



Kinerja Enzim Ganda Pada *Pretreatment* Mikroalga Untuk Produksi Bioetanol

Padil^{1,2, ✉}, Siti Syamsiah², Muslikhin Hidayat², Rina Sri Kasiamdari³

DOI 10.15294/jbat.v4i2.7564

¹Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau Kampus Bina Widya Jl. HR Subrantas Km 12,5 Simpang Panam, Pekanbaru

²Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Gadjah Mada Jl Grafika No 2, Sinduadi, Mlati, Kec. Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta

³Laboratorium Sistemika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Jl. Teknika Selatan, Sekip utara, Daerah Istimewa Yogyakarta

Article Info

Sejarah Artikel:

Diterima Oktober 2016

Disetujui November 2016

Dipublikasikan Desember 2016

Keywords :

Enzim, mikroalga, *pre-treatment*

Abstrak

Penggunaan biomassa mikroalga sebagai bahan baku untuk memproduksi bioetanol sangat menjanjikan, hal ini disebabkan oleh sejumlah besar karbohidrat terdapat dalam fisiologi sel mikroalga. Kendala utama dari hidrolisis enzimatik dalam rangka memproduksi bioetanol adalah terikatnya granula pati dalam dinding sel yang kaku. Oleh sebab itu langkah *pre-treatment* diperlukan untuk melepaskan dan mengkonversi karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana sebelum proses fermentasi. Mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* merupakan mikroalga hijau (Chlorophyta) yang mana dinding selnya mengandung selulosa dan hemiselulosa sebagai konstituen utama, oleh karena itu, penelitian ini melihat pengaruh penggunaan enzim selulase dan xilanase sebagai strategi untuk membuka dinding sel mikroalga. Parameter yang berbeda yang akan diselidiki adalah konsentrasi enzim, suhu, pH, serta metode penggunaan enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* tertinggi glukosa yang diperoleh adalah 31,912% (w/w) dan ini dicapai pada kondisi proses suhu 45°C, pH 4,5, jumlah biomassa mikroalga 5 g/L, konsentrasi enzim selulase dan xilanase masing-masing 30% (w/w) pada waktu 40 menit pada mekanisme penggunaan enzim selulase dan xilanase secara simultan.

Abstract

The use of biomass of microalgae as a feedstock to produce bioethanol is very promising, it is caused by a large amount of carbohydrates contained in microalgae physiology cell. The main obstacle of enzymatic hydrolysis in order to produce bioethanol is the bound starch granules in a rigid cell wall. Therefore, pre-treatment steps needed to remove and convert complex carbohydrates into simple sugars before the fermentation process. Tetraselmis Chuii microalgae species are green microalgae (Chlorophyta) in which the cell wall containing cellulose and hemicellulose as the main constituent, therefore, this study observe the effect of the use of cellulase enzymes and xylanase as a strategy to open up the cell walls of microalgae. Another investigated parameter is the enzyme concentration, temperature, pH, and methods of use of enzymes. The results showed that the highest yield of glucose obtained was 31.912% (w / w) and is achieved under the conditions of a temperature of 45°C, pH of 4.5, the amount of biomass of microalgae as 5 g/L, the concentration of cellulase enzymes and xylanase 30% (w / w) at 40 minute at mechanism using cellulase and xylanase enzymes simultaneously.

PENDAHULUAN

Penelitian pengembangan energi baru terbarukan dan berkelanjutan telah menjadi perhatian yang serius dari para peneliti akhir-akhir ini, hal ini disebabkan oleh terus berkurangnya cadangan bahan bakar yang berasal dari fosil dan terjadinya perubahan iklim akibat pembakaran bahan bakar fosil yang berlebihan (Chen et al., 2011; Harun et al., 2010; Ho et al., 2011; Ho et al., 2013). Penggunaan biomassa sebagai pengganti bahan bakar yang berasal dari fosil menjadi perhatian para peneliti, karena peran pentingnya dalam mengurangi emisi CO₂ ke atmosfer ketika dibakar (Schmidt, J., et al., 2010 ; Inn et al., 2013). Selain dapat mengurangi emisi CO₂, biomassa merupakan sumber bahan baku yang menjanjikan untuk energi baru terbarukan yang dapat menghasilkan berbagai jenis biofuel, seperti biodiesel (Ho et al., 2010) dan bioetanol (Jhon et al., 2011). Saat ini, bahan baku bioetanol terutama berasal dari sukrosa dan tanaman pertanian yang mengandung pati seperti tebu dan jagung (Nigam, P.S., Singh, A., 2011; Ho et al., 2013). Namun, dengan menggunakan tanaman pertanian sebagai bahan baku bioetanol masih menyisakan sejumlah masalah diantaranya adalah persaingan penggunaan untuk produk pangan versus energi (Nigam, P. S., & Singh, A. 2011; Inn et al., 2013). Untuk mengatasi permasalahan tersebut muncul bahan baku generasi kedua dari biomassa lignoselulosa.

Bioetanol generasi kedua yang berasal dari biomassa lignoselulosa menawarkan pilihan alternatif karena ketersediaan yang melimpah dan tidak bersaing dengan produk pangan (Jegannathan et al.,2009). Namun permasalahan yang muncul adalah menghilangkan lignin dari bahan lignoselulosa telah menghambat potensi komersialisasi sumber energi terbarukan ini (Karthika et al., 2012). Dengan demikian bahan baku untuk bioetanol sekarang dialihkan ke bahan baku generasi ketiga yaitu mikroalga (Ross et al.,2008). Hal ini disebabkan oleh mikroalga memiliki kandungan karbohidrat tinggi seperti pati, selulosa dan hemiselulosa yang dapat dikonversi menjadi glukosa sebagai bahan baku bioetanol, disamping itu mikroalga tidak mengandung lignin serta dapat menyerap CO₂ (Lee et al.,2015 ; Ho et al.,2013 ; John et al., 2011 ; Park et al., 2011).

Produksi bioetanol dari mikroalga perlu melibatkan beberapa proses diantaranya adalah *pretreatment*, sakarifikasi, fermentasi, dan pemurnian produk. *Pretreatment* mikroalga dilakukan untuk memecah dinding sel dalam rangka melepaskan polisakarida seperti pati, struktural karbohidrat, dan nutrisi lainnya sebelum hidrolisis enzimatis dan proses fermentasi (Chauve et al.,2010 ; Domozych, D.S et al.,2012 ; Hamandez D., et al.,2015 ; Ho et al.,2013). Dinding sel mikroalga hijau (Chlorophyta) mengandung selulosa dan hemiselulosa sebagai konstituen utama (Hamandez D., et al.,2015 ; Chen et al.,2013; Choi et al., 2010). Karena sifat enzim ini spesifik, maka enzim selulase dan xilanase dapat digunakan untuk membuka dan menghidrolisis dinding sel biomasa mikroalga (Harun, et al., 2011).

Beberapa penelitian tentang *pretreatment* dan hidrolisis mikroalga dengan menggunakan enzim telah dilakukan. *Pre-treatment* sekaligus sakarifikasi mikroalga dengan enzim dilakukan oleh Eshaq et al., 2010 yaitu menggunakan kombinasi enzim selulase dan α -amilase. Dari penelitian ini enzim selulase bereaksi dengan selulosa yang terdapat pada mikroalga membentuk glukosa, sedangkan α -amilase bereaksi dengan pati menghasilkan dekstrin. Pada penelitian ini tidak ditinjau sejauh mana enzim selulase dapat memecah dinding sel untuk melepaskan pati sebelum proses sakarifikasi (Sze, 1998 ; Chen et al.,2013). Marsalkova et al.,2010 menggunakan kombinasi enzim α -amilase, glukoamilase, dan xilanase dalam rangka mengkonversikan mikroalga menjadi glukosa. Penelitian ini memiliki beberapa kelemahan diantaranya adalah pembukaan dinding sel mikroalga tidak optimal, disebabkan oleh dinding sel mikroalga tersusun dari selulosa dan hemiselulosa (Libessart et al.,1995 ; Chen et al.,2013), enzim *xylanase* hanya bereaksi dengan hemiselulosa dan tidak bereaksi dengan selulosa, sehingga enzim α -amilase yang bereaksi dengan pati yang terperangkap dalam sel yang kaku tidak optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai kondisi proses seperti suhu, pH, dan konsentrasi enzim pada *pretreatment* enzimatis mikroalga menggunakan enzim selulase dari *Aspergillus niger* dan xilanase dari *Trichoderma longibrachiatum* secara simultan untuk mendapatkan kondisi proses *pretreatment* yang optimum.

METODE

Biomassa Mikroalga

Mikroalga yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroalga hijau dengan spesies *Tetraselmis chuii* berbentuk *powder* yang dibeli dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL), Propinsi Lampung, Indonesia.

Enzim

Enzim selulase dari *Aspergillus niger* 22178, dibeli dari Sigma-Aldrich, Singapura, berbentuk *powder* dan berwarna putih dengan aktiviti $\approx 0,8$ unit per mg padat. Setiap 0,8 unit selulase membebaskan 1,0 μmol glukosa dari substrat selulosa pada pH 4,0-5,0; Enzim endo-1,4- β -xilanase dari *Trichoderma longibrachiatum* X2629 dari Sigma-Aldrich, Singapura, berbentuk padatan dengan aktiviti $\geq 1,0$ unit per mg padat. Setiap 1,0 unit xilanase membebaskan 1,0 μmol glukosa per menit dari substrat xilan pada pH 4,5 dan suhu 30°C.

Pre-treatment mikroalga dengan menggunakan enzim

Pre-treatment mikroalga menggunakan dua jenis enzim yaitu selulase dari *Aspergillus niger* 22178 untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa dan endo-1,4- β -xilanase dari *Trichoderma longibrachiatum* X2629 untuk mengkonversi hemiselulosa menjadi glukosa.

Percobaan *pre-treatment* selulosa dan hemiselulosa menggunakan enzim selulase dan xilanase dilakukan dengan memvariasikan suhu *pre-treatment*, pH, konsentrasi enzim dan waktu *pre-treatment* serta metode penggunaan enzim.

Percobaan pertama dilakukan dengan menggunakan mikroalga 500 mg dimasukkan dalam erlemeyer 250 mL dan tambahkan *buffer solution* 100 mL dengan pH 4,5, dimana nilai pH ini merupakan pH optimum enzim selulase dan xilanase adalah 4,0 sampai 5,0 (Harun et al., 2011). Setelah mikroalga larut, kemudian erlemeyer yang berisi mikroalga dimasukkan ke dalam *shakerbatch* untuk pemanasan sampai mencapai suhu 40°C, setelah suhu larutan dalam erlemeyer mencapai 40°C, tambahkan enzim selulase maupun xilanase 10% (w/w). Pada saat enzim sudah dimasukkan ke dalam erlemeyer,

maka dilakukan pengadukan. Proses *pre-treatment* dilakukan selama 60 menit dan pengambilan sampel dilakukan setiap 10 menit. Setiap akhir proses *pre-treatment* larutan disentrifugasi untuk memisahkan larutan dan padatan. Larutan hasil *pre-treatment* kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit menggunakan *waterbatch*, kemudian sampel dimasukkan ke dalam freezer pada suhu -30°C dengan tujuan untuk menghentikan aktivitas enzim. Untuk mengetahui pengaruh variabel yang lain dilakukan percobaan seperti langkah di atas. Untuk melihat pengaruh suhu *pre-treatment* dilakukan dengan memvariasikan suhu 45°C; 50°C; 60°C. Adapun untuk melihat pengaruh konsentrasi enzim dilakukan dengan memvariasikan 20% (w/w) dan 30% (w/w). Sedangkan untuk melihat pengaruh pH dilakukan dengan memvariasikan pH 4,0; 4,5; 5,0; dan 5,5 dengan masa mikroalga yang tetap 500 mg. Sedangkan pengaruh waktu *pre-treatment* dilakukan pada waktu 10; 20; 30; 40; 50; dan 60 menit.

Metode Analisa

Biomassa mikroalga akan dianalisa kadar glukosa, selulosa, hemiselulosa, lemak, protein dan kadar pati. Analisis kadar glukosa menggunakan metode Nelson Somogyi. Analisis kadar selulosa dan hemiselulosa dilakukan dengan menggunakan metode Chesson-Datta, analisis kadar pati dilakukan dengan metode hidrolisis asam (Apriyantono dkk., 1989). Sedangkan analisa kadar lemak menggunakan metode gravimetri sedangkan kadar protein menggunakan metode *kjeldahl*.

Analisa glukosa produk dilakukan dengan menggunakan metode gula reduksi Nelson Somogyi secara spektrofotometri yang prosedurnya dijabarkan oleh (Sudarmadji, 1997). Langkah pertama adalah mengambil larutan sampel sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL larutan Nelson, kemudian dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 100 °C selama 20 menit. Larutan sampel didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Arsenomolybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan aquades 7 mL dan digojog lagi. Larutan sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan λ (panjang gelombang) 540 nm.

Untuk menentukan nilai konsentrasi glukosa dalam sampel, maka harus dibuat kurva absorbansi standar glukosa. Cara yang dilakukan sama seperti pengukuran absorbansi pada larutan sampel. Larutan glukosa dengan masing-masing konsentrasi 6; 10; 40; 60; dan 80 mg/L diambil 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan Nelson. Masing-masing larutan kemudian dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 100 °C selama 20 menit. Larutan didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Arsenomolybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan aquades 7 mL dan digojog lagi. Larutan sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan λ (panjang gelombang) 540 nm dan dibuat *plotting* kurva standar dari hasil yang diperoleh.

Perhitungan kadar glukosa dilakukan dengan terlebih dahulu dibuat kurva standar glukosa antara konsentrasi glukosa (sumbu Y) dalam larutan dengan absorbansi yang terukur oleh spektrofotometer UV-VIS (sumbu X). Setelah itu nilai absorbansi dari larutan sampel yang didapatkan dari pengukuran dengan spektrofotometer UV-VIS diplot ke dalam kurva standar sehingga didapatkan nilai konsentrasi glukosa dalam larutan sampel. Nilai konsentrasi ini akan disimbolkan dengan P dalam g/L. *Yield* glukosa dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) \text{ pada waktu } t}{\text{Konsentrasi mikroalga mula - mula } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pre-treatment mikroalga untuk menghasilkan glukosa sebagai bahan baku bioetanol pada penelitian ini menggunakan dua enzim. Sebelum dilakukan proses *pre-treatment* enzimatik, dilakukan terlebih dahulu analisa bahan baku untuk mengetahui karakteristik mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*.

Komposisi mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*

Tabel 1 merangkum komposisi biokimia dari mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*. Diketahui bahwa mikroalga yang digunakan pada penelitian ini mengandung lebih banyak karbohidrat yakni sebesar 79,36% berat kering, dimana hemiselulosa 49,54%, selulosa 10,20% dan pati 19,62%.

Mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* merupakan mikroalga hijau (Chlorophyta) yang mana dinding selnya mengandung selulosa dan hemiselulosa sebagai konstituen utama (Hamandez D., et al., 2015 ; Chen et al., 2013; Choi et al., 2010), sehingga komponen tersebut dapat bereaksi secara spesifik dengan enzim selulase dan xilanase membentuk glukosa sebagai bahan baku bioetanol. Sedangkan komposisi yang tersisa adalah protein dan lemak.

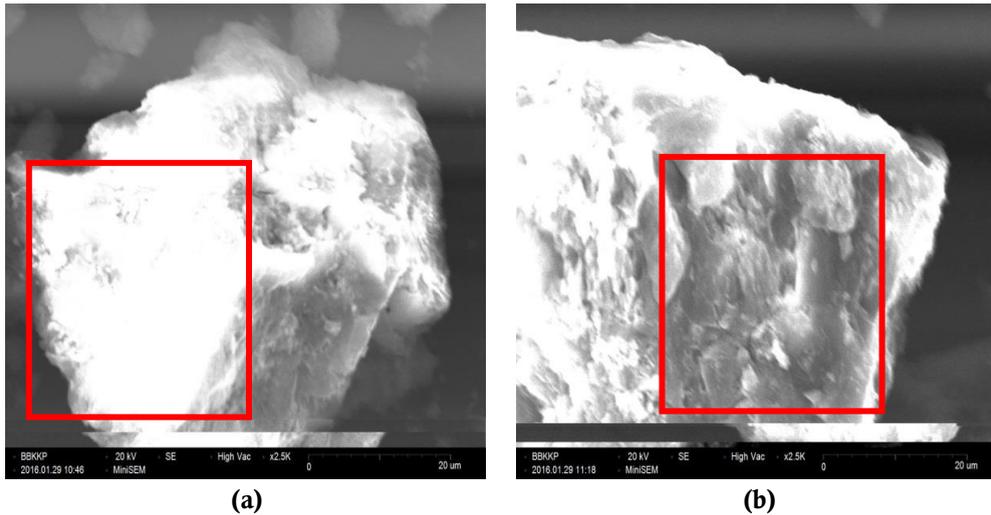
Tabel 1. Komposisi mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*

Komponen	Komposisi (% w/w)
Total karbohidrat	79.36
Hemiselulosa	49.54
Selulosa	10.20
Pati	19.62
Protein	19.57
Lemak	1.07

Pre-treatment mikroalga secara enzimatik

Selain pati, beberapa mikroalga terutama mikroalga hijau memiliki komposisi selulosa dan hemiselulosa yang terdapat pada dinding sel, yang juga dapat digunakan untuk memproduksi glukosa sebagai bahan baku bioetanol, dimana pati yang ada pada mikroalga terikat dalam dinding sel yang kaku (John dkk., 2011). Oleh karena itu pembukaan dinding sel mikroalga bertujuan untuk melepaskan pati sebagai sumber karbon selama proses fermentasi dan sekaligus mereaksikan selulosa dan hemiselulosa (Chena dkk., 2013; Choi dkk., 2010; Domozych dkk., 2012; Lee dkk., 2015; Libessart dkk., 1995). Dalam penelitian ini, digunakan enzim sebagai *pre-treatment* dinding sel mikroalga. Konsentrasi enzim yang berbeda yang bereaksi dengan sel mikroalga dan analisa mikroskopis dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk melihat perubahan morfologi sebelum dan setelah proses *pre-treatment*.

Gambar mikroskopis dari sel mikroalga sebelum dan setelah *pre-treatment* ditunjukkan pada Gambar 1. Kondisi proses Gambar 1 (b) *pre-treatment* dengan 3% (w / w) enzim selulase dan xilanase selama 40 menit pada suhu 45 °C dengan pembesaran 2500 kali. Gambar 1 (a) menunjukkan bahwa sel-sel mikroalga sebelum *pre-treatment* memiliki dinding sel yang utuh sedangkan sel mikroalga setelah *pre-treatment* telah rusak atau dinding sel menjadi pecah.



Gambar 1. *Scanning Electron Microscope* (SEM) (a) mikroalga sebelum *pretreatment* dan (b) mikroalga setelah *pretreatment* dengan pembesaran 2.500 kali.

Sebelum *pre-treatment* dilakukan terlihat bahwa sel-sel mengelompok di dalam plasma sel secara utuh dan sebagian besar berbentuk lonjong, hal ini terlihat jelas pada Gambar 1 (a) terlihat bahwa bentuk permukaan dari mikroalga masih utuh. Gambar 1 (b) menunjukkan pecah dan rusaknya dinding atau permukaan sel, hal ini membuktikan bahwa enzim selulase dan xilanase dapat membuka dinding sel mikroalga dan melepaskan pati yang terjebak.

Pengaruh konsentrasi enzim

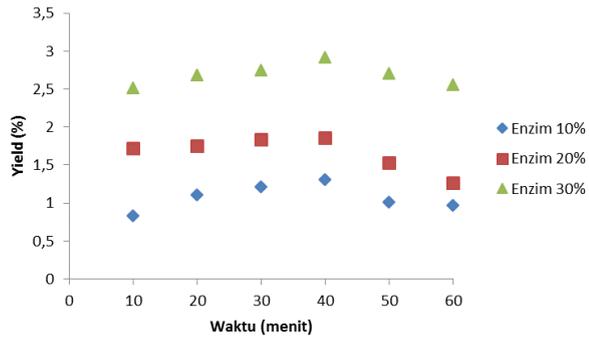
Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim selulase, xilanase maupun selulase dan xilanase secara simultan pada proses *pre-treatment* dilakukan tiga variasi konsentrasi yang berbeda yaitu 10%, 20%, dan 30% (w/w), dengan waktu tinggal 40 menit dan suhu 45°C, sedangkan konsentrasi mikroalga yang digunakan adalah 5 g/L. Hasil penelitian disajikan pada Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4.

Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim dan waktu proses, terjadi peningkatan *yield* glukosa, tetapi peningkatan ini hanya terjadi dari waktu 10 sampai 40 menit. Hal ini dapat dijelaskan bahwa semakin besar konsentrasi enzim dengan pertambahan waktu akan menyebabkan aktivitas enzim semakin besar dan semakin cepat reaksi yang dikatalisis enzim serta semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat yang akan menyebabkan semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk. Maka produk yang terbentukpun akan semakin banyak. Tetapi waktu

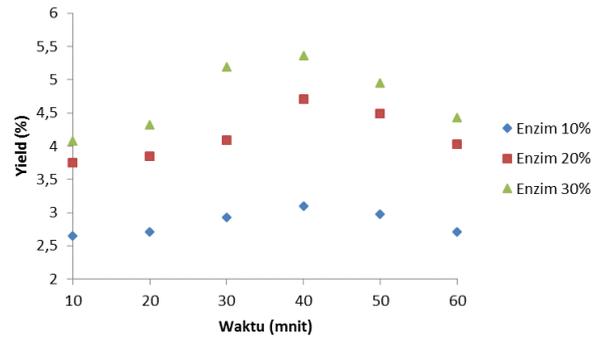
di atas 40 menit *yield* glukosa yang dihasilkan semakin kecil, hal ini disebabkan oleh jumlah substrat yang tersedia sudah mulai berkurang dengan bertambahnya waktu.

Penelitian ini menghasilkan *yield* glukosa masing-masing menggunakan enzim selulase, xilanase serta selulase dan xilanase secara simultan berturut-turut adalah 2,92%, 5,37%, dan 31,91%. Kondisi proses yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu 45°C dengan pH 4,5. Dari *Yield* glukosa yang diperoleh terlihat bahwa penggunaan enzim secara simultan jauh lebih baik dibandingkan dengan penggunaan enzim secara terpisah. *Yield* Glukosa yang diperoleh dari penelitian ini lebih tinggi dibanding penelitian yang dilakukan oleh (Harun et al. 2011) dengan *yield* glukosa 29,9% dengan menggunakan enzim selulase pada konsentrasi mikroalga 10 g/L, adapun spesies mikroalga yang digunakan Harun et al adalah spesies *Chlorococum humicola*. Disamping itu penelitian ini juga memiliki *yield* glukosa yang lebih tinggi dari penelitian yang dilakukan oleh (Jefriadi, 2016) yaitu 23,94% dengan menggunakan enzim selulase,amilase, dan glukamilase pada konsentrasi mikroalga 3,33 g/L, adapun spesies mikroalga yang digunakan adalah *Tetraselmis chuii*.

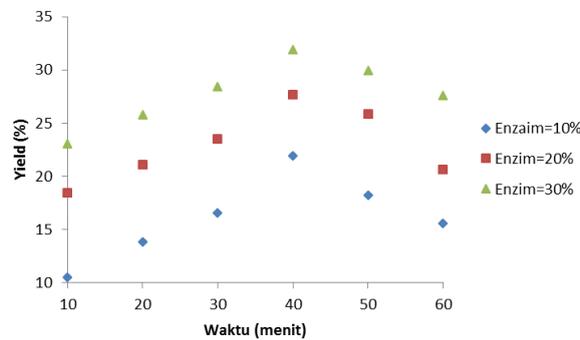
Tetapi jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Marsalkova et al. 2010) *yield* glukosa penelitian ini lebih rendah. Adapun *yield* glukosa yang dihasilkan oleh (Marsalkova et al. 2010) adalah 39% pada konsentrasi mikroalga 22 g/L dengan menggunakan enzim amilase, glukamilase dan xilanase adapun spesies mikroalga yang digunakan



Gambar 2. *Yield* glukosa pada konsentrasi enzim selulase yang berbeda dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada suhu 45°C dan pH 4,5



Gambar 3. *Yield* glukosa pada konsentrasi enzim *xylanase* yang berbeda dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada suhu 45°C dan pH 4,5



Gambar 4. *Yield* glukosa pada konsentrasi enzim selulase dan *xylanase* yang berbeda dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada suhu 45°C dan pH 4,5

adalah *Chlorella vulgaris*. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh (Ho et al. 2010) menghasilkan *yield* glukosa 38,9% dengan menggunakan enzim selulase dan amilase serta spesies mikroalganya adalah *Chlorella vulgaris*.

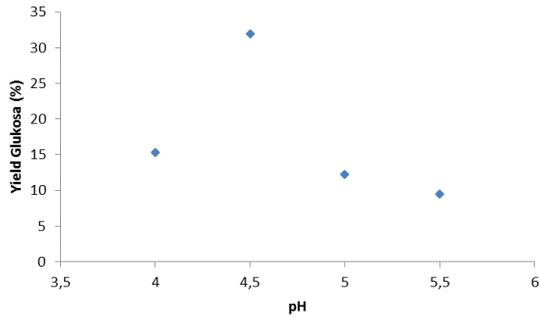
Pengaruh pH dan temperatur *pre-treatment*

Variasi pH yang dilakukan pada *pre-treatment* enzimatik baik selulase, xilanase maupun selulase dan xilanase secara simultan adalah 4,0 sampai 5,5 adapun hasilnya disajikan pada Gambar 5. pH optimum yang didapatkan dari penelitian ini adalah 4,5, dimana *yield* glukosa yang diperoleh pada penggunaan enzim secara simultan adalah 31,91%. Pada pH 5,0-5,5 *yield* glukosa yang didapatkan mengalami penurunan, hal ini terjadi karena enzim akan mengalami perubahan struktur atau muatan asam amino yang merupakan sisi aktif yang berfungsi dalam pengikatan substrat. Hal ini mengakibatkan terganggunya interaksi antara sisi aktif enzim dengan substrat sehingga *yield* glukosa yang

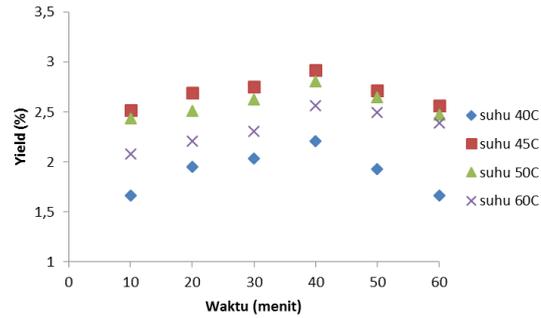
dihasilkan menjadi lebih rendah (Harun et al., 2011; Shuler and Kargi, 1991).

Pada penelitian ini juga diamati pengaruh suhu terhadap *yield* glukosa yang dihasilkan baik menggunakan enzim selulase, xilanase maupun selulase dan xilanase secara simultan pada konsentrasi enzim 30% (w/w) selama 60 menit serta pH 4,5 seperti yang ditampilkan pada Gambar 6, Gambar 7 serta Gambar 8.

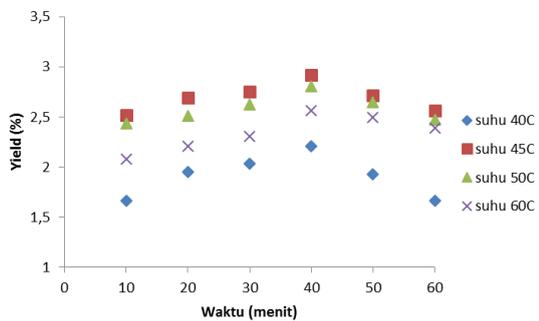
Suhu *pre-treatment* yang optimum baik untuk enzim selulase, xilanase maupun selulase dan xilanase secara simultan adalah 45°C dengan *yield* glukosa masing-masing adalah 2,916%, 5,315%, dan 31,912%. sedangkan suhu di atas dan di bawah 45°C menghasilkan *yield* glukosa yang lebih rendah. Aktivitas enzim akan meningkat bersamaan dengan peningkatan suhu proses, laju proses metabolisme akan naik sampai batasan suhu maksimal. Kecepatan reaksi meningkat dengan naiknya suhu, hal ini disebabkan oleh peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi, akan tetapi pada akhirnya energi kinetik enzim melampaui rintangan energi untuk



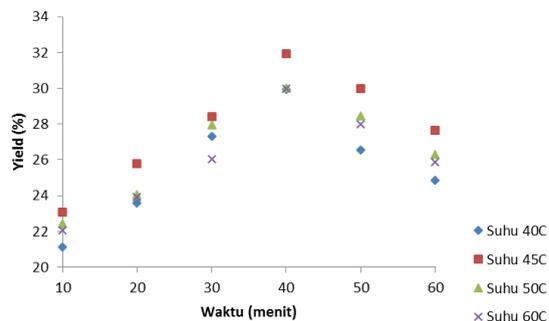
Gambar 5. Yield glukosa pada pH yang berbeda dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada suhu 45°C dan konsentrasi enzim 30% (w/w)



Gambar 6. Yield glukosa pada suhu yang berbeda menggunakan enzim selulase dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada pH 4,5 dan konsentrasi enzim 30% (w/w)



Gambar 7. Yield glukosa pada suhu yang berbeda menggunakan enzim xilanase dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada pH 4,5 dan konsentrasi enzim 30% (w/w)



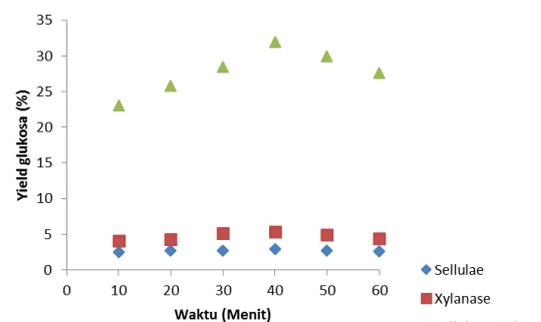
Gambar 8. Yield glukosa pada suhu yang berbeda menggunakan enzim selulase dan xilanase secara simutan dengan konsentrasi mikroalga yang tetap 5 g/L, pada pH 4,5 dan konsentrasi enzim 30% (w/w)

memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah, yang mempertahankan struktur sekunder-tersternya. Pada suhu ini terjadi denaturasi enzim menunjukkan suhu optimal. Pada umumnya enzim akan bekerja baik pada suhu optimum, yaitu antara 30 sampai 50°C (Harun et al., 2011; Shuler and Kargi, 1991).

Pengaruh metode penggunaan enzim

Untuk melihat pengaruh keefektifan penggunaan enzim, maka pada penelitian ini dilakukan tiga metode percobaan penggunaan enzim yaitu menggunakan enzim selulase dan xilanase secara sendiri-sendiri serta selulase dan xilanase secara simultan. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Gambar 9.

Proses *pre-treatment* menggunakan enzim selulase dan xilanase secara simultan menghasilkan *yield* glukosa yang lebih tinggi dibanding proses *pre-treatment* dengan menggunakan enzim selulase dan xilanase secara terpisah, hal ini dikarenakan pada proses ini setiap



Gambar 9. Yield glukosa pada berbagai metode penggunaan enzim

enzim berperan untuk menghidrolisis substrat yang berbeda. Enzim selulase akan menghidrolisis selulosa, enzim xilanase akan menghidrolisis hemiselulosa. Karena sifat enzim yang sangat spesifik, maka proses yang menggunakan enzim selulase hanya menghidrolisis selulosa saja dan xilanase hanya menghidrolisis hemiselulosa. Hasil ini juga menunjukkan bahwa penggunaan enzim selulase dan xilanase secara simultan cukup efektif untuk menghidrolisis selulosa yang merupakan bahan

penyusun dinding sel mikroalga sekaligus menghidrolisis hemiselulosa yang juga terdapat pada dinding sel mikroalga.

KESIMPULAN

Pembukaan dinding sel mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* dapat dilakukan dengan menggunakan enzim selulase dan xilanase dengan penggunaan secara simultan. Adapun kondisi optimum pembukaan dinding sel mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* adalah suhu 45°C, pH 4,5, konsentrasi enzim selulase dan xilanase masing-masing 30% (w/w) pada waktu 40 menit dengan *yield* glukosa 31,912%.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., and Chang, J.S., Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresour. Technol.* 102, (2011) 71-81.
- Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J., Bai, F.W., and Chang, J.S., Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engineering Journal*, 78, (2013) 1-10.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers Plant Sci.* 3, (2012) 82.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 101 (13), (2010) 4775-4800.
- Hamandez D., Riano B., Coca M., Garcia Gonzalez M.,C., Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production, *Chemical Engineering Journal* 262 (2015) 939-945
- Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (5), (2007) 937-953.
- Halim R., Harun R., Danquah M.K., Webley P.A., Microalgal cell disruption for biofuel development, *Applied Energy* 91 (2012) 116-121
- Harun, R., Danquah, M.K., and Forde, G.M., Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, (2010) 199-203.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Lee, D.J., and Chang, J.S., , Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review, *Biotechnol. Adv.*, 29, (2011) 189-198.
- Ho, S.H, Huang, S.W., Chen C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., and Chang, J.S., , Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresource Technology*, 135, (2013) 191-198.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3), (2002) 506-577.
- Padil et al., Cell Disruption Mikroalga Secara Enzimatis Dengan Menggunakan Sellulase, *Reaktor*, Vol. 15 No. 4, (2015) 213-217
- Schmidt, J., Leduc, S., Dotzauer, E., Kindermann, G., & Schmid, E.. Cost-effective CO₂ emission reduction through heat, power and biofuel production from woody biomass: A spatially explicit comparison of conversion technologies. *Applied Energy*, 87, (2010) 2128-2141
- Inn Shi Tan, Man Kee Lam, Keat Teong Lee Hydrolysis of macroalgae using heterogeneous catalyst for bioethanol production *Carbohydrate Polymers* 94 (2013) 561- 566).
- John, R.P., Anisha, G.S., and Nampoothiri, M.K., Ashok Pandey Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology*, 102, (2011) 186-193
- Nigam, P.S., Singh, A., Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energ. Combust.* 37 (1), (2011)52-68.
- Marsalkova, B., Sirmirova, M., Kurec, M., Branyik, T., Branyikova, I., Melzoch, K., Zachleder, V., Microalgae *Chlorella* sp. as an alternative source of fermentable

- sugars. *Chem. Eng. Trans.* 21 (2010) 1279–1284.
- Moxley, G., Zhang, Y.H.P., More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. *Energy Fuels* 21 (6), (2007) 3684–3688.
- Jegannathan, K. R., Chan, E.-S., & Ravindra, P.. Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, (2009) 2163–2168
- Karthika, K., Arun, A. B., & Rekha, P. D. Enzymatic hydrolysis and characterization of lignocellulosic biomass exposed to electron beam irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 90, (2012) 1038–1045
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L., & Weckhuysen, B. M. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*, 110, (2010) 3552–3599.
- Ross, A. B., Jones, J. M., Kubacki, M. L., & Bridgeman, T. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. *Bioresource Technology*, 99, (2008) 6494–6504
- Lee, O.K., Oh, Y.K., and Lee, E.Y., Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1, *Bioresource Technology*, 196, (2015) 22-27
- Ho, S.H, Huang, S.W., Chen C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., and Chang, J.S., Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresource Technology*, 135, (2013) 191-198
- John, R.P., Anisha, G.S., and Nampoothiri, M.K., Ashok Pandey Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology*, 102, (2011) 186-193
- Park, J.-H., Hong, J.-Y., Jang, H. C., Oh, S. G., Kim, S.-H., Yoon, J.-J., & Kim, Y. J. Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 108, (2011) 83–88.
- M. Chauve, H. Mathis, D. Huc, D. Casanave, F. Monot, N. Ferreira, comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases, *Biotechnol. Biofuels* 3 (2010),
- Chu, F.L.E., Dupuy, J.L., and Webb, K.L., Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*, *Aquaculture*, 29, (1982)241–252
- Harun, R., Michael, K. and Danquah, Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production, *Chemical Engineering Journal*, 168, (2011) 1079-1084
- Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, OX, UK, Ames, Iowa, USA. (2004)