

CELL DISRUPTION MIKROALGA SECARA ENZIMATIS DENGAN SELULASE

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

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 Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
Jl. Teknik Selatan, Sekip utara, Daerah Istimewa Yogyakarta

*Penulis korespondensi : fadilpps@yahoo.com

Abstract

ENZYMATIC CELL DISRUPTION OF MICROALGAE USING CELLULASE. *Micro-algae is one source of potential alternative energy of third generation to be developed as bioethanol raw material. The starch content trapped in Micro-algae cell walls causing the need of cell disruption to release and convert starch into simple glucose before the fermentation process. This study aims to open up the cell walls of Micro-algae and to explore the effect of cellulase enzymes from *Aspergillus niger* as Micro-algae cell disruption strategy as well as the optimization of process parameters, i.e the concentration of enzyme, temperature, pH, and time which produce the highest glucose yield. The results showed that the highest glucose yield was 82.44% (w/w) obtained at an enzyme concentration of 30% (w/w), temperature 45°C, pH of 4.5 at 40 minutes, the amount of Micro-algae as 0.5 g/L. In general, cell disruption method using cellulase enzyme was proven to be a promising option to open the cell walls of Micro-algae and convert cellulose into simple glucose simultaneously in producing bioethanol.*

Keywords: *bioethanol; cellulose; cell disruption; enzymatic; micro-algae; starch*

Abstrak

*Mikroalga merupakan salah satu sumber energi alternatif generasi ketiga yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku bioetanol. Kandungan pati yang terperangkap dalam dinding sel mikroalga menyebabkan perlunya cell disruption untuk melepaskan sekaligus mengkonversi pati menjadi glukosa sederhana sebelum proses fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk membuka dinding sel mikroalga sekaligus mengeksplorasi pengaruh enzim sellulase dari *aspergillus niger* sebagai strategi cell disruption mikroalga serta melakukan optimasi parameter proses yaitu konsentrasi enzim, suhu, pH, dan waktu yang memberikan yield glukosa tertinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa yield glukosa tertinggi adalah 82,44% (w/w) yang diperoleh pada konsentrasi enzim 30% (w/w), suhu 45°C, pH 4,5 pada waktu 40 menit, dengan jumlah mikroalga 0,5 g/L. Secara umum, metode cell disruption dengan menggunakan enzim sellulase terbukti menjadi pilihan yang menjanjikan untuk membuka dinding sel mikroalga sekaligus mengkonversi selulosa menjadi glukosa sederhana dalam memproduksi bioetanol.*

Kata kunci: *bioetanol; selulosa; cell disruption; enzimatis; mikroalga; pati*

How to Cite This Article: Padil, Syamsiah, S., Hidayat, M., dan Kasiamdari, R.S., (2015), *Cell Disruption Mikroalga Secara Enzimatis dengan Sellulase*, Reaktor, 15(4), 213-217, <http://dx.doi.org/10.14710/reaktor.15.4.213-217>

PENDAHULUAN

Cadangan energi minyak bumi yang bersumber dari energi fosil kecenderungannya dari waktu ke waktu terus menurun, di samping itu penggunaan

energi fosil yang berlebihan dapat menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan dan perubahan iklim (Chen dkk., 2011; Harun dkk., 2010; Ho dkk., 2011; Ho dkk., 2013). Sejumlah negara seperti Brasil,

Amerika Serikat dan Kanada telah berkomitmen untuk mengembangkan sumber energi alternatif yang dapat diperbaharui, ekonomis dan ramah lingkungan (Mussnug dkk., 2010; Nigam dan Singh, 2010). Mikroalga dianggap sebagai bahan baku yang berpotensi untuk memproduksi bioetanol (Lee dkk., 2015).

Mikroalga memiliki kemampuan untuk menangkap CO₂ selama fotosintesis, sehingga mengurangi konsentrasi emisi gas rumah kaca di lingkungan. Mikroalga memiliki pertumbuhan yang sangat cepat ($\pm 7-10$ hari). Mikroalga dapat tumbuh pada lahan non produktif seperti gurun, pantai, serta mikroalga juga dapat dibudidayakan dengan menggunakan photobioreaktor skala besar. Mikroalga juga dapat tumbuh pada berbagai limbah sebagai sumber nutrisi seperti nitrogen dan fosfor (Chen dkk., 2011; Harun dkk., 2011; John dkk., 2011; Lee dkk., 2015).

Mikroalga seperti *Chlorella*, *Chamydolomonas*, *Dunaliella*, dan *Tetraselmis* memiliki kandungan karbohidrat > 40% berat kering, sehingga berpotensi sebagai bahan baku bioetanol. (Lee dkk., 2015; Ho dkk., 2013; John dkk., 2011; Lee dkk., 2015). Karbohidrat yang terkandung dalam mikroalga sebagian besar dalam bentuk pati dan selulosa, dimana pati pada mikroalga terikat dalam dinding sel yang kaku (Chen dkk., 2013; Choi dkk., 2010; Domozych dkk., 2012; Lee dkk., 2015; Libessart dkk., 1995). Hal ini menyebabkan perlunya dilakukan proses pembukaan dinding sel (*cell disruption*) untuk melepaskan dan mengkonversikan pati menjadi gula sederhana sebelum proses fermentasi dilakukan. (Choi dkk., 2010; Harun dkk., 2011). Adapun komponen utama dari dinding sel sebagian besar spesies mikroalga adalah selulosa dan hemiselulosa (Chen dkk., 2013; Chu dkk., 1982; Harun dkk., 2011).

Cell disruption mikroalga dapat dilakukan secara kimia, enzimatis, mekanik, maupun kombinasi (Ho dkk., 2013; Lee dkk., 2015; Rabelo dkk., 2009). *Cell disruption* secara kimia prosesnya lebih cepat dan lebih murah dibanding dengan cara enzimatis maupun mekanik. Penggunaan bahan kimia dapat menyebabkan terjadinya dekomposisi gula menjadi komponen lain yang tidak diinginkan pada proses fermentasi seperti furfural. (Harun dkk., 2010; Ho dkk., 2013). *Cell disruption* secara enzimatis lebih lambat dan lebih mahal dibandingkan dengan proses kimia (Ho dkk., 2013; Lynd dkk., 2002), tetapi proses enzimatis ramah lingkungan dan dapat menghasilkan glukosa dengan kemurnian tinggi tanpa menghasilkan inhibitor pada proses fermentasi. Proses enzimatis dilakukan pada kondisi proses yang rendah baik temperatur maupun tekanan serta tidak adanya masalah korosi. Adapun proses mekanik memerlukan energi yang cukup tinggi. (Balat dkk., 2008; Choi dkk., 2010).

Beberapa penelitian tentang *pretreatment* dan hidrolisis mikroalga dengan menggunakan enzim telah

dilakukan. Proses *pretreatment* mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii* menggunakan enzim α -amilase (Termamyl 120 L) dan sakarifikasi dengan menggunakan enzim amiloglukosidase (AMG 300 L) dengan menggunakan metode hidrolisis dan fermentasi terpisah (SHF). Pada penelitian ini diperoleh 235 mg etanol pada kondisi operasi 1 g biomassa mikroalga, suhu 90°C, pH 4,5, dan waktu 30 menit (Choi dkk., 2010). Penelitian yang dilakukan oleh Ho dkk. (2013) menggunakan mikroalga *Chlorella vulgaris* FSP-E menghasilkan glukosa 0,461 g/g biomassa.

Penelitian ini bertujuan untuk membuka dinding sel mikroalga sekaligus mengeksplorasi pengaruh enzim selulase dari *aspergillus niger* sebagai strategi *cell disruption* mikroalga serta melakukan optimasi parameter proses yaitu konsentrasi enzim, suhu, pH, dan waktu yang memberikan yield glukosa tertinggi.

METODE PENELITIAN

Bahan

Selulase dari *aspergillus niger* 22178, dibeli dari Sigma-Aldrich, Singapura, berbentuk *powder* dan berwarna putih dengan aktivitas $\approx 0,8$ unit per mg padat. Setiap 0,8 unit selulase membebaskan 1,0 μ mol glukosa dari substrat selulosa pada pH 4,0-5,0. D(+)-Glukose merk KgaA 64271 Darmstadt Germany, Acetic acid (glacial) 100% merk KgaA 64271 Darmstadt Germany yang digunakan dibeli di toko *Chemix*, Yogyakarta, Indonesia.

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

Cell Disruption Secara Enzimatis

Cell disruption mikroalga dilakukan dengan menggunakan enzim selulase yang berasal dari *aspergillus niger*. Pada penelitian ini dilakukan tiga variasi konsentrasi enzim yang berbeda (10-30% w/w), dengan massa mikroalga yang tetap 0,5 g. Campuran enzim-mikroalga dimasukkan ke dalam erlemeyer yang berisi 100 mL larutan buffer dan ditempatkan dalam *shaker* pada temperatur yang berbeda dengan kisaran 40-60°C, kisaran pH 4,0-5,5 untuk waktu 60 menit. Sampel diambil untuk setiap interval waktu 10 menit dan segera pisahkan antara padatan dengan larutan menggunakan *centrifuge* selama 10 menit. Larutan yang telah terpisah dari padatan langsung dipanaskan dalam *water batch* pada suhu 90°C selama 10 menit dengan tujuan untuk menghentikan aktivitas enzim. Sampel disimpan di dalam *freezer* pada suhu -30°C.

Metode Analisis

Analisa mikroskopis sel mikroalga sebelum dan sesudah *cell disruption* dilakukan dengan menggunakan mikroskop *fluorescence* jenis

AX10SKOP-40 dengan pembesaran 1000 kali. Komposisi mikroalga yang dianalisa adalah selulosa, hemiselulosa, dan *Hot Water Soluble* (HWS) dengan menggunakan metode Chesson (Datta, 1981).

Analisis glukosa dilakukan dengan menggunakan metode gula reduksi Nelson Somogyi secara spektrofotometri (Sudarmadji dkk., 1997). Kurva standar glukosa dibuat dengan larutan glukosa pada konsentrasi (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,0 mg/L). Larutan glukosa diambil 1 mL dan dicampur dengan 1 mL larutan Nelson. Larutan dipanaskan pada *water bath* pada suhu 100°C selama 20 menit. Larutan didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Arsenomolybdat dan digojog dengan vortex, kemudian ditambahkan aquades 7 mL dan digojog lagi. Larutan sampel diukur absorbansinya menggunakan spektro UV-VIS RS spectrophotometer, LaboMed, inc dengan λ (panjang gelombang) 540 nm. *Yield* glukosa dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } \left(\frac{g}{L}\right) \text{ pd berbagai wkt}}{\text{Konsentrasi substrat } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Mikroalga

Komposisi biokimia mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* disajikan pada Tabel 1. Empat puluh tujuh koma dua persen (47,2%) dari berat kering adalah komponen α -selulosa, kemudian diikuti dengan hemiselulosa 35,5% dan komposisi sisanya adalah *Hot Water Soluble* (HWS) sebesar 17%, tanpa adanya lignin. Komposisi α -selulosa yang cukup tinggi berpotensi sebagai bahan baku untuk memproduksi bioetanol.

Tabel 1. Komposisi mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*

Komponen	Komposisi (% w/w)
α -selulosa	47,2 %
Hemiselulosa	35,5%
HWS	17%

Cell Distruption Mikroalga

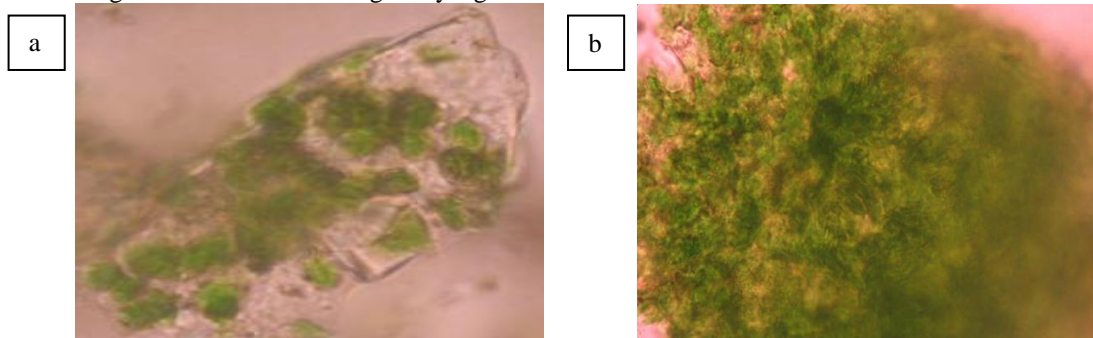
Selain pati, beberapa mikroalga terutama mikroalga hijau terdapat selulosa sebagai karbohidrat pada dinding sel, yang juga dapat digunakan untuk produksi bioetanol (John dkk., 2011). Pati yang ada pada mikroalga terikat dalam dinding sel yang kaku

(Chena dkk., 2013; Choi dkk., 2010; Domozych dkk., 2012; Lee dkk., 2015; Libessart dkk., 1995). Pembukaan dinding sel mikroalga bertujuan melepaskan pati sebagai sumber karbon selama proses fermentasi. Gambar mikroskopis dari sel mikroalga sebelum dan setelah *cell distruption* ditunjukkan pada Gambar 1. Sel-sel mikroalga dalam (b) *cell distruption* dengan 3% (w/w) enzim sellulase selama 40 menit pada 45°C. Gambar diambil pada 1000x pembesaran. Gambar menunjukkan bahwa sel-sel mikroalga sebelum *cell distruption* memiliki dinding sel utuh sedangkan sel mikroalga setelah *cell distruption* telah rusak atau pecah dinding sel.

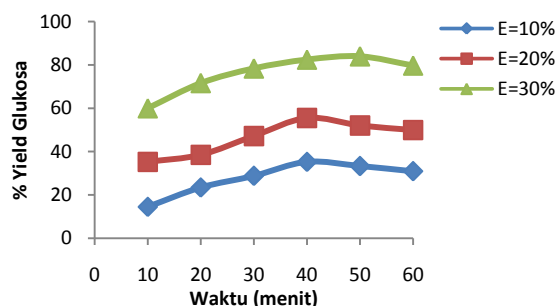
Sebelum *cell distruption* dilakukan terlihat bahwa sel-sel mengelompok di dalam plasma sel secara utuh dan sebagian besar berbentuk lonjong. Hal ini menunjukkan bahwa pati terperangkap di dalam sel. Gambar 1b menunjukkan pecahnya dinding sel, hal ini dibuktikan dengan rusaknya plasma sel dan sel-sel mikroalga. Perubahan dari sel-sel yang utuh menjadi sel-sel yang rusak setelah *cell distruption* secara enzimatik menunjukkan bahwa enzim sellulase dapat membuka dinding sel mikroalga dan melepaskan pati yang terjebak.

Pengaruh Konsentrasi Enzim

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim sellulase pada proses *cell distruption* dilakukan tiga variasi konsentrasi yang berbeda yaitu 10%, 20%, dan 30% (w/w), dengan waktu tinggal tetap 40 menit, suhu konstan 45°C, dan konsentrasi mikroalga yang digunakan 5 g/L. Hasil penelitian disajikan dalam Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim dan waktu proses, terjadi peningkatan *yield* glukosa, tetapi peningkatan ini hanya terjadi dari waktu 10-40 menit. Hal ini dapat dijelaskan bahwa semakin besar konsentrasi enzim dengan penambahan 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. Waktu di atas 40 menit menghasilkan *yield* glukosa tidak terjadi peningkatan yang signifikan, karena setelah selang beberapa waktu, jumlah substrat yang tersedia sudah mulai berkurang.



Gambar 1. Gambar mikroskopis (a) mikroalga sebelum *cell distruption* dan (b) mikroalga setelah *cell distruption*

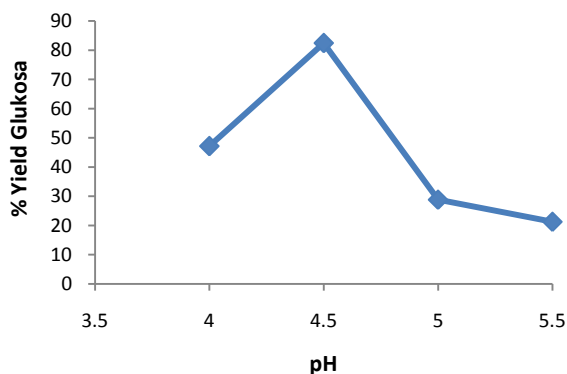


Gambar 2. Yield glukosa dengan konsentrasi enzim yang berbeda untuk *powder* biomassa yang tetap 5 g/L, pada suhu 45°C dan pH 4,5

Penelitian ini menghasilkan *yield* glukosa 82,44%, lebih tinggi dibanding penelitian yang dilakukan oleh (Choi dkk., 2010) yang mempelajari pengaruh enzim amilase dari *B.licheniformis* dan glukamilase dari *aspergillus niger*, pada pH 4,5 dan suhu 55°C selama 30 menit dengan konversi glukosa yang diperoleh 0,57 g glukosa/g biomassa mikroalga. Dalam penelitian lain mikroalga dengan spesies *Chlorococum humicola* dihidrolisis menggunakan enzim dari *Trichoderma reesei*, menghasilkan *yield* glukosanya 64,2% (w/w) pada suhu 40°C, pH 4,8 dan konsentrasi mikroalga 10 g/L (Harun dkk., 2011).

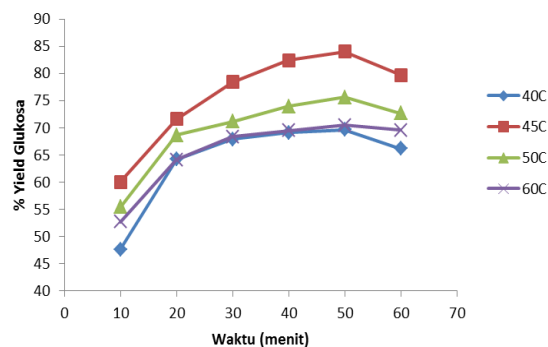
Pengaruh pH dan Temperatur Cell Disruption Secara Enzimatik

Variasi pH yang dilakukan pada *cell disruption* enzimatik mikroalga spesies *Tetraselmis chuii* adalah 4,0-5,5 dan hasilnya disajikan pada Gambar 3. pH optimum yang didapatkan dari penelitian ini adalah kisaran 4,0-4,5, dimana *yield* glukosa yang tertinggi didapatkan pada pH 4,5. Pada pH 5,0-5,5 *yield* glukosa yang didapatkan mengalami penurunan, hal ini terjadi karena enzim selulase 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 dkk., 2011; Shuler dan Kargi, 1991).



Gambar 3. Pengaruh pH pada *cell disruption* enzimatik mikroalga spesies *Tetraselmis chuii*

Pada penelitian ini juga diamati pengaruh suhu terhadap *yield* glukosa yang dihasilkan dengan konsentrasi enzim 30% (w/w) selama 60 menit seperti yang ditampilkan pada Gambar 4. Suhu *cell disruption* yang optimum adalah 45°C dengan *yield* glukosa 82,44%, 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 mula-mula 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 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 30-50°C (Harun dkk., 2011; Shuler dan Kargi, 1991).



Gambar 4. Yield glukosa dengan suhu yang berbeda untuk *powder* biomassa yang tetap 5 g/L, pada konsentrasi enzim 30% dan pH 4,5

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *cell disruption* dengan menggunakan enzim selulase berhasil dilakukan, hal ini dibuktikan dengan rusaknya plasma sel dan sel-sel mikroalga. Proses *cell disruption* mikroalga sekaligus mengkonversi selulosa menjadi glukosa sederhana dalam memproduksi bioetanol. *Yield* glukosa tertinggi adalah 82,44% (w/w) yang diperoleh pada konsentrasi enzim 30% (w/w), suhu 45°C, dan pH 4,5 pada waktu 40 menit dengan jumlah mikroalga 0,5 g/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Balat, M., Balat, H., and Oz, C., (2008), Progress in bioethanol processing, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 34, pp. 551-573.
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., and Chang, J.S., (2011), Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresour. Technol.* 102, pp. 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., (2013), Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engineering Journal*, 78, pp. 1-10.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., and Sim, S.J., (2010), Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *Bioresour. Technol.*, 101, pp. 5330-5336.
- Chu, F.L.E., Dupuy, J.L., and Webb, K.L., (1982), Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*, *Aquaculture*, 29, pp. 241-252.
- Datta, R., (1981), Acidogenic fermentation of lignocellulose-acid yield and conversion of components, *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 23 (9), pp. 2167-2170.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., and Willats, W.G.T., (2012), The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity, *Front. Plant Sci.*, 3, p. 82.
- Harun, R., Danquah, M.K., and Forde, G.M., (2010), Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, pp. 199-203.
- Harun, R., Michael, K., and Danquah, (2011), Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production, *Chemical Engineering Journal*, 168, pp.1079-1084.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Lee, D.J., and Chang, J.S., (2011), Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review, *Biotechnol. Adv.*, 29, pp. 189-198.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., and Chang, J.S., (2013), Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresource Technology*, 135, pp. 191-198.
- John, R.P., Anisha, G.S., and Nampoothiri, M.K., (2011), Ashok Pandey Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology*, 102, pp. 186-193
- Lee, O.K., Oh, Y.K., and Lee, E.Y., (2015), Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1, *Bioresource Technology*, 196, pp. 22-27.
- Lee, O.K., Seong, D.H., Lee, C.G., and Lee, E.Y., (2015), Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 29, pp. 24-31.
- Libessart, N., Maddelein, M.L., Koornhuyse, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., D'Hulst, C., and Ball, S., (1995), Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*, *Plant Cell*, 7, pp. 1117-1127.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, and Pretorius W.H., (2002), Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66 (3), pp. 506-577.
- Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schluter, A., and Kruse, O., (2010), Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *J. Biotechnol.*, 150, pp. 51-56.
- Nigam, P.S. and Singh, A., (2010), Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog. Energy Combust. Sci.*, doi:10.1016/j.pecs. 01, p. 003.
- Rabelo, S.C, Filho, R.M, and Costa, A.C., (2009), Lime pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production, *Appl Biochem Biotechnol*, 153, pp.139-50.
- Shuler, M.L. and Kargi, F., (1991), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Prentice-Hall College Div., pp 75-78.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. (1997), *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Yogyakarta: Liberty.