

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Pertanian Sebagai Sumber Karbon (C)

Peningkatan produk pertanian diikuti oleh meningkatnya limbah hasil pertanian seperti jerami padi, tongkol jagung, batang kedelai, kulit pisang, kulit kacang dan lain-lain yang belum dimanfaatkan secara optimal. Pada umumnya limbah-pertanian tersebut masih mengandung sumber energi dan nutrisi, sehingga dapat dikonversi menjadi produk yang memiliki nilai ekonomi seperti kompos, pakan ternak atau digunakan sebagai medium pertumbuhan mikroba. Pemanfaatan limbah hasil pertanian ini selain dapat menambah nilai ekonomi juga akan menanggulangi masalah pencemaran.

Selulosa merupakan biomolekul yang paling banyak ditemukan di alam dan merupakan unsur utama penyusun kerangka tumbuhan (Masfufatun, 2010) . Di dalam limbah, senyawa selulosa masih terikat kuat dengan lignin dan senyawa karbohidrat lainnya sehingga lebih dikenal dengan lignoselulosa. Lignoselulosa terdiri atas tiga polimer yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin.

Tabel 1. Kadar Lignoselulosa pada Berbagai Limbah.

JenisLimbah	Selulosa (%)	Hemiselulosa/Xilan (%)
Sekam Padi	58,85	18,03
Tongkol jagung	50	25
Bagas tebu	45	35

(Sumber: Fitriani dkk., 2001; Jalaludin dan Samsul, 2005)

Serat selulosa merupakan polimer glukosa yang memiliki ikatan β -1,4 glikosida yang terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen.

Konfigurasi β inilah yang membuat selulosa bersifat keras, sukar larut dalam air, dan tidak manis. Ikatan β -1,4 glikosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis enzimatik. Keteraturan struktur tersebut menimbulkan terbentuknya ikatan hidrogen secara intra dan inter molekuler dalam molekul selulosa (Kim dkk., 2010).

Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin.

Adanya ikatan alkil dan ikatan eter senyawa pengikat lignin ini menyebabkan bahan-bahan lignoselulosa sulit dihidrolisa (Iranmahboob dkk., 2002; Sun dkk., 2002). Lignin merupakan senyawa kompleks yang tersusun dari unit fenil propana yang terikat di dalam struktur tiga dimensi dan merupakan material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin mengandung karbon yang relatif tinggi sehingga resisten terhadap degradasi. Oleh karena itu, lignin harus dipecah agar hemiselulosa dan selulosa dapat dihidrolisis. Proses *pretreatment* (delignifikasi) perlu dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur maupun ukurannya. Rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi

glukosa. Berbagai macam metode fisik dan kimia-fisik telah banyak digunakan dalam proses delignifikasi terhadap bahan baku lignoselulosa (Fandkk., 1982).

Proses delignifikasi memecah lapisan pelindung lignin dan memperbesar luas permukaan kontak antara substrat dengan enzim selulase pada tahap hidrolisis. Hal tersebut membuat enzim selulase lebih efektif mengkonversi selulosa menjadi glukosa. Hidrolisis yang digunakan adalah hidrolisis enzim karena memiliki kemampuan untuk memproduksi glukosa dengan kadar tinggi (75-95%) dan tidak berlangsung pada temperatur tinggi (Sun dkk., 2002; Taherzadeh dkk., 2008).

Hidrolisis selulosa secara enzimatik dapat dideteksi dengan beberapa cara, salah satunya dengan melihat aktivitas CMCase. *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) adalah senyawa karbohidrat turunan selulosa, kopolimer dua unit β -D glukosa dan β -D-glukopiranososa 2-*O*-(karboksilmetil)-garam monosodium yang terikat melalui ikatan β -1,4-glikosidik. CMC memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis. Hidrolisis CMC menjadi gula-gula sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa proses hidrolisis secara enzimatis lebih menguntungkan dari pada menggunakan asam. Hidrolisis secara enzimatis selain tidak menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* (pH 4,8 dan suhu 50 °C) juga ternyata memberikan hasil yang lebih tinggi. (Masfufatun, 2010).

2.2 Enzim

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai biokatalisator dalam reaksi kimia. Fungsi katalis enzim sangat spesifik, yaitu hanya mengkatalis satu macam reaksi kimia saja. Beberapa enzim mengkatalis suatu kelompok reaksi yang berhubungan dekat. Kekhususan sifat katalitik enzim merupakan fungsi dari struktur 3 dimensi molekul enzim. Dalam suatu reaksi, enzim akan bergabung dengan reaktan atau substrat (S) membentuk suatu kompleks enzim-substrat. Setelah reaksi berlangsung akan dihasilkan produk (P) sementara enzim (E) kembali ke bentuk semula.



Molekul enzim umumnya lebih besar dari substrat, dan kombinasi enzim-substrat dihubungkan dengan ikatan lemah, seperti ikatan hidrogen, gaya van der Waals dan interaksi hidrofobik. Kemampuan katalisis enzim sangat tinggi. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi kimia dari 10^8 sampai 10^{20} kali secara spontan. Enzim mengkatalis reaksi dengan mengikat substrat yang cocok pada sisi aktifnya (Madigan dan Martinko, 2006).

2.3 Enzim Selulase

Enzim bekerja secara spesifik sehingga enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa pun bersifat spesifik (Saha, 2003). Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa. Selulase mengubah selulosa menjadi glukosa melalui tiga tahap. Pada tahap pertama enzim *endoselulase* memecah ikatan kristal selulosa yang semula berupa

ikatan silang menjadi ikatan selulosa rantai lurus. Pada tahap kedua, enzim *eksoselulase* memecah selulosa berantai lurus menjadi selobiose, yaitu senyawa yang terdiri dari dua molekul glukosa. Pada tahap terakhir, enzim *selobiase* mengubah selobiose menjadi molekul-molekul glukosa (Saha, 2003).

Selulase merupakan enzim ekstra seluler yang terdiri atas kompleks endo- β -1,4-glukonase (CMCase, Cxselulase endoselulase, atau *carboxymethyl cellulase*), kompleks ekso- β -1,4-glukonase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan β -1,4-glukosidase atau selobiase (Crueger and Crueger, 1984).

Enzim selulase yang dikenal dengan nama sistematik β -1,4 glukano-4-glukano hidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Sebagai enzim yang berukuran besar, enzim selulose terdiri dari beberapa enzim yang bekerja bersama menghidrolisis selulosa (Silva dkk., 2005). Diketahui bahwa mikroorganisme tertentu menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Partikel selulosome inilah yang akan terdisintegrasi menjadi enzim-enzim, yang secara sinergis mendegradasi selulosa (Belitz dkk., 2008). Sedikitnya ada tiga enzim yang terlibat dalam degradasi atau hidrolisis selulosa, yaitu endo- β -glukanase, ekso- β -glukanase, dan β -glukosidase (Silva dkk., 2005). Pengelompokan nama lain dan fungsi enzim selulase (Tabel 2) adalah sebagai berikut.

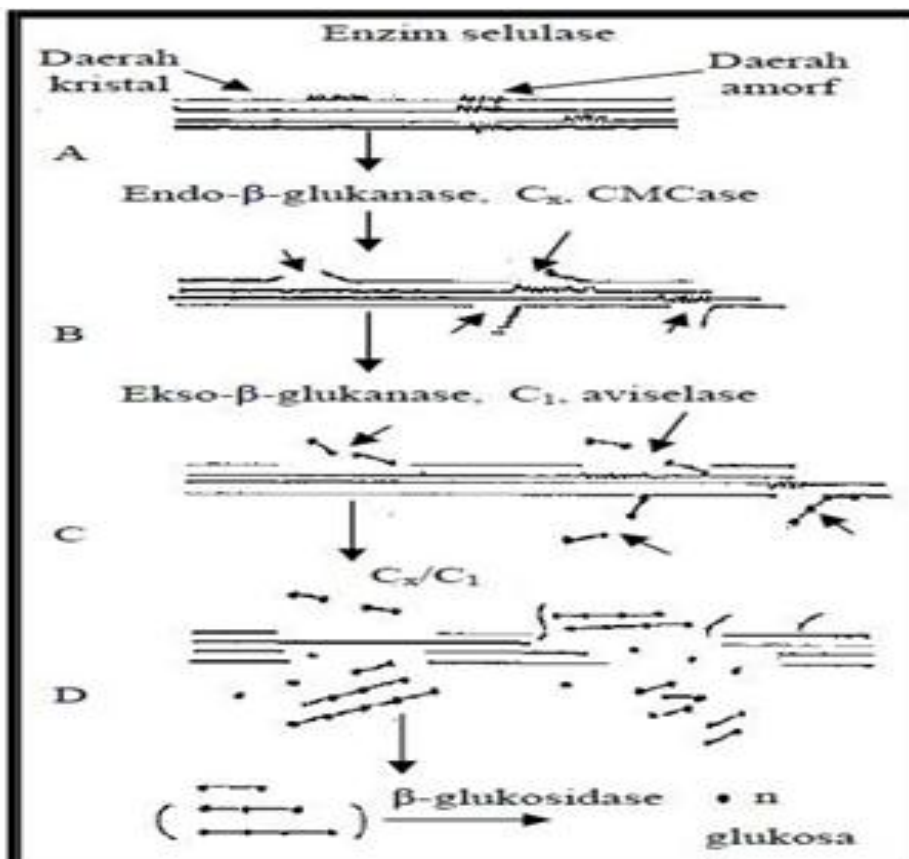
- a. Enzimendo- β -1,4-glukanase (β -1,4-D-glukan-4-glukano hidrolase) menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak terutama pada daerah amorf serat selulosa. Enzim ini dapat bereaksi dengan selulosa kristal tetapi kurang aktif. Selain itu, endo- β -1,4-glukanase tidak menyerang selobiosa, tapi menghidrolisis selodekstrin dan selulosa yang telah dilunakkan dengan asam fosfat dan selulosa yang telah disubstitusi (seperti CMC). Enzim ini secara umum dikenal sebagai CMC-ase atau selulaseCx.
- b. Enzim β -1-glukanase atau secara umum dikenal dengan selulase C1, menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan membebaskan selobiosa tetapi tidak menyerang selulosa yang disubstitusi.
- c. Enzim β -1,4-glukosidase atau selobiase menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida yang menghasilkan glukosa.

Tabel 2. Komponen Enzim di Dalam Kompleks Enzim Selulase

Nama	Sinonim	Reaksi
Endo- β -glukanase	Faktor C_x ; CMCase; 1,4- β -D-glukan glukano hidrolase	Hidrolisis ikatan 1,4- β -D-glukosidik, membentuk glukosa dan selo-oligo sakarida.
Ekso- β -1 glukanase	Faktor C_1 ; avicelase; 1,4- β -D-glukan selobiohidrolase	Eksohidrolisis ikatan 1,4- β -D-glukosidik membentuk selobiosa dari selulosa atau 1,4- β -gluko oligosakarida.
β -1 glukosidase	Selobiase; amygdalase	Hidrolisis residu β -D-glukosa terminal dalam β -glukan.

(sumber: Belitz dkk., 2008).

Tahapan-tahapan hidrolisis selulosa oleh selulase dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini

**Gambar1. Tahapan Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatis (Ghori, 2001)**

2.4. Bakteri Selulolitik

Mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa dinamakan mikroorganisme selulolitik. Bakteri yang dapat mendegradasi selulosa disebut juga bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik memiliki kemampuan dalam menghidrolisis bahan-bahan dari alam yang mengandung selulosa menjadi produk yang lebih sederhana (Marganingtyas, 2011).

Beberapa jenis bakteri yang dapat mendegradasi selulosa adalah *Chaetoniium* sp, *Chytophaga* sp, dan *Clostridium* sp (Rao dalam Nurmayani, 2007).

Sebagai contoh, dalam beberapa penelitian yang menggunakan bakteri jenis *Clostridium* sp. untuk produksi beberapa pelarut antara lain dinyatakan Ezeji dkk., (2007) memproduksi aseton, butanol dan etanol dari tepung jagung dengan kadar 14,28 g/L. Bakteri selulolitik dapat mendegradasi molekul kompleks pada substrat tidak larut dalam air dengan berbagai cara menggunakan berbagai enzim untuk memutuskan bagian yang berbeda di dalam substrat. Proses perombakan secara enzimatis terjadi dengan adanya enzim selulase sebagai agen perombak yang bersifat spesifik untuk menghidrolisis ikatan β -(1,4)-glikosidik, serta rantai selulosa dan derivatnya (Ambriyanto, 2010).

Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tidak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yaitu selobiosa (Fan dkk., 1982). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan media air dan dibantu dengan katalis asam atau enzim. Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi

menjadi produk fermentasi yang nantinya dapat diolah lagi menjadi bioetanol. Umumnya degradasi selulosa terjadi pada pH normal (Hatami dkk., 2008).

Tabel 3. Kompilasi Berbagai Penelitian Tentang Produksi Enzim Selulase

No	Mikroba	Kondisi Optimum	Sumber Karbon	Sumber Nitrogen	Aktivitas Enzim	Pustaka
1	<i>Bacillus circulans</i>	pH: 7 Suhu: 50°C	Avicel	Pepton, <i>Yeast Extract</i>	87,96 U/mL	Suhardi, (2010)
2	Bakteri isolat C5-3	pH: 5 Suhu: 80°C	CMC, Jerami, tongkol jagung, kulit pisang	KNO ₃ , <i>Yeast Extract</i>	0,026 U/ml	Meryandini dkk., (2009)
3	Bakteri isolat C4-4	pH: 5 Suhu: 70°C	CMC, Jerami, tongkol jagung, kulit pisang	KNO ₃ , <i>Yeast Extract</i>	0,112 U/mL	Meryandini dkk., (2009)
4	Bakteri isolat C11-1	pH: 8 Suhu: 70°C	CMC, Jerami, tongkol jagung, kulit pisang	KNO ₃ , <i>Yeast Extract</i>	0,193 U/ml	Meryandini dkk., (2009)
5	Bakteri isolat C5-1	pH: 3,5 Suhu: 90°C	CMC, Jerami, tongkol jagung, kulit pisang	KNO ₃ , <i>Yeast Extract</i>	0,042 U/ml	Meryandini dkk., (2009)
6	<i>Bacillus circulans</i>	pH: 7 Suhu: 50°C	CMC	(NH ₄) ₂ SO ₄	129,97 U/ml	Suhardi, (2010)
7	<i>Achantina fulica</i>	pH: 5,16 Suhu: 50°C	CMC	-	0,053 U/ml	Masfufatun, (2010)
8	<i>Aspergillus niger</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	CMC	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1742 U/ml	Saliu dan Sani, (2012)

9	<i>Aspergillus niger</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	<i>Alkali treated corn cob</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1698 U/ml	Saliu dan Sani, (2012)
10	<i>Aspergillus niger</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	<i>Untreated corn cob</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1401 U/ml	Saliu dan Sani, (2012)
11	<i>Penicillium decumbens</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	CMC	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0381 U/ml	Saliu dan Sani, (2012)
12	<i>Penicillium decumbens</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	<i>Alkali treated corn cob</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1111 U/ml	Saliu dan Sani, 2012
13	<i>Penicillium decumbens</i>	pH: 4,8 Suhu: 50°C	<i>Untreated corn cob</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0592 U/ml	Saliu dan Sani, (2012)
14	<i>Aspergillus niger</i> NFU 6018	pH: 4,8 Suhu: 50°C	Bagas tebu	Urea 0,3%	0,5447 mg/ml	Gunam dkk., (2011)
15	<i>Aspergillus niger</i>	pH: 8 Suhu: 28°C	Avicel	<i>Yeast Extract</i>	55,56 U/ml	Susanti, 2011
16	<i>Bacillus circulans</i>	pH: 9 Suhu: 37°C	CMC	Ekstrak khamir, polipepton	111,11 U/ml	Susanti, (2011)
17	<i>Bacillus subtilis</i>	pH: 6,5-7,5 Suhu: 45°C	CMC		11,5 IU/ml	Verma dkk, (2012)