



## APLIKASI ENZIM DI INDUSTRI PULP DAN KERTAS: I. BIDANG PULP

Krisna Septiningrum\*, Ikhwan Pramuaji

Balai Besar Pulp dan Kertas

Jl. Raya Dayeuhkolot No. 132, Bandung

Diterima : 28 Februari 2017, Revisi akhir : 4 Agustus 2017, Disetujui terbit : 14 Agustus 2017

### *ENZYME APPLICATION IN PULP AND PAPER INDUSTRY: I. PULP SECTION*

#### **ABSTRACT**

*This review introduce about biotechnological application of enzyme in pulp and paper industry. These enzymes can be applied as biological agents in biopulping, biobleaching including Hexenuronic acid (HexA) removal. Degrading enzyme from white rot fungi, xylanase, laccase, lipase and  $\alpha$ -glucuronidase are the the most applicable enzyme in the process. Nowadays, enzyme application is still under laboratory scale, only a few is applied further until industrial scale. There are some limitations for further application related with technical aspects such as effectivity of the enzyme during its application comparing with chemical compounds, enzyme availability in the market, enzyme characteristic that appropriate with the process in pulp mill and economical aspect. In the other hand, these technologies also provide some advantages such as reduce energy consumption, reduce or substitute chemicals and more environmental friendly.*

*Keywords: biopulping, biobleaching, HexA removal, enzyme, pulp industry*

#### **ABSTRAK**

Kajian ini berisi mengenai aplikasi bioteknologi terutama enzim di industri pulp dan kertas. Enzim ini dapat diaplikasikan pada proses *pulping*, *biobleaching* termasuk penghilangan *Hexenuronic acid* (HexA). Enzim dari jamur pelapuk putih, xilanase, lakase, lipase dan  *$\alpha$ -glucuronidase* merupakan enzim yang penting untuk diaplikasikan pada proses-proses tersebut. Aplikasi enzim saat ini masih dalam skala laboratorium, hanya beberapa diterapkan lebih lanjut sampai skala industri. Beberapa keterbatasan untuk aplikasi lebih lanjut terkait dengan aspek teknis adalah efektivitas enzim yang lebih rendah jika dibandingkan dengan bahan kimia, keterbatasan produk enzim yang ada di pasar khususnya karakteristik enzim yang sesuai untuk industri pulp, dan keterbatasan dari aspek ekonomi. Namun di satu sisi, teknologi ini juga diketahui memiliki beberapa kelebihan seperti dapat mengurangi penggunaan energi, mengurangi atau substitusi bahan kimia, dan lebih ramah lingkungan.

Kata kunci: *biopulping*, *biobleaching*, penghilangan HexA, enzim, industri pulp

#### **PENDAHULUAN**

Untuk mendukung perkembangan industri pulp dan kertas menuju industri hijau seperti diamanatkan di dalam UU No. 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian maka industri pulp perlu

menerapkan teknologi proses yang ramah lingkungan. Industri pulp dan kertas diharapkan mengutamakan upaya efisiensi dan efektivitas penggunaan sumber daya di dalam proses produksinya agar selaras dengan kelestarian fungsi lingkungan hidup. Teknologi ramah lingkungan

yaitu teknologi yang hemat dalam penggunaan bahan baku, bahan penolong, energi dan air dalam proses produksi serta meminimalkan limbah, termasuk optimalisasi diversifikasi energi. Salah satu teknologi yang dikembangkan adalah aplikasi bioteknologi menggunakan enzim di industri pulp dan kertas. Enzim dapat diaplikasikan dalam beberapa proses seperti terlihat pada Gambar 1. Penggunaan enzim ini dapat menyediakan metode yang sederhana, *cost effective* dan ramah lingkungan untuk meningkatkan kualitas pulp dan kertas, penghilangan limbah serta menurunkan penggunaan proses tradisional di industri pulp dan kertas (Virk, Sharma and Capalash, 2011). Namun aplikasi enzim masih memiliki kendala yang cukup besar terutama dari sisi teknis dan ekonomis (Bajpai, 1999). Beberapa kendala tersebut adalah efektivitas enzim yang lebih rendah jika dibandingkan dengan bahan kimia, keterbatasan produk enzim yang ada di pasaran khususnya karakteristik enzim yang sesuai untuk industri pulp.

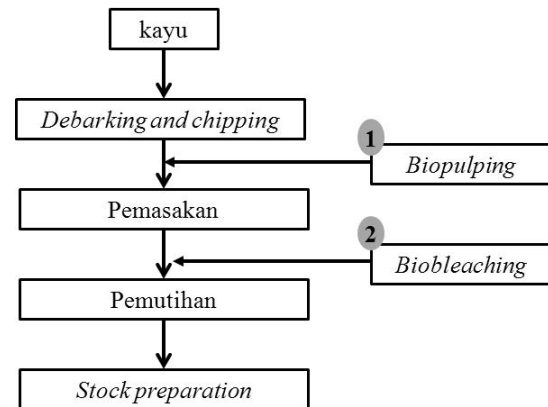
Kajian ini berisi informasi perkembangan teknologi terkini dari aplikasi enzim di industri pulp dan kertas. Informasi perkembangan teknologi ini penting untuk disebarluaskan mengingat industri pulp dan kertas memainkan peran penting di sektor ekonomi karena terus mengalami perkembangan yang cukup signifikan di Indonesia. Kumpulan informasi tersebut diperoleh dari jurnal, prosiding nasional dan internasional serta buku acuan yang terkait dengan aplikasi enzim. Kajian ini berupa perkembangan informasi mengenai aplikasi enzim pada proses pembuatan pulp yaitu:

1. *Biopulping* menggunakan jamur pelapuk putih dan lakase,
2. *Biobleaching* menggunakan xilanase, lakase, lipase dan  $\alpha$ -glucuronidase. Enzim ini diketahui dapat digunakan untuk proses delignifikasi pulp dan menurunkan kandungan HexA

## APLIKASI ENZIM PADA PROSES PEMBUATAN PULP

### A. *Biopulping* menggunakan Jamur Pelapuk Putih dan Lakase

Kayu dapat diubah menjadi produk pulp dengan menggunakan beberapa metode seperti delignifikasi secara kimia, pemisahan serat secara mekanis serta gabungan perlakuan kimia



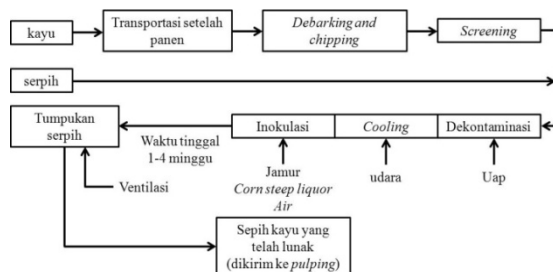
Gambar 1. Aplikasi Enzim di Industri Pulp

dan mekanis serta secara biologi (*biopulping*). Proses biologi menggunakan jamur pelapuk putih ini dikembangkan sejak tahun 1986. *Biopulping* didefinisikan sebagai proses perlakuan kayu atau sumber lignoselulosa lainnya menggunakan enzim yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih untuk mereduksi penggunaan bahan kimia yang digunakan untuk *pulping* (Husaini *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012). Jamur pelapuk putih banyak digunakan pada proses ini karena dapat mendegradasi seluruh komponen kayu sejak jamur ini mampu menghasilkan enzim pendegradasi lignin, selulosa dan hemiselulosa pada waktu yang bersamaan (Eggert *et al.*, 1996; Husaini *et al.*, 2011). Pengaruh utama perlakuan jamur pelapuk putih dan enzimatis terhadap serpih kayu adalah kayu menjadi lebih berpori dan lebih lunak sehingga serpih kayu menjadi lebih mudah untuk dipisahkan seratnya saat proses *pulping* dan secara spesifik pada proses *refining* (Singh *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2012). Hasil mikroskop elektron menunjukkan jamur dapat merenggangkan ikatan antar serat sehingga lebih mudah di-*refining* (Yang *et al.*, 2007). Selain itu penggunaan jamur dapat mengurangi penggunaan bahan kimia, mengurangi waktu pemasakan pada *pulping* kimiawi, menurunkan energi pada proses *refining* sebesar 20-30% (Scott *et al.*, 1998; Mohiuddin, 2004; Yang *et al.*, 2007; Ferraz *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Yadav, R., Chaudhry, S., Dhiman, 2010; Koshy and Nambisan, 2011), memodifikasi serat secara spesifik dan meningkatkan sifat fisik lembaran pulp seperti indeks tarik dan indeks retak (Scott *et al.*, 1998; Ferraz *et al.*, 2008; Yadav, R., Chaudhry, S., Dhiman, 2010), menurunkan konsumsi bahan kimia (Mohiuddin, 2004; Yadav, R., Chaudhry, S., Dhiman, 2010; Torres *et al.*, 2012).

Meningkatnya sifat fisik lembaran ini dapat terjadi karena jamur mampu meningkatkan fibrilasi eksternal dan internal serat (Yang et al., 2007). Reduksi bahan kimia ini akan menurunkan beban pencemar terhadap lingkungan (Singh et al., 2010) dan dapat meminimalkan kandungan bahan organik teroksidasi pada efluen proses pemutihan pulp. Efisiensi penggunaan jamur pada proses *biopulping* tergantung dari beberapa faktor seperti jenis jamur yang digunakan dan

Tabel 1. Keuntungan dan Kerugian *Biopulping* menggunakan Jamur Pelapuk Putih (Scott et al., 1998; Yadav, R., Chaudhry, S., Dhiman, 2010).

Keuntungan	Kerugian
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dapat digunakan untuk <i>hardwood</i> dan <i>softwood</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kecepatan reaksi rendah dan kompleksitas kontrol operasi</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dapat menurunkan waktu penggilingan (<i>refining</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Jamur yang digunakan dapat menyebabkan alergi pada pekerja di industri pulp dan kertas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Meningkatkan penghematan energi sejumlah 30% pada <i>pulping</i> mekanis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menyebabkan pigmentasi sehingga kecerahan pulp menurun</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Meningkatkan sifat fisik serat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Waktu tinggal yang cukup lama</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduksi bahan kimia <i>pulping</i> kimiawi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Serpih kayu menjadi coklat sehingga <i>brightness</i> menurun</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduksi kandungan <i>pitch</i></li> </ul>	



Gambar 2. Aplikasi Penambahan Jamur pada Proses *Biopulping* (diadaptasi dari Scott et al., 1998)

waktu inkubasi. Keuntungan dan kerugian proses *biopulping* menggunakan jamur pelapuk putih dapat dilihat pada Tabel 1. Konsep dari aplikasi jamur pada proses *biopulping* dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mohiuddin (2004) menunjukkan bahwa *Fomes lignosus* dan *Ceriporiopsis subvermispora* layak untuk digunakan pada proses *biopulping* menggunakan proses Soda-AQ dan proses Kraft. Jamur yang digunakan dapat menurunkan bilangan kappa (KN) sekitar 20% untuk kedua proses *pulping* yang digunakan. Target KN yang diinginkan (KN 20) juga dapat diperoleh dengan menurunkan alkali *charge* sebesar 9%, selain itu penggunaan jamur juga dapat meningkatkan jumlah siklus pemasakan jika dibandingkan dengan proses sebelumnya dan dapat meningkatkan sifat fisik kertas (indeks retak, tarik dan sobek) secara signifikan (20-40%) (Mohiuddin, 2004). Hasil serupa juga diperoleh oleh Yadav et al. (2010) yaitu perlakuan awal serpih kayu eukaliptus dan poplar menggunakan *C. subvermispora* 1-14087-55-3 dapat meningkatkan kekuatan fisik pulp coklat seperti kekuatan retak dan sobek (Yadav et al., 2010). Ketika *F. lignosus* digunakan pada simulasi proses perlakuan awal yute hijau, energi yang digunakan dapat dihemat sejumlah 10-20% pada tingkatan kekuatan pulp atau derajat penggilingan yang sama, selain itu kecerahan pulp meningkat sejumlah 1-3% ISO. Ketika jenis jamur lain yaitu *Phanerochaeta chrysosporium* digunakan untuk proses *biopulping*, kekuatan pulp yang diperoleh lebih baik jika dibandingkan dengan pulp yang diberi perlakuan menggunakan *F. lignosus* pada derajat giling yang sama.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Yadav et al. (2010) menunjukkan perlakuan awal serpih kayu eukaliptus dan poplar menggunakan *C. subvermispora* 1-14087-55-3 dapat menurunkan kandungan lignin, akibatnya kandungan hemiselulosa dan selulosa meningkat. Ketika serpih kayu dimasak, *pulp yield* akan menurun karena terjadi penguraian lignin dan karbohidrat. Ketika dilakukan pulp *beating*, terjadi reduksi *beating* sebesar 21,6% jika dibandingkan dengan kontrol. Hasil ini menunjukkan perlakuan awal menggunakan jamur pelapuk putih lebih ekonomis jika dikaitkan dengan konsumsi energi. Ketika pulp hasil perlakuan ini diputihkan, konsumsi senyawa berbasis dasar klorin yang digunakan menurun untuk mendapatkan *brightness* yang sama dengan kontrol. Efluen hasil

pemutihan menggunakan sekuens CDEOPD<sub>1</sub>D<sub>2</sub> menunjukkan bahwa beban pencemar pada air limbah menurun ditandai dengan menurunnya kandungan COD, BOD, AOX dan warna (Yadav *et al.*, 2010).

Waktu inkubasi yang digunakan memiliki pengaruh yang besar terhadap derajat giling dan kekuatan pulp, hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan waktu inkubasi 12-14 hari mempunyai pengaruh besar terhadap kualitas pulp dibandingkan waktu inkubasi 10 hari. Namun *pulp yield* menurun sejumlah 12,3% karena degradasi lignin dan selulosa oleh jamur. Ketika jamur digunakan untuk proses simulasi APMP, energi yang digunakan pada proses tereduksi sekitar 5% lebih tinggi, selain itu sifat kertas yang diperoleh lebih baik jika dibandingkan dengan proses RMP (Mohiuddin, 2004).

Lakase mampu mendepolimerisasi lignin dan delignifikasi pulp kayu dan serat kraft pulp pada proses biopulping (Nigam, 2014). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Kaur dan Nigam (2014) menunjukkan bahwa lakase yang diperoleh dari hasil isolasi (SL4), dapat meningkatkan kecerahan pulp sejumlah 1,8 U dan dapat menghemat penggunaan ClO<sub>2</sub> sejumlah 25% jika dibandingkan dengan kontrol.

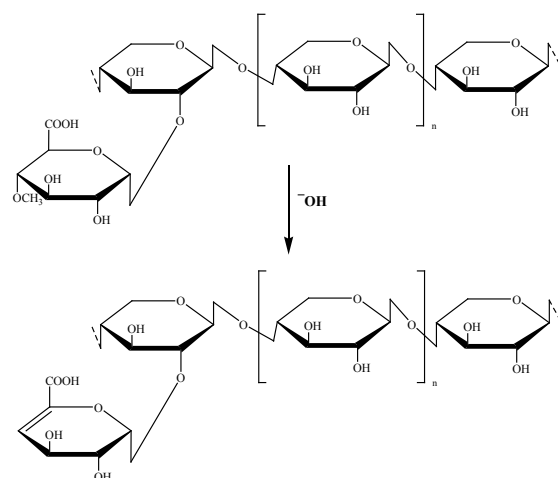
### **B. Biobleaching**

Pada proses produksi kertas, *pulping* adalah suatu tahapan dimana serat selulosa dipisahkan dari lignin. Lignin yang tersisa dari proses tersebut berikatan secara kovalen dengan karbohidrat sehingga membentuk senyawa baru yang merupakan penyebab utama pulp menjadi berwarna kuning atau coklat gelap. Kraft pulp yang berwarna tersebut harus diputihkan sebelum digunakan sebagai bahan baku produksi kertas. Proses penghilangan lignin dari pulp disebut dengan *bleaching*. Proses ini penting karena alasan estetika dan meningkatkan sifat kertas yang dihasilkan. Saat ini sebagian besar proses *bleaching* masih menggunakan bahan kimia berdasar klorin seperti klorin dan klorin dioksida (Bajpai, 1999; Virk, Sharma and Capalash, 2011). Proses ini efektif untuk menghilangkan lignin yang tersisa pada pulp (delignifikasi), namun produk samping yang terbentuk yaitu senyawa organik teroksidasi berpengaruh buruk terhadap lingkungan karena bersifat toksik, persisten dan bioakumulatif (Bajpai, 1999; Cheng *et al.*, 2013). Beberapa

teknologi lain seperti delignifikasi oksigen, *extended cooking*, dan substitusi bahan kimia berdasar klorin dengan hidrogen peroksida, ozon dan *mono-peroxysulphate* (MPS) telah digunakan dalam proses *bleaching*, namun teknologi ini memerlukan tambahan investasi dan modifikasi proses.

*Hexenuronic acid* (HexA) adalah senyawa baru yang terbentuk pada proses Kraft pulping, asam 4-*O*-metil-glukuronat, senyawa asam dominan dari kayu jarum (*softwood*) dan kayu daun (*hardwood*), dikonversi menjadi asam hexenuronat karena proses β-eliminasi dari kelompok 4-*O*-metoksil, setelah kehilangan atom hidrogen yang terikat pada posisi residu kelima asam (Teleman *et al.*, 1996). Proses konversi dan struktur kimia dari HexA dapat dilihat pada Gambar 3. Senyawa ini dapat terbentuk pada kondisi alkali dan suhu tinggi selama proses pulping. Penelitian lanjutan mengenai keberadaan senyawa ini dikonfirmasi lebih lanjut menggunakan *Nuclear magnetic resonance* (NMR) *spectroscopy* dan spektroskopi massa yang dilakukan oleh Teleman *et al.* (1996).

Li dan Gellersted (1996) menyatakan bahwa 3 - 6 KN unit pulp kayu daun (*hardwood*) yang diputihkan dan 1 - 3 KN unit pulp kayu jarum (*softwood*) yang diputihkan adalah HexA. Keberadaan HexA memberikan pengaruh terhadap kualitas pulp yang dihasilkan dan proses pemutihan. HexA diketahui dapat meningkatkan konsumsi bahan pemutih elektrofilik seperti klorin dioksida, ozon, peroksida dan asam perasetat pada tahapan pemutihan (Vuorinen *et al.*, 1999)



Gambar 3. Konversi 4-*O*-metil-D-Glukuronoxilan menjadi Hexenuronoxilan (Teleman *et al.*, 1996)

dan menurunkan kestabilan kecerahan (Kuwabara et al., 2012). Selain itu HexA berikatan dengan ion logam (Vuorinen et al., 1999) dan berkontribusi terhadap pembentukan asam oksalat dan menimbulkan kerak pada mesin kertas karena pembentukan kalsium oksalat (Elsander, A., Ek, M., and Gellerstedt, 2000).

Beberapa teknologi sudah digunakan untuk meminimalkan kandungan HexA di dalam pulp baik secara kimiawi dan biologis. Beberapa teknologi kimiawi yang sudah digunakan adalah menyisipkan tahapan asam dan suhu tinggi di antara proses pemasakan dan pemutihan, menggunakan bahan kimia pemutih elektrofilik seperti bahan kimia berdasar klorin dan ozon (Vuorinen et al., 1999) dan asam perasetat (Tavast et al., 2011). Namun teknologi ini memiliki keterbatasan terkait dengan isu lingkungan seperti pembentukan senyawa klor-organik dan menurunnya kualitas pulp misalnya viskositas karena penggunaan ozon (Pouyet, Chirat and Lachenal, 2013)

Berdasarkan batasan tersebut, teknologi enzim (*biobleaching*) mulai diperkenalkan untuk proses *bleaching* karena teknologi ini sederhana dan efektif untuk menurunkan biaya penggunaan bahan kimia *bleaching* sehingga kandungan AOX pada efluen menurun (Fillat and Roncero, 2009b; Sharma et al., 2014; Dai et al., 2016). Selain itu proses ini juga tidak membutuhkan investasi yang terlalu besar (Dai et al., 2016).

Beberapa jenis enzim yang telah digunakan pada proses *biobleaching* adalah enzim hemiselulase (xilanase, EC 3.2.1.8), ligninolitik (lakase, EC 1.10.3.2), lipase (EC. 3.1.1.3) dan  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139).

## 1. Xilanase (EC 3.2.1.8)

### 1.1 Proses Delignifikasi Pulp

Proses delignifikasi menggunakan xilanase pertama kali dipopulerkan oleh Viikari et al. pada tahun 1994. Xilanase (EC 3.2.1.8) merupakan enzim hidrolitik yang digunakan untuk menghilangkan kompleks lignin karbohidrat (LCC) yang dihasilkan pada proses kraft dan berperan sebagai penghalang fisik pada proses pemutihan kimiawi. Karakteristik xilanase yang diperlukan pada proses *biobleaching* adalah bersifat stabil dan aktif pada suhu tinggi dan alkali (pH 9 - 12), bebas aktivitas (Singh, Pandey and Agrawal, 2013; Gangwar, Prakash and

Prakash, 2015), dan memiliki spesifisitas yang tinggi (Bajpai, 1999). Genus *Bacillus* diketahui dapat memproduksi xilanase bebas selulase dalam jumlah besar dengan karakteristik tersebut (Saurabh Sudha Dhiman, Jitender Sharma, 2008; Nagar et al., 2013). Penggunaan xilanase pada proses *pre-bleaching* akan mengubah struktur utama xilan sehingga proses ekstraksi lignin menjadi lebih mudah selama proses *bleaching*, akibatnya bahan kimia yang digunakan untuk proses *bleaching* dapat direduksi secara signifikan (Virket et al., 2011). Teknik ini disebut dengan *bleach boosting* (Shatalov and Pereira, 2009).

Perkembangan penggunaan xilanase untuk proses *biobleaching* sangat cepat karena beberapa kelebihan dari sisi teknis, ekonomi dan lingkungan, seperti:

1. Tingkat kecerahan pulp yang diinginkan dapat dicapai dengan menggunakan bahan kimia klorin atau klorin dioksida yang lebih sedikit. Xilanase dapat meningkatkan kecerahan pulp dengan mekanisme sebagai berikut:
  - a. Xilan yang mengendap pada permukaan lignin akan dihidrolisis oleh xilanase, sehingga meningkatkan aksesibilitas bahan kimia pemutihan ke dalam serat (Shatalov and Pereira, 2009; Valls et al., 2010; Aracri and Vidal, 2011; Cheng et al., 2013; Sharma et al., 2014).
  - b. Xilanase menghidrolisis LCC yang tersisa pada pulp, membuka struktur serat selulosa sehingga xilan akan terfragmentasi yang diikuti dengan ekstraksi fragmen-fragmen yang terbentuk sehingga lignin coklat dan LCC yang tersisa pada pulp tersebut lebih mudah diekstraksi pada tahapan pemutihan (Shatalov and Pereira, 2009; Gangwar, Prakash and Prakash, 2015; Fillat et al., 2017).

Hasil penelitian menunjukkan xilanase yang berasal dari *Bacillus pumilus* SV-85S menunjukkan tingkat kecerahan pulp campuran dari berbagai macam kayu dan non kayu seperti eukaliptus, bambu, dll meningkat sejumlah 2,7 poin jika dibandingkan dengan kontrol (Nagar et al., 2013). Peningkatan kecerahan pulp ini diperoleh setelah pulp diputihkan dengan urutan CDE<sub>1</sub>D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> (C: klorin; D: klorin dioksida; E: ekstraksi alkali (NaOH)). Hasil serupa diperoleh oleh penelitian Gangwar et al (2015), Optimase CX 72L dapat meningkatkan kecerahan

- pulp sebesar 0,9 – 2,1 U untuk pulp *Acacia mangium* dan sebesar 0,8 – 1,7 U untuk *Eucalyptus globules* (Gangwar, Prakash and Prakash, 2015). Kecerahan pulp yang berasal dari jerami gandum menunjukkan peningkatan sebesar 3,93% ketika ditambahkan xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010).
2. Penggunaan xilanase pada proses *biobleaching* dapat menurunkan konsumsi bahan kimia pemutihan sejumlah 15-20% (Saleem *et al.*, 2009; Nie *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2016) tanpa mengubah kondisi di pabrik. Bahan kimia klorin akan menurun lebih dari 30% sehingga senyawa organoklorin yang terbentuk pada efluen menurun sejumlah 15- 20% dapat dicapai sehingga biaya produksi berkurang (Thakur, Jain and Mathur, 2012; Valenzuela *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2016). Hasil penelitian menunjukkan xilanase dapat mereduksi bahan aktif klorin sejumlah 35-41% untuk kayu daun dan 10-20% untuk kayu jarum pada tahap klorinasi untuk skala laboratorium dan skala industri (Bajpai, 1999). Hasil penelitian menunjukkan aplikasi xilanase bebas selulase yang berasal dari *Bacillus circulans* pada kraft pulp dengan bahan baku berupa campuran antara *mix hardwood* (82-84%) dan bambu (16-18%) dapat menurunkan penggunaan konsumsi klorin aktif pada proses pemutihan tanpa disertai dengan penurunan kecerahan pulp (Torres *et al.*, 2012). Penelitian lain menunjukkan aplikasi penambahan xilanase yang berasal dari *B. pumilus* SV-85S dapat mereduksi konsumsi klorin sebesar 29,16%. Adanya penurunan konsumsi klorin menggunakan xilanase menunjukkan proses *biobleaching* lebih ekonomis dan lebih ramah lingkungan. Aplikasi xilanase skala industri telah dilakukan di Marathon, Pulp Inc, mill, dengan waktu tinggal 60 menit pada pH 6,5 - 7,0 pada tangki *brown stock*. Hasil aplikasi menunjukkan penggunaan bahan kimia klorin dapat diturunkan pada tahap Do, dengan penghematan sebesar 3,4% jika dibandingkan dengan kontrol (Tolan and Collins, 2004).
  3. Penggunaan xilanase dapat mensubstitusi penggunaan klorin dioksida sejumlah 5-7 kg/ton kraft pulp (Jiang, Bouchard and Berry, 2006; Thakur, Jain and Mathur, 2012; Nagar *et al.*, 2013).
  4. Menurunkan *post colour number* (PC) dan *yellowing* karena xilanase dapat menghilangkan gugus karboksilat, ion penukar pada pulp dan xilan yang berikatan dengan HexA (Thakur, Jain and Mathur, 2012; Sharma *et al.*, 2014; Gangwar, Prakash and Prakash, 2015).
  5. Penggunaan xilanase dapat dikombinasikan dengan urutan *bleaching* ECF (*Elemental Chlorine Free*) maupun TCF (*Totally Chlorine Free*) dan dapat meningkatkan kecepatan proses *bleaching* pada kedua proses tersebut (Han *et al.*, 2012; Thakur, Jain and Mathur, 2012) tanpa mengganggu proses yang sudah ada di industri (Thakur, Jain and Mathur, 2012; Valenzuela *et al.*, 2014).
  6. Xilanase dapat meningkatkan kekuatan fisik pulp, viskositas pulp, membuat pulp lebih mudah untuk di-*refining*. Namun hal ini sangat dipengaruhi dari karakteristik xilanase yang digunakan seperti spesifikasi substrat dari xilanase (Bajpai, 1999). Aplikasi xilanase yang berasal dari bakteri (terutama genus *Bacillus*) dan jamur diketahui dapat meningkatkan kualitas pulp seperti kekuatan tarik, kekuatan sobek, kekuatan retak, *tear factor*, *teariness*, panjang putus, *double fold number*, porositas dan viskositas jika dibandingkan dengan kontrol (Beg *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2012; Nagar *et al.*, 2013). Xilanase dari *Bacillus circulans* diketahui dapat meningkatkan kualitas pulp seperti faktor retak (9%), faktor sobek (4,6%), panjang putus (4,4%), *double fold number* (12,5%), porositas Gurley (4%) dan viskositas (11,8%) dapat meningkat secara signifikan (Torres *et al.*, 2012). Hal serupa juga diperoleh ketika aplikasi xilanase dari *Bacillus pumilus* SV-85S dapat meningkatkan kualitas kertas yang ditandai dengan meningkatnya beberapa parameter fisik lembaran pulp seperti kekuatan tarik, kekuatan sobek, kekuatan retak, *tear factor*, dan *teariness* jika dibandingkan dengan kontrol (Nagar *et al.*, 2013). Beg *et al.* (2001) menyatakan bahwa terjadi peningkatan kekuatan tarik dan retak sebesar > 63% dan 8% ketika pulp diberikan perlakuan xilanase yang diproduksi oleh *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg *et al.*, 2001). Hasil penelitian lain menunjukkan xilanase dari *Staphylococcus* sp. SG-13 dapat meningkatkan kekuatan tarik dan retak sejumlah 10 dan 17%.
  7. Menurunkan KN, dan jumlah noda pada lembaran (Tolan and Collins, 2004;

Septiningrum and Sugesty, 2013; Singh, Pandey and Agrawal, 2013; Gangwar, Prakash and Prakash, 2015). Hasil penelitian pengaruh xilanase terhadap KN menunjukkan hasil yang berbeda-beda seperti:

- a. Xilanase dapat menurunkan KN (2 - 10 U) dan meningkatkan kecerahan pulp sejumlah 2% ISO baik untuk pulp berbahan baku *hardwood* dan bagas karena adanya disosiasi LCC dari serat (Thakur, Jain and Mathur, 2012).
  - b. Nair *et al.* (2010) menyatakan kecerahan pulp yang diberi perlakuan xilanase dapat meningkat sebesar 5 - 7 poin jika dibandingkan dengan kontrol, namun tidak berpengaruh terhadap KN (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010).
8. Dari sisi lingkungan, aplikasi xilanase dapat menurunkan kandungan AOX (*Adsorbable Organic Halides*) (Dai *et al.*, 2016) sejumlah 21,4 – 26.6 % jika dibandingkan dengan kontrol (Nie *et al.*, 2015), COD (*Chemical Oxygen Demand*), BOD (*Biological Oxygen Demand*), dan meningkatkan rasio BOD dan COD pada efluen jika dibandingkan dengan kontrol, artinya efluen menjadi lebih mudah untuk didegradasi secara biologis pada pengolahan sekunder (Thakur, Jain and Mathur, 2012)

### **Aplikasi Xilanase pada Proses Delignifikasi Pulp**

Xilanase digunakan dalam bentuk larutan pada proses *pre-bleaching* pulp di *brown stock washer* yang bersifat alkali (pH 9-12) (Tolan and Collins, 2004). Pulp kemudian dipompa ke *high density tower*, dimana xilanase bekerja untuk menghidrolisis xilan. Aktivitas xilanase dihentikan ketika pulp bereaksi dengan bahan kimia pengoksidasi pada tanki *bleaching* pertama. Beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi xilanase pada proses *pre-bleaching* adalah: pH, suhu, dosis enzim yang digunakan, dispersi enzim, konsistensi (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010), waktu kontak enzim dengan pulp dan jenis pulp yang digunakan (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010).

Nair *et al.* (2010) menyatakan konsistensi pulp merupakan faktor penentu efektivitas dispersi enzim dan meningkatkan efisiensi kerja enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

konsistensi pulp 10% merupakan konsistensi terbaik untuk mendapatkan kecerahan pulp maksimal, pada konsistensi ini aktivitas xilanase terhadap serat pulp mencapai optimal, yang diikuti dengan pelepasan senyawa kromofor dan gula tereduksi. Selain itu juga dinyatakan bahwa lebih dari 70% gula tereduksi terlepas dari pulp dan diikuti dengan peningkatan pelepasan material UV (ultraviolet) dan *visible absorbance spectra* sebesar 20% jika waktu inkubasi enzim ditingkatkan dari 1 jam menjadi 5 jam. Selain itu juga dinyatakan bahwa jumlah gula tereduksi yang dilepaskan tergantung pada dosis xilanase yang digunakan. Hal ini berkorelasi dengan meningkatnya pelepasan kromofor dan material pengabsorpsi pada panjang gelombang 237 nm. Dosis xilanase yang digunakan mempengaruhi jumlah gula tereduksi yang dilepaskan dan material pengabsorpsi sehingga kedua parameter ini dapat digunakan untuk mengetahui efisiensi perlakuan enzim pada proses *bleaching*. Waktu tinggal enzim juga berperan untuk meningkatkan efisiensi kinerja enzim. Hasil penelitian menunjukkan penurunan elemental klorin dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meningkat seiring dengan meningkatnya dosis enzim yang digunakan (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010)

Aplikasi xilanase pada pulp non kayu juga diketahui dapat menurunkan konsumsi bahan kimia klorin yang digunakan. Nair *et al.* (2010) menyatakan klorin aktif yang digunakan pada proses *bleaching* menggunakan xilanase komersial dengan dosis 9,35 IU/g – 18,2 IU/g dapat menurun sejumlah 14,6% - 25,9%. Selain itu jumlah klorin aktif yang digunakan pada pulp bagas dapat diturunkan menjadi 18% ketika diberi perlakuan xilanase yang berasal dari *Thermomyces lanuginosus* SSBP. Penelitian lain menunjukkan bahwa total klorin yang digunakan pada proses *pre-bleaching* menurun sejumlah 28,3% ketika xilanase yang berasal dari *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 digunakan untuk memutihkan pulp dari jerami gandum (Nair, Shibdu and Shashidhar, 2010). Hasil serupa diperoleh ketika xilanase diaplikasikan pada pulp yute (*jute*, *Corchorus* sp.), penggunaan xilanase dapat menurunkan konsumsi bahan kimia klorin sejumlah 15%. Penurunan bahan kimia klorin menjadi lebih tinggi ketika ditambahkan proses alkali yaitu sebesar 30% dan menjadi 40-45% ketika ditambahkan perlakuan oksigen (Mohiuddin, 2004)

## 1.2 Aplikasi Xilanase untuk Penghilangan HexA

Xilanase saat ini banyak digunakan untuk proses *pre-bleaching*, namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa xilanase juga dapat digunakan untuk menurunkan kandungan HexA pada pulp, sebagai efek sekunder (Shatalov and Pereira, 2009; Aracri and Vidal, 2011; Cadena et al., 2011; Thakur, Jain and Mathur, 2012; Valenzuela et al., 2014; Gangwar, Prakash and Prakash, 2015). HexA dapat dihilangkan dari pulp dengan menggunakan xilanase dengan cara menghidrolisis xilan yang berikatan dengan HexA (Gangwar, Prakash and Prakash, 2015) sehingga memfasilitasi pelepasan lignin dari pulp (Henriksson and Teeri, 2009). Beberapa xilanase dari famili yang berbeda (GH (*Glycoside Hydrolase*) 5, 10, 11 dan 30) telah diteliti lebih lanjut untuk menghilangkan HexA (Gallardo et al., 2010a; Valls et al., 2010; Valenzuela et al., 2014). Setiap famili xilanase yang digunakan menunjukkan perilaku yang berbeda ketika diaplikasikan untuk menghilangkan HexA, perbedaan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: sumber alami polimer xilan, proses pemasakan yang digunakan, panjang polimer xilan, kandungan xilan pada serat, jenis dan aksesibilitas dari xilan serta keberadaan dan kandungan gugus samping xilan (Gallardo et al., 2010b; Valls et al., 2010; Valenzuela et al., 2014).

Hasil penelitian menunjukkan xilanase GH 11 merupakan xilanase yang paling efisien untuk meningkatkan delignifikasi, *pulp bleachability*, kecerahan dan menghilangkan HexA jika dibandingkan dengan xilanase GH10 dan GH5 (Gallardo et al., 2010b; Valls et al., 2010). Xilanase GH11 juga diketahui lebih baik digunakan untuk proses *pre-bleaching* untuk menurunkan konsumsi bahan kimia pemutihan jika dibandingkan dengan xilanase GH10 (Valls et al., 2010), namun tidak meningkatkan kualitas pulp yang diperoleh (Valenzuela et al., 2014). Jika hanya ditinjau dari aspek penghilangan HexA, GH10 menunjukkan hasil yang lebih baik jika dibandingkan GH11 (Valls et al., 2010) dan Xyn30D serta Xyn30Dcat (Valenzuela et al., 2014). Gallardo et al (2010) menyatakan jika xilanase GH11 dan GH5 digunakan secara bersama-sama, kecerahan pulp semakin meningkat karena ada efek sinergis dari kedua enzim tersebut. Selain itu xilanase GH5 juga mampu menurunkan kandungan HexA ketika digunakan untuk memutihkan pulp dari

*Eucalyptus globulus* namun dengan pengaruh yang lebih rendah jika dibandingkan dengan GH11 (Gallardo et al., 2010b).

Shatalov dan Pereira (2009) yang mengaplikasikan endo-1,4- $\beta$ -xilanase komersial kepada pulp belum putih yang berasal dari kayu (*E. globulus* L.) dan non kayu (*Arundo donax* L.) menunjukkan kecerahan pulp meningkat setelah penambahan xilanase jika dibandingkan dengan kontrol. Selain itu diketahui ada korelasi positif antara meningkatnya kecerahan pulp dengan penghilangan HexA. Ketika xilanase digunakan sebagai perlakuan awal pada pemutihan TCF, kecerahan pulp meningkat sebesar 3% ISO jika

Dibandingkan dengan kontrol, hal ini menunjukkan bahwa xilanase berperan sebagai *bleach boosting* yang disertai dengan meningkatkan penghilangan HexA dan lignin dari pulp (Shatalov and Pereira, 2009).

Penggunaan xilanase GH30 (*enzyme cocktail* dan enzim rekombinan GH10, Xyn30D, Xyn30Dcat dari GH 30, dan GH11) yang berasal dari *Paenibacillus barcinonensis* sebagai agen penghilangan HexA telah dilakukan oleh Valenzuela et al. (2014). Hasil menunjukkan xilanase GH30 sebagai domain katalitik tunggal lebih efektif digunakan untuk menghilangkan HexA jika dibandingkan dengan Xyn30Dcat, yang mengandung CBM-35 (*Carbohydrate-binding Module*). Keberadaan CBM menurunkan efisiensi pemutihan oleh xilanase, karena memiliki berat molekul tinggi sehingga tidak dapat berpenetrasi ke dalam lignin yang terjebak di serat pulp (Valenzuela et al., 2014).

## 2. Lakase (EC 1.10.3.2)

Lignin yang terlarut pada proses pemasakan menyebabkan terbentuknya residu berwarna coklat yang perlu dihilangkan pada produksi pulp putih. Teknologi *bleaching* ramah lingkungan seperti *Elemental Chlorine Free* (ECF) dan *Totally Chlorine Free* (TCF) saat ini sedang dikembangkan untuk menggantikan proses *bleaching* konvensional. TCF memiliki beberapa kelemahan seperti senyawa  $H_2O_2$  dan  $O_2$  yang digunakan memiliki tingkat delignifikasi yang rendah jika dibandingkan dengan klorin sehingga kurang efisien untuk mencapai *brightness* yang tinggi, meningkatkan endapan lipofilik (*pitch*) yang dapat mengganggu pada proses pembuatan kertas (Jurado et al., 2011; Virk, Sharma and Capalash, 2011) sehingga perlu dicarikan



teknologi ramah lingkungan lainnya. Salah satu teknologi alternatif yang dikembangkan adalah penggunaan enzim lignolitik seperti lakase dan peroksidase sebagai bahan pensubstitusi klorin (Jurado *et al.*, 2011).

Lignin memiliki struktur tiga dimensi hasil reaksi dari *p-hidroxicinnamyl alcohols*, *p-coumaryl*, *coniferyl*, dan *sinapsyl alcohols* dan bentuk-bentuk terasilasi mereka. Lignin dapat didegradasi menjadi bentuk fenoksi radikal berupa polimer yang heterogen dan rekalsitran. Proses degradasi ini disebut dengan proses dehidrogenasi yang diprakarsai oleh enzim oksidatif seperti peroksidase dan/ atau lakase (Jurado *et al.*, 2011). Jamur pelapuk putih diketahui mampu menghasilkan enzim oksidatif ekstraselular dan berperan penting dalam degradasi lignin (Virk, Sharma and Capalash, 2011). Peroksidase lignolitik terdiri dari tiga jenis enzim yaitu:

- a. lignin peroksidase (LIP, E.C.1.11.1.14), yang mampu mengoksidasi unit lignin non- fenolik secara langsung;
- b. mangan peroksidase (MNP, E.C.1.11.1.13), enzim ini mengoksidasi unit fenolik melalui oksidasi  $Mn^{2+}$  menjadi  $Mn^{3+}$ , dan
- c. peroksidase *versatile* (VP, E.C.1.11.1.16), yang berbagai sifat katalitik dengan LiP dan MNP.

Enzim oksidatif lainnya seperti lakase (E.C 1.10.3.1), diketahui mampu mengkatalisis oksidasi berbagai senyawa fenolik, seperti polifenol dan metoksi-tersubstitusi fenol, serta amina aromatik. Lakase adalah enzim tembaga biru yang memiliki rentang spesifikasi substrat luas yang berfungsi untuk mengkatalisis oksidasi fenol, anilin dan thiol aromatis yang disertai dengan reduksi empat elektron oksigen menjadi air (Woolridge, 2014). Lakase memiliki keuntungan jika dibandingkan dengan peroksidase lignolitik lainnya karena mereka menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron pada aktivitas katalitiknya sehingga lebih cocok untuk keperluan industri dan lingkungan (Moldes and Vidal, 2008; Jurado *et al.*, 2011). Keuntungan lainnya adalah lakase merupakan enzim pendegradasi lignin yang efektif dengan selektivitas tinggi serta memberikan tingkat kerusakan yang rendah pada selulosa (Pei *et al.*, 2016). Pemutihan pulp menggunakan bahan non klorin (lakase) dipatenkan pertama kali pada tahun 1994 untuk mendapatkan pulp yang lebih putih dengan kandungan lignin yang rendah.

## **Sistem Lakase Mediator (SML)**

Lakase dapat bekerja dengan baik untuk mengoksidase lignin non-fenolik dengan atau tanpa bantuan dari mediator alamiah maupun sintesis (Jurado *et al.*, 2011). Namun keberadaan mediator dapat meningkatkan rentang efektif substrat yang dapat didegradasi oleh lakase. Mediator atau *enhancers* ini berperan sebagai substrat intermediet untuk lakase, substrat tersebut akan teroksidasi dalam bentuk radikal yang akan berinteraksi lebih lanjut dengan substrat target (Moldes and Vidal, 2008). Hasil penelitian menunjukkan penggunaan lakase tanpa mediator dapat menyebabkan perubahan struktur secara minor dan depolimerisasi lignin. Keberadaan mediator pada reaksi akan meningkatkan oksidasi derivat lignin (Sharma *et al.*, 2014) seperti senyawa lignin non-fenolik dan beberapa ekstraktif lipofilik yang menghasilkan warna pada lignin.

## **Aplikasi Lakase untuk Delignifikasi Pulp**

Kombinasi antara lakase dengan mediator kimia yang disebut sistem mediator lakase (SML) pada proses *biobleaching* memberikan pengaruh positif jika dibandingkan dengan penggunaan xilanase saja pada proses delignifikasi pulp seperti pengurangan bilangan kappa, peningkatan kecerahan, modifikasi struktural dari sisa serat lignin, penghilangan ekstraktif seperti sterol dalam pulp, penurunan AOX, dan pengurangan kebutuhan klorin dioksida pada pemutihan sistem ECF (Valls, Vidal and Roncero, 2010; Aracri and Vidal, 2011; Cadena *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Quintana *et al.*, 2015; Pei *et al.*, 2016) Fillat and Roncero., 2009-2).

Penggunaan lakase dengan mediator sintesis dan alamiah akan memberikan pengaruh yang berbeda pada proses pemutihan pulp. Mediator sintesis dapat menurunkan KN dan meningkatkan kecerahan pulp secara cepat setelah tahap lakase (L) namun efektivitasnya menurun pada tahap ekstraksi alkali (E) (Virk, Sharma and Capalash, 2011). Efek yang berbeda ditunjukkan ketika mediator alamiah digunakan pada tahap L, KN akan meningkat sedangkan kecerahan pulp akan menurun, hal ini disebabkan oleh kondensasi parsial dari mediator alamiah pada pulp melalui reaksi *coupling-radical* (Kunamneni *et al.*, 2008). Pada tahap ekstraksi, mediator yang terkondensasi terbuang akibatnya KN menurun

diikuti dengan meningkatnya kecerahan pulp. Hal yang berbeda juga ditunjukkan dari parameter viskositas, viskositas pulp akan menurun jika mediator sintetis seperti HBT digunakan pada dosis tinggi (Virk, Sharma and Capalash, 2011) karena mendegradasi selulosa, merubah gugus fungsional atau keduanya (Fillat and Roncero, 2009b), hal sebaliknya diperoleh ketika mediator alamiah digunakan. Perbedaan efek dari kedua mediator ini disebabkan oleh mekanisme reaksi yang berbeda dari kedua mediator. Mediator sintetis menyebabkan degradasi dan/atau oksidasi karbohidrat pada rantai selulosa (Virk, Sharma and Capalash, 2011). Sedangkan mediator alami mengoksidasi karbohidrat pada rantai selulosa menjadi kelompok karbonil selama tahap L, sehingga pulp rentan terhadap degradasi oleh yang kuat medium alkali yang digunakan dalam tahap pemutihan (Fardim and Durán, 2004).

#### **Aplikasi Lakase untuk Menurunkan HexA**

Salah satu aplikasi terbaru dari lakase adalah dapat menurunkan kandungan HexA pada pulp. Penelitian yang dilakukan oleh (Valls, Vidal and Roncero, 2010) menunjukkan kandungan HexA pada pulp kraft eukaliptus menurun oleh sistem lakase-HBT (*1-hydroxybenzotriazole*) dan penurunan tersebut didorong oleh perlakuan awal menggunakan xilanase. Efektifitas lakase untuk menghilangkan HexA dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sumber lakase, kondisi aplikasi, dan jenis mediator yang digunakan (Aracri and Vidal, 2011; Cadena *et al.*, 2011).

Valls *et al* (2010) meneliti evolusi HexA dan lignin selama perlakuan menggunakan *laccase-1-hydroxybenzotriazole* (1-HBT) (tahap L) dengan perlakuan awal xilanase dan tanpa perlakuan awal xilanase (tahap X). Hasil penelitian menunjukkan kandungan HexA pada pulp menurun ketika dilakukan aplikasi lakase-HBT, efek terbesar diperoleh pada dosis lakase-HBT tertinggi. Lakase-HBT diketahui dapat menghancurkan HexA dengan cara mengoksidasi senyawa tersebut. Mekanisme serupa juga teramati ketika bahan kimia pemutih elektrofilik seperti klorin dioksida, ozon dan perasid digunakan untuk menghilangkan HexA. Namun di sisi lainnya penggunaan lakase-HBT pada dosis tinggi dapat menurunkan viskositas pulp. Sistem-lakase-HBT akan mendegradasi selulosa dengan cara membentuk gugus karbonil yang dapat memecah selulosa dengan  $\beta$ -eliminasi pada

kondisi alkali. Ketika pulp diberikan perlakuan awal menggunakan xilanase, KN akan meningkat secara signifikan sekitar 11% lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan menggunakan lipase saja (Valls, Vidal and Roncero, 2010). Hasil serupa juga diperoleh oleh Cadena *et al.* (2011). Aplikasi dengan LG dan *p-coumaric acid* diketahui dapat meningkatkan KN pada pulp coklat dan pulp putih. Meningkatnya KN pada pulp terjadi karena struktur kimia dari kedua mediator yang memiliki gugus aromatik/fenolik, sehingga dapat dioksidasi oleh asam permanganat yang digunakan pada pengukuran KN akibatnya berkontribusi terhadap nilai KN. Pengaruh lainnya adalah pulp menjadi lebih cerah dan penghilangan HexA menjadi lebih efisien (Cadena *et al.*, 2011).

Penggunaan lakase-*Violuric acid* (VA) (tahap L-VA) dan xilanase (tahap X) untuk menghilangkan lignin dan HexA juga telah dilakukan menggunakan pulp sisal (*Agave sisalana*) (Aracri and Vidal, 2011). Hasil penelitian menunjukkan pengurangan KN pada tahap L lebih tinggi jika pulp telah diberi pra-perlakuan menggunakan xilanase (tahap X). Hal ini terjadi karena tahap X dapat meningkatkan aksesibilitas sistem lakase-*Violuric acid* (VA) ke dalam serat pulp, sehingga memfasilitasi diperbaiki penghilangan lignin dan HexA yang akan berkontribusi terhadap nilai KN, hal ini sesuai dengan peran xilanase sebagai *bleach boosting agent*. Selain itu pra-perlakuan xilanase menunjukkan efisiensi tinggi untuk meningkatkan kecerahan pulp pada tahap L. Hasil penelitian menunjukkan aplikasi L-VA juga diketahui dapat menurunkan viskositas pulp, karena pulp menjadi lebih rentan terhadap degradasi oleh media alkali kuat yang digunakan dalam tahap pemutihan. Kandungan HexA dapat dihilangkan sejumlah 27% jika dibandingkan dengan kontrol, ketika diberikan perlakuan awal xilanase. Penelitian lain yang dilakukan oleh Cadena *et al.* (2011) menunjukkan bahwa penggunaan lakase yang berasal dari *Trametes villosa* dan *lauryll gallate* (LG) memberikan efisiensi penghilangan HexA pada serat lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan asam (tahap A) dan klorin dioksida panas pada tahap pemutihan pulp. Aplikasi ini dilakukan pada pulp rami yang diperoleh pada proses soda. Penurunan HexA pada serat meningkat ketika mediator digunakan bersama-sama dengan lakase, karena mediator dalam bentuk teroksidasi

dapat menembus lebih dalam ke dinding serat dan mendegradasi HexA yang terdapat pada bagian tersebut (Cadena *et al.*, 2011).

Hambatan terbesar untuk aplikasi SML pada skala industri adalah utama potensi toksisitas dari mediator sintetis, mediator *cost* (Thakur, Jain and Mathur, 2012; Woolridge, 2014; Fillat *et al.*, 2017) dan terbentuknya radikal hidroksil yang dapat menyebabkan oksidasi selulosa sehingga derajat polimerisasi selulosa menurun yang ditandai dengan menurunnya viskositas pulp (Valls, Vidal and Roncero, 2010; Aracri and Vidal, 2011; Woolridge, 2014). Selain itu juga ditandai dengan meningkatnya kandungan *Chemical Oxygen Demand* (COD) dan warna air limbah yang dikeluarkan setelah aplikasi.

### **Kelemahan Penggunaan Enzim pada Proses Bio-bleaching**

Kelemahan pertama dari aplikasi enzim adalah meningkatnya kandungan COD pada air limbah yang dikeluarkan (Fillat and Roncero, 2009a). Peningkatan COD pada air limbah yang dihasilkan pada dasarnya menunjukkan efisiensi yang baik dari kinerja enzim untuk mendegradasi karbohidrat dan penghilangan lignin. Warna air limbah setelah aplikasi enzim tersebut meningkat secara signifikan (Fillat and Roncero, 2009a) jika dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan warna air limbah terjadi karena meningkatnya senyawa kromoforik yang dihasilkan dari oksidator dan/atau degradasi lignin dan mediator. Selain itu, peningkatan warna dan COD air limbah yang dikeluarkan tergantung dari konsentrasi lignin, hasil produk degradasi enzim, enzim, SML, dan karbohidrat dari selulosa (Fillat and Roncero, 2009b).

Kelemahan kedua adalah meningkatnya toksisitas air limbah yang dihasilkan, namun hal ini sangat dipengaruhi oleh jenis mediator yang digunakan. Tingkat toksisitas air limbah pada perlakuan lakase-SLD (*synapyl aldehyde*) menunjukkan nilai enam kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan lakase-VA. Meningkatnya toksisitas ini terjadi karena adanya proses oksidasi pulp pada aplikasi lakase-VA dan oksidasi mediator oleh lakase pada aplikasi lakase-SLD (Aracri and Vidal, 2011).

Beberapa isu terkait dengan aplikasi lakase-mediator sintetis terkait dengan aspek teknis dan ekonomis perlu dipertimbangkan sebelum dilakukan implementasi skala industri. Meskipun

biaya pengadaan mediator sintetis seperti HBT masih ekonomis jika dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia tambahan lainnya pada industri pulp, namun masih diperlukan beberapa upaya untuk mendapatkan mediator yang lebih murah dan ramah lingkungan.

Aplikasi lakase untuk industri pulp dan kertas masih terbatas karena lakase membutuhkan mediator untuk mendegradasi lignin yang akan meningkatkan biaya produksi dan bersifat toksik sehingga kurang ramah lingkungan (Jurado *et al.*, 2011). Namun seiring dengan ditemukannya mediator alami seperti *3-hydroxyanthranilic acid* dari *Pycnoporus cinnabarius*, yang diketahui dapat meningkatkan proses delignifikasi (Eggert *et al.*, 1996), *syringaldehyde* (SA) dan asetosiringon (AS) yang ketersediaannya cukup tinggi dan lebih ramah lingkungan maka aplikasi lakase di industri pulp semakin meningkat. Ketersediaan mediator ini cukup tinggi karena dapat diperoleh dari lindi hitam yang berasal dari pemasakan eukaliptus dengan proses kraft (Camarero *et al.*, 2007; Cañas and Camarero, 2010). Mediator alam ini menawarkan beberapa keuntungan seperti lebih efektif dari sisi biaya, kurang toksik dibandingkan mediator sintetis serta penggunaan enzim yang dapat dipakai ulang (Virik, Sharma and Capalash, 2011).

### **3. Lipase (EC. 3.1.1.3)**

Lipase komersial (Amano, lipaseA) telah diaplikasikan untuk proses pra-perlakuan pulp kayu daun dan kayu jarum (Nguyen *et al.*, 2008). LipaseA mengandung aktivitas *feruloyl esterase* dan beberapa enzim tambahan lainnya. Kandungan enzim pada lipase ini diduga berasosiasi dengan efek langsung proses pemutihan terhadap menurunnya KN dan kandungan HexA pada pulp yang digunakan. LipaseA dapat menurunkan kandungan HexA antara 13% dan 24,4% pada *unbleached hardwood kraft pulp* (UBHW), *oxygen delignified hardwood kraft pulp* (O2HW), *unbleached softwood kraft pulp* (UBSW) dan *oxygen delignified softwood kraft pulp* (O2SW). Ketika penurunan HexA dihitung berdasarkan persentase terhadap KN pulp, kandungan HexA pada pulp menurun berkisar di antara 26% - 51%. Berdasarkan hasil percobaan tersebut lipase dapat mendegradasi HexA secara spesifik sehingga lignin yang berikatan dengan gugus tersebut terlepas dari pulp. Hasil penelitian ini

juga membuktikan bahwa HexA adalah tempat pembentukan LCC. Spesifisitas lipase terhadap HexA juga diketahui berdasarkan hasil uji kandungan xilosa pada filtrat hasil pra-perlakuan pulp yang mengandung sejumlah kecil xilosa. Hasil ini menunjukkan bahwa lipase bersifat sangat spesifik karena dapat menghidrolisis xilosa yang berikatan dengan residual lignin dan HexA.

#### 4. $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139)

Hasil penelitian Septiningrum *et al.* (2015) menunjukkan HexA dapat dihilangkan secara langsung menggunakan GH67  $\alpha$ -glucuronidase yang berasal dari *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6. Penghilangan HexA ini dilakukan pada senyawa model *hexenuronosyl xylotriase* dengan menggunakan kerja sinergis dari dua jenis enzim yang diperoleh dari ekstrak kasar intraselular yaitu  $\alpha$ -glucuronidase dan  $\beta$ -xilosidase (Septiningrum *et al.*, 2015).

### KESIMPULAN

Aplikasi enzim di industri pulp dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu untuk *biopulping* dan *biobleaching* termasuk proses penghilangan HexA. Aplikasi enzim tersebut berupa:

- Penggunaan jamur pelapuk putih dan lakase pada proses *biopulping*. Aplikasi enzim dilakukan sebelum proses pemasakan.
- Penggunaan enzim pada proses *biobleaching* untuk delignifikasi pulp dan menurunkan kandungan HexA. Enzim-enzim yang digunakan adalah xilanase, lakase, lipase dan  $\alpha$ -glucuronidase. Enzim ini dapat digunakan sendiri-sendiri ataupun dalam sistem enzim (*enzyme cocktail*). Enzim diaplikasikan sebelum proses pemutihan dengan cara ditambahkan ke dalam *brown stock washer*.

Saat ini aplikasi enzim masih berskala laboratorium, namun beberapa sudah mencapai skala industri. Beberapa kendala terbesar dari aplikasi enzim terkait dengan sisi teknis dan ekonomis seperti keterbatasan ketersediaan enzim yang kontinu, belum tersedianya karakteristik enzim yang sesuai dengan aplikasi di pabrik, penggunaan bahan kimia tambahan seperti mediator untuk lakase. Namun di satu sisi aplikasi enzim memberikan beberapa keuntungan seperti

pengurangan konsumsi bahan kimia, lebih ramah lingkungan dan investasi yang rendah. Teknologi aplikasi enzim ini dapat dijadikan salah satu teknologi alternatif yang memberikan pandangan baru di industri pulp Indonesia menuju industri pulp yang lebih ramah lingkungan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aracri, E. and Vidal, T. (2011) "Xylanase- and laccase-aided hexenuronic acids and lignin removal from specialty sisal fibres," *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 83(3), pp. 1355–1362. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.058.
- Bajpai, P. (1999) "Application of enzymes in the pulp and paper industry," *Biotechnology Progress*, 15, pp. 147–157.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G. (2001) "Microbial xylanases and their industrial applications : a review," *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, pp. 326–338. doi: 10.1007/s002530100704.
- Cadena, E. M., Du, X., Gellerstedt, G., Li, J., Fillat, A., García-Ubasart, J., Vidal, T. and Colom, J. F. (2011) "On hexenuronic acid (HexA) removal and mediator coupling to pulp fiber in the laccase/mediator treatment.," *Bioresource technology*. Elsevier Ltd, 102(4), pp. 3911–7. doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.127.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A. and del Río, J. C. (2007) "Paper pulp delignification using laccase and natural mediators," *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), pp. 1264–1271. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.09.016.
- Cañas, A. I. and Camarero, S. (2010) "Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes.," *Biotechnology Advances*, 28(6), pp. 694–705. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- Cheng, X., Chen, G., Huang, S. and Liang, Z. (2013) "Biobleaching effects of crude xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 on Eucalyptus Kraft Pulp," *Bioresources*, 8(4), pp. 6424–6433.
- Dai, Y., Song, X., Gao, C., He, S., Nie, S. and Qin, C. (2016) "Xylanase-Aided chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp to reduce AOX formation," *Bioresources*, 11(1), pp. 3204–3214.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. and Eriksson, K. L. (1996) "A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase," *FEBS Letters*, 391, pp. 144–148.

- Elsander, A., Ek, M., and Gellerstedt, G. (2000) "Oxalic acid formation during ECF and TCF bleaching of kraft pulp.," *TAPPI Journal*, 83(2), pp. 73–77.
- Fardim, P. and Durán, N. (2004) "Retention of cellulose, xylan and lignin in kraft pulping of eucalyptus studied by multivariate data analysis: Influences on physicochemical and mechanical properties of pulp," *J. Braz. Chem.Soc.*, 15(4), pp. 514–522.
- Ferraz, A., Guerra, A., Mendonca, R., Masarin, F., Vicentim, M., Aguiar, A. and Pavan, P. (2008) "Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping," *Enzyme and Microbial Technology*, 43, pp. 178–185. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.10.002.
- Fillat, U., Martín-sampedro, R., González, Z., Ferrer, A. N. A., Ibarra, D. and Eugenio, M. E. (2017) "Biobleaching of orange tree pruning cellulose pulp with xylanase and laccase mediator systems," *Cellulose Chemistry and Technology*, 51(1-2), pp. 55–65.
- Fillat, U. and Roncero, M. B. (2009a) "Biobleaching of high quality pulps with laccase mediator system: Influence of treatment time and oxygen supply," *Biochemical Engineering Journal*, 44, pp. 193–198. doi: 10.1016/j.bej.2008.12.002.
- Fillat, U. and Roncero, M. B. (2009b) "Effect of process parameters in laccase-mediator system delignification of flax pulp Part I. Pulp properties," *Chemical Engineering Journal*, 152, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.cej.2009.05.036.
- Gallardo, O., Fernández-Fernández, M., Valls, C., Valenzuela, S. V., Roncero, M. B., Vidal, T., Díaz, P. and Pastor, F. I. J. (2010a) "Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid.," *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), pp. 6290–4. doi: 10.1128/AEM.00871-10.
- Gallardo, O., Fernández-Fernández, M., Valls, C., Valenzuela, S. V., Roncero, M. B., Vidal, T., Díaz, P. and Pastor, F. I. J. (2010b) "Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid.," *Applied and environmental microbiology*, 76(18), pp. 6290–4. doi: 10.1128/AEM.00871-10.
- Gangwar, K., Prakash, N. and Prakash, R. (2015) "Amenability of Acacia and Eucalyptus hardwood pulps to Elemental Chlorine-Free Bleaching: Application and efficacy of microbial xylanase," *Bioresources*, 10(4), pp. 8405–8413.
- Gary M. Scott, Masood Akhtar, Michael J. Lentz, Eric Horn, R. E. S. and T. K. K. (1998) "An overview of biopulping research: discovery and engineering," *Journal of Korea TAPPI*, 30(4), pp. 18–27.
- Han, Y., Agarwal, V., Dodd, D., Kim, J., Bae, B., Mackie, R. I., Nair, S. K. and Cann, I. K. O. (2012) "Biochemical and structural insights into xylan utilization by the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*," *The Journal of biological chemistry*, 287(42), pp. 34946–60. doi: 10.1074/jbc.M112.391532.
- Henriksson, G. and Teeri, T. (2009) "Biotechnology in the forest industry," in Ek, Monica; Gellerstedt, Goran; Henriksson, G. (ed.) *Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Biotechnology*. Berlin: Walter de Gruyter, pp. 273–300.
- Husaini, A., Fisol, F. A., Yun, L. C., Hasnain, M., Muid, S. and Roslan, H. A. (2011) "Lignocellulolytic enzymes produced by tropical white rot fungi during biopulping of Acacia mangium wood chips," *J Biochem Tech*, 3(2), pp. 245–250.
- Jiang, Z.-H., Bouchard, J. and Berry, R. (2006) "Evidence for the formation of lignin-hexenuronic acid-xylan complexes during modified kraft pulping processes," *Holzforschung*, 60(2), pp. 137–142. doi: 10.1515/HF.2006.022.
- Jiang, Z.-H., Van Lierop, B. and Berry, R. (2000) "Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching industry," *TAPPI Journal*, 83(1), pp. 167–175.
- Jurado, M., Martín, A. T., Martínez, M. J. and Biológicas, C. D. I. (2011) "Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: Role of laccase in the processes," *Comprehensive Biotechnology*. Second Edi. Elsevier B.V., 6, pp. 595–603. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00398-6.
- Koshy, J. and Nambisan, P. (2011) "Biopulping of Paddy Straw by *Pleurotus eous*," *Journal of Advanced Biotechnology*, 11(1), pp. 44–46.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A. and Alcalde, M. (2008) "Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis.," *Microbial Cell Factories*, 7, p. 32. doi: 10.1186/1475-2859-7-32.
- Kuwabara, E., Zhou, X., Homma, M., Takahashi, S., Kajiyama, M., Ohi, H. (2012) "Relationship between hexenuronic acid content of pulp and brightness stability in accelerated aging," *Japan Tappi Journal*, 66(7), pp. 63–77.

- Mohiuddin, G. (2004) *Biotechnological application of enzymes for making paper pulp from green jute / kenaf ( the whole plant )*, pp. 1–71.
- Moldes, D. and Vidal, T. (2008) “Laccase – HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp : Influence of the operating conditions,” *Bioresources Technology*, 99, pp. 8565–8570. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.008.
- Nagar, S., Jain, R. ., Thakur, V. . and Gupta, V. . (2013) “Bleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S,” *Biotech*, 3, pp. 277–285. doi: 10.1007/s13205-012-0096-y.
- Nair, S. G., Shibdu, R. and Shashidhar, S. (2010) “Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45,” *Indian J Microbiol*, 50, pp. 332–338. doi: 10.1007/s12088-010-0049-2.
- Nguyen, D., Zhang, X., Jiang, Z.-H., Audet, A., Paice, M. G., Renaud, S. and Tsang, A. (2008) “Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Accessory enzymes degrade hexenuronic acids,” *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), pp. 130–136. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.11.012.
- Nie, S., Wang, S., Qin, C., Yao, S., Friday, J., Song, X. and Li, K. (2015) “Removal of hexenuronic acid by xylanase to reduce adsorbable organic halides formation in chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp,” *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 196, pp. 413–417. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.115.
- Nigam, S. K. & V. (2014) “Production and application of laccase enzyme in pulp and paper industry,” *Impact Journals*, 2(4), pp. 153–158.
- Pei, Y., Wang, S., Qin, C., Su, J. and Nie, S. (2016) “Optimization of Laccase-Aided chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp,” *Bioresources*, 11(1), pp. 696–712.
- Pouyet, F., Chirat, C. and Lachenal, D. (2013) “Origin of Cellulose Depolymerization During Ozone Treatment of Hardwood Kraft Pulp,” *Bioresources*, 8(4), pp. 5289–5298.
- Qifeng Yang, Huaiyu Zhan, Shuangfei Wang, Shiyu Fu, and K. L. (2007) “Bio-modification of eucalyptus chemithermo- mechanical pulp with different white-rot fungi,” *Bioresources*, 2(4)(Gruber 2000), pp. 682–692.
- Quintana, E., Valls, C., Barneto, A. G., Vidal, T., Ariza, J. and Roncero, M. B. (2015) “Studying the effects of laccase treatment in a softwood dissolving pulp : Cellulose reactivity and crystallinity,” *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 119, pp. 53–61. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.019.
- Saleem, M., Rizwan, M., Yasmin, R. and Imran, M. (2009) “Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp . XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp,” *International Biodeterioration & Biodegradation*. Elsevier Ltd, 63, pp. 1119–1124. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.09.009.
- Saurabh Sudha Dhiman, Jitender Sharma, B. B. (2008) “Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review,” *Bioresources*, 3(4), pp. 1377–1402.
- Septiningrum, K., Ohi, H., Waeonukul, R. and Pason, P. (2015) “Enzyme and Microbial Technology The GH67  $\alpha$ -glucuronidase of *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6 removes hexenuronic acid groups and facilitates biodegradation of the model xylooligosaccharide hexenuronosyl xylotriase,” *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 71, pp. 28–35. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.01.006.
- Septiningrum, K. and Sugesty, S. (2013) “Pengaruh Penambahan Xilanase Pada Proses Pemutihan,” *Jurnal Selulosa*, 3(1), pp. 15–26.
- Sharma, A., Vadde, V., Shrivastava, A., Kumar, R., Mohan, R., Gupta, R. and Chander, R. (2014) “Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents : A pilot scale study,” *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 169, pp. 96–102. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.066.
- Shatalov, A. a and Pereira, H. (2009) “Impact of hexenuronic acids on xylanase-aided biobleaching of chemical pulps,” *Bioresource technology*. Elsevier Ltd, 100(12), pp. 3069–75. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.020.
- Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, P. F. and Peng, L. C. (2010) “Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review,” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9(2), pp. 141–151. doi: 10.1007/s11157-010-9200-0.
- Singh, V., Pandey, V. C. and Agrawal, S. (2013) “Potential of *Laceyella sacchari* strain B42 crude xylanase in biobleaching of kraft pulp,” *African Journal of Biotechnology*, 12(6), pp. 570–579. doi: 10.5897/AJB12.1961.
- Tavast, D., Brännvall, E., Lindström, M. E., Wood, W. and Centre, S. (2011) “Selectiveness and efficiency of combined peracetic acid and chlorine dioxide bleaching stage for kraft pulp in removing hexenuronic acid,” *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(1-2), pp. 89–95.

- Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M. and Vuorinen, T. (1996) "Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy," *Carbohydrate research*, 280(2), pp. 197–208. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593635>.
- Thakur, V. ., Jain, R. . and Mathur, R. . (2012) "Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine-based chemicals during CEH and ECF bleaching," *Bioresources*, 7, pp. 2220–2235.
- Tolan, J. . and Collins, J. (2004) "Use of xylanase in the production of bleached , unrefined pulp at Marathon Pulp Inc," *Pulp and Paper Canada*, 105(7), pp. 167–169.
- Torres, C. E., Negro, C., Fuente, E. and Blanco, A. (2012) "Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96(2), pp. 327–344. doi: 10.1007/s00253-012-4345-0.
- Valenzuela, S. V., Valls, C., Roncero, M. B., Vidal, T., Diaz, P. and Pastor, F. I. J. (2014) "Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(3), pp. 401–406. doi: 10.1002/jctb.4132.
- Valls, C., Vidal, T., Gallardo, O., Diaz, P., Javier Pastor, F. I. and Blanca Roncero, M. (2010) "Obtaining low-HexA-content cellulose from eucalypt fibres: Which glycosyl hydrolase family is more efficient?," *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 80(1), pp. 154–160. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.11.006.
- Valls, C., Vidal, T. and Roncero, M. B. (2010) "The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal," *Process Biochemistry*, 45(3), pp. 425–430. doi: 10.1016/j.procbio.2009.10.015.
- Virk, A. P., Sharma, P. and Capalash, N. (2011) "Use of laccase in pulp and paper industry.," *Biotechnology progress*, 28(1), pp. 21–32. doi: 10.1002/btpr.727.
- Vuorinen, T., Chemistry, F. P., Teleman, A., Buchert, J. and Tenkanen, M. (1999) "Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulp," *Journal of Pulp and Paper Science*, 25(5).
- Woolridge, E. (2014) "Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass," *Catalysts*, 4(1), pp. 1–35. doi: 10.3390/catal4010001.
- Yadav, R., Chaudhry, S., Dhiman, S. . (2010) "Biopulping and its potential to reduce effluent loads from bleaching of hardwood kraft pulp," *Bioresources*, 5(1), pp. 159–171.

