

## ISOLASI DAN SELEKSI JAMUR PENDEGRADASI SENYAWA BENSONITRIL\*

### [Isolation and Selection of Benzonitrile Degrading Fungus]

YB Subowo<sup>1</sup>✉, Bambang Sunarko<sup>2</sup> dan Indrawati Gandjar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi - LIPI

<sup>2</sup>Bidang Bioproses, Puslit Bioteknologi - LIPI

<sup>3</sup>Jurusan Biologi, FMIPA - UI

#### ABSTRACT

A study on isolation and selection of benzonitrile degrading fungi were conducted. The aim of this study was to obtain fungi that high potentially on degrading nitrile compounds. Microbial sources were derivat from industrial wastes, fungi-infecting plant and fungi grown on decayed wood. Eighteen isolates were isolated from those samples. Five isolates were capable to grow on benzonitrile. Isolate-AV1 which was identified as *Fusarium oxysporum* was capable of degrading 0.15% (v/v) benzonitrile.

**Key words:** isolate, benzonitrile degradation, *Fusarium*.

#### PENDAHULUAN

Bensonitril atau fenil sianida ( $C_6H_5CN$ ) termasuk kelompok nitril aromatis (Kobayashi, 1991). Senyawa ini berupa cairan, beraroma dan bersifat sangat toksik. Bensonitril digunakan sebagai pelarut dan untuk memproduksi senyawa *intermediet* dalam industri farmasi, industri cat dan industri karet. Beberapa senyawa bensonitril digunakan dalam industri herbisida, contohnya diklobenil (2,6 diklorobensonitril), bromoksinil (3,5-di-bromo-4-hidroksi bensonitril) dan ioksinil (3,5-diodo-4-hidroksi bensonitril) (Nawaz *et al.*, 1992).

Pada umumnya nitril sangat toksik, bahkan beberapa diantaranya bersifat mutagenik, karsinogenik dan teratogenik (Linardi *et al.*, 1996). Produk uraiannya berupa  $CN^-$  dapat membentuk  $HCN$ ,  $NaCN$  dan  $KCN$ ; yang sangat beracun. Sianida dapat bereaksi dengan kofaktor enzim sehingga menyebabkan enzim tidak aktif. Keracunan merupakan hasil dari tidak aktifnya sitokrom oksidase (sitokrom  $aa_3$ ) dan respirasi seluler sehingga jaringan yang membutuhkan oksigen tinggi seperti otak, jantung, dan hati sangat terpengaruh (Borron, 2001).

Penggunaan nitril dalam industri akan menghasilkan limbah mengandung nitril. Dumestre *et al.* (1997) melaporkan bahwa sejumlah besar sianida dibuang dalam bentuk limbah padat dan limbah cair

dari industri lempeng logam, industri obat-obatan, fiber sintetis dan plastik. Keberadaan senyawa nitril di lingkungan akan membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu dibutuhkan proses penguraian nitril yang aman dan murah untuk menangani limbah tersebut. Penguraian nitril dapat dilakukan secara fisika dan kimia, tetapi metode ini biayanya sangat mahal. Sebagai alternatif penanggulangan secara mikrobiologis lebih menarik, karena secara ekologis lebih dapat dipertanggung jawabkan dan biayanya lebih murah.

Beberapa jenis bakteri dapat menggunakan senyawa nitril sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen. Mikroorganisme ini mempunyai enzim pendegradasi nitril sehingga dapat melakukan proses metabolisme. Kobayashi (1991) melaporkan bahwa *Rhodococcus rhodochrous* J1 dapat tumbuh pada bensonitril 0,1% (v/v) walaupun pertumbuhannya lambat. *Klebsiella pneumoniae* dapat menggunakan 8,4 mM bensonitril dan 36 mM butironitril sebagai sumber C dan N (Nawaz *et al.*, 1992). Sampai saat ini penggunaan jamur (kapang dan cendawan) untuk degradasi senyawa nitril relatif masih sedikit sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Tujuan penelitian adalah untuk memperoleh isolat jamur yang mempunyai kemampuan tinggi dalam mendegradasi bensonitril.

\*) Bagian dari Tesis MSi, Program Studi Biologi, Program Pascasarjana FMIPA, Universitas Indonesia



## BAHAN DAN METODE

### Sumber isolat.

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tiga sumber, yaitu (1) limbah industri (2) tanaman terinfeksi, dan (3) kayu lapuk yang ditumbuhi cendawan.

### Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk dari Sigma dan Merck, meliputi: bensonitril, laktonitril, akrilonitril, b-aminopropionitril, adiponitril, glukosa, amonium nitrat.

### Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Taoge Ekstrak Agar (TEA) (Jutono *et al.*, 1980), Potato Dextrosa Agar (PDA) (Smith & Onions, 1994), Media mineral (Meyer & Schlegel, 1983).

### Metode

#### Isolasi jamur dari sampel

Isolasi jamur dari limbah industri dilakukan dengan cara mengambil dan menambahkan 1 ml limbah cair atau 1 g limbah padat ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml media mineral yang sudah ditambah bensonitril 0,25% v/v. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm. Setelah 5 hari inkubasi dilakukan isolasi dengan menggunakan ose yang digoreskan pada permukaan media Taoge Ekstrak Agar (TEA). Miselium jamur yang tumbuh dipindahkan ke media TEA baru untuk pemurnian.

Isolasi jamur dari tanaman terinfeksi dilakukan dengan cara memotong bagian pohon yang terinfeksi kapang, kemudian sampel tersebut diinokulasikan pada permukaan media TEA. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang. Miselium yang tumbuh dipindahkan pada media TEA baru untuk pemurnian. Isolasi jamur dari kayu lapuk diawali dengan membersihkan permukaan tubuh buah cendawan yang tumbuh pada kayu lapuk dengan alkohol 70%, kemudian memotong bagian tengahnya pada ukuran 0,5 x 0,5 cm. Potongan ini ditempelkan pada tutup cawan petri dengan menggunakan vaselin. Spora cendawan akan jatuh ke permukaan media PDA. Miselium yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media PDA baru untuk pemurnian.

#### Pengujian pertumbuhan isolat jamur pada bensonitril

Isolat jamur ditumbuhkan dalam erlenmeyer berukuran 100 ml berisi 50 ml media mineral yang mengandung bensonitril 0,25% (v/v). Kultur kemudian diinkubasikan pada suhu ruang, dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm selama 7 hari. Pertumbuhan miselium jamur diamati secara visual, untuk mengetahui terjadinya penambahan miselium.

#### Pengujian pertumbuhan isolat jamur pada bensonitril sebagai sumber karbon, energi, dan nitrogen

Pengujian pengaruh nitril sebagai sumber karbon dan energi terhadap pertumbuhan isolat jamur dilakukan dengan menumbuhkan isolat tersebut pada 50 ml media mineral mengandung bensonitril 0,25% (v/v) dan amonium nitrat 10 mM. Pengujian pengaruh nitril sebagai sumber nitrogen dilakukan dengan menumbuhkan isolat jamur pada 50 ml media mineral mengandung bensonitril 0,25% (v/v) dan glukosa 10 mM. Sedangkan pengujian pengaruh nitril sebagai sumber karbon, energi, dan nitrogen dilakukan dengan menumbuhkan isolat jamur pada 50 ml media mineral mengandung bensonitril 0,25%. Masing-masing kultur diinkubasikan pada suhu ruang (28°C), dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm. Setelah 7 hari pertumbuhan miselium diamati secara visual, untuk melihat melihat penambahan miselium dalam kultur.

#### Pengaruh konsentrasi bensonitril terhadap pertumbuhan isolat jamur

Isolat yang tumbuh pada bensonitril 0,25%, ditumbuhkan pada media mengandung bensonitril dengan konsentrasi 0,15%; 0,25%; 0,50%; 1% (v/v). Masing-masing kultur kemudian diinkubasikan pada suhu ruang dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm. Setelah 7 hari miselium jamur dipanen dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman No 1. Bobot biomassa ditentukan setelah dikeringkan pada suhu 40°C selama 3 hari (Mougin *et al.*, 1994).

#### Penentuan pola pertumbuhan isolat jamur pada bensonitril

Isolat terpilih ditumbuhkan pada 50 ml media mineral yang mengandung bensonitril 0,15%. Kultur diinkubasi pada suhu ruang, dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm selama 8 hari. Setiap hari diambil 50 ml kultur, disaring kemudian ditentukan bobot biomasanya setelah dikeringkan pada suhu 40°C selama 3 hari.



### Pengujian kemampuan isolat dalam mendegradasi benzonitril

Isolat jamur terpilih ditumbuhkan pada media mineral mengandung benzonitril dalam fermentor. Sebanyak 2 liter media dimasukkan ke dalam fermentor berukuran 3 liter. Setelah 4 hari, kultur dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Miselium kemudian dicuci dengan bufer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Sebanyak 1 ml suspensi miselium ditambahkan ke dalam 9 ml bufer mengandung benzonitril 0,15%, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang, dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm selama 1 jam. Setelah sentrifugasi, kadar amonium dalam supernatan ditentukan dengan metode Nessler, yaitu dengan menambahkan 0,1 ml sampel (supernatan) ke dalam 9,9 ml  $\text{NaOH}$  0,1N. Ke dalam larutan tersebut kemudian ditambahkan 0,2 ml larutan Nessler, didiamkan selama 20 menit, dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm

### Pengaruh beberapa senyawa nitril terhadap pertumbuhan isolat jamur

Setiap isolat jamur terpilih ditumbuhkan pada 50 ml media mineral mengandung laktonitril 1%, akrilonitril 1%, b-aminopropionitril 0,5%, atau adiponitril 1%. Masing-masing kultur kemudian diinkubasikan pada suhu ruang, dengan cara digoyang pada kecepatan 115 rpm. Setelah 7 hari miselium dipanen dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman No 1. Bobot miselium ditentukan setelah dikeringkan pada suhu 40°C selama 3 hari (Mougin *et al.*, 1994).

### Identifikasi isolat jamur pendegradasi benzonitril

Isolat jamur terpilih ditumbuhkan pada media TEA dan PDA. Bentuk koloni, morfologi, bentuk dan ukuran spora isolat tersebut diamati di bawah

mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan merujuk pada buku "Introduction to food-borne fungi" karangan Samson *et al.* (1981) dan "Compendium of soil fungi" karangan Domsch *et al.* (1980).

## HASIL

### Pertumbuhan isolat jamur pada senyawa benzonitril

Dari hasil penelitian dapat diisolasi sebanyak 18 isolat yang berasal dari limbah industri, tanaman terinfeksi dan kayu lapuk. Kedelapan belas isolat tersebut terdiri atas 15 isolat kapang dan 3 isolat cendawan. Isolat-isolat tersebut kemudian ditumbuhkan pada benzonitril 0,25%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 5 isolat mampu tumbuh pada keterdapatan senyawa tersebut.

**Tabel 1.** Pertumbuhan Isolat jamur pada Benzonitril.

No.	Isolat	Pertumbuhan pada Benzonitril 0,25%
1.	VI3, AV1, BIII1,	+
2.	VI4, AIII2	+
3.	BIII2, VII2, VII3	-
4.	AIII1, VI1, VI2	-
5.	BIV1, AIV1, BIII3, BI1, AII1, VII1, AI1	-

Keterangan: + = tumbuh - = tidak tumbuh

### Pertumbuhan isolat jamur pada benzonitril sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen

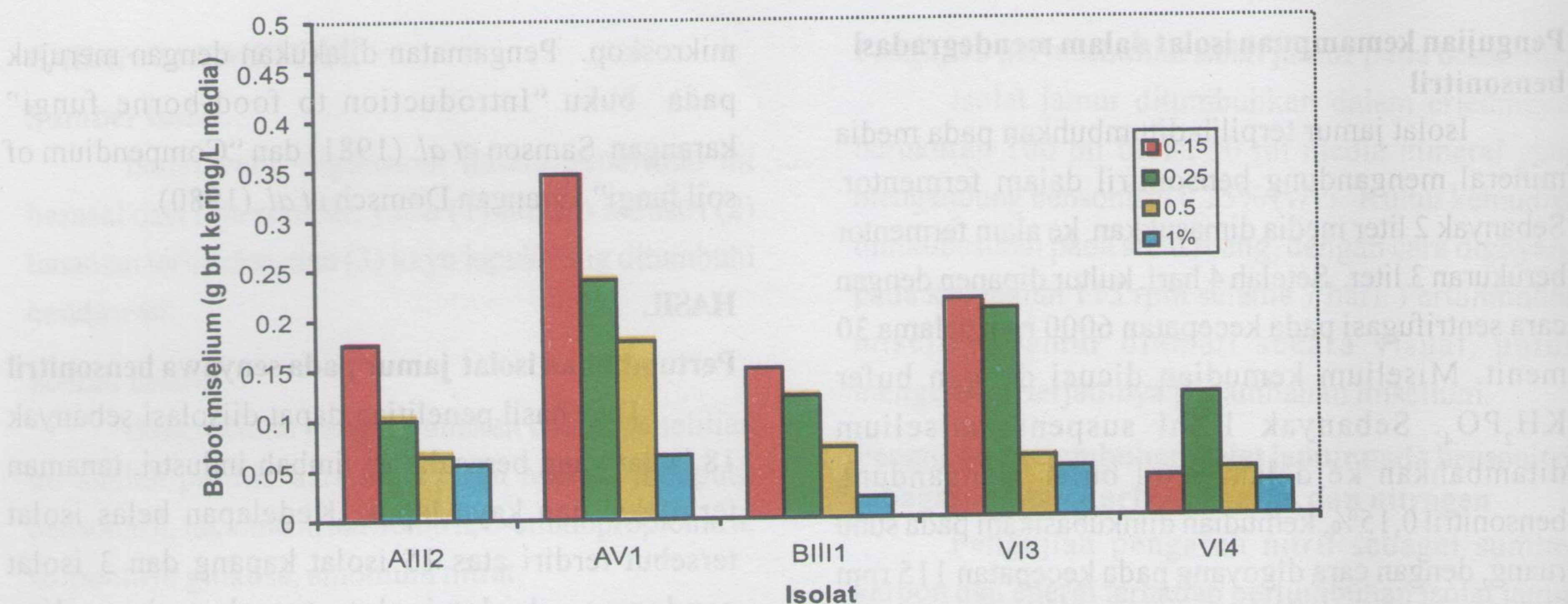
Dari lima isolat yang diuji ternyata hanya tiga isolat yang mampu menggunakan benzonitril (0,25 % v/v) sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya, tiga isolat mampu menggunakannya sebagai sumber nitrogen dan lima isolat mampu menggunakan benzonitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen untuk pertumbuhannya.

**Tabel 2.** Pertumbuhan isolat pada benzonitril sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen.

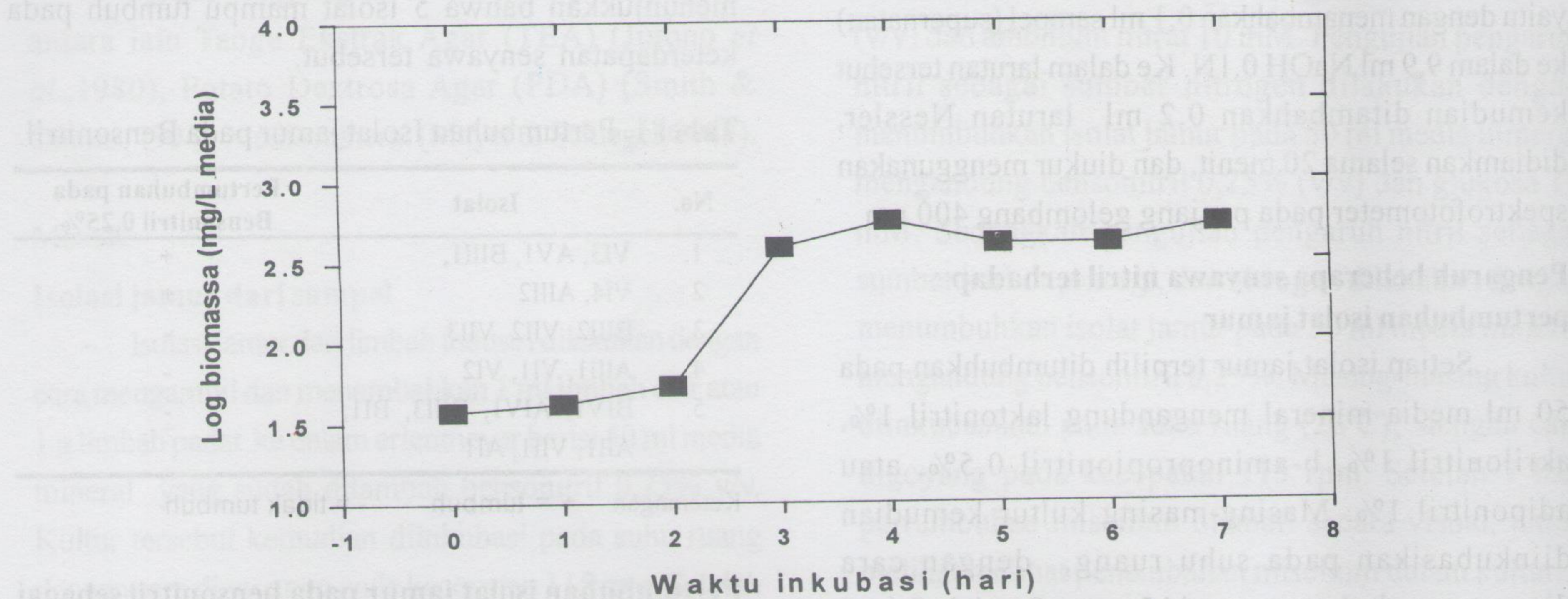
No.	Isolat	Benzonitril sebagai sumber			Kontrol
		Karbon dan Energi	Nitrogen	Karbon, Energi dan Nitrogen	
1.	VI3	+	+	+	+
2.	AIII2	+	-	+	+
3.	AV1	+	-	+	+
4.	BIII1	-	+	+	+
5.	VI4	-	+	+	+

Keterangan: + = tumbuh - = tidak tumbuh





Gambar 1. Bobot miselium dari pertumbuhan beberapa isolat pada bensonitril.



Gambar 2. Pola pertumbuhan AV1 pada bensonitril 0,15 % v/v.

**Pengaruh konsentrasi bensonitril terhadap pertumbuhan isolat jamur**

Hasil uji pengaruh konsentrasi bensonitril terhadap pertumbuhan 5 isolat jamur menunjukkan bahwa kelima isolat yang diuji ternyata mampu tumbuh pada kisaran konsentrasi antara 0,15% sampai dengan 1 % v/v, dan pertumbuhan terbaik dari kelima isolat tersebut ditunjukkan pada 0,15 % v/v. Diantara kelima isolat tersebut, isolat AV1 tampaknya mempunyai toleransi yang paling baik terhadap bensonitril, karena menunjukkan bobot perolehan miselium yang paling tinggi, sebesar 0,346 g bobot kering/ L dalam pertumbuhannya pada bensonitril 0,15%. Sedangkan BIII1 merupakan isolat yang mempunyai toleransi terendah terhadap bensonitril dengan bobot perolehan miselium hanya sebesar 0,020 g berat kering/L.

Perolehan biomassa ini kurang lebih hanya sebesar 5,78% dibandingkan dengan perolehan biomassa AV1.

**Pola Pertumbuhan isolat AV1 pada bensonitril**

Pola pertumbuhan AV1 pada bensonitril 0,15 % v/v dapat dilihat pada Gambar 2. Tampak dari gambar tersebut bahwa pertumbuhan AV1 pada bensonitril masih memerlukan fase lag, kurang lebih selama 48 jam, sebelum memasuki fase eksponensial. Fase eksponensial berlangsung selama sekitar 48 jam sebelum memasuki fase stasioner. Laju pertumbuhan (i) AV1 pada bensonitril dalam fase eksponensial dapat ditentukan sebesar 0,012 jam<sup>-1</sup>, dan capaian biomassa tertinggi sebesar 0,5720 g bobot kering/L media. Sedangkan waktu yang diperlukan untuk melipatgandakan perolehan biomassa (t<sub>2</sub>) AV1 pada bensonitril dapat ditentukan sebesar 57 jam.



### Pertumbuhan AV1 pada beberapa senyawa nitril

Hasil pengujian pertumbuhan AV1 pada beberapa nitril menunjukkan bahwa isolat tersebut ternyata mampu tumbuh pada laktonitril 1%, akrilonitril 1%, b-amino propionitril 0,5%, dan adiponitril 1% sebagai satu-satunya sumber energi, karbon dan nitrogen. Dengan perolehan biomassa masing-masing 0,196 g berat kering/L; 0,140 g berat kering/L; 1,226 g berat kering/L dan 0,296 g berat kering/L.

### Kemampuan AV1 dalam mendegradasi senyawa benzonitril

Hasil inkubasi sel AV1 dalam benzonitril 0,15% v/v juga menunjukkan adanya pembentukan amonium dalam media reaksi, sebesar 2,61 mM.

**Tabel 3.** Kemampuan isolat jamur mendegradasi senyawa benzonitril

No.	Isolat	Kadar Benzonitril (%)	Konsentrasi Amonium (mM)
1.	AV1	0,15	2,61
2.	Tanpa sel	0,15	0,12

### Identifikasi isolat AV1

Identifikasi dilakukan pada AV1, sebagai isolat yang mampu mendegradasi benzonitril. Isolat AV1 memiliki ciri-ciri antara lain koloni pada cawan petri berwarna putih kecoklatan, hifa halus dan pendek. AV1 yang ditumbuhkan pada media PDA, suhu 25°C, pada umur 4 hari mempunyai diameter koloni sebesar 2,5 cm. Secara morfologis AV1 mempunyai ciri: hifa bersepta, konidiofor pendek, terdiri 1 septa, ditemukan makrokonidia dan mikrokonidia. Makrokonidia terdiri 2 - 4 septa, berukuran 5 - 16 mm x 2 - 4 mm, sedangkan mikrokonidia terdiri 1 septa, berukuran 3 - 11 mm x 2 - 4 mm. Klamidospora dijumpai di ujung hifa dan di tengah hifa, namun kebanyakan di tengah hifa. Berdasarkan ciri-ciri tersebut dapat disimpulkan bahwa AV1 adalah *Fusarium oxysporum*.

### PEMBAHASAN

Lima isolat mampu tumbuh pada benzonitril 0,25%. Ini berarti bahwa walaupun dalam literatur dijumpai hanya sedikit laporan tentang degradasi senyawa nitril oleh cendawan atau kapang (Banerjee *et al.*, 2002; Asano *et al.*, 1981; Barclay *et al.*, 1998),

namun ternyata tidak terlalu sulit untuk mendapatkan isolat jamur dari alam yang mampu tumbuh dan kemungkinan juga mampu mendegradasi senyawa tersebut. Disamping itu, berdasarkan keragaman sumber, dari mana isolat-isolat jamur tersebut diperoleh, dapat ditarik kesimpulan bahwa jamur pendegradasi nitril tampaknya mempunyai penyebaran yang relatif luas di alam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lima isolat, yaitu VII1, AIII2, AV1, BIII1, dan VI4 mampu menggunakan benzonitril (nitril aromatik) sebagai satu-satunya sumber karbon energi dan nitrogen untuk tumbuhnya. Benzonitril diurai menjadi asam bensoat dan amonia. Di dalam sel, asam bensoat sebagai sumber C dan energi dibentuk menjadi protokatekhuat atau katekhol. Kedua senyawa ini masuk ke dalam 3-oxoadipat pathway membentuk 3-oxoadipat. Dari 3-oxoadipat dihasilkan asetilCoA dan Suksinil CoA. Protokatekhol atau katekhol juga dapat masuk *meta-cleavage pathway*, katekhol membentuk asam piruvat dan asetaldehida. Asam piruvat bereaksi dengan Coenzim A membentuk asetil CoA. Protokatekhuat membentuk 2 asam piruvat, selanjutnya menjadi 2 asetil CoA. Amonium sebagai sumber N bereaksi dengan 2-oxoglutarat membentuk glutamat. Kemudian glutamat ini digunakan untuk membentuk L-lisin (Gottschalk, 1988).

Isolat AV1 menghasilkan bobot biomassa paling tinggi pada benzonitril 0,15%, diduga isolat ini memiliki aktivitas enzim pendegradasi benzonitril paling tinggi dibandingkan isolat lain. Aktivitas enzim ini mencapai titik optimum pada benzonitril 0,15% atau 14,55 mM. Pada konsentrasi kurang dari 0,15% aktivitas enzim lebih kecil sehingga biomassa yang dihasilkan lebih rendah. Pada konsentrasi di atas 0,15% biomassa yang dihasilkan lebih rendah, hal ini disebabkan benzonitril bersifat toksik sehingga menghambat pertumbuhan. Beberapa bakteri juga dapat memanfaatkan benzonitril. Bandyopadhyay *et al.* (1986) melaporkan bahwa *Arthrobacter* sp. J1 dapat tumbuh pada media benzonitril 0,1% untuk menghasilkan benzonitrilase. *Klebsiella pneumoniae* mampu menggunakan benzonitril 8,4 mM (Nawas *et al.*, 1992). Bila dibandingkan dua jenis bakteri di atas, isolat AV1 mempunyai toleransi lebih tinggi terhadap benzonitril.



Pertumbuhan isolat AV1 pada bensonitril 0,15% memerlukan fase lag selama 48 jam. Hal ini disebabkan bensonitril bersifat toksik sehingga isolat ini memerlukan adaptasi sebelum tumbuh. Menurut Dumestre *et al.* (1997) *Fusarium solani* IHEM 8026 yang ditumbuhkan pada media mengandung sianida, pada awal tahapan detoksifikasi tidak terjadi pertumbuhan. Meskipun kapang ini mampu merombak sianida namun pertumbuhan baru terjadi pada saat kandungan senyawa tersebut telah mengalami penurunan.

Perolehan biomassa AV1 yang ditumbuhkan pada laktonitril, akrilonitril, b-aminopropionitril dan adiponitril masing-masing sekitar 56%, 40%, 400%, dan 85% dibandingkan perolehan biomassa AV1 yang ditumbuhkan pada bensonitril (0,5720 g bobot kering/L). Isolat AV1 masih lebih kecil kemampuan tumbuhnya pada senyawa nitril lain dibandingkan *Candida famata*. *Candida famata* dapat tumbuh pada asetronitril, akrilonitril, butironitril, isobutironitril, metakrilonitril, propionitril, suksinonitril, valeronitril, asetamida, isobutiramida, dan suksinamida sebagai sumber N (Linardi *et al.*, 1996).

Pembentukan amonium, walaupun relatif kecil, dapat diinterpretasikan bahwa AV1 mampu mendegradasi bensonitril, sehingga dapat diartikan pula bahwa enzim pendegradasi bensonitril yang disintesis dalam sel kapang tersebut. Menurut Kobayashi & Shimizu (2000), degradasi senyawa nitril, baik yang melibatkan enzim kompleks nitril-hidratase dan amidase maupun yang hanya melibatkan enzim nitrilase saja akan menghasilkan amonium dan asam karboksilat sebagai produk akhirnya. Selain itu, terbentuknya amonium dalam proses degradasi senyawa nitril juga memberi petunjuk awal bahwa isolat AV1 mampu mensintesis enzim pendegradasi nitril, walaupun belum dapat dibuktikan dalam penelitian ini apakah yang terbentuk enzim nitrilase saja atau enzim nitril-hidratase dan amidase atau ketiga enzim tersebut disintesis secara bersamaan.

*Fusarium oxysporum* dikenal sebagai patogen tanaman, yaitu penyebab busuk akar, batang dan buah (Samson *et al.*, 1981). Kemampuan kapang tersebut dalam mendegradasi senyawa nitril kemungkinan berkaitan dengan kemampuannya menginfeksi

tanaman. Seperti dilaporkan oleh Kobayashi & Shimizu (2000) pada tumbuhan yang mengalami kerusakan jaringan, telah terjadi hidrolisis sianoglukosida menjadi gula, aldehida dan HCN. Terbentuknya HCN (senyawa nitril anorganik), kemungkinan digunakan untuk melindungi jaringan tumbuhan dari serangan patogen. Dengan demikian, pada saat kapang parasit menginfeksi tumbuhan maka akan terjadi kerusakan jaringan tumbuhan. Oleh karena itu, hanya kapang yang memiliki enzim pengurai HCN yang mempunyai peluang untuk bertahan dan menjadi patogen tanaman tersebut.

## KESIMPULAN

*Fusarium oxysporum* AV1 mampu tumbuh pada bensonitril pada kisaran konsentrasi antara 0,15% (v/v) sampai dengan 1% (v/v) dan memanfaatkannya sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen untuk tumbuhnya. Laju pertumbuhan (i) pada bensonitril 0,15 % v/v adalah sebesar 0,012 jam<sup>-1</sup> dengan capaian biomassa tertinggi sebesar 0,5720 g bobot kering/L media. Selain pada bensonitril, *Fusarium oxysporum* AV1 juga mampu tumbuh pada laktonitril, akrilonitril, b-amino propionitril dan adiponitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon dan nitrogen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asano Y, S Ando, Y Tani, H Yamada and T Ueno. 1981. Fungal Degradation of triacrylonitrile. Agric. Biol. Chem. **45** (1):57-62.
- Bandyopadhyay AK, T Nagasawa, Y Asano, K Fujishiro, Y Tani and H Yamada. 1986. Purification and characterization of Benzonitrilases from *Arthrobacter* sp Strain J-1. Appl. Environ. Microbiol **51** (2): 302-306.
- Banerjee A, R Sharma, UC Banerjee. 2002. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**: 33-44.
- Barclay M, VA Tett and CJ Knowles. 1998. Metabolism and enzymology of cyanide/ metalocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. Enzyme and Microbial Technology **23**: 321-330.



- Borron SW. 2001.** Toxicity cyanide. *Journal eMedicine*, **2** (6): 1-10.
- Domsch KH, W Gams, TH Anderson. 1980.** *Compendium Of Soil Fungi*. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 859p.
- Dumestre A, T Chone, JM Portal, M Gerard and J Berthelin. 1997.** Cyanide degradation under alkaline by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (7):2729-2734.
- Gottschalk G. 1988.** *Bacterial Metabolism*. Springer-verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 359p.
- Jutono, J Soedarsono, S Hartadi, SS Kabirun, D Suhadi, Soesanto. 1980.** *Pedoman praktikum Mikrobiologi Umum*. Dep. Mikrobiologi, Fak. Pertanian UGM, Yogyakarta, 181 hal.
- Kobayashi M. 1991.** Studies on enzymes involved in nitrile metabolism in *Rhodococcus rhodochrous*. PhD Thesis.
- Kobayashi M and S Shimizu. 2000.** Nitrile hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology* **4**:95-102.
- Linardi VR, JCT Dias, CA Rosa. 1996.** Utilization of acetonitrile and other aliphatic nitriles by a *Candida famata* strain. *FEMS Microbiology Letter* **144**: 67-71.
- Meyer O and HG Schlegel. 1983.** Biology of aerobic carbon monoxide Oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol*, **37**: 277-310.
- Mougin C, C Laugero, M Asther, J Dubroca, P Frasse and M Asther. 1994.** Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (2): 705-708.
- Nawaz MS, TM Heinze and CE Cerniglia, 1992.** Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (1): 27-31.
- Samson RA, ES Hoekstra, CAN van Oorschot. 1981.** *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor schimmelcultures, Baarn, Delft. 247p.
- Smith D and AHS Onions. 1994.** *The Preservation and Maitance of Living Fungi*. International Mycological Institute, CAB International, 122p.