



AGROINDUSTRIAL TECHNOLOGY JOURNAL

Available online at : ejournal.unida.gontor.ac.id

POTENSI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE MIKROBA ASAL LIMBAH INDUSTRI MINYAK KAYU PUTIH

Potential and Characterization of Microbial Cellulase from the Eucalyptus Oil Industry Waste

Muhammad Nur Kholis¹⁾, Anis Asmediana²⁾, Maya Sari³⁾

^{1) 2) 3)} Department of Agroindustrial Technology, University of Darussalam Gontor, Jl. Raya Siman
Km. 6, Ponorogo, Indonesia

^{*)} E- mail: mnurkholis@unida.gontor.ac.id

ARTICLE INFO :

Diterima 30 September 2019., Diperbaiki 22 Oktober 2019, Disetujui 28 November 2019

Abstrak

Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara bertahap rantai selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase banyak dihasilkan dari berbagai jenis mikroba baik bakteri atau kapang indigenous dari biomassa limbah pertanian, salah satunya berasal dari biomassa limbah minyak kayu putih. Salah satu pemanfaatan enzim selulase adalah digunakan pada proses biokonversi biomassa lignoselulosa pertanian menjadi bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi mikroba selulolitik dari biomassa limbah industri minyak kayu putih. Hal ini merupakan dasar pada pemanfaatan selulase tersebut dapat dimanfaatkan untuk degradasi biomassa limbah minyak kayu putih menjadi bioetanol. Berdasarkan hasil analisa komponen selulosa limbah minyak kayu putih didapatkan kandungan selulosa sebesar 32,37%. Hasil isolasi mikroba asal biomassa minyak kayu putih didapatkan sembilan isolat potensial selulolitik dengan nilai indeks selulolitik terbesar pada isolat C9. Isolat C9 memiliki waktu optimum produksi enzim pada jam ke-16 masa pertumbuhan dari mikroba tersebut. Hasil hidrolisis enzimatik selama satu jam, biomassa minyak kayu putih dengan menggunakan enzim selulase menghasilkan derajat polimerisasi sebesar 2,6.

Kata kunci : limbah minyak kayu putih, biomassa, bioetanol

Abstract

Cellulase is a complex enzyme that continuously cuts the cellulose chain into glucose. Cellulase enzymes are produced from various types of microbes, bacteria or indigenous molds from agricultural waste biomass, one of which is derived from the biomass of eucalyptus oil waste. One of the utilization of cellulase enzymes is used in the process of bioconversion of agricultural lignocellulosic biomass into bioethanol. This study aimed to isolate cellulolytic microbial from from the biomassa of eucalyptus oil industry. This is the basis for the use of cellulase to be used for the degradation of eucalyptus oil waste biomass into bioethanol. Based on the analysis of eucalyptus waste cellulose components, the cellulose content was 32.37%. The results of microbial isolation from eucalyptus oil biomass obtained nine isolates of cellulolytic potential with the largest cellulolytic index value in isolate C9. isolate C9 has the optimum time to produce enzymes at the 16th hour of growth of the microbes. The result of enzymatic hydrolysis for one hour, eucalyptus oil biomass using cellulase enzymes produced a degree of polymerization of 2.6.

Keywords : waste eucalyptus oil, biomassa, bioethanol

PENDAHULUAN

Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara rantai selulosa menjadi glukosa. Enzim ekstraseluler ini terdiri atas kompleks endoglucanase, exoglucanase, dan β -glucosidase (Juturu & Wu, 2014). Enzim selulase termasuk enzim hidrolase karena memotong ikatan 1,4- β -D-glikosidik pada selulosa, hemiselulosa, lichenin, dan β -D-glukan (Harshvardhan, Mishra, & Jha, 2013). Enzim selulase banyak dihasilkan dari berbagai jenis mikroba baik bakteri atau kapang. Beberapa jenis mikroba yang menghasilkan selulase, *Bacillus* sp. SM3-M8 merupakan mikroba hasil isolasi dari limbah molases yang mampu menghasilkan selulase dengan suhu optimum 45°C dan pH 7 (Harshvardhan, *et.al.*, 2013), *Bacillus subtilis* sub sps, *Bacillus mojavensis* and *Bacillus cereus* jenis bakteri asal limbah industri kertas (Rasul *et.al.*, 2015), *Paenibacillus terrae* ME27-15 dan *Bacillus vallismortis* RG-07 (Reddy *et.al.*, 2017) asal tanah asal tanah di China, *Cellulomonas fimi* asal limbah pertanian di India (Yan-Ling, *et.al.*, 2014).

Enzim selulase banyak diaplikasikan pada industri pakan ternak, makanan, pertanian, tekstil, deterjen, dan industri kertas (Kuhad *et.al.*, 2011). Selain itu enzim selulase dapat diaplikasikan pada biokonversi biomassa lignoselulosa menjadi bioetanol (Anindyawati, 2010).

Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme membutuhkan substrat berupa selulosa yang berfungsi untuk menginduksi produksi enzim selulase. Sebagian besar selulosa didegradasi secara aerob dan sebagian kecil didegradasi secara anaerob (Alam, *et.al.*, 2004). Keberadaan mikroba pendegradasi selulosa tersebut dapat ditemukan pada limbah pertanian yang memiliki kandungan lignoselulosa seperti biomassa limbah minyak kayu putih yang berperan sebagai substrat untuk mikroba penghasil enzim selulase. Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi enzim selulase dari mikroba yang sudah diisolasi sebelumnya dari biomassa limbah industri minyak kayu putih. Hal ini merupakan dasar pada pemanfaatan selulase tersebut dapat dimanfaatkan untuk degradasi biomassa limbah minyak kayu putih menjadi bioetanol. Bioetanol merupakan energi terbarukan yang diproduksi dari proses fermentasi (Anuj *et al.*, 2007). Proses fermentasi tersebut dapat menggunakan berbagai jenis mikroba (aktinomisetes, fungi, bakteri) potensial yang memiliki aktivitas dalam degradasi selulosa. Beberapa jenis mikroba yang digunakan dalam proses produksi bioethanol adalah *Actinomycetes*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium species*, *Ruminococcus albus*, *Aspergillus species*, *Chaetomium species*, *Fusarium*

species, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Myrothecium species*, *Penicillium species*, *Trichoderma species* (Milala, *et.al.*, 2005, Schwarz, 2001). *Bacillus cereus* GBPS9 and *Bacillus thuringiensis* Serovar Kurstaki HD1 digunakan pada biomassa bagasse (Ire, *et.al.*, 2016), *Streptomyces viridiochromogenes* pada biomassa jerami padi (Noura El-Ahmady El-Naggar, *et.al.*, 2011), *Streptomyces gancidicus*, *Streptomyces malachitofuscus*, *Streptomyces stramineus* dan *Streptomyces glomeratus* (Jeffrey & Azrizal, 2007), dan *Streptomyces viridiochromogenes* (Naura, *et.al.*, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan identifikasi jenis mikroba potensial untuk produksi bioetanol yang berasal dari limbah produksi minyak kayu putih.

METODE PENELITIAN

Terdapat tiga tahapan penelitian yaitu:

- 1. Analisis Kandungan Serat.** Analisis kandungan serat sebelum dan sesudah proses delignifikasi meliputi kadar air, kadar lignin, kadar abu, kadar protein, hemiselulosa dan selulosa (AOAC, 2005).
- 2. Isolasi bakteri.** Pengambilan sampel biomassa limbah minyak kayu putih dengan cara mengambil sampel limbah yang sudah membusuk pada ke

dalam 10-20 cm. Sampel kemudian dimasukan dalam wadah plastik gelap berlabel. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan metode cawan sebar pada media CMC.

- 3. Kurva Pertumbuhan.** Kultur berumur 3 hari diinokulasikan sebanyak satu corckborer ke dalam 100 mL media biomassa limbah biomassa minyak kayu putih 1% cair dan diinkubasi dalam inkubator bergoyang. Setiap 24 jam dilakukan pengukuran kekeruhan sel dan aktivitas selulase. Kurva pertumbuhan bakteri dihitung berdasarkan bobot kering biomassa sel. Endapan yang telah kering ditimbang dan diplotkan terhadap waktu inkubasi sehingga diperoleh kurva pertumbuhan bakteri. Enzim selulase ekstrak kasar didapat dengan melakukan sedimentasi hasil kultur pada kecepatan 8400 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Uji aktivitas diukur dengan mengukur pembentukan gula pereduksi hasil hidrolisis enzim selulase berdasarkan metode DNS (Miller, 1959). Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol glukosa dalam satu menit. Satu unit aktivitas setara dengan 16,67 nkat (Dybkaer 2001).
- 4. Hidrolisis.** Hidrolisis Enzimatik Selulosa Biomassa minyak kayu putih.

Hidrolisis biomassa minyak kayu putih dengan enzim selulase dilakukan pada konsentrasi substrat 2% dan 8% (b/v) yang dilarutkan dalam enzim. Sampling produk hidrolisis dilakukan pada jam ke-1, 3, dan 6. Aktivitas enzim dihentikan pada suhu 100 °C selama 15 menit. Analisis produk hidrolisis berdasarkan pada nilai derajat polimerasi. Derajat polimerasi ditentukan berdasarkan perbandingan antara gula total dengan gula reduksi. Gula total dihitung dengan menggunakan metode Fenol-H₂SO₄ (Apriyantono et al., 1989) dan gula reduksi dihitung dengan menggunakan metode DNS (Miller, 1959). Derajat polimerasi dihitung berdasarkan perbandingan antara total gula dengan gula reduksi yang dihasilkan.

$$\text{Derajat Polimerasi} = \frac{\text{Gula total (mg/mL)}}{\text{Gula reduksi (mg/mL)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pretreatment biomassa limbah minyak kayu putih.

Pretreatment biomassa limbah pertanian bertujuan merubah komposisi bahan lignoselulosa dengan menghilangkan kandungan lignin, mengurangi kirtalinitis selulosa serta mempermudah dalam proses degradasi dengan menggunakan mikroba (An, *et.al*, 2015). Semakin tinggi selulosa yang dapat di degradasi oleh mikroba maka bioethanol yang dihasilkan akan semakin tinggi.

Analisis Kandungan Serat.

Komponen utama dalam bahan lignoselulosa adalah selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Ketiganya membentuk suatu ikatan kimia yang kompleks yang menjadi bahan dasar dinding sel tumbuhan (Hermiati, *et.al*. 2010). Kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin dalam biomassa limbah pertanian berbeda-beda tergantung sumber dari bahan tersebut.

Tabel 1. Kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin pada beberapa biomassa limbah pertanian (Kholis & Sari, 2018)

Jenis biomassa	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Biomassa minyak kayu putih	32,27	6,59	20,33
Bonggol jagung	33,10	17,90	21
Batang tembakau	51,55	10,62	23,48
Jerami padi	33 - 38	26-32	17-19
Kedelai	33	14	15
Ampas tebu	44.43	55.90	17
Tandan kosong kelapa sawit	40,52	33,72	22,90

Berdasarkan hasil analisa komponen selulosa limbah minyak kayu putih tidak

berbeda jauh dibandingkan dengan bonggol jagung, jerami padi dan

kedelai. Jumlah selulosa yang terkandung dalam bahan menunjukkan potensi untuk bioetanol. Beberapa hasil penelitian bioetanol dari sekam padi, sabut kelapa dan bonggol jagung yang memiliki kadar selulosa 42,2 %, 35% dan 45% menghasilkan kadar etanol 14,4227% ; 0,01289% dan 6 % (Fitriani, *et.al.*, 2013,

Anggorowati, *et.al.*, 2013, Novia *et.al.*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa kadar etanol yang dapat dihasilkan dari limbah biomassa selulosa di pengaruhi oleh berapa faktor diantaranya lama perendaman dan bahan kimia yang digunakan saat proses delignifikasi, serta jenis mikroba yang digunakan untuk menghasilkan etanol.

Tabel 2. Hasil Isolasi Bakteri Limbah Minyak Kayu Putih

Kode isolat	Karakter Morfologi
C1	Warna kuning, tepi tidak rata, basah/berlendir
C2	Warna putih tulang, tepi tidak rata, koloni koyak,
C3	Warna coklat, tepi rata, kering
C4	Warna putih kecoklatan, tepi tidak rata, kering
C5	Warna putih kecoklatan, tepi rata, tipis, basah
C6	Warna putih kehitaman, tepi rata, basah
C7	Warna putih kehitaman, tepi tdiak rata, kering
C8	Warna putih tulang, tepi rata, basah
C9	Warna kuning keputihan, tepi rata, basah
C10	Warna putih tipis, tepi rata, basah

Isolasi bakteri

Hasil isolasi bakteri asal limbah minyak kayu putih untuk menentukan bakteri potensial dalam pembuatan bioetanol ditunjukkan pada Tabel 2.

Hasil isolasi mikroba indigeneous limbah biomasa minyak kayu putih dapat dilakukan ujilanjutan untuk menentukan jenis bakteri yang terdapat dalam limbah biomasa minyak kayu putih. Isolasi bakteri indigenus telah dilakukan diberepa limbah industri seperti, industri penyamakan kulit, industri di daerah lawang dan limbah tanaman jagung. Jenis bakteri yang ditemukan yaitu golongan *Streptococci*, *Streptobacilli*, *Coccus*

(Wardani, *et.al.* 2015), *Pseudomonas* dan *Bacillus* (Zahid, *et.al.* 2015) sedangkan bakteri yang teridentifikasi yaitu *Pseudomonas flourescens* dan *Enterobacter agglomerans* (Prambudiono, *et.al.* 2018).

Isolasi bakteri dari beberapa limbah industri memiliki dominasi warna krem, putih dan kuning serta memiliki tepian yang tidak beraturan. Isolasi mikoba dari limbah biomasa minyak kayu putih memiliki kesamaan warna dan bentuk tepian dari penelitian sebeumnya, hal ini mendasari kemungkinan bakteri indigeneous dari limbah biomasa minyak

kayu putih memiliki golongan yang sama dengan limbah industri lain.

Potensi mikroba selulolitik indigeneus asal limbah biomassa minyak kayu putih

Potensi mikroba selulolitik asal limbah biomassa minyak kayu putih dilihat berdasarkan uji merah kongo dengan melihat zona bening yang muncul pada media *carboxymethyl-cellulase* (CMC). Uji merah kongo secara luas digunakan sebagai indikator potensi isolat dalam mendegradasi selulase (Johnsen, *et.al.* 2014).

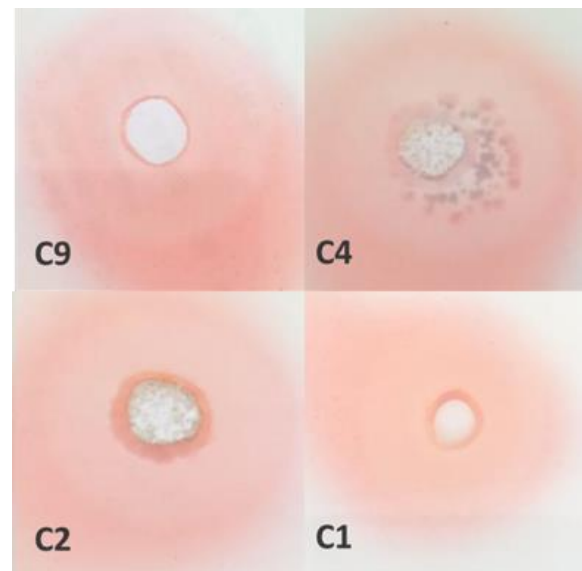
Tabel 3. Zona bening isolat mikroba indigeneus asal biomassa limbah minyak kayu putih

Kode isolat	Zona Bening
C1	0,7 cm
C3	0,5 cm
C4	0,8 cm
C9	0,9 cm

Pembentukan zona bening menunjukkan yang dihasilkan oleh mikroba dalam komponen CMC (Gambar 2). Tabel 3 menunjukkan terdapat empat isolat yang menunjukkan zona bening masing-masing, isolat C1 : 0,7 cm, isolat C3 : 0,5 cm, isolat C4 : 0,8 cm, dan isolat C9 : 0,9 cm.

Isolat C9 (Gambar 2) termasuk isolat potensial selulolitik karena memiliki zona bening paling besar jika dibandingkan dengan isolat, hal ini menunjukkan

semakin lebar zona bening isolat, menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase yang tinggi serta dimungkinkan adanya kompleksitas jenis enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroba (Kholis, *et.al.* 2014).



Gambar 1. Zona bening pada isolat potensial selulolitik

KESIMPULAN

Hasil penelitian sementara menunjukkan adanya penurunan kandungan lignin pada limbah biomassa minyak kayu putih 25,84 % menjadi 20,33%. Kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin limbah biomassa minyak kayu putih masing-masing adalah sebagai berikut 32,27%, 6,59%, dan 20,33%. Proses isolasi mikroba indigeneus pada media CMC 2%, didapatkan 10 isolat dengan berbagai karakter morfologi yang berbeda. Isolat C9 merupakan isolat

potensial selulolitik yang memiliki zona bening sebesar 0,9 cm.

DAFTAR PUSTAKA

- Anuj KC, Rundravaram R, Narasu ML, Rao LR, Ravindra P. (2007). Economic and environmental impact of bioethanol production technology. *Biohecnol. Mol. Biol. Rev.*2(1): 14-32.
- [AOAC]. Association of Official Analytical Chemist. (2005). *Official Methods of Analysis*. The 4th Ed. Gaithersburg, Md: AOAC International
- Fitriani, S. Bahri dan Nurhaeni. (2013). Produksi Bioetanol Tongkol Jagung (Zea Mays) dari Hasil Proses Delignifikasi. *Online Jurnal of Natural Science*, Vol 2 (3) : 66-74
- Harshvardhan K, Mishra A, Jha B. (2013). Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: a potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *Mol Catal Enz.* 93: 51-56. doi: 10.1016/j.molcatb.2013.04.009
- Ire, F.S., Ezebuio, V.Ogugbue, C.J. Bioresour. (2016). Production of bioethanol by bacterial co-culture from agro-waste-impacted soil through simultaneous saccharification and co-fermentation of steam-exploded bagasse. *Bioprocess.* 3: 26. doi:10.1186/s40643-016-0104-x
- Jeffrey, L.S.H., M.R. Azrizal. (2017). Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science.* 35(1): 153–157.
- Johnsen, H.R. and Krause, K. (2014). Cellulase Activity Screening Using Pure Carboxymethylcellulose: Application to Soluble Cellulolytic Samples and to Plant Tissue Prints. *Int J Mol Sci.* 15(1): 830–838. doi: [10.3390/ijms15010830].
- Juturu V, Jin Chuan Wu. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33 : 188–203
- Kholis M., N. & Sari, M. (2018). Potensi Biomassa Limbah Pertanian Dalam Produksi Bioetanol. Conference on Innovation and Application of Science and Technology. Universitas Widyagama Malang. 12 September 2018.
- Kuhad R.C., R. Gupta, & A.Singh. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, vol. 2011, Article ID 280696, 10 pages, doi:10.4061/2011/280696

- Milala, M. A., A. Shugaba, A. Gidado, A. C. Ene, J. A. Wafar. (2005). Studies on the use of agricultural wastes for cellulose enzyme production by *A. niger*. *Journal of Agriculture and Biological Science*, 1:325–328.
- Novia, I. Utami, L. Windiyati. (2014). Pembuatan Bioetanol Dari Sekam Padi Menggunakan Kombinasi Soaking In Aqueous Ammonia (Saa) Pretreatment – Acid Pretreatment – Hidrolisis – Fermentasi. *Teknik Kimia* No. 1, Vol. 20.
- Noura El-Ahmady El-Naggar, A. A. Sherief, Hamza, S.S. (2011). Bioconversion process of rice straw by thermotolerant cellulolytic *Streptomyces viridiochromogenes* under solid-state fermentation conditions for bioethanol production. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11998-12011. Doi 10.5897/AJB11.1256
- Pambudiono A, Endang S, Mohamad A. (2018). The Potential of Indigenous Bacteria for Removing Cadmium from Industrial Wastewater in Lawang, East Java. *J. Tropical Life Science*. 8(1) : 62 – 67.
- Rachmaniah O, Lisa F.S, Lazuardi K. (2009). Pengaruh liquid hot water terhadap perubahan struktur sel bagas. Makalah pada Seminar Nasional XIV, 22-23 Juli 2009. Surabaya.
- Rasul F, A. Afroz, U. Rashid, S. Mehmood, K. Sughra, N. Zeeshan. (2015). Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *International Journal of Biosciences*. 6 (3) :230-238
- Reddy, K.V. T. Vijayalashmi, P. Ranjit, M.N. Raju. (2017). Characterization of Some Efficient Cellulase Producing Bacteria Isolated from Pulp and Paper Mill Effluent Contaminated Soil. *Braz. arch. biol. technol.* 60 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-201716022>
- Saini, A, N. K Aggarwal, A. Yadav. (2017). Isolation and Screening of Cellulose Hydrolyzing Bacteria from Different Ecological Niches. *Bioengineering and Bioscience* 5(1): 7-13, 2017 DOI: 10.13189/bb.2017.050102
- Sanz ML, Gibson GR, Rastall RA. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *J Agric Food Chem*. 53: 5192-5199. doi:10.1021/jf050276w.
- Schwarz. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 634–649

- Sukumaran R. K., R. R. Singhania, and A. Pandey, (2005). Microbial cellulases production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64 (11): 832– 844
- Wardani A, Ahmad S, Hari S. (2015). Keragaman Koloni Bakteri Indigenous Pengolahan Limbah Cair Industri Penyamakan Kulit. *J. Biosaintropis*. 1(1) : 19-25.
- Widyastuti, S.M. (1999). Dekomposisi Limbah Kayu Putuh Menggunakan *Trichoderma* sp. Terpilih. *Buletin Kehutanan* 39 : 1-11.
- Yan-Ling Liang, Z. Zhang, Min Wu, Yuan Wu, and Jia-Xun Feng. (2014). Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Biomed Res Int.*: 512497. doi: 10.1155/2014/512497
- Zahid M, Abbasi M.K, Sohail H dan Nasir R. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*. Vol 6 : 1–10