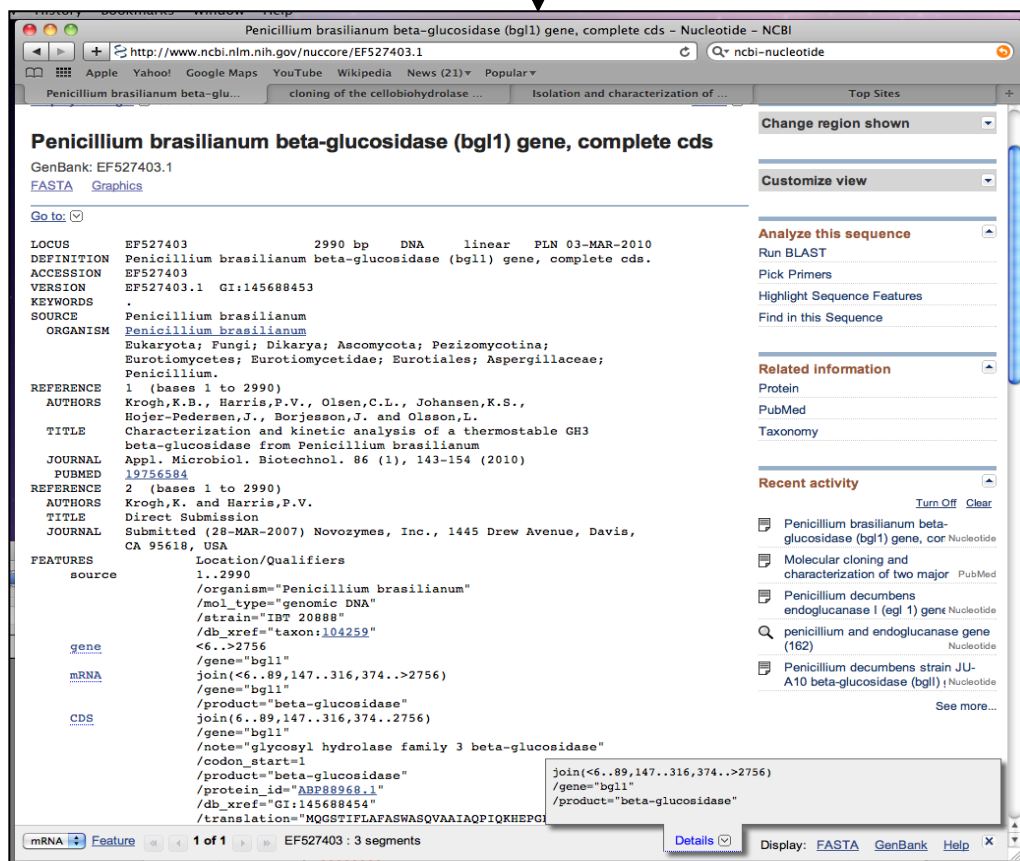
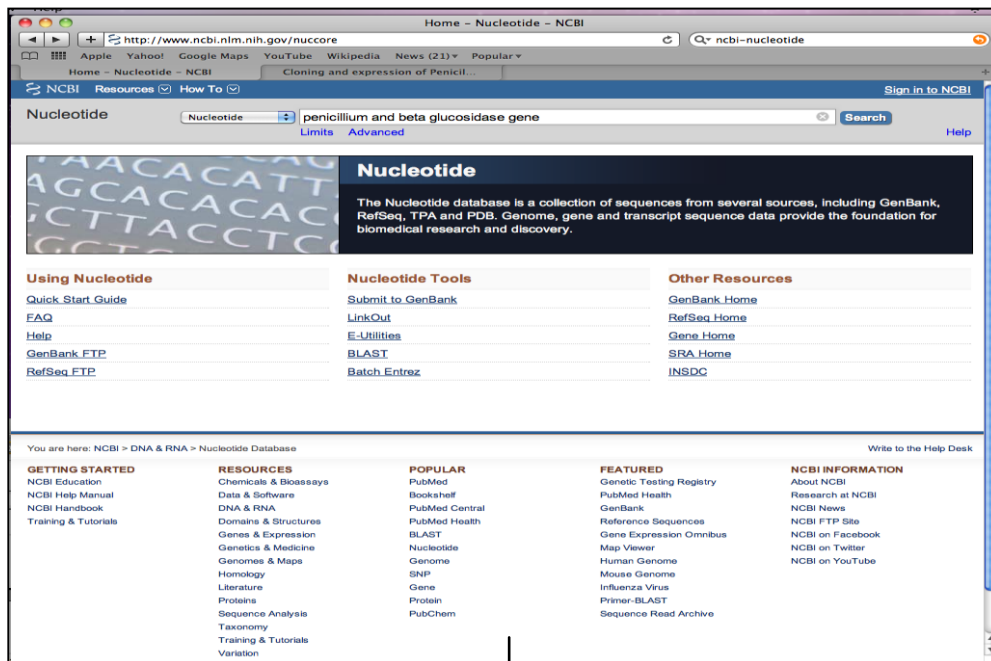
- thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:143--154.
- Li, X.-H., H.-J. Yang, B. Roy, E.Y. Park, L.-J. Jiang, D. Wang & Y.-G. Miao. 2010. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiological Research* **165**: 190--198.
- Liu Y.-T., Z.-Y. Luo, C.N. Long, H.-D. Wang, M.-N. Long & Z. Hu. 2011. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnology* **28**(6): 733--737.
- Livneh, Z., O. Cohen-Fix, R. Skaliter & T. Elizur. 1993. Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**(6): 465--513.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl & I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(3): 506--577.
- Maki, M., K.T. Leung, W. Qin. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences* **5**(5): 500--516.
- Nelson, D.L. & M.M. Cox. 2005. *Lehninger: Principles of biochemistry*. 4th ed. W.H. Freeman, New York: 1.119 hlm.
- Nicolás-Santiago, S.D., C. Regalado-González, B. García-Almendárez, F. J. Fernández, A. Téllez-Jurado & S. Huerta-Ochoa. 2006. Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gs1 mutants. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**(1): 51--60.
- Nuswantara, S. 2014. Self-communication.
- Purves, K., D. Sadava & H.C. Heller. 2003. *Life: The science of biology*. 7th ed. Sinauer Associates and W. H. Freeman: 1.120 hlm.
- Rajeshkumar, J. & M.H.M. Ilyas. 2011. Production of phosphatase by mutated fungal strains. *International Multidisciplinary Research Journal* **1**(5): 23--29.
- Ramzan, M., M. Asgher, M.A. Sheikh & H. Nawaz. 2013. Hyperproduction of manganese peroxidase through chemical mutagenesis of *Trametes*

- versicolor* IBL-04 and optimization of process parameters. *BioResources* **8**(3): 3953--3966.
- Ranoa, D.R.E., C.Y. Lumibao, J. L. Roxas, B.B. San Luis & C.T. Hedreyda. 2005. Comparison of conventional plate assays with DNA-based screening protocols for protease and cellulase production from putative *Bacillus* isolates. *Science Diliman* **17**(1): 31--36.
- Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL). New York: xxvii + 18.125.
- Sega, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* **134**: 113--142.
- Shafique, S., R. Bajwa & S. Shafique. 2009. Mutation of *Alternaria tenuissima* FCBP-252 for hyper-active α -amylase. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**: 591--596.
- Singh, V.K., R. Govindarajan, S. Naik & A. Kumar. 2000. The effect of hairpin structure on PCR amplification efficiency. *Molecular Biology Today* **1**(3): 67--69.
- Singhania, R.R., A.K. Patel, R.K. Sukumaran, C. Larroche & A. Pandey. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* **127**: 500--507.
- Skouboe, P., J.W. Taylor, J.C. Frisvad, D. Lauritsen, L. Larsen, C. Albæk, M. Boysen & L. Rossen. 2000. Molecular methods for differentiation of closely related *Penicillium* species. *Dalam*: Samson, R.A. & J.I. Pitt (eds.) 2000. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers: 179--188 hlm.
- Sørensen, A., M. Lübeck, P.S. Lübeck & B.K. Ahring. 2013. Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* **3**: 612--631.
- Syed, S., S. Riyaz-Ul-Hassan & S. Johri. 2013. A novel cellulose from an endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. *American Journal of Microbiological Research* **1**(4): 84--91.

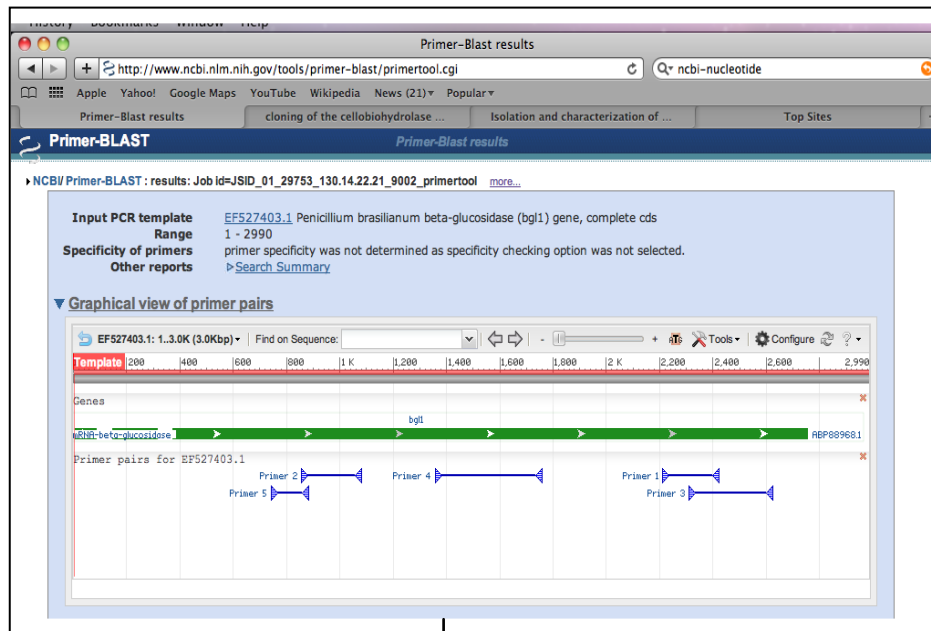
- Tamarin, R. H. 2001. *Principles of genetics*. 7th ed. The McGraw–Hill Companies: xvi+609 hlm.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**(12): 2725--2729.
- Tateno, Y., N. Takezaki & M. Nei. 1994. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Molecular Biology and Evolution* **11**(2): 261--277.
- Tiwari, K.L., S.K. Jadhav & A. Kumar. 2011. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East Journal of Scientific Research* **7**(2): 203--210.
- Voet, D. & J.G. Voet. 2011. *Biochemistry*. 4th ed. Joh Wiley & Sons Inc., New Jersey: xxviii + 1.428 hlm.
- Wolska, K. & P. Szweda. 2012. Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. *Dalam: Mahmut Caliskan-Genetic Diversity in Microorganisms*, Book 4. In Tech: 53--94 hlm.
- Wu, Z., Y. Tsumura, G. Blomquist & X-R. Wang. 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9): 5389--5397.
- Zhao, R-b., Bao H-y & Liu Y-x. 2010. Isolation and characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for biodegradation of methamidophos. *Agricultural Sciences in China* **9**(5): 695--703.

Lampiran II.1

Perancangan primer BG



Lampiran II.1 (Lanjutan)



Primer-BLAST results

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCAAGCACCTCCATCGGAC	Plus	20	2216	2235	60.04	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GTTGAGAGGTTGAGGGGAGC	Minus	20	2417	2398	60.04	60.00	2.00	2.00
Product length 202									

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGTGGCCATTGCTGATGC	Plus	20	861	880	60.04	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	TCACCCGGCATGCTCATATC	Minus	20	1078	1059	59.96	55.00	6.00	2.00
Product length 218									

Primer pair 3

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAACAGCACTGTCTCCCTCC	Plus	20	2315	2334	60.04	60.00	6.00	0.00
Reverse primer	AATGTTGAGCTCTGACGGG	Minus	20	2620	2601	60.04	55.00	6.00	3.00
Product length 306									

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGAAGGGTACAGTTCTGCT	Plus	20	1362	1381	60.04	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	AGAGGGTCAGATTGTTGCGG	Minus	20	1755	1736	60.04	55.00	3.00	1.00
Product length 394									

Primer pair 5

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTGGAAACGAGCAGGAGCA	Plus	20	747	766	59.96	50.00	2.00	0.00
Reverse primer	GCATCAGCAAATGCCACAA	Minus	20	880	861	60.04	50.00	6.00	0.00
Product length 134									

Lampiran II.2

Data kuantifikasi DNA isolat *wild-type* dan mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

Kode Isolat	DNA 1 (ng/μl)	DNA 2 (ng/μl)
<i>Wild-type</i>	Invalid	invalid
UV ₁₃	Invalid	invalid
EM ₃₁	210,7	243,4
UM ₂₃	157,4	172,3

Lampiran II.3

Hasil penyejajaran sekuen strain referensi dengan isolat *wild-type* dan mutan *Penicillium* sp. ID10-T065

10 20 30 40 50 60 70

Ref -----ATGGGCCGTGTGTAGGAAACACTGGATCAATTCTCGTCTCGGATTCAAAGGATTTTGTGTA 1-60
MetGlyArgValEndGluThrLeuAspGlnPheLeuValSerAspSerLysAspPheVal

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

80 90 100 110 120 130 140

Ref -----CCCAGGATTCACCACAGGGTGTTTCGGTTCGCAGATTATTCTCCGCTTTTCACATCTAGCCAAATGGCCGC 61-130
ProArgIleHisHisArgValPheGlySerGlnIleIleProProLeuSerHisLeuAlaLysTrpPro

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

150 160 170 180 190 200 210

Ref -----CGCAACATTTGACCGCTCAATTCTTTATCAACGAGGCCAAGCCATGGCACAGGAACACAAGGCTAAGGGT 131-200
ProGlnHisLeuThrAlaGlnPhePheIleAsnGluAlaLysProTrpHisArgAsnThrArgLeuArgVal

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

220 230 240 250 260 270 280

Ref -----ATCACAATTCAATTGGGCCCTGTTGCCGGCCCTCTCGGTCGCATCCCCGAGGGCGGCCGCAACTGGGAAG 201-270
SerGlnPheAsnTrpAlaLeuLeuProAlaLeuSerValAlaSerProArgAlaAlaAlaThrGlyLys

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

290 300 310 320 330 340 350

```

Ref  GATTCTCCCCTGATCCTGTCTTGACTGGTATAGCCATGGCTGAGACAATTAAGGGCATGCAGGATACTGG 271-340
Wt   -----
AspSerProLeuIleLeuSerEndLeuValEndProTrpLeuArgGlnLeuArgAlaCysArgIleLeu

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

          360      370      380      390      400      410      420
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Ref  AGTGATTGCTTGCGCTAAACATTATATTGGAACGAGCAGGAGCACTTCCGTCAAGTGGGTGAAGCTGCG 341-410
Wt   GluEndLeuLeuAlaLeuAsnIleIleLeuGluThrSerArgSerThrSerValLysTrpValLysLeuArg
      -----

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

          430      440      450      460      470      480      490
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Ref  GGTCCACGATACACTATTTCGATACTATTTTCATCTAATATTGACGACCGTGCTATGCATGAGCTATACT 411-480
Wt   ValThrAspThrLeuPheProIleLeuPheHisLeuIleLeuThrThrValLeuCysMetSerTyrThr
      -----

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

          500      510      520      530      540      550      560
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Ref  TGTGGCCATTTGCTGATGCCGTCGCGCTGGTGTGGGTCTTTTCATGTGCTCATACTCTCAGATCAACAA 481-550
Wt   CysGlyHisLeuLeuMetProPheAlaLeuValTrpValLeuSerCysAlaHisThrLeuArgSerThr
      -----

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

          570      580      590      600      610      620      630
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Ref  CTCCTACGGATGCCAAACAGTCAGACCCTCAACAAGCTCCTCAAGAGCGAATTGGGCTTCCAAGGCTTT 551-620
Wt   ThrProThrAspAlaLysThrValArgProSerThrSerSerSerArgAlaAsnTrpAlaSerLysAlaLeu
      -----

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

          640      650      660      670      680      690      700
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Ref  GTCATGAGCGATTGGGGTGCCCATCACTCTGGAGTGTCATCGGCGCTAGCTGGACTTGATATGAGCATGC 621-690
Wt   SerEndAlaIleGlyValProIleThrLeuGluCysHisArgArgEndLeuAspLeuIleEndAlaCys
      -----

UV13 -----
EM31 -----
UM23 -----

```

	710	720	730	740	750	760	770	
Ref								
	CGGGTGATACCGAATTTGATTCTGGCTTGAGCTTCTGGGGCTCTAACCTCACCATTGCAATTCGAACGG	691-760						
Wt	ArgValIleProAsnLeuIleLeuAlaEndAlaSerGlyAlaLeuThrSerProLeuGlnPheEndThr							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	780	790	800	810	820	830	840	
Ref								
	CACGGTTCCCGAATGGCGCCTGGATGACATGGCGATGCGAATTATGGCTGCATACTTCAAAGTTGGCCTT	761-830						
Wt	AlaArgPheProAsnGlyAlaTrpMetThrTrpArgCysGluLeuTrpLeuHisThrSerLysLeuAlaLeu							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	850	860	870	880	890	900	910	
Ref								
	ACTATTGAGGATCAACCAGATGTCAACTTCAATGCCTGGACCCATGACACCTACGGATATAAATACGCTT	831-900						
Wt	LeuLeuArgIleAsnGlnMetSerThrSerMetProGlyProMetThrProThrAspIleAsnThrLeu							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	920	930	940	950	960	970	980	
Ref								
	ATAGCAAGGAAGATTACGAGCAGGTCAACTGGCATGTTCGATGTTTCGACGCGACCACAATAAGCTCATTCTG	901-970						
Wt	IleAlaArgLysIleThrSerArgSerThrGlyMetSerMetPheAlaAlaThrThrIleSerSerPhe							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	
Ref								
	CGAGACTGCCGCGAAGGGTACAGTTCTGCTGAAGAACAACCTTTCATGCTCTCCCTCTGAAGCAGCCCAGG	971-1040						
Wt	AlaArgLeuProArgArgValGlnPheCysEndArgThrThrPheMetLeuSerLeuEndSerSerProGly							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
Ref								
	TTTCGTGGCCGTCGTTGGTCAGGATGCCGGGCCAAACCCCAAGGGCCCTAACGGCTGCGCAGACCGAGGAT	1041-1110						
Wt	SerTrpProSerLeuValArgMetProGlyGlnThrProArgAlaLeuThrAlaAlaGlnThrGluAsp							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							

	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	
Ref								
Ref	GCGACCAAGGC	ACTCTCGCAAT	GGGATGGGGCT	CAGGGTCTACCGAAT	TCCCTTACCTGGT	CACTCCTGA	1111-1180	
Wt	AlaThrLysAlaLeuSerGlnTrpAspGlyAlaGlnGlyLeuProAsnSerLeuThrTrpSerLeuLeu							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	
Ref								
Ref	CAC	TGCTATT	CAGTCAA	AGGTCCT	CGAATAC	GGGGT	CGATACGAGAGTATTTT	GATAACTATGACGAC 1181-1250
Wt	ThrLeuLeuPheSerGlnArgSerSerAsnThrGlyValAspThrArgValPheLeuIleThrMetThrThr							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	
Ref								
Ref	AATGCTATCTT	GTCGCTT	GTCTCAC	AGCCTGATG	CAACCTGTATCGT	TTTTTGCAAAT	GCCGATTCCGGTG 1251-1320	
Wt	MetLeuSerCysArgLeuSerHisSerLeuMetGlnProValSerPheLeuGlnMetProIleProVal							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
Ref								
Ref	AAGGCTACAT	CACTGT	CGACAACA	ACTGGGGT	GACCGCAACA	ATCTGACCCTCTGGCAAAAT	GCCGATCA 1321-1390	
Wt	LysAlaThrSerLeuSerThrThrThrGlyValThrAlaThrIleEndProSerGlyLysMetProIle							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	
Ref								
Ref	AGT	GATTAGCA	CTGT	CAGCTCG	CGATGCAACA	ACACAATCGTTG	TCTCCACTCTGT	CGGACCAAGTGTG 1391-1460
Wt	LysEndLeuAlaLeuSerAlaArgAspAlaThrThrGlnSerLeuPheSerThrLeuSerAspGlnCysCys							
UV13	-----							
EM31	-----							
UM23	-----							
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	
Ref								
Ref	CTAAATGGT	TATATAG	CACCCGA	ACATCAC	AGCTATTG	TCTGGGCAGGGAT	GCCAGCGCAAGAATCTG 1461-1530	
Wt	EndMetValTyrMetSerThrArgThrSerGlnLeuLeuSerGlyGlnGlyCysGlnAlaLysAsnLeu							
UV13	CGACACTCGGTTCTCCAGAAAACTTGTTCGGAACCCGCGACGAAAAAGCGATAGTATAC--ATGATTTG							
EM31	CGACACTCGGTTCTCCAGAAAACTTGTTCGGAACCCGCGACGAAAAAGCGATAGTATAC--ATGATTTG							
UM23	CGACACTCGGTTCTCCAGAAAACTTGTTCGGAACCCGCGACGAAAAAGCGATAGTATAC--ATGATTTG							

AspThrArgPheSerArgLysThrCysSerGluProAlaThrGluLysArgEndTyrThr EndPhe										
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610			
Ref										
	---GCAATGCTCTCGTGGATATTCTTTGGGG---CAATGTTAAACCTGCGCGGTGCGCACTCCGTTTCACTCTGGG									1531-1600
Wt	AlaMetLeuSerTrpIlePhePheGly AlaMetLeuThrLeuProValAlaLeuArgSerProGly									
	AATGCCCTACTTTCCCGAACC									
UV13	GluCysProThrPheProGluProArgGlnSerArgArgLysProTrpMetLysArgProLysProProLeu									
	AATGCCCTACTTTCCCGAACC									
EM31	GluCysProThrPheProGluProArgGlnSerArgArgLysProTrpMetLysArgProLysProProLeu									
	AATGCCCTACTTTCCCGAACC									
UM23	GluCysProThrPheProGluProArgGlnSerArgArgLysProTrpMetLysArgProLysProProLeu									
	GluCysProThrPheProGluProArgGlnSerArgArgLysProTrpMetLysArgProLysProProLeu									
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680			
Ref										
	CCAAAAGTCGAGAGGACTATGGCACTGATATAATGTACGAGCCCAACACGGCCAGCGTGC									1601-1670
Wt	ProLysValGluArgThrMetAlaLeuIleEndCysThrSerProThrTrpAlaSerValArgLeu Ser									
	CGACGGGCTGATCTTGGTCCTTCACCCAAGTACTCGGTACTTACATCACC									
UV13	AspGlyLeuIleLeuValLeuHisProSerThrArgTyrLeuHisHisArgAlaLysTyrGlySerSer									
	CGACGGGCTGATCTTGGTCCTTCACCCAAGTACTCGGTACTTACATCACC									
EM31	AspGlyLeuIleLeuValLeuHisProSerThrArgTyrLeuHisHisArgAlaLysTyrGlySerSer									
	CGACGGGCTGATCTTGGTCCTTCACCCAAGTACTCGGTACTTACATCACC									
UM23	AspGlyLeuIleLeuValLeuHisProSerThrArgTyrLeuHisHisArgAlaLysTyrGlySerSer									
	AspGlyLeuIleLeuValLeuHisProSerThrArgTyrLeuHisHisArgAlaLysTyrGlySerSer									
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750			
Ref										
	AGGATTTCACCGAGAGCATCTACCTCGACTACCGCCATTTTCGACAAAGCTGGTATCGAGCCAATTTACGA									1671-1740
Wt	ArgIleSerProArgAlaSerThrSerThrThrAlaIleSerThrLysLeuValSerSerGlnPheThr									
	CGGGGT-----AGCGGTAAC									
UV13	ArgGly SerGlyAsnSerAlaGlyProHisAspLeu HisAspLeuProProAlaLys Asn									
	CGGGGT-----AGCGGTAAC									
EM31	ArgGly SerGlyAsnSerAlaGlyProHisAspLeu HisAspLeuProProAlaLys Asn									
	CGGGGT-----AGCGGTAAC									
UM23	ArgGly SerGlyAsnSerAlaGlyProHisAspLeu HisAspLeuProProAlaLys Asn									
	ArgGly SerGlyAsnSerAlaGlyProHisAspLeu HisAspLeuProProAlaLys Asn									
	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820			
Ref										
	GTTTGGATTTCGGCTCTCCTATACCACTT-CGAATACTCTG-ACCTCCGTGTTGTGAAGAAGTATGTTT									1741-1810
Wt	SerLeuAspSerAlaSerProIleProPro SerAsnThrLeu ThrSerValLeuEndArgSerMetPhe									
	TTTCGAATCTCGTTTATCTTGGGGTCAGCGTGCAAGTCTCAGTACCTGGATGTTG-----GCCTTCCCTC									
UV13	PheArgIleSerPheIleTrpGlyGlnArgAlaGlyProGlnTyrLeuAspVal GlyLeuProSer									
	TTTCGAATCTCGTTTATCTTGGGGTCAGCGTGCAAGTCTCAGTACCTGGATGTTG-----GCCTTCCCTC									
EM31	PheArgIleSerPheIleTrpGlyGlnArgAlaGlyProGlnTyrLeuAspVal GlyLeuProSer									
	TTTCGAATCTCGTTTATCTTGGGGTCAGCGTGCAAGTCTCAGTACCTGGATGTTG-----GCCTTCCCTC									
UM23	PheArgIleSerPheIleTrpGlyGlnArgAlaGlyProGlnTyrLeuAspVal GlyLeuProSer									
	PheArgIleSerPheIleTrpGlyGlnArgAlaGlyProGlnTyrLeuAspVal GlyLeuProSer									
	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890			
Ref										
	AACCATACAGTCCCACGACCGGCACCGGTGCTCAAGCACCTTCCATCGGACAGCCACCTAGCCAGAACCT									1811-1880
Wt	AsnHisThrValProArgProAlaProValLeuLysHisLeuProSerAspSerHisLeuAlaArgThr									
	ACATATCTATTCAAGTCACTGGTACTGGCTGACATACACCCCGAAAAGGCCAATCACTCCGCCG----									
UV13	HisIleTyrSerSerHisTrpTyrTrpLeuThrTyrThrProLysArgProIleThrProPro Pro									
	ACATATCTATTCAAGTCACTGGTACTGGCTGACATACACCCCGAAAAGGCCAATCACTCCGCCG----									
EM31	HisIleTyrSerSerHisTrpTyrTrpLeuThrTyrThrProLysArgProIleThrProPro Pro									
	ACATATCTATTCAAGTCACTGGTACTGGCTGACATACACCCCGAAAAGGCCAATCACTCCGCCG----									
UM23	HisIleTyrSerSerHisTrpTyrTrpLeuThrTyrThrProLysArgProIleThrProPro Pro									
	HisIleTyrSerSerHisTrpTyrTrpLeuThrTyrThrProLysArgProIleThrProPro Pro									
	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960			
Ref										
	GGATACCTACAAGTTCCCTGCTACATACAAGTACATCAAACCTTCATTATCCCTACCTGAACAGCACT									1881-1950
Wt	TrpIleProThrSerSerLeuLeuHisThrSerThrSerLysProSerPheIleProThrEndThrAlaLeu									
	GTTCCACC-----GCCCGACGCTCATTCTCGGTTTCTGGAA---TTCTTTCCTCCTTATTTC-----									
	PheThr AlaArgArgSerPheCysValSerGly IleLeuSerSerLeuPheHis									

```

UV13  GTTCACC-----GCCCGACGCTCATTCTGCGTTTCTGGAA---TTCTTTCCTCCTTATTTC-----
      PheThr    AlaArgArgSerPheCysValSerGly   IleLeuSerSerLeuPheHis
EM31  GTTCACC-----GCCCGACGCTCATTCTGCGTTTCTGGAA---TTCTTTCCTCCTTATTTC-----
      PheThr    AlaArgArgSerPheCysValSerGly   IleLeuSerSerLeuPheHis
UM23  GTTCACC-----GCCCGACGCTCATTCTGCGTTTCTGGAA---TTCTTTCCTCCTTATTTC-----
      PheThr    AlaArgArgSerPheCysValSerGly   IleLeuSerSerLeuPheHis

      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
Ref   GTCTCCCTCCGCGCTGCTTCCAAGGATCCCGAATACGGTCGTACAGACTTTATCCACCCACGCGCGTG 1951-2090
      SerProSerAlaLeuLeuProArgIleProAsnThrValValGlnThrLeuSerHisProThrArgVal
Wt    --CTCCTCACGCTCCCTCGTTTTGATCTT---TCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCATATTTT
      SerSerArgSerProArgPheAspLeu   SerGlyPhePhePhePhePheSerProProIlePhe
UV13  --CTCCTCACGCTCCCTCGTTTTGATCTT---TCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCATATTTT
      SerSerArgSerProArgPheAspLeu   SerGlyPhePhePhePhePheSerProProIleLeu
EM31  --CTCCTCACGCTCCCTCGTTTTGATCTT---TCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCATATTTT
      SerSerArgSerProArgPheAspLeu   SerGlyPhePhePhePhePheSerProProIlePhe
UM23  --CTCCTCACGCTCCCTCGTTTTGATCTT---TCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCAATTTT
      SerSerArgSerProArgPheAspLeu   SerGlyPhePhePhePhePheSerProProLysPhe

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
Ref   ATGGCTCCCTCAACCTCTCAACCCCGCTGGAGACCCAGTGGCCAGTGGTGGAACAACATGCTCTACGA 2021-2090
      MetAlaProLeuAsnLeuSerThrProLeuGluThrGlnTrpProValValGluThrThrCysSerThr
Wt    CCGGATGCCTTTCGCCGTTGAAAA-----
      SerGlyCysLeuSerProLeuLys
UV13  CCGGAGGCCGTTTCGCCCGGAAAAA-----
      SerGlyGlyArgSerProGlyLysLys
EM31  CCGAAGCCCTTTCCTTTGAAAA-----
      SerGluAlaLeuSerProLeuLys
UM23  CCGGATCCCTTTCGCCGTTGAAAA-----
      SerGlySerLeuSerProLeuLys

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
Ref   CGAACTTTACGAGGTCACTGCACAGATCAAAAACACTGGCGACGTGGCCGGCGACGAAGTCGTCCAGCTT 2091-2160
      ThrAsnPheThrArgSerLeuHisArgSerLysThrLeuAlaThrTrpProAlaThrLysSerSerSerPhe
Wt    -----
UV13  -----
EM31  -----
UM23  -----

      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
Ref   TACGTAGATCTCGGGGTGACAACCCGCTCGTCAGTTGAGAACTTTGACAGGTTTTATCTGCTGCCCG 2161-2230
      ThrEndileSerGlyValThrThrArgLeuValSerEndGluThrLeuThrGlyPheIleCysCysPro
Wt    -----
UV13  -----
EM31  -----
UM23  -----

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
Ref   GTCAGAGCTCAACATTCCGGGCTACATTGACGCGCCGTGATTTGAGCAACTGGGATATTGAGGCGCAGAA 2231-2300
      ValArgAlaGlnHisSerGlyLeuHisEndArgAlaValIleEndAlaThrGlyIleLeuArgArgArg
Wt    -----
UV13  -----
EM31  -----
UM23  -----

      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380

```

Ref CTGGCGAGTTACGGAATCGCCTAAGAGAGTGTATGTTGGACGGTCGAGTCGGGATTTGCCGCTGAGCTCA 2301-2370
 ThrGlyGluLeuArgAsnArgLeuArgGluCysMetLeuAspGlyArgValGlyIleCysArgEndAlaHis

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

2390
|....|..
 Ref CAATTGGAGTAA 2371-2382
 AsnTrpSer

Wt -----

UV13 -----

EM31 -----

UM23 -----

Lampiran II.4
Tabel kodon asam amino

First letter of codon (5' end)		Second letter of codon							
		U		C		A		G	
U	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	U	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	U	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
	U	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
C	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	C	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	C	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	C	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	A	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	A	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	A	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	G	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	G	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	G	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

[Sumber: Nelson & Cox 2005]

Lampiran II.5
Hasil analisis NCBI BLAST *Penicillium* sp. ID10-T065 pada situs
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected: 0							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Penicillium sp. 8-12c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2870	2870	100%	0.0	99%	KC790520.1
☐	Penicillium sp. 6-16M 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2865	2865	100%	0.0	99%	KC143067.1
☐	Eupenicillium javanicum isolate AFTOL-ID 429 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2865	2865	100%	0.0	99%	EF413620.1
☒	Penicillium oxalicum strain 114-2 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S	2857	2857	100%	0.0	99%	KF152942.1
☐	Penicillium decumbens strain ML-017 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2857	2857	100%	0.0	99%	FJ458446.1
☐	Penicillium decumbens strain 13-01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2857	2857	100%	0.0	99%	EU667998.1
☐	Penicillium decumbens strain L-06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2857	2857	100%	0.0	99%	EU273880.1
☐	Eupenicillium javanicum 18S small subunit rRNA gene	2857	2857	100%	0.0	99%	U21298.1
☐	Chromocleista sp. 12F 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2854	2854	100%	0.0	99%	FJ716250.1

DISKUSI PARIPURNA

β -glukosidase sebagai salah satu komponen enzim selulase memiliki peran penting dalam proses hidrolisis materi selulosa, yaitu menghidrolisis molekul selobiosa menjadi glukosa. Proses tersebut akan mengurangi akumulasi selobiosa yang merupakan inhibitor sekresi endoglukanase (EG) dan selobiohidrolase (CBH) (Singhania dkk. 2013; Sørensen dkk. 2013). β -glukosidase yang dihasilkan oleh fungi lebih disukai oleh industri karena proses pemulihan yang mudah, memiliki aktivitas yang tinggi, serta stabil dalam rentang pH dan suhu yang luas (Lis & Sharon 1993). Produktivitas BGL dari kultur fungi dianggap rendah bagi skala industri sehingga diperlukan pengembangan hiperproduksi BGL (Lynd dkk. 2002; Maki dkk. 2009). Salah satu cara adalah dengan memutasi gen regulator dan promotor pada enzim tersebut. Lokasi dan jumlah gen juga perlu diketahui untuk mempelajari peran BGL dalam regulasi gen dan hidrolisis selulosa (Fowler & Brown 1992).

Penicillium sebagai salah satu genus fungi potensial penghasil BGL merupakan target baru bagi industri untuk pengembangan hiperproduksi BGL yang lebih efisien dari *Trichoderma reesei* (strain industri untuk produksi selulase) (Sun dkk. 2008; Amore & Faraco 2012; Syed dkk. 2013). Laboratorium Mikrobiologi Terapan, P2 Biotek, LIPI memiliki koleksi isolat-isolat *Penicillium* selulolitik. Isolat-isolat tersebut ditapis kemudian satu isolat potensial dipilih untuk dimutasi dan dianalisis aktivitas BGL serta sekuen gen pengode (*bgl1*). Mutasi dilakukan menggunakan sinar ultraviolet (UV) dan etil metil sulfonat (EMS).

Proses penapisan menggunakan metode *Plate Agar Assay*, yaitu menumbuhkan mikroorganisme pada medium agar mengandung substrat yang sesuai dengan kerja enzim. Penapisan dilakukan dengan menganalisis pembentukan zona bening pada tiap isolat. Zona bening yang terbentuk menandakan isolat mampu menggunakan substrat sebagai sumber karbon dan menghidrolisis menjadi unit lebih sederhana dengan menghasilkan enzim ekstraseluler (Castro dkk. 1995; Ranoa dkk. 2005). Aktivitas hidrolisis diukur dengan membandingkan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter

koloni yang tumbuh untuk mendapatkan nilai Indeks Enzimatik (IE). Isolat dengan nilai IE lebih besar dari 1,5 merupakan isolat potensial penghasil selulase (Florencio dkk. 2012).

Hasil pengujian penapisan dari 12 isolat *Penicillium* sp. pada medium CMC 1% agar menunjukkan bahwa ada tiga isolat yang memiliki nilai IE lebih dari 1,5, yaitu ID10-T009 (1,87), ID10-T018 (3,00) dan ID10-T065 (4,88). Penapisan ke-12 isolat *Penicillium* sp. dilakukan dengan tujuan memilih satu isolat potensial penghasil selulase untuk dimutasi dan dianalisis aktivitas BGL pada isolat mutan dan *wild-type*. Isolat ID10-T065 memiliki nilai IE tertinggi, yaitu 4,88. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat ID10-T065 menghasilkan serangkaian enzim selulase terbanyak jika dibandingkan dengan ke-11 isolat *Penicillium* sp. lainnya, sehingga isolat tersebut mampu secara efektif menghidrolisis substrat CMC 1%.

Hasil Mutasi *Penicillium* sp. ID10-T065

Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 dimutasi dengan tiga perlakuan, yaitu pemaparan pada sinar UV (0--15 menit; 13 cm; 0,1 J/cm²), EMS (konsentrasi 0--5% selama 1 jam), serta kombinasi UV-EMS (3 menit; 13 cm; 0,1 J/cm² menggunakan UV dan konsentrasi EMS 2% dan 3% selama 1 jam). Data hasil mutasi menunjukkan bahwa dosis sinar UV optimum adalah 0,1 J/cm², berjarak 13 cm dengan panjang gelombang 254 nm selama 3 menit. Tingkat kematian spora pada perlakuan tersebut mencapai 96%. Konsentrasi EMS optimum adalah 3% karena tingkat kematian spora mencapai 99% pada dosis tersebut. Pertumbuhan koloni mutan dari perlakuan kombinasi ternyata tidak mencapai tingkat kematian yang diharapkan (95--99%). Tingkat kematian hanya sebesar 73--78%.

Seluruh koloni mutan menunjukkan karakter morfologi yang sama dengan morfologi *wild-type*, yaitu spora berwarna hijau dengan tekstur seperti karpet dan tepi koloni rata dengan ukuran koloni berkisar 0,5--1 cm. Karakter perbedaan fenotipe dan peningkatan pertumbuhan mutan bukan merupakan tolak ukur keberhasilan mutasi, akan tetapi berdasarkan peningkatan produksi dan sekresi enzim. Sebagai contoh, pertumbuhan dan karakter fenotipe mutan *Ashbya*

gossypii tidak menunjukkan perbedaan dengan *wild-type*, namun aktivitas enzim ekstraseluler isolat tersebut menunjukkan peningkatan hingga tiga kali lipat dari *wild-type* (Ribeiro dkk. 2013).

Mutan-mutan yang diperoleh selanjutnya diseleksi untuk diuji aktivitas selulase berdasarkan metode *Plate Agar Assay*. Sebanyak 15 isolat (14 isolat mutan + 1 isolat *wild-type*) diuji kemampuan menghasilkan zona bening pada medium CMC 1% agar menggunakan zat pewarna *Congo Red* 0,5% (Teather & Wood 1982). Isolat-isolat dengan nilai IE tertinggi dari setiap perlakuan mutasi dipilih menjadi isolat yang akan dianalisis aktivitas BGL-nya. Hasil penapisan mutan menunjukkan bahwa dari 5 isolat mutan UV yang diuji seluruhnya memiliki nilai IE lebih dari 1,5. Mutan UV₁₃ memiliki nilai IE tertinggi (2,40) dibandingkan dengan UV₁₁ (2,21), UV₁₂ (2,32), UV₁₄ (2,30) dan UV₁₅ (2,27).

Mutan EMS diuji sebanyak 3 isolat yang berasal dari konsentrasi EMS 2% (EM₂₁ dan EM₂₂), serta 3% (EM₃₁). Seluruh mutan EMS yang diuji menunjukkan nilai IE yang lebih tinggi dari 1,5. Mutan EM₃₁ memiliki nilai IE tertinggi (2,73) dibandingkan mutan EM₂₁ (2,38) dan EM₂₂ (2,45). Nilai IE mutan EMS menunjukkan kisaran nilai yang lebih tinggi dari mutan UV. Hal tersebut menandakan bahwa kemampuan mutan EMS dalam menghidrolisis substrat pada medium agar lebih tinggi dibandingkan mutan UV. Hal tersebut menunjukkan bahwa EMS merupakan mutagen potensial karena dapat meningkatkan aktivitas hidrolisis substrat.

Sebanyak 6 mutan dari perlakuan kombinasi (UV-EMS) diuji aktivitas selulasenya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa mutan UM₂₃ memiliki IE tertinggi (2,66) dibandingkan nilai IE UM₂₁ (2,52), UM₂₂ (1,39), UM₃₁ (2,62), UM₃₂ (2,52) dan UM₃₃ (0,89). Data menunjukkan bahwa empat isolat mutan (UM₂₁, UM₂₃, UM₃₁, dan UM₃₂) memiliki nilai IE lebih besar dari 1,5; akan tetapi dua isolat lainnya memiliki nilai IE di bawah 1,5, yaitu mutan UM₂₂ (1,39) dan UM₃₃ (0,89). Variasi nilai IE yang ditunjukkan mutan kombinasi menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan tidak stabil. El-Bondkly & Keera (2007) menyatakan bahwa mutasi kombinasi menggunakan UV dan EMS efisien dalam menginduksi variabilitas genetik, namun aktivitas enzim yang dihasilkan tidak stabil.

Aktivitas β -glukosidase mutan dan *wild-type Penicillium* sp. ID10-T065

Mutan dengan nilai IE tertinggi dari masing-masing perlakuan dipilih untuk diukur aktivitas BGL dan dianalisis sekuen gen *bgl1*. Aktivitas BGL mutan dan *wild-type* diproduksi pada dua konsentrasi substrat, yaitu selobiosa 0,1% dan selobiosa 1%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas BGL pada konsentrasi substrat 0,1% dari ketiga mutan, yaitu UV₁₃ (1,88 IU/ml), EM₃₁ (1,86 IU/ml), dan UM₂₃ (1,80 IU/ml) lebih tinggi dibandingkan *wild-type* (1,78 IU/ml). Aktivitas BGL pada selobiosa 1% menunjukkan bahwa mutan UV₁₃ (5,53 IU/ml) dan EM₃₁ (4,26 IU/ml) memiliki aktivitas BGL yang lebih tinggi dibandingkan *wild-type* (1,78 IU/ml), sedangkan mutan UM₂₃ (1,75 IU/ml) memiliki aktivitas yang lebih rendah dari *wild-type*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas BGL tertinggi ditunjukkan oleh mutan UV₁₃ (1,88 IU/ml dan 5,53 IU/ml), sedangkan aktivitas terendah ditunjukkan oleh mutan UM₂₃ (1,75 IU/ml dan 1,80 IU/ml). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sinar UV merupakan mutagen potensial dan efektif jika dibandingkan dengan EMS untuk meningkatkan aktivitas enzim-enzim komersial (Ager & Haynes 1990; Agrawal dkk. 1999; Pfeifer dkk. 2005).

Sinar UV dapat mengakibatkan kerusakan DNA serta menginduksi mutasi (Ikehata & Ono 2011). Salah satu efek utama dari mutasi dengan sinar UV, yaitu dapat mengakibatkan perubahan struktur pirimidin (sitosin ataupun timin) sehingga akan mengakibatkan terjadinya dimer pirimidin. Dimer pirimidin dapat merusak struktur heliks DNA dan menghambat proses replikasi lebih lanjut (Pfeifer dkk. 2005; Irfan dkk. 2011). Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan terjadi peningkatan gen pengode enzim pada DNA serta peningkatan ekspresi gen sehingga aktivitas enzim juga mengalami peningkatan (Shafique dkk. 2009).

Perlakuan mutasi kombinasi UV-EMS menunjukkan bahwa aktivitas BGL pada mutan kombinasi (UM₂₃) memiliki aktivitas enzim lebih rendah dari mutan-mutan UV atau EMS. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan penambahan EMS setelah mutasi UV dapat mengarah pada terhambatnya proses perbaikan sel. Penurunan aktivitas dapat terjadi akibat adanya alkilasi sehingga menghambat proses perbaikan sel yang menyebabkan aktivitas enzim menurun (Ager & Haynes 1990). Mutan UM₂₃ selain menunjukkan aktivitas enzim yang rendah

dibandingkan mutan lainnya, juga menunjukkan ketidakstabilan aktivitas enzim. Ketidakstabilan tersebut ditunjukkan oleh nilai aktivitas BGL yang berfluktuasi, kadang lebih tinggi dan terkadang lebih rendah dari *wild-type*. Hal tersebut kemungkinan terjadi akibat mutan yang diperoleh tidak mencapai tingkat kematian 95--99%, sedangkan mutan dari UV dan EMS tingkat kematiannya mencapai 96--99%. Tingkat kematian yang mendekati konsentrasi subletal dapat meningkatkan aktivitas enzim pada mutan (Chand dkk. 2005). Tingkat kematian mutan potensial sebesar 95--99% (Solov'eva dkk. 2005)

Analisis gen *bgl1*

Analisis mutasi pada sekuen nukleotida dilakukan dengan merancang primer spesifik *bgl1*, menentukan primer dan suhu *annealing* optimum, serta menyajikannya hasil sekuen *wild-type* dengan mutan. Hasil optimasi primer dan suhu *annealing* menunjukkan bahwa primer yang dapat digunakan sebagai cetakan amplifikasi gen *bgl1* adalah primer BG₂ dengan suhu *annealing* 54,9° C. Hasil sekuen gen *bgl1* (600 bp) mutan dan *wild-type* disejajarkan. Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi perubahan urutan basa pada posisi basa 2015--2040. Hasil analisis menunjukkan bahwa mutan UV₁₃ memiliki perbedaan paling banyak (7 basa) dengan isolat *wild-type* dibandingkan EM₃₁ (5 basa) dan UM₂₃ (2 basa). Perubahan yang terjadi pada UV₁₃ ditunjukkan pada posisi basa ke-2017 (T → C); basa ke-2026 (T → G); basa ke-2030 (T → G); basa ke-2037 (G → C); serta triplet basa ke-2038--2040 (TTG → GGA). Perubahan basa pada mutan EM₃₁ terjadi pada posisi basa ke-: 2024 (G → A), 2026 (T → G), 2027 (G → C), 2034 (G → C), dan 2037 (G → T). Mutan UM₂₃ mengalami 2 perubahan urutan basa, yaitu pada posisi basa ke-2015 (T → A) dan 2027 (G → C).

Hasil analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa seluruh isolat mutan mengalami mutasi substitusi, yaitu mutasi yang terjadi akibat penggantian satu basa oleh basa lainnya. Mutasi mutan UV₁₃ pada basa ke-2017 dan 2040 menunjukkan peristiwa substitusi transisi, yaitu penggantian basa purin oleh purin lainnya atau basa pirimidin oleh basa pirimidin lainnya. Substitusi pada basa ke-2017 merupakan transisi pirimidin karena basa timin diganti oleh basa sitosin. Substitusi pada basa ke-2040 menunjukkan peristiwa transisi purin, yaitu basa

guanin diganti oleh basa adenin. Basa ke-2026, 2030, 2038, dan 2039 menunjukkan perubahan basa yang sama, yaitu timin berubah menjadi guanin; sedangkan pada basa ke-2037 terjadi perubahan dari basa guanin menjadi sitosin. Perubahan demikian dikenal dengan nama mutasi transversi, yaitu mutasi yang terjadi akibat basa purin diganti oleh pirimidin, atau sebaliknya (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Perubahan satu basa pada basa ke-2017, 2026 dan 2030 mengakibatkan terjadi perubahan asam amino yang diterjemahkan. Mutasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino dikenal dengan *missense mutation* (Purves dkk. 2003; Hogg 2005). Perubahan basa pada posisi 2037 tidak mengubah sintesis asam amino yang dibentuk, yaitu dari prolin tetap menjadi prolin. Mutasi pada basa ke-2037 dikenal sebagai *silent mutation*, yaitu perubahan basa nukleotida tidak mengubah asam amino ketika diterjemahkan ke dalam mRNA. Hal tersebut terjadi karena satu asam amino dapat disintesis oleh beberapa kode genetik, seperti asam amino prolin dikode oleh triplet CCU, CCA, CCG, CCC (Purves dkk. 2003; Voet & Voet 2011).

Mutasi menggunakan sinar UV akan mengakibatkan pembentukan dimer pirimidin pada dua basa pirimidin yang berdekatan sehingga dapat merusak struktur rantai DNA atau menghambat berjalannya proses replikasi (Shafique dkk. 2009; Irfan dkk. 2011). Hasil sekuen menunjukkan hampir seluruh perubahan basa nukleotida yang terjadi pada mutan UV₁₃ merupakan posisi basa pirimidin yang saling berdekatan, yaitu TT (basa ke- 2017, 2038--2040); CT (basa ke-2030); dan CC (basa ke-2037), kecuali pada basa ke-2026. Induksi mutasi dengan sinar UV dapat menyebabkan kerusakan DNA spesifik yang terjadi pada situs dua pirimidin (dipirimidin) yang saling berdekatan. Kerusakan tersebut terbentuk melalui reaksi fotokimia dan diikuti absorpsi energi UV pada basa DNA. Sinar UV yang masuk ke dalam DNA akan diabsorpsi oleh ikatan ganda pada basa pirimidin (timin dan sitosin) dan menyebabkan basa tersebut bereaksi dengan molekul pirimidin di sebelahnya (Goodsell 2001; Ikehata & Ono 2011). Mutasi substitusi basa sitosin menjadi timin merupakan mutasi paling sering terjadi akibat radiasi sinar UV, meskipun ada kemungkinan terjadi transversi, *frameshift mutation*, duplikasi dan delesi (Livneh dkk. 1993; Ikehata & Ono 2011).

Mutasi pada mutan EM₃₁ juga menunjukkan mutasi substitusi (transisi dan transversi). Mutasi transisi terjadi pada basa ke-2024, sedangkan mutasi transversi terjadi pada basa ke-2026, 2027, 2034, dan 2037. Perubahan basa pada posisi 2024, 2026, dan 2027 mengakibatkan terjadi perubahan penerjemahan asam amino (*missense mutation*), sedangkan perubahan basa pada posisi 2034 dan 2037 menunjukkan peristiwa *silent mutation* (Purves dkk. 2003; Hogg 2005).

Agen alkilasi seperti EMS dapat menginduksi modifikasi kimia pada nukleotida sehingga mengakibatkan perubahan basa dan kesalahan pasangan basa. Guanin merupakan situs basa nukleotida yang paling mudah teralkilasi oleh EMS. Guanin yang teralkilasi menghasilkan residu O⁶-etilguanin. Residu tersebut akan berpasangan dengan timin, namun tidak dapat berpasangan dengan sitosin. Mekanisme perbaikan DNA dapat memperbaiki kesalahan pasangan tersebut dengan mengganti guanin menjadi adenin, sehingga terbentuk pasangan basa baru, yaitu adenin-timin. Perubahan basa ke-2024 menunjukkan mekanisme penggantian dan perbaikan basa G/C menjadi A/T. EMS dalam jumlah sedikit juga dapat menginduksi transversi G/C menjadi C/G seperti pada basa ke-2027 atau transisi A/T menjadi G/C seperti pada basa ke-2026 (Sega 1984; Kim dkk. 2006).

Mutasi pada mutan kombinasi UV-EMS (UM₂₃) menunjukkan peristiwa mutasi transversi, yaitu timin diganti adenin (basa ke-2015) dan guanin diganti sitosin (basa ke-2027). Perubahan basa di kedua posisi tersebut mengakibatkan terjadi perubahan penerjemahan asam amino (*missense mutation*). Interaksi yang terjadi antara UV dan EMS tidak berhubungan dengan peningkatan mutasi atau konversi pada gen, akan tetapi kombinasi kedua mutagen kemungkinan memengaruhi penghambatan proses perbaikan DNA. Alkilasi yang terjadi setelah mutasi UV dapat menghambat kerja enzim perbaikan (*repair enzymes*), sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim (Ager & Haynes 1990). Berdasarkan hasil aktivitas enzim mutan UM₂₃ (Makalah I), diketahui bahwa aktivitas enzim menurun pada mutasi kombinasi UV-EMS.

Identifikasi isolat *Penicillium* sp. ID10-T065

Hasil analisis gen menunjukkan bahwa perubahan basa yang terjadi akibat mutasi dapat meningkatkan aktivitas enzim BGL. Mutan UV₁₃ merupakan mutan dengan jumlah basa terbanyak yang mengalami mutasi dibandingkan EM₃₁ dan UM₂₃. Hasil aktivitas BGL menunjukkan bahwa mutan UV₁₃ memiliki aktivitas BGL yang lebih tinggi dibandingkan EM₃₁ dan UM₂₃. Hal tersebut menunjukkan bahwa mutasi dengan sinar UV untuk peningkatan strain dalam menghasilkan enzim BGL lebih efektif dibandingkan dengan EMS atau kombinasi UV dan EMS (Ager & Haynes 1990; Makalah I).

Berdasarkan hasil sekuen gen 18S rDNA *Penicillium* sp. ID10-T065 menunjukkan fragmen DNA berukuran 1590 bp yang berada pada posisi 804 sampai 2392. Hasil analisis BLAST pada sekuen gen 18S rDNA menunjukkan tingkat kesamaan (*similarity*) sebesar 99% dengan spesies *P. oxalicum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, dan *P. expansum*. Tingkat *similarity* terdekat isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 adalah dengan strain *Penicillium oxalicum* strain 114-2 (KF152942). Hasil pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik juga menunjukkan bahwa isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 memiliki ciri yang mirip dengan strain *P. oxalicum* ZHJ6 (Zhao dkk. 2010).

Identitas isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 belum dapat ditentukan sebagai spesies *P. oxalicum*, meskipun tingkat *similarity* 99%. Oleh sebab itu, dilakukan analisis filogenetik menggunakan model Neighbor-Joining (NJ) dengan metode Kimura dua-parameter untuk mengetahui hubungan kekerabatan isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 dengan strain *Penicillium* lainnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 masuk ke dalam genus *Penicillium*, akan tetapi berada pada cabang pohon yang berbeda dengan *P. oxalicum*, sehingga masih perlu dilakukan analisis molekuler lainnya untuk konfirmasi spesies.

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Aktivitas enzim β -glukosidase pada isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 dapat ditingkatkan dengan memutasi spora menggunakan sinar UV dan EMS. Aktivitas BGL pada mutan UV₁₃ (1,88 IU/ml dan 5,53 IU/ml) dan EM₃₁ (1,86 IU/ml dan 4,26 IU/ml) lebih tinggi dibandingkan *wild-type* (1,78 IU/ml), sedangkan aktivitas pada mutan UM₂₃ (1,80 IU/ml dan 1,75 IU/ml) tidak stabil. Mutan UV₁₃ memiliki aktivitas BGL tertinggi dibandingkan EM₃₁ dan UM₂₃. Mutan UM₂₃ menunjukkan aktivitas terendah dari dua mutan lainnya.

Mutasi menggunakan sinar UV pada isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 lebih efektif dibandingkan EMS atau kombinasi UV-EMS. Mutan UV₁₃ menunjukkan perubahan basa terbanyak dibandingkan dua mutan lainnya (EM₃₁ dan UM₂₃). Mutasi yang terjadi akibat sinar UV dan EMS berupa mutasi transisi, transversi, *missense mutation*, serta *silent mutation*. Mutasi kombinasi UV-EMS mengakibatkan DNA mengalami transversi serta *missense mutation*.

Isolat *Penicillium* sp. ID10-T065 diketahui memiliki kesamaan identitas sebesar 99% secara molekuler dan fenotipe morfologi yang mirip dengan isolat *P. oxalicum* strain 114-2 (KF152942). Analisis filogenetik menunjukkan isolat ID10-T065 merupakan genus *Penicillium*.

SARAN

Untuk pengembangan penelitian selanjutnya, perlu dilakukan optimasi produksi enzim pada konsentrasi substrat yang berbeda yang lebih besar dari selobiosa 1%. Selain itu, perlu dilakukan uji stabilitas strain mutan hingga beberapa generasi (minimal 3 generasi). Mutasi menggunakan mutagen lain perlu dikembangkan untuk mengetahui pola mutasi apakah terjadi pada posisi basa yang sama.

DAFTAR ACUAN

- Abo-State, M.A.M., A.I. Hammad, M. Swelim & R.B. Gannam. 2010. Enhanced production of cellulase(s) by *Aspergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environment* **8**(4): 402--410.
- Adrio, J.L. & A.L. Demain. 2006. Genetic improvement of process yielding microbial products. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **30**: 187--214
- Ager, D.D. & R.H. Haynes. 1990. Analysis of interactions between mutagens, II. Ethyl methanesulfonate and ultraviolet light in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **232**: 327--336.
- Agrawal, R., A. Satlewal & A. K. Verma. 2013. Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *Biotech*: 381--388.
- Amore, A. & V. Faraco. 2012. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**: 3286--3301.
- Bai, H., H. Wang, J. Sun, M. Irfan, M. Han, Y. Huang, X. Han & Q. Yang. 2013. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *Experimental and Clinical Sciences Journal* **12**: 528--540.
- Bhatia, Y., S. Mishra & V.S. Bisaria. 2002. Microbial β -glucosidase: Cloning, properties, and application. *Critical Reviews in Biotechnology* **22**(4): 375--407.
- Bon, E.P.S. & M.A. Ferrara. 2007. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Document for FAO Seminar: *The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries*. Rome, 12 October 2007: 1--11 hlm.
- Brown, J.A., D.J. Falconer & T.M. Wood. 1987. Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and

- β -glucosidase production. *Enzyme and Microbial Technology* **9**(3): 169--175.
- Castro, G.R., M.D. Baigori & F. Sineriz. 1995. A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **22**: 51--56.
- Chand, P., A. Aruna, A.M. Maqsood & L.V. Rao. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 318--323.
- Chandra, M., A. Kalra, N.S. Sangwan, S.S. Gaurav, M.P. Darokar & R. S. Sangwan. 2009. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology* **100**: 1659--1662.
- Cotton, R.G. 1993. Current methods of mutation detection. *Mutation Research* **285**(1): 125--44.
- Dillon, A.J.P., S.O. Paesi-Toresan & L.P. Barp. 1992. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp. strain denominated 3MUV24. *Brazilian Journal of Genetics* **15**(3): 491--498.
- Doolotkeldieva, T.D. & S.T. Bobusheva. 2011. Screening of wild-type fungal isolates for cellulolytic activity. *Microbiology Insights* **4**: 1--10.
- EL-Bondkly, A.M. & A.A. Keera. 2007. UV- and EMS- induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii*. *Arab Journal of Biotechnology* **10**(2): 241--248.
- Fawzi, E.M. & H.S. Hamdy. 2011. Improvement of carboxymethyl cellulase production from *Chaetomium cellulolyticum* NRRL 18756 by mutation and optimization of solid state fermentation. *Bangladesh Journal of Botany* **40**(2): 139--147.
- Florencio, C., S. Couri & C.S. Farinas. 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*: 1--7.
- Fowler, T. & R.D. Brown. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Molecular Microbiology* **6**(21): 3225--3235.

- Goodsell, D.S. 2001. The molecular perspective: Ultraviolet light and pyrimidine dimmers. *The Oncologist* **6**: 298--299.
- Hjelm, L.N., E.L.H. Chin, M.R. Hedge, B.W. Coffee & L.J.H. Bean. 2010. A simple method to confirm and size deletion, duplication, and insertion mutation detected by sequence analysis. *Journal of Molecular Diagnostics* **12**(5): 607--610.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: xi+ 468 hlm.
- Ike, M., J.Y. Park, M. Tabuse & K. Tokuyasu. 2010. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 2059--2066.
- Ikehata, H. & T. Ono. 2011. The Mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* **52**: 115--125.
- Irfan, M., J. Javed & Q. Syed. 2011. UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for enzyme production in submerged fermentation. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **44**(4): 137--140.
- Javed, M.M., Ikram-Ul-Haq & I. Mariyam. 2011. Multistep mutagenesis for the over-expression of cellulase in *Humicola insolens*. *Pakistan Journal of Botany* **43**(1): 669--677.
- Jun, H., Y. Bing, Z. Keying, D. Xuemei & C. Daiwen. 2009. Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. *Indian Journal of Microbiology* **49**: 188--195.
- Jung, Y.R., H.Y. Shin, H.Y. Yoo, Y. Um & S.W. Kim. 2012. Production of cellulose and β -glucosidase in *Trichoderma reesei* mutated by proton beam irradiation. *Korean Journal of Chemical Engineering* **29**(7): 925--930.
- Kader, A.J., O. Omar & L.S. Feng. 1999. Isolation of cellulolytic fungi from The Bario Highlands, Sarawak. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*. 1--3.
- Kim, Y.S., K.S. Schumaker & J-K. Zhu. 2006. EMS Mutagenesis of *Arabidopsis*. Dalam: Salinas, J. & J.J. Sanchez-Serrano (eds.) 2006. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, Humana Press Inc.: 101--103.

- Kuhad, R.C., M. Kumar & A. Singh. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Letters in Applied Microbiology* **19**: 397--400.
- Li, X.-H., H.-J. Yang, B. Roy, E.Y. Park, L.-J. Jiang, D. Wang & Y.-G. Miao. 2010. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiological Research* **165**: 190--198.
- Lin, Y. & S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resource: Current state prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**(6): 627--642.
- Lis, H. & N. Sharon. 1993. Protein glycosylation: Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry* **218**(1):1--27.
- Liu, G., L. Zhang, Y. Qin, G. Zou, Z. Li, X. Yan, X. Wei, M. Chen, L. Chen, K. Zheng, J. Zhang, L. Ma, J. Li, R. Liu, H. Xu, X. Bao, X. Fang, L. Wang, Y. Zhong, W. Liu, H. Zheng, S. Wang, C. Wang, L. Xun, G-P Zhao, T. Wang, Z. Zhou & Y. Qu. 2013. Long-term strain improvements accumulate mutations in regulatory elements responsible for hyper-production of cellulolytic enzymes. *Scientific Reports* **3**: 1569--1575.
- Livneh, Z., O. Cohen-Fix, R. Skalter & T. Elizur. 1993. Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**(6): 465--513.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky & J. Darnell. 2004. *Molecular cell biology*. 5th ed. WH Freeman & Co., New York: xviii + 973 hlm.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl & I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(3): 506--577.
- Mahdieh, N. & B. Rabbani. 2013. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian Journal of Pediatrics* **23**(4): 375--388.
- Maki, M., K.T. Leung & W. Qin. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences* **5**(5): 500--516.
- Nollau, P. & C. Wagener. 1997. Methods for detection of point mutations: Performance and quality assessment. *Clinical Chemistry* **43**(7): 111--1128.

- Omojasola, P. F., O.P. Jilani & S.A. Ibiyemi. 2008. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nature and Science* **6**(2): 64--79.
- Pereira, J.F., M.V. de Queiroz, E.A.Gomes, J.I. Muro-Abad & E.F. de Araujo. 2002. Molecular characterization and evaluation of pectinase and cellulase production of *Penicillium* spp. *Biotechnology Letters* **24**: 831—838.
- Pérez, J., J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia & J. Martínez. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: An overview. *International Microbiology* **5**: 53--63.
- Peterson, R. & H. Nevalainen. 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30- thirty years of strain improvement. *Microbiology* **158**: 58--68.
- Pfeifer, G.P., Y.H. You & A. Besaratinia. 2005. Mutation induced by ultraviolet. *Mutation Research* **571**: 19--31.
- Purves, K., D. Sadava & H.C. Heller. 2003. *Life: The science of biology*. 7th ed. Sinauer Associates and W. H. Freeman: 1.120 hlm.
- Rajeshkumar, J. & M.H.M. Ilyas. 2011. Production of phosphatase by mutated fungal strains. *International Multidisciplinary Research Journal* **1**(5): 23--29.
- Ramzan, M., M. Asgher, M.A. Sheikh & H. Nawaz. 2013. Hyperproduction of manganese peroxidase through chemical mutagenesis of *Trametes versicolor* IBL-04 and optimization of process parameters. *BioResources* **8**(3): 3953--3966.
- Ranoa, D.R.E., C.Y. Lumibao, J.L. Roxas, B.B. San Luis & C.T. Hedreyda. 2005. Comparison of conventional plate assays with DNA-based screening protocols for protease and cellulase production from Putative *Bacillus* Isolates. *Science Diliman* **17**(1): 31--36.
- Ribeiro, O., F. Magalhaes, T.Q. Aguiar, M.G. Wiebe, M. Pentilla & L. Domingues. 2013. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered* **4**: 322--331.
- Sega, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* **134**: 113--142.
- Seiboth, B., C. Ivanova & V. Seidl-Seiboth. 2011. *Trichoderma reesei*: A fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. *Dalam*: M. A. Bernardes (ed.)

2011. *Biofuel production-recent developments and prospects*. In Tech: 311--340.
- Shafique, S., R. Bajwa & S. Shafique. 2009. Mutation of *Alternaria tenuissima* FCBP-252 for hyper-active α -amylase. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**: 591--596.
- Sharada, R., G. Venkateswarlu, S. Venkateshwar & M.A. Rao. 2013. Production of cellulase-A Review. *International Journal of Phamaceutical, Chemical and Biological Sciences* **3**(4): 1070--1090.
- Singhania, R.R., A.K. Patel, R.K. Sukumaran, C. Larroche & A. Pandey. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* **127**: 500--507.
- Solov'eva, I.V., O.N. Okunev, V.V. Vel'kov, A.V. Koshelev, T.V. Bubnova, E.G. Kondrat'eva, A.A. Skomarovskii & A.P. Sinitsyn. 2005. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. *Microbiology* **74**(2): 141--146.
- Sørensen, A., M. Lübeck, P.S. Lübeck & B.K. Ahring. 2013. Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* **3**: 612--631.
- Sukumaran, R.K., R.R. Singhania & A. Pandey. 2005. Microbial cellulases: Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* **64**: 832--844.
- Sun, X., Z. Liu, K. Zheng, X. Song, & Y. Qu. 2008. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **42**: 560--567.
- Syed, S., S. Riyaz-Ul-Hassan & S. Johri. 2013. A novel cellulose from an endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. *American Journal of Microbiological Research* **1**(4): 84--91.
- Taherzadeh, M.J. & K. Karimi. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources* **2**(4): 707--738.
- Tamarin, R. H. 2001. *Principles of genetics*. 7th ed. The McGraw-Hill Companies: xvi+609 hlm.

- Teather, R.M. & P.J. Wood. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **43**(4): 777--780.
- Tiwari, K.L., S.K. Jadhav & A. Kumar. 2011. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East Journal of Scientific Research* **7**(2): 203--210.
- Voet, D. & J.G. Voet. 2011. *Biochemistry*. 4th ed. Joh Wiley & Sons Inc., New Jersey: xxviii + 1.428 hlm.
- Vu, V. H., T.A. Pham & K. Kim. 2009. Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. *Mycobiology* **37**(4): 267--271.
- Vu, V. H., T.A. Pham & K. Kim. 2011. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. *Mycobiology* **39**(1): 20--25.
- Zhang, Y-H.P, M.E. Himmel & J.R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* **24**: 452--481.
- Zhao, R-b., Bao H-y & Liu Y-x. 2010. Isolation and characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for biodegradation of methamidophos. *Agricultural Sciences in China* **9**(5): 695--703.