

Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus substillis* dengan Substrat Tandan Kosong Sawit dengan Metode Perlakuan Awal Asam

¹⁾Nazsha Nayyazsha Nazaris, ²⁾Said Zul Amraini, ³⁾David Andrio

¹⁾Mahasiswa Program Studi Teknik Kimia, ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia,

³⁾Dosen Jurusan Teknik Lingkungan

Fakultas Teknik, Universitas Riau

Kampus Binawidya Jl. HR. Subrantas Km 12,5 Pekanbaru 28293

nazsha.nayyazsha@student.unri.ac.id

ABSTRACT

The cellulase enzyme is a collection of several enzyme that work together to hydrolyze cellulase. Cellulase enzyme are widely used in the textile, food, detergent, bioefuel and pulp and paper industries so that the enzyme needs continue to increase every year. The production of cellulase enzyme using natural substrate which is widely available in Indonesia, namely empty palm bunches as a carbon source as an expensive carboxymethyl cellulase (CMC) substitute and using Bacillus substillis isolates. This study aims to obtain optimum conditions for cellulase enzyme production with acid pretreatment on oil palm empty fruit bunch substrate and variations in pH of the medium using Bacillus substillis. Pretreatment was carried out so that lignocellulose biomass is more easily hydrolyzed and increases glucose level which will enter the next production phase. Variations in the pretreatment were carried out by adding with acids as well as variations in pH 6,5;7,0; and 7,5. Enzyme activity was calculated using the Nelson-Somogyi method. The result showed that the highest enzyme activity was obtained at pH 7,0 and 40°C at the pretreatment TKS with acid of 0,041 U/ml.

Keywords : *Cellulase enzyme, Bacillus substillis, pretreatment, oil palm empty fruit bunch*

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara yang mengarah pada pemanfaatan bioenergi sebagai salah satu energi terbarukan yang ramah lingkungan. Di Indonesia kebutuhan enzim sebanyak 99% untuk industri lokal masih diimpor dari luar negeri seperti Cina, India, Jepang, dan sebagian dari Eropa. Pada tahun 2017 kebutuhan enzim di Indonesia diperkirakan akan meningkat sebesar 2500 ton dengan nilai impor 200 milyar dan diperkirakan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya (Kemenristekdikti, 2017).

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis dalam suatu reaksi kimia maupun biologis (Fogler, 2006). Penggunaan enzim dalam mendegradasi polimer telah banyak

dilakukan dalam berbagai jenis industri maupun sektor lainnya. Salah satu enzim yang paling banyak digunakan untuk mendegradasi selulosa adalah enzim selulase. Enzim selulase juga banyak digunakan dalam industri tekstil, makanan, deterjen, *pulp* dan kertas, serta *biofuel*. Diperkirakan sekitar 20% dari satu miliar US dolar hasil penjualan industri enzim dunia terdiri atas selulase, hemiselulase, dan pektinase. Nilai ini diduga akan terus bertambah seiring dengan meningkatnya kebutuhan industri terhadap enzim-enzim tersebut (Howard *et al.*, 2003).

Produksi enzim selulase membutuhkan selulosa sebagai substrat. Substrat yang komersial digunakan saat ini adalah selulosa murni seperti Avicel dan Solka Floc, atau penginduksi organik

seperti laktosa dan CMC (Kalsom, 1997), namun harga selulosa murni memiliki biaya yang mahal.

Tandan kosong sawit (TKS) merupakan salah satu biomassa lignoselulosa yang memiliki kandungan selulosa cukup tinggi yaitu 37,53% dari berat kering (Sitorus, 2012). Limbah TKS merupakan limbah berlignoselulosa yang belum dimanfaatkan secara optimal, tidak mahal dan bersifat terbarukan, sehingga penggunaan TKS sebagai substrat untuk produksi enzim selulase dapat dijadikan alternatif untuk menekan biaya bahan baku substrat serta mengurangi pencemaran lingkungan akibat limbah TKS.

Indonesia merupakan negara penghasil kelapa sawit terbesar di dunia dengan total area sekitar 9 juta hektar yang menghasilkan sekitar 27,5 juta ton CPO per tahun (GAPKI, 2013). Salah satu daerah pemasok kelapa sawit adalah Provinsi Riau. Pada tahun 2017 luas areal tanaman kelapa sawit sekitar 8.721.148 Ha, tersebar di Provinsi Riau (BPS, 2017).

Tandan kosong sawit memiliki struktur bahan lignoselulosa sangat kompleks dimana selulosa, hemiselulosa dan lignin terkandung didalamnya saling berikatan. Selulosa dan hemiselulosa tidak dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan hemiselulase kecuali lignin pada substrat dihilangkan terlebih dahulu. Lignin merupakan komponen yang paling sulit untuk didegradasi karena strukturnya yang kompleks dan heterogen. Sehingga diperlukan suatu perlakuan awal untuk mendegradasi lignin.

Perlakuan awal ini bertujuan untuk memecah pelindung lignin, merubah struktur lignoselulosa, dan membuat selulosa dan hemiselulosa menjadi lebih mudah dihidrolisis setelah struktur lignin dan hemiselulosa pecah. Bagian kristalin selulosa akan merenggang dan menjadi berkurang kristalinitasnya. Perlakuan awal merupakan suatu tahap penting dalam proses konversi biomassa lignoselulosa yang bertujuan untuk menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa,

dan meningkatkan porositas bahan sehingga memudahkan proses hidrolisis serta fermentasi gula.

Berbagai macam metode dan teknik perlakuan awal telah dicoba pada biomassa yang berbeda-beda. Hasilnya bervariasi untuk setiap metode maupun jenis biomassa lignoselulosa. Setiap metode perlakuan awal juga memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Perlakuan awal kimia bertujuan untuk meningkatkan biodegradasi selulosa dengan menghilangkan lignin dan atau hemiselulosa. Metode ini juga bertujuan menurunkan tingkat polimerisasi dan kristalinitas komponen selulosa. Beberapa metode perlakuan awal yang umumnya digunakan adalah perlakuan awal asam, perlakuan awal basa, dan perlakuan awal organosolv (Hidayat, 2013).

Perlakuan awal asam menggunakan larutan asam sebagai katalisnya. Asam memiliki pengaruh yang kuat pada hemiselulosa dan lignin dibandingkan pada struktur kristalin selulosa. Tujuan utama metode ini adalah melarutkan sebagian hemiselulosa agar dapat menjangkau struktur selulosa (Hidayat, 2013).

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tandan kosong sawit, H₂SO₄ 1,5%, *Bacillus substillis*, CMC 1%, NaCl, Medium LB, Larutan buffer fosfat, reagen Nelson-Somogyi, aquadest.

2.2 Alat yang digunakan

Alat yang digunakan berupa peralatan gelas seperti erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 500 ml, oven, *autoclave*, cawan *petridish*, labu ukur 1000 ml, labu ukur 500 ml, labu ukur 250 ml, timbangan analitik, *shaking incubator*, tabung reaksi, bunsen spiritus, jarum ose, *centrifuge*, kuvet, *hotplate stirrer*, pipet tetes, corong kaca, pH meter, dan spektrofotometer UV-Vis.

2.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini melalui beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yaitu :

2.3.1 Perlakuan Awal TKS

TKS dikeringkan terlebih dahulu, kemudian diberi perlakuan awal secara fisika dengan proses *milling* atau pemecahan biomassa dan dipotong menjadi sekitar 2-4 mm.

2.3.1.1 Perlakuan Awal Kimia

Perlakuan awal kimiawi seperti perlakuan awal asam menggunakan H₂SO₄ 1,5%.

2.3.2 Pembuatan Media Produksi Standar

Media pemeliharaan yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) dengan komposisi yaitu 10 gr pepton, 5 gr ekstrak *yeast* (sumber nitrogen) dan 5 gr NaCl. LB ditambahkan dengan substrat CMC 1% (sumber karbon). Media dilarutkan dengan *aquadest* sesuai ukuran volume produksi yang diinginkan. Pada penelitian ini produksi yang dilakukan dalam volume 45 ml buffer pH 7,0 dan ditambahkan 0,45gr CMC (CMC 1% dalam 45 ml larutan). Kemudian media sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2.3.3 Peremajaan Isolat

Sebanyak 1-2 ose isolat murni *Bacillus subtilis* dari LIPI diinokulasikan ke dalam Media Luria-Bertani (LB) Agar. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang telah diremajakan ini digunakan sebagai stok kultur untuk penelitian ini.

2.3.4 Produksi Enzim

2.3.4.1 Pembuatan Media Starter

Sebanyak 1-2 ose inokulum dimasukkan ke Media Luria-Bertani (LB) cair. Media LB yang digunakan adalah sebanyak 10% dari media produksi. Total media produksi adalah 50 ml, maka digunakan media starter sebanyak 5 ml. Media starter ini dibuat dengan melarutkan 0,125 gr bubuk LB ke dalam 5 ml

aquadest. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 6 jam pada suhu 37 °C. Dilakukan agitasi sebesar 150 rpm.

2.3.4.2 Pembuatan Media Produksi

Setelah 6 jam, 5 ml media starter yang telah mengandung inokulum dimasukkan ke dalam 45 ml media produksi standar, sehingga total media produksi adalah 50 ml. Media ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dan dilakukan agitasi 150 rpm.

Variasi pH

Metode yang digunakan sama seperti metode produksi enzim diatas, hanya dilakukan modifikasi pada substrat, yaitu digunakan TKS sebagai pengganti CMC, sebanyak 10%. Dilakukan pengaturan pH awal menjadi 6,5;7,0; dan 7,5. Dengan pengaturan suhu 40 °C. Media disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Larutan buffer fosfat dengan pH tertentu dapat dibuat dengan jumlah larutan A dan B sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi Larutan A dan B untuk pH tertentu.

pH	Larutan A (ml)	Larutan B (ml)
6,5	68,5	31,5
7,0	39,0	61,0
7,5	16,0	84,0

2.3.5 Ekstraksi Enzim Selulase

Setelah 24 jam, ekstrak kasar enzim dimasukkan kedalam tabung reaksi dan disentrifugasi dalam keadaan dingin dengan suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Enzim kasar yang dihasilkan kemudian dianalisis aktivitas enzimnya.

2.3.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Nelson-Somogyi

Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml. Aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai 1 mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 ml filtrat enzim kasar selulase. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya 1 µmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media oleh 1 ml ekstrak kasar enzim

selulase selama masa inkubasi. Untuk menghitung besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut digunakan rumus (Kombong, 2004) :

$$\text{Aktivitas Enzim (U/ml)} = \frac{C}{\text{BM Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan :

AE = Aktivitas Enzim (Unit/ml)

C = Konsentrasi Glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa (180 gr/mol)

T = Waktu Inkubasi (menit)

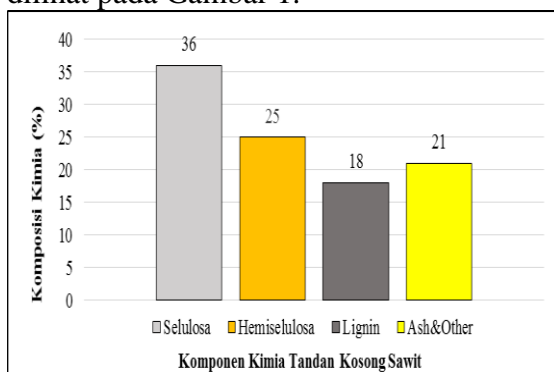
H = Volume Total Enzim-Substrat (ml)

E = Volume Enzim (ml)

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Komposisi TKS sebelum dilakukan Perlakuan Awal

Tandan kosong sawit sebelum dilakukan proses perlakuan awal, mulanya dikarakterisasi terlebih dahulu untuk mengetahui komposisi selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang terkandung didalamnya. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Komposisi Kimia Tandan Kosong Sawit sebelum Perlakuan Awal

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa persentase masing-masing komponen kimia tandan kosong sawit yaitu 36% selulosa, 25% hemiselulosa, 18% lignin, dan ash&other 21%. Hasil tersebut sesuai dalam *range* komposisi komponen dalam biomassa secara umum yaitu selulosa (35-50%), hemiselulosa (20%-35%), lignin (15-20%), dan ash&other (15-20%) (Mood, 2013).

3.2 Komposisi TKS setelah Perlakuan Awal Asam

Komposisi kimia tandan kosong sawit setelah dilakukan perlakuan awal secara asam menggunakan H₂SO₄ 1,5% menghasilkan 39% selulosa, 21% hemiselulosa, 15% lignin, dan 25% *ash & other*. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan awal dengan pelarut asam mampu memutus ikatan antara selulosa, hemiselulosa dan lignin dalam TKS. Penambahan asam akan memperbesar kadar lignin terurai yang berarti memperkecil lignin yang terkandung didalam TKS. Selain itu, penambahan asam akan membuat pH rendah. pH merupakan salah satu hal yang mempengaruhi daya larut lignin, pH rendah akan membuat gugus hidroksil fenolat terprotonasi, terkondensasi, dan mengendap dalam pelarut polar (Ariani & Idiawati, 2011).

4. Kesimpulan

Hasil menunjukkan dengan menggunakan variasi metode perlakuan awal (*pretreatment*) secara kimia dengan asam pada substrat TKS berpengaruh terhadap selulosa yang dihasilkan. Perlakuan awal TKS menggunakan asam H₂SO₄ 1,5% meningkatkan kandungan selulosa lebih besar dari 36% menjadi 39%. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada pH medium 7,0 pada substrat TKS yang diberi perlakuan awal dengan asam, dan suhu operasi 40 °C dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,041 U/ml.

Daftar Pustaka

- Ariani, L., & Idiawati, N. 2011. Penentuan Lignin dan Kadar Glukosa dalam Hidrolisis Organosolv dan Hidrolisis Asam. *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*, 5(2): 140-150.
- Badan Pusat Statistik. 2017. *Pedoman Pendataan Survei Perkebunan Tahun 2017*. Jakarta Pusat : Badan Pusat Statistik.

- Dali, S., Arfah, R., Karim, A., Patong, A.R. 2013. Eksplorasi Enzim Amilase dari Mikroba yang Diisolasi dari Sumber Air Panas di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Produksi Maltodekstrin. *Laporan Akhir*. Makassar: Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
- Elwin, Lutfi, M., & Hendrawan, Y. 2013. Analisis Pengaruh Waktu Pretreatment dan Konsentrasi NaOH terhadap Kandungan Selulosa, Lignin, dan Hemiselulosa Eceng Gondok Pada Proses Pretreatment Pembuatan Bioetanol. *Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 2 (2): 104-110
- Fogler, H.S. 2006. *Elements of Chemical Reaction Engineering Fourth Edition*. United States of America: Pearson Education, Inc.
- GAPKI. 2013. Diplomasi Kelapa Sawit.
- Hidayat, M., 2013. Teknologi Pretreatment Bahan Lignoselulosa Dalam Proses Produksi Bioetanol. *Jurnal Biopropal Industri*, 4 : 33-48.
- Howard RL, Abotsi E., Rensburg van J. Howard., S. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *Afr J Biotechnology* 2:602-619.
- Kalsom, U., Ariff, A.B., Zulkifli, H.S. 1997. The Treatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber For Subsequent use as Substrate for Cellulase Production by *Chaetomium Globosum* Kunze. *Biosource Technology* 62: 1-9.
- Kementrian Riset dan Teknologi, 2017, *Siaran Pers Kemenristekdikti* : Gresik.
- Kombong, H. 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*. 5: 16-20.
- Mood, H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., 2013. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, A Comprehensive Review With A Focus on Pretreatment. *Journal Renewable and Sustainable Energy*, 27 : 77-93.
- Salapa, I.S. & Sidiras, D.K. 2017. Organosolv Pretreatment as A Major Step of Lignocellulosic Biomass Refining. *Engineering Conferences International*.