



Hidrolisis Selulosa dengan Enzim Selulase dari Bekicot, *Achatina Fulica* untuk Produksi Etanol Menggunakan *Zymomonas Mobilis* Atcc 10988

Masfufatun dan Surya Rosa Putra

Abstrak

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Oleh karena itu CMC mudah dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana oleh enzim selulase dan selanjutnya difermentasi menjadi etanol oleh bakteri.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) beserta karakternya dan mempelajari pola fermentasi *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 yang menggunakan hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)* sebagai substrat dalam produksi etanol. Kadar Glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis dianalisa dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson, sedangkan kadar etanol dari proses fermentasi dianalisa dengan Kromatografi Gas (GC). Dari penelitian ini diperoleh enzim selulase dengan aktivitas (Filter Paper Ase) sebesar 0,0202 $\mu\text{mol/mL}$ per menit (0,0202 Unit) dan aktivitas spesifik sebesar 0,023 Unit/mg protein. Disamping itu enzim beraktivitas maksimum pada pH 5,2, temperatur 50°C, dan konsentrasi substrat 4% serta memiliki parameter kinetik V_m sebesar 0,0023mg/mL per menit dan Km sebesar 0,0053 mg/mL. Pada kondisi optimum enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) mampu menghidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)* dengan kadar glukosa 0,245 g/100mL (61,45 mg glukosa/g CMC). Fermentasi dengan menggunakan Hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)* sebagai substrat dihasilkan etanol sebesar 0,457 g/g glukosa atau yield etanol sebesar 89,6 % dibanding teori (0,0283 g etanol/g CMC).

Kata Kunci: Hidrolisis, hidrolisat, *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)*, selulase

1. Pendahuluan

Kebutuhan energi bahan bakar minyak, sampai saat ini masih disuplai oleh bahan yang berasal dari fosil. Dengan deposit terbatas dan tidak dapat diperbaharui, cepat atau lambat pasti habis. Keterbatasan ini mendorong usaha penghematan dan mencari sumber energi pengganti. Alternatif penggunaan etanol sebagai bahan bakar, salah satu pemecahan masalah. Keuntungan dari penggunaan etanol, dapat di produksi terus menerus, ramah lingkungan serta dapat digunakan sebagai bahan baku industri kimia, kosmetik dan farmasi

Produksi etanol di berbagai negara telah dilakukan dengan menggunakan bahan baku yang berasal dari hasil pertanian dan perkebunan. Dengan demikian akan menimbulkan pertentangan antara kebutuhan produksi bahan bakar dan penggunaan sebagai bahan pangan dan pakan. Oleh karena itu dilakukan upaya mencari bahan baku alternatif lain dari sektor non pangan untuk pembuatan etanol. Salah satunya adalah dari bahan selulosa.

Di alam, selulosa banyak dijumpai sebagai selulosa natif yang masih berikatan dengan senyawa lainnya seperti lignin dan selulosa. Adapula selulosa yang telah dijadikan serbuk bahkan dimurnikan dengan derajat kristalinitas tinggi seperti avisel. Avisel lebih sukar larut dibandingkan serbuk selulosa. Selain itu dikenal juga beberapa senyawa turunan selulosa, diantaranya adalah *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)*. *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)* merupakan kopolimer dua unit β -D glukosa dan β -D-glukopiranosida 2-O-(karboksilmetil)-garam monosodium yang terikat melalui ikatan β -1,4-glikosidik. *Carboxy*

Methyl Cellulose (CMC) memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menjadi gula-gula sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Proses hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan daripada menggunakan asam. Selain tidak menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* (pH 4,8 dan suhu 50°C), ternyata proses hidrolisis secara enzimatik menghasilkan *yield* lebih tinggi (Duff and Murray, 1996). Enzim selulase diproduksi oleh mikroba selulolitik dari golongan bakteri dan jamur. Permasalahan yang sering muncul dalam penelitian adalah kurang tersedianya enzim selulase yang murah dan efisien untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memanfaatkan bekicot sebagai sumber enzim selulase. Proses isolasi enzim selulase dari hepatopankreas bekicot lebih mudah dilakukan daripada isolasi dari bakteri atau jamur sehingga biaya produksi enzim bisa ditekan.

Proses hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menghasilkan glukosa (gula reduksi) yang selanjutnya dijadikan sebagai bahan baku dalam pembuatan etanol melalui proses fermentasi. Berbagai mikroba telah digunakan dalam fermentasi etanol. Diantaranya adalah bakteri *Zymomonas mobilis*.

Beberapa penelitian fermentasi etanol dari berbagai substrat dengan menggunakan mikroba *Zymomonas mobilis* telah dilakukan, diantaranya menggunakan substrat glukosa dengan *Zymomonas mobilis* mutan oleh Muspahaji (2008) dan Alfena (2009), glukosa dengan *Zymomonas mobilis* amobil (Pancasning, 2008), sukrosa dengan *Z. mobilis* ATCC 10988 oleh Hany (2009), sari buah pisang dengan *Zymomonas mobilis* FNCC 0056 oleh Imamah (2006), sari buah pepaya oleh Sujito, (2008), limbah karet alam oleh Ttripetchul dkk (1992), buah dan limbah nanas dengan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 oleh Tanaka dkk, (1999)

Oleh karena itu dalam penelitian akan dilakukan fermentasi etanol dari substrat hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum aktivitas enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) beserta karakternya dan mempelajari pola fermentasi hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menjadi etanol oleh *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

2. Eksperimen

Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase

Isolasi Enzim Selulase dari bekicot, *Achatina fulica*

Sebanyak 35 gram hepatopankreas bekicot dihomogenisasi dengan 500mL 1% NaCl dingin (pH=7) dalam waringblender selama 3 menit pada suhu 1-4°C. Homogenat yang diperoleh kemudian disaring melalui kain pada suhu 2-4°C dan filtratnya disentrifuge selama 80 menit pada suhu 2°C dan 4200 rpm dalam International Refrigerated Centrifuge dengan rotor no. 840(Saryono, 1991). Supernatan yang diperoleh merupakan preparat enzim selulase diuji kadar proteinnya dengan metode *Bradford* (Bradford, 1976) dan diuji aktivitas selulasenya (Ghose,1987).

Karakterisasi enzim selulase

Penentuan Kondisi Optimum

Kondisi Optimum reaksi enzim meliputi suhu, pH dan substrat, ditentukan melalui serangkaian percobaan yang kondisinya di variasi dan substrat yang digunakan adalah *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Silaban, R., 1999).

pH optimum ditentukan dengan cara sebagai berikut: disediakan beberapa larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) 2% dalam bufer asetat dengan pH berbeda 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, dan 5,6. Masing-masing larutan diambil 40 ml dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml yang berbeda. Ke dalam masing-masing labu erlenmeyer ditambahkan 10 ml larutan enzim kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit dengan kecepatan 160 rpm. Reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Kadar Gula

reduksi dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) ditentukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Suhu optimum dilakukan dengan cara sebagai berikut: Ke dalam 6 buah labu erlenmeyer 100mL dimasukkan masing-masing 40 mL *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) 2% dalam larutan buffer asetat pH optimum dan ditambahkan 10 mL enzim selulase. Campuran dalam labu diinkubasi pada suhu berbeda (30°C, 40°C, 50°C dan 60°C) dan kecepatan 160 rpm selama 60 menit. reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Kadar Gula reduksi dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) ditentukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Substrat optimum dilakukan dengan cara sebagai berikut: Disediakan larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dalam larutan buffer asetat pH optimum dengan konsentrasi yang berbeda dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100mL masing-masing sebanyak 40mL. Selanjutnya ditambahkan 10mL larutan enzim. Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 60 menit. Sesudah reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan, ditentukan kadar glukosa dan laju reaksinya

Menentukan Parameter Kinetik Reaksi Enzimatis

Parameter kinetik reaksi enzimatik adalah laju reaksi maksimum (V_m) dan tetapan *Michaelis-Menten* (K_m), ditentukan dengan menggunakan persamaan *Michelis Menten* atau persamaan *Lineweaver Burk*. Persamaan *Michelis Menten* diperoleh dengan membuat kurva hubungan $[S]$ dengan V , sedangkan persamaan *Lineweaver Burk* diperoleh dengan membuat kurva hubungan $1/[S]$ dengan $1/V$. Data laju reaksi (V) diperoleh dari percobaan optimasi substrat.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC)

Hidrolisis secara Enzimatis

Disediakan labu erlenmeyer 250 mL dan diisi dengan 100 mL larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan konsentrasi optimum dalam bufer asetat dengan pH optimum. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 40 mL larutan enzim kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama beberapa jam dengan kecepatan 160 rpm. Setiap interval waktu 60 menit reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Kadar gula reduksi dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) ditentukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan Jamur *Trichoderma viridie*

Regenerasi *Trichoderma Viride* pada media padat (Agar Miring)

Sebanyak 1 ose *Trichoderma Viride* diambil dengan menggunakan jarum ose. Kemudian digoreskan di atas permukaan agar miring dengan pola zig-zag. Semua pemindahan dilakukan di dalam ruang steril (*laminary air flow*) dekat dengan api spiritus. Hasil pemindahan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam.

Pembuatan starter *Trichoderma Viride*

Satu slant *Trichoderma viridae* pada media PDA umur 72 jam (hasil regenerasi) ditambah 5 ml aquades steril. Kemudian dikocok hingga homogen dengan menggunakan Vortex mixer selama beberapa menit hingga spora terlepas.

Proses Hidrolisis

Sebanyak 5 gram CMC dimasukkan labu erlenmeyer 500 ml yang berisi 100mL media cair YMB. Medium disterilkan dalam *outoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian ditunggu sampai dingin. Media diinokulasi dengan starter *Trichoderma viride* secara aseptik. Kemudian diinkubasi dalam shaking incubator pada suhu 30°C dengan goncangan 80 rpm selama 30 hari. Setiap interval waktu 1 hari ditentukan kadar gula reduksinya dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan Katalis Asam

Disediakan labu erlenmeyer 250mL dan diisi dengan 100 mL larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) 2%. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 40 mL larutan HCl 4N kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama beberapa jam dengan kecepatan 160 rpm. Setiap interval waktu 60 menit ditentukan kadar gula reduksinya dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Proses Fermentasi Hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) Regenerasi *Zymomonas mobilis* pada media padat (Agar Miring)

Sebanyak 1 ose *Zymomonas mobilis* diambil dengan menggunakan jarum ose. Kemudian digoreskan di atas permukaan agar miring dengan pola zig-zag. Semua pemindahan dilakukan di dalam ruang steril (*laminary air flow*) dekat dengan api spiritus. Hasil pemindahan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam.

Produksi biomassa

Inokulum dibuat dengan memindahkan sel *Zymomonas mobilis* dari media agar miring ke labu 250mL yang mengandung 50 mL media cair pH 5,5. Media yang telah diinokulasi ini kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu 30°C dan di *shaker* 125 rpm. Inokulum yang diperoleh ditransfer ke labu 1 liter yang mengandung 450mL media cair diinkubasi dan di *shaker* pada kecepatan 125 rpm. Setelah 17-18 jam inkubasi dihentikan sehingga diperoleh biomassa/starter biakan *Zymomonas mobilis* yang dipakai sebagai inokulat pada proses fermentasi.

Proses Fermentasi

Sebanyak 200mL starter *Zymomonas mobilis* disentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Biomassa yang diperoleh disuspensikan dalam air steril dan dimasukkan dalam labu 100mL yang berisi media fermentasi. Media yang telah dinokulasi ini diinkubasi pada suhu 30°C selama beberapa jam dan di *shaker* pada kecepatan 50 rpm. Sebagai kontrol dilakukan fermentasi dengan menggunakan glukosa murni sebagai sumber karbonnya. Setiap interval 5 jam diuji kadar gula dan etanol. Sebelum dianalisa, hasil fermentasi disentrifuge terlebih dahulu. Glukosa dianalisa dengan metode Somogyi-Nelson dan etanol dianalisa dengan kromatografi gas.

Metoda Analisa

Uji aktivitas selulose Secara Umum

Pada tabung reaksi betutup diisi dengan 1,0 mL larutan buffer asetat pH 4,8 dan 0,5mL larutan enzim dalam buffer asetat. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan. Pada saat suhu mencapai 50°C, ke dalam tabung tersebut dimasukkan kertas saring berukuran 1,0 x 6,0 cm (~ 50 mg) lalu diaduk (NB. Semua bagian kertas saring Whatman No 1 harus tercelup dalam cairan (Ghose, 1987). Setelah 1 jam reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Selanjutnya kadar glukosa ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson (Sudarmaji, 1984). Sedangkan kandungan protein pada ekstrak enzim selulase ditentukan dengan menggunakan metode *Bradford* (Bradford, 1976)

1 Unit Aktivitas : banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 µg glukosa per mililiter substrat tiap menit pada kondisi percobaan.

Analisa Kadar Etanol

Kadar etanol hasil fermentasi ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Gas.

3. Pembahasan

Isolasi Enzim Selulase

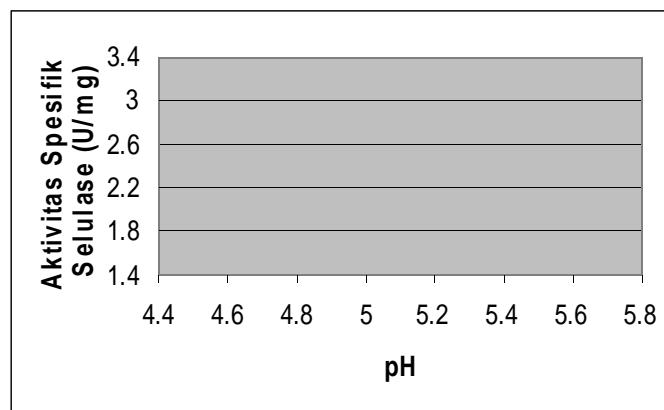
Enzim Selulase diisolasi dari hepatopankreas bekicot (*Achatina fulica*) dengan menggunakan metode dekstruksi dan sentrifugasi. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase, berwarna coklat muda. Dari 35 gram hepatopankreas (11 ekor bekicot) diperoleh 450 ml ekstrak kasar selulase per 500ml campuran. Selanjutnya

ekstrak kasar tersebut diuji kadar proteinnya dengan menggunakan metode *Bradford*. Dari perhitungan diperoleh kandungan protein dalam ekstrak kasar enzim selulase sebesar 1,72 mg per mL ekstrak enzim selulase. Kandungan protein ini jauh lebih rendah dibandingkan hasil penelitian yang dilakukan Saryono (1991), yaitu sebesar 4,4 mg/mL ekstrak enzim selulase. Hal ini terjadi karena ekstrak enzim yang dihasilkan pada penelitian ini terlalu encer dan tidak dilakukan proses pemekatan sebagaimana yang telah dilakukan Saryono (1991). Pemekatan ekstrak enzim dilakukan melalui proses liofilisasi dengan tujuan untuk mengurangi pelarut pada suhu -87°C dan tekanan 1,3 bar.

Keberhasilan isolasi enzim selulase ditentukan melalui uji aktivitas enzim dengan menggunakan substrat kertas saring whatman no 1 (FP-ase). Kadar glukosa sebagai hasil aktivitas enzim selulase ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson. Dari perhitungan didapatkan ekstrak enzim selulase dari bekicot memiliki aktivitas FP-ase (*Filter Paper Ase*) sebesar $0,0202 \mu\text{mol/mL}$ per menit dan aktivitas spesifik sebesar 0,023 unit/mg protein. Hasil Aktivitas enzim selulase ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan Saryono (1991), yang melaporkan bahwa aktivitas enzim selulase mencapai $3,4 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL}$ per menit dan aktivitas spesifik sebesar 0,7727 unit/mg protein. Hal ini terjadi karena Saryono (1991) melakukan tahap pemurnian terhadap ekstrak enzim selulase setelah tahap liofilisasi. Pemurnian dilakukan melalui tahap fraksinasi dan dialisis. Oleh karena itu perlu sebelum digunakan proses hidrolisis, ekstrak enzim perlu dipekatkan terlebih dahulu dan selanjutnya dimurnikan.

1 Unit Aktivitas : banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μmol glukosa per mililiter substrat tiap menit pada kondisi percobaan.

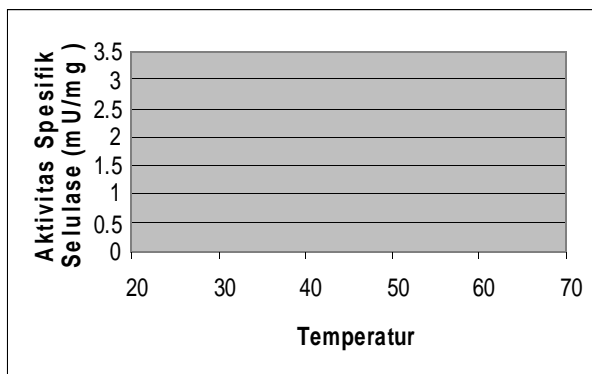
Karakterisasi Enzim Selulase Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Selulase pH Optimum



Gambar 3.1. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase

Gambar 3.1 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim selulase adalah pada pH optimum, yaitu pH 5,2 dengan aktivitas sebesar 9,46 unit per 10 mL enzim. Hasil pH optimum ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan Saryono(1999) yang juga melaporkan aktivitas optimum enzim selulase dalam menghidrolisis limbah nanas berlangsung pada pH 5,2. Dengan demikian perubahan pH akan mempengaruhi ionisasi gugus fungsi residu asam amino pada enzim, terutama asam amino jenis asam glutamat(Bhat, 1997). Perubahan ionisasi gugus fungsi akan menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim selulase dan sifat katalitiknya.

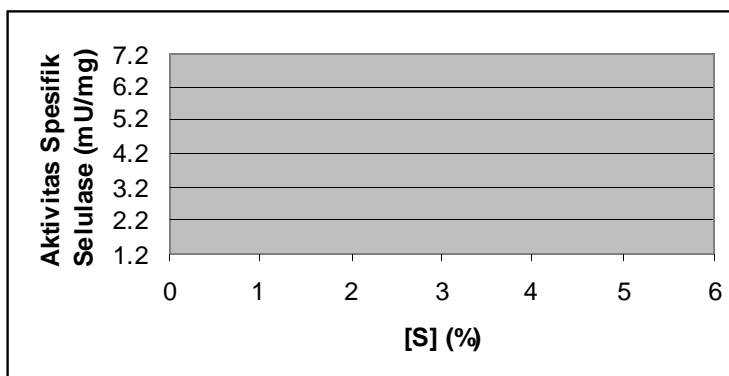
Temperatur Optimum



Gambar 3. 2. Kurva pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim Selulase

Gambar 3.2 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim selulase dicapai pada temperatur 50°C, dengan aktivitas sebesar 9,46 unit/10 mL enzim. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sreenath (2002), yang melaporkan bahwa aktivitas optimum enzim selulase dari *Trichoderma viridae* dan *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) berlangsung pada suhu 50°C. Kondisi ini berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan Saryono (1991) dan maisaroh (2009). Aktivitas optimum selulase terhadap selulosa ampas nanas berlangsung pada temperatur optimum 37°C (Saryono, 1991) sedangkan terhadap selulosa ampas tebu (bagas) pada temperatur 40°C (Maisaroh, 2009). Perbedaan temperatur optimum ini kemungkinan karena *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) memiliki viskositas yang lebih tinggi dibandingkan selulosa yang lain pada konsentrasi yang sama (4%), sehingga enzim selulosa membutuhkan energi yang cukup tinggi untuk menurunkan viskositas larutan CMC. Oleh karena itu untuk memperoleh data yang akurat perlu dilakukan pengaruh variasi substrat terhadap temperatur optimum aktivitas enzim selulase.

Substrat Optimum



Gambar 3.3. Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase

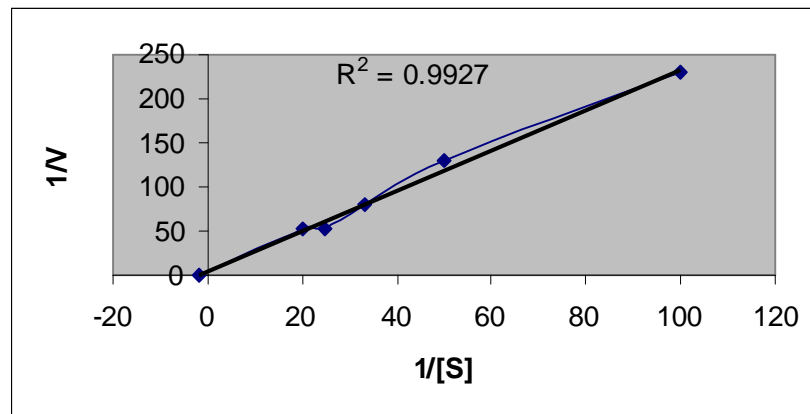
Berdasarkan kurva hubungan antara konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim (Gambar 4.5), menunjukkan adanya hubungan kuantitatif di antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik. Makin tinggi konsentrasi substrat, maka makin besar probabilitas substrat dalam berikatan dengan sisi aktif enzim. Pada konsentrasi substrat di atas 4% ternyata mulai terjadi penurunan kecepatan reaksi enzimatik. Hal ini terjadi karena konsentrasi semakin tinggi viskositas *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) makin tinggi sehingga probabilitas substrat berikatan dengan sisi aktif enzim makin kecil. Data

yang diperoleh dari optimasi substrat ini digunakan untuk menentukan parameter kinetik enzim selulase yang meliputi V_m (Kecepatan Reaksi Maksimum) dan K_m (Konstanta Michaelis-Menten)

Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

V_m merupakan kecepatan maksimum yaitu kecepatan yang berangsur-angsur dicapai pada konsentrasi substrat tinggi (enzim telah jenuh dengan substrat) sedangkan K_m merupakan konstanta yang menyatakan konsentrasi substrat pada saat kecepatan reaksi mencapai setengah kali kecepatan maksimum.

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $1/V$ adalah fungsi dari $1/[S]$. Dengan demikian jika dibuat kurva hubungan antara $1/V$ dengan $1/[S]$, akan terbentuk garis lurus (gambar 4.6).

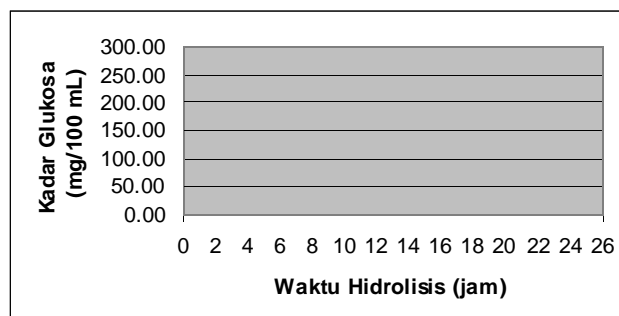


Gambar 3.4. Kurva Hubungan $1/V$ dengan $1/[S]$

Berdasarkan persamaan regresi liner yang diperoleh maka ekstrak kasar enzim selulase yang diisolasi dari bekicot (*Achatina fulica*) memiliki harga V_m sebesar 0,0023 mg/mL per menit dan K_m sebesar 0,0053 mg/mL. Parameter kinetik ini berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan saryono (1991), bahwa enzim selulase dari bekicot dengan menggunakan substrat suspensi ampas nanas dalam buffer asetat pH 5,2 mempunyai harga K_m 0,0142 mg glukosa/mL dan nilai V_m sebesar 0,0250 mg/mL/menit. Perbedaan nilai parameter kinetik ini dimungkinkan karena substrat yang digunakan berbeda. Setengah kecepatan maksimum enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) tercapai pada konsentrasi substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) lebih rendah dibandingkan substrat ampas nanas.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* secara Enzimatis

Gambar 3.5. menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim dicapai pada waktu hidrolisis 22 jam dengan kadar glukosa 245,8 mg/100mL (61,45 mg glukosa/g CMC)

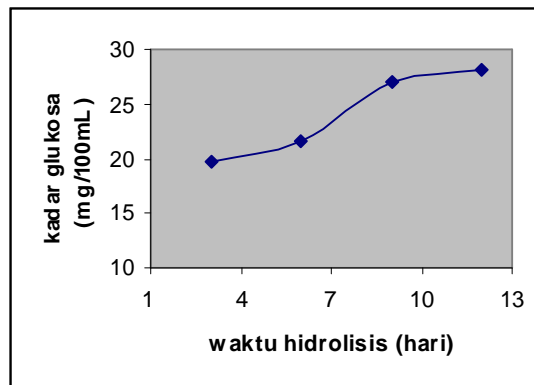


Gambar 3.5. Kurva hubungan antara kadar glukosa dengan waktu hidrolisis menggunakan enzim selulase

Penambahan waktu hidrolisis akan meningkatkan kadar glukosa. Sisi aktif enzim dalam mengikat substrat secara optimum membutuhkan waktu yang cukup. Jika waktu yang dikondisikan pada enzim dan substrat kurang dari cukup, maka sisi aktif enzim belum optimal dalam mengikat substrat, sehingga produk yang terbentuk masih sedikit pada saat reaksi dihentikan. Pada saat waktu hidrolisis optimum, substrat terikat secara maksimum oleh sisi aktif enzim, sehingga pada saat ini dihasilkan produk yang melimpah.

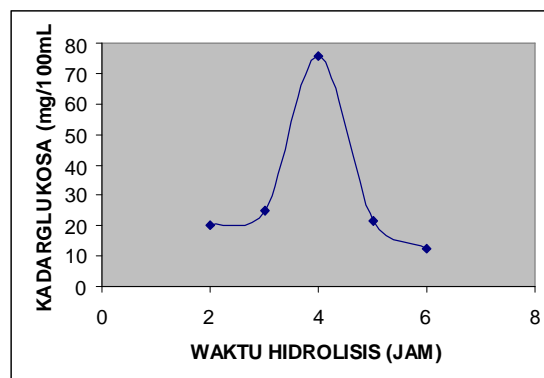
Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) secara biologis

Hidrolisis berlangsung sangat lambat karena menggunakan *Trichoderma viridae* secara langsung (enzim tidak dalam keadaan terekstrak). Dari gambar 3.6. menunjukkan bahwa kadar glukosa mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu hidrolisis. Setelah hidrolisis berlangsung 12 hari, kadar glukosa yang dihasilkan sebesar 28,087 mg/100 mL. Jika waktu hidrolisis diperpanjang dimungkinkan kadar glukosa mengalami peningkatan tetapi relative tidak terlalu besar. Sebagaimana yang telah dilakukan oleh Krisnawati (1999), dalam waktu 30 hari glukosa yang dihasilkan bisa mencapai kadar 30,25 mg/100 mL. Di dalam industri, waktu hidrolisis yang lama sangat tidak menguntungkan karena tidak efisien.



Gambar. 3.6. Kurva hubungan antara kadar glukosa dengan waktu hidrolisis menggunakan *Trichoderma viridae*.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* dengan Katalis Asam



Gambar 3.7. Kurva hubungan antara kadar glukosa dengan waktu hidrolisis menggunakan HCl

Dari gambar 3.7 menunjukkan bahwa kadar glukosa tertinggi diperoleh setelah hidrolisis berlangsung selama 4 jam yaitu sebesar 75,846 mg/100 mL. Setelah 4 jam, terjadi penurunan kadar glukosa sebesar 71,4%. Menurut Taherzadeh (2008) penurunan kadar glukosa ini dikarenakan terjadinya proses degradasi glukosa oleh asam menjadi senyawa lain seperti furfural, 5-hidroxymethylfurfural (HMF), asam levulinat, asam asetat, asam format, asam uronat, fenol, formaldehid dan beberapa senyawa lain. Senyawa-senyawa ini

merupakan senyawa inhibitor yang dapat menghambat pembentukan etanol pada tahap fermentasi selanjutnya.

Dari ketiga cara hidrolisis yang telah dilakukan, maka yang paling efisien adalah hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menggunakan enzim selulase. Selain tidak menimbulkan korosi, hidrolisis dengan enzim selulase dapat berlangsung lebih cepat pada kondisi mild sehingga kadar glukosa yang dihasilkan lebih tinggi. Oleh karena itu sebagai tahap penelitian berikutnya adalah melakukan proses fermentasi hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) hasil hidrolisis secara enzimatik menjadi etanol dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

Fermentasi

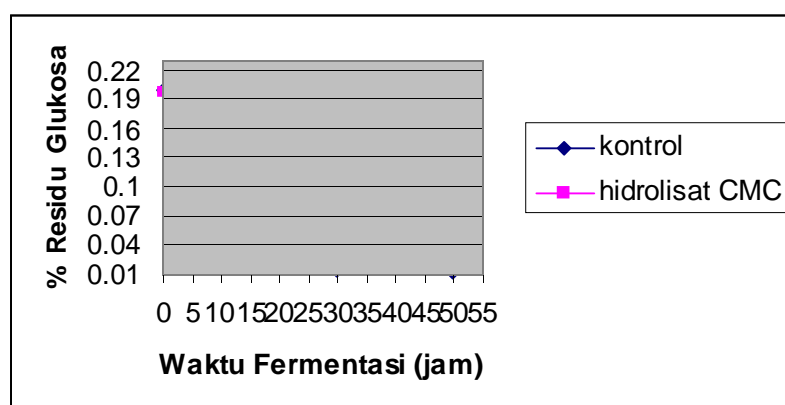
Penyiapan Sel *Zymomonas mobilis*

Penyediaan biakan *Zymomonas mobilis* meliputi 2 tahap yaitu penanaman dalam media padat dan selanjutnya penanaman dalam media cair. Penanaman dalam media padat bertujuan untuk memperbanyak stok biakan murni. Biakan *Zymomonas mobilis* mampu tahan dalam media padat selama dua minggu, sehingga perlu diregenerasi/diremajakan setiap dua minggu sekali. Pindahkan biakan *zymomonas mobilis* dari media padat ke media cair dengan tujuan untuk memperoleh inokulum yang sudah beradaptasi dengan lingkungan fermentasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya (Hani,2009), telah ditentukan kurva pertumbuhan *Zymomonas mobilis*. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase log atau eksponensial bakteri *Z. mobilis*. Pada fase log, pertumbuhan bakteri berlangsung paling cepat. Dengan demikian fase ini merupakan fase yang paling baik untuk dijadikan inokulum dalam proses fermentasi. Biomassa dipanen pada saat pertumbuhan bakteri mencapai fase akhir logaritma yaitu pada 17-18 jam. Pada fase ini diharapkan mampu bekerja lebih baik dalam proses fermentasi setelah mengalami adaptasi dan memiliki ukuran yang lebih seragam.

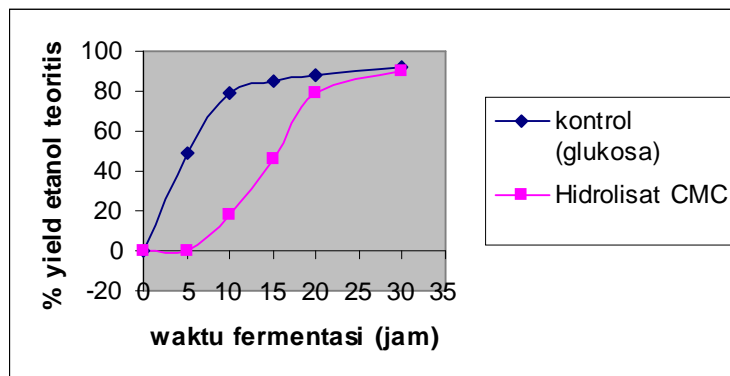
Menentukan Pola Fermentasi Etanol

Fermentasi etanol dilakukan menggunakan proses anaerob, yaitu dengan *shaker* sangat pelan 50 rpm, pada media fermentasi pH optimum 5,5 (Hani, 2009). Pola fermentasi etanol menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 diperoleh dengan memantau pola konsumsi glukosa dan produksi etanol setiap 5 jam selama 50 jam.

Dalam setiap proses fermentasi seiring dengan berjalannya waktu akan terjadi peningkatan jumlah etanol yang dihasilkan dan penurunan jumlah residu glukosa. Hal ini karena glukosa yang tersedia sebagai substrat akan secara bertahap dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk diubah menjadi etanol. Penggambaran lebih jelas dapat dipahami dari gambar 3.8 dan 3.9.



Gambar 3.8. Pola Konsumsi Glukosa pada Fermentasi



Gambar 3.9. Pola produksi etanol pada Fermentasi

Dari Gambar 3.8 dan 3.9 pola fermentasi menggunakan substrat hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menunjukkan bahwa dalam waktu 5 jam belum nampak kenaikan kadar etanol dan penurunan kadar glukosa yang berarti. Hal ini dikarenakan selama waktu 5 jam *Zymomonas mobilis* melakukan adaptasi terhadap media fermentasi yang berbeda dengan media cair. Di dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) selain glukosa juga terdapat senyawa lain seperti selobiosa, selotriosa, selotetrosa dan lain-lain (Sreenath, 2002). Setelah fermentasi berlangsung selama 10 jam laju konsumsi glukosa (hidrolisat CMC) *Zymomonas mobilis* meningkat dengan tajam yaitu sebesar 0,0967 g glukosa/L per jam. Sedangkan laju konsumsi glukosa murni *Zymomonas mobilis* lebih besar dan lebih cepat yaitu 0,2581 g glukosa/L per jam setelah fermentasi berlangsung 5 jam. Laju konsumsi hidrolisat CMC maupun glukosa murni mulai konstan pada saat fermentasi berlangsung selama 30 jam.

Fermentasi etanol dengan menggunakan glukosa murni 0,199% sebagai substrat (kontrol) selama 30 jam menghasilkan etanol sebesar 0,47 g etanol/g glukosa, artinya memberikan *yield* etanol sebesar 92,38% dibanding teori. Sedangkan fermentasi dengan menggunakan hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai substrat menghasilkan etanol sebesar 0,457 g etanol/g gula reduksi, artinya memberikan *yield* etanol sebesar 89,6 % dibanding teori. Hasil fermentasi ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilaporkan Hany (2009), *yield* etanol tertinggi sebesar 61,18%. Hal ini kemungkinan karena sukrosa yang digunakan Hany (2009) sebagai substrat dikonversi menjadi etanol dan produk lainnya seperti levan oleh *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

Berdasar data hasil penelitian tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dapat dijadikan sebagai substrat alternatif pengganti glukosa dalam pembuatan etanol.

4. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa

1. Enzim selulase yang diisolasi dari bekicot (*Achatina fulica*) bekerja optimum pada pH 5,2, temperatur 50°C, dan konsentrasi substrat 4%
2. Aktivitas enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) terhadap *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebesar 0,0202 $\mu\text{mol/mL}$ per mnit (0,0202 Unit) sedangkan kandungan proteinnya 1,72 mg/mL enzim sehingga aktivitas spesifiknya sebesar 0,023 Unit/mg protein
3. Karakterisasi enzim selulase dari bekicot dengan menggunakan substrat CMC dalam buffer asetat pH 5,2 mempunyai harga V_m sebesar 0,0023mg/mL per menit dan K_m sebesar 0,0053 mg/mL
4. Pada kondisi optimum enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) mampu menghidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan kadar glukosa 245,8 mg/100mL (61,45 mg glukosa/g CMC) selama 22 jam
5. Fermentasi dengan menggunakan hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai substrat selama 30 jam dihasilkan etanol sebesar 0,457 g/g glukosa atau *yield* etanol sebesar 89,6 % dibanding teori (0,028g etanol/g CMC) dengan laju konsumsi hidrolisat

CMC tertinggi sebesar 96,7 mg glukosa/L per jam pada saat fermentasi berlangsung 10 jam.

Penghargaan

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada

1. Dr. Surya Rosa Putra, MS., selaku Dosen Pembimbing yang dengan penuh kesabaran telah membimbing penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
2. Prof. Dr. Taslim Ersam., selaku koordinator Program Magister Kimia ITS atas segala kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan.
3. Departemen Agama yang telah memberikan beasiswa pada penulis selama menempuh Program Magister Kimia di ITS
4. serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini.

Daftar Pustaka

- Bhat, M.K., (1997), *Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications*, Food Macromolecul Science Departement, Institute pf Food Research. Biotechnology Advances. Vol.15. 583-620
- Hanny,S.H., (2009), Penentuan pH Optimum dalam Produksi Bioetanol dengan Menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 19088, Skripsi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya.
- Saryono,(1991), *Hidrolisa Selulosa Ampas Nanas, Ananas comucus dengan Enzim Selulase dari Bekicot, Achatina fulica*, Master theses, Departemen Teknik Sipil ITB, Bandung.
- Silaban, Ramlan., (1999), *Enzim Selulolitik pada Bakteri Pseudomonas alchaligenes PaAf-18*, PhD Theses from JBPTITBPP, Bandung
- Sudarmadji, S., Haryono,B., Harsono., (1984), *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberti, Yogyakarta
- Sreenath, H.K., (2002), *Hydrolysis of CarboxyMethylCellulose by Cellulases*, Department of Food Science, Purdue University, West Lafayette, Indiana-47907 (U.S.A)