

PRODUKSI LAKASE DAN POTENSI APLIKASINYA DALAM PROSES PEMUTIHAN PULP

Hendro Risdianto^{*)}, Sri H Suhardi¹, Wardono Niloperbowo¹, Tjandra Setiadi²

^{*)}Staf Peneliti Balai Besar Pulp dan Kertas

¹Pusat Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10, Bandung

²Program Studi Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10, Bandung

LACCASE PRODUCTION AND ITS POTENTIAL IN PULP BLEACHING PROCESS

ABSTRACT

This study was focused on production and utilisation of laccase in pulp bleaching process. Laccase was produced by white-rot fungi of Marasmius sp which was immobilised in luffa sponge in a modified immersion bioreactor. The Experiment was conducted to study the effect of variation of immersion periods in the production of laccase. The immersion periods applied in this study were 15 minutes, 12 hours and 24 hour respectively. Laccase was then utilised in pre-treatment of pulp bleaching of Accacia mangium unbleached-pulp. The bleaching processes were conducted with and without addition mediator of 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) which has ability to enhance the delignification process.

The results showed that immersion period of 12 hours exhibited the highest maximum laccase activity. Maximum level of laccase attained from culture with 12 hours immersion period was 457.6 U/L. When the immersion period be double (24 hours), the level of laccase, however, becoming lower i.e. 281.9 U/L. A 15 minutes immersion period has resultef in a level of laccase of 384.4 U/L. Utilisation of crude enzymes by addition of ABTS mediator with enzyme exposure time 6 hours at temperature of 45°C has increased brightness for 2.8 points. Pretreatment in similar conditions with no ABTS has added showed an increase in brightness for 0.7 point. It demonstrated that the addition of ABTS has improved biobleaching process. The pulp exposed to crude enzymes for 6 days at room temperature has increased the brightness of pulp to 5.3 points. These results indicate that laccase has a potential ability in pulp bleaching process.

Keywords: a modified temporary immersion bioreactor, bleaching, brightness, crude enzyme, laccase, luffa, Marasmius sp., white-rot fungi.

INTISARI

Penelitian ini ditujukan untuk memproduksi lakase dan menggunakannya dalam proses pemutihan pulp. Produksi lakase dilakukan dengan menggunakan jamur pelapuk putih Marasmius sp. yang diimmobilisasi pada bulustru. Bioreaktor yang digunakan adalah bioreaktor imersi berkala termodifikasi. Penelitian produksi lakase dilakukan dengan variasi waktu imersi 15 menit, 12 jam dan 24 jam. Produk berupa ekstrak kasar lakase digunakan sebagai perlakuan awal proses pemutihan pulp Acacia mangium. Pemutihan pulp dilaksanakan dengan dan tanpa mediator 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) yang berfungsi untuk meningkatkan proses delignifikasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu imersi 12 jam menghasilkan lakase dengan aktivitas paling tinggi yaitu mencapai 457,6 U/L, lebih tinggi dibandingkan waktu imersi 15 menit (348,4 U/L) dan waktu imersi 24 jam (281,9 U/L). Pemutihan pulp menggunakan ekstrak kasar lakase dengan bantuan ABTS selama 6 jam dan suhu 45°C dapat meningkatkan derajat putih sebesar 2,8 poin. Sedangkan pada kondisi yang sama namun tanpa penambahan ABTS hanya dapat meningkatkan derajat putih 0,7 poin. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan ABTS dapat meningkatkan proses pemutihan. Sementara penggunaan ekstrak kasar lakase selama enam hari dapat meningkatkan derajat putih sebesar 5,3 poin. Dengan demikian, lakase memiliki potensi untuk peningkatan derajat putih proses pemutihan pulp yang diharapkan dapat mengurangi kebutuhan bahan kimia pemutih dan mengurangi limbah berbahaya proses pemutihan.

Kata kunci: bioreaktor imersi berkala termodifikasi, pemutihan, derajat putih, ekstrak kasar, lakase, bulustru, Marasmius sp., jamur pelapuk putih.

PENDAHULUAN

Pulp dari proses pemasakan harus diputihkan untuk mendapatkan kertas putih. Pemutihan biasanya dilakukan dengan reaksi delignifikasi bertahap yang melibatkan klor dan natrium hidroksida. Limbah yang berbahaya akan dihasilkan dari proses pemutihan yang menggunakan senyawa klor yaitu senyawa organik terklorinasi seperti 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8 TCDD), dan 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-furan (2,3,7,8 TCDF) yang terdeteksi sebagai *Adsorbable Organic Halide* (AOX). Senyawa-senyawa tersebut bersifat toksik dan bioakumulatif (Lindsay K dan Smith D.W, 2002). Usaha untuk mengurangi efek negatif proses pemutihan telah banyak dilakukan diantaranya dengan pemutihan sistem *Elemental Chlorine Free* (ECF) dan *Totally Chlorine Free* (TCF). Pada pemutihan ECF menggunakan senyawa klor dioksida, sementara pada TCF menggunakan senyawa selain klor (seperti ozon, hidrogen peroksida, enzim) untuk memutihkan pulp. Salah satu bahan pemutih yang ramah lingkungan adalah enzim.

Lakase (EC 1.10.3.2, benzenediol: oxygen oxidoreductase) merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang berfungsi mengkatalisis proses pemecahan lignin, sehingga dapat digunakan sebagai bahan aktif pada proses pemutihan pulp. Dengan kemampuannya ini, industri pulp, kertas dan tekstil mulai menggunakan enzim ini pada proses produksinya untuk mendapatkan proses produksi yang efisien dan ramah lingkungan. Hal ini dikarenakan kerja enzim ini hanya memerlukan oksigen dan menghasilkan air sebagai satu-satunya produk samping (Riva, 2005). Namun demikian penggunaan enzim ini pada industri tersebut di atas masih sangat rendah atau masih dalam tahap pengembangan.

Lakase banyak dihasilkan oleh jamur pelapuk putih yang merupakan kelompok jamur pengurai kayu dengan kemampuan mendegradasi lignin dan melakukan dekomposisi lignin (Pérez dkk, 2002). Beberapa contoh jamur pelapuk putih antara lain *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *P. chrysosporium*, *Heterobasidium annosum*, *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus spp.* dan *Phellinus pini* (Martinez dkk, 2005). Lakase merupakan hasil metabolisme sekunder dari jamur pelapuk putih pada kondisi tertentu seperti nitrogen dan karbon yang terbatas (Ten

Have dan Teunissen, 2001). Faktor lain yang mempengaruhi produksi enzim tersebut adalah pH, temperatur dan *inducer*. Penambahan senyawa yang memiliki struktur mirip dengan lignin dan senyawa fenol seperti *xyletene* dan *veratryl alcohol* dapat menginduksi produksi enzim (Van der Merwe, 2002). Selain faktor tersebut, transfer oksigen juga sangat penting. Kultur yang teragitasi secara mekanis merupakan penghambat produksi lakase karena adanya tegangan geser (*shear stress*) yang diterima oleh miselia jamur dalam kultur rendam (Prasad dkk, 2005). Oleh karena itu, teknik kultivasi dan pemilihan bioreaktor sangat berpengaruh pada produksi enzim ini.

Salah satu teknik kultivasi yang banyak dilakukan adalah imobilisasi jamur berfilamen. Imobilisasi merupakan teknik yang membatasi pergerakan bebas sel. Imobilisasi sel jamur mempunyai keuntungan antara lain sel terdispersi merata, pemisahan sel dengan medium cair lebih mudah sehingga memungkinkan untuk proses kultur curah berulang, proses kontinyu dan lanjutan proses hilirnya (Couto dkk, 2007). Bahan untuk imobilisasi dapat berupa media sintesis atau bahan alami. Bahan sintesis *polyurethane foam* (PUF) dan sepon nilon sangat cocok untuk imobilisasi jamur pelapuk putih *Phanerochaete chrysosporium* (Luke dan Burton, 2001). Penggunaan substrat padat alami, khususnya limbah pertanian lignoselulosa, sebagai substrat pertumbuhan untuk jamur telah digunakan untuk produksi lakase (Couto dkk, 2004). Limbah pertanian tersebut mengandung lignin dan/atau selulosa dan hemiselulosa yang berperan sebagai inducer lakase. Selain itu, kebanyakan dari limbah tersebut kaya akan gula yang secara alami mudah dimetabolisme oleh mikroorganisme. Hal ini membuat proses menjadi lebih ekonomis. Namun, penggunaan bahan lignoselulosa juga menimbulkan beberapa masalah seperti degradasi media penyangga yang dapat menghalangi transfer massa oksigen.

Bioreaktor yang tepat untuk produksi lakase adalah tanpa sistem agitasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa produksi lakase tertahan karena gaya mekanis yang dialami jamur. Hess dkk (2002) mendapatkan bahwa produksi lakase oleh *Trametes multicolor* menurun pada saat menggunakan reaktor tangki berpengaduk disebabkan rusaknya miselia karena gaya geser (*shear stress*). Couto dkk (2004) menggunakan bioreaktor imersi dan peneliti yang sama pada tahun 2006

menggunakan bioreaktor *air-lift* untuk memproduksi lakase. Pada kedua bioreaktor tersebut tidak terdapat tegangan geser (*shear stress*) akibat agitasi mekanis, namun kebutuhan oksigen tetap terpenuhi dengan baik. Pada bioreaktor imersi yang digunakan, perendaman kultur jamur terimobilisasi dilakukan dengan mencelupkannya ke dalam medium cair. Pada periode waktu tertentu kultur diangkat dari medium cair sehingga terdapat periode antara waktu tercelup dan tidak tercelup. *Temporary immersion bioreactor* telah digunakan dengan sukses untuk menumbuhkan kultur *Trametes versicolor* dan *Phanerochaete chrysosporium* yang digunakan untuk penghilangan warna sintesis (Böhmer dkk, 2006). Sistem kultivasi ini berhasil karena dapat mengurangi tegangan geser yang menghambat produksi lakase.

Penelitian penggunaan lakase pada proses pemutihan pulp telah banyak dilakukan. Bajpai (1999) mendapatkan bahwa penggunaan lakase untuk pemutihan pulp kraft kayujarum (*softwood*) dan kayudaun (*hardwood*) dapat menurunkan bilangan kappa sebesar 17,2 dan meningkatkan derajat putih pulp sebesar 5,9 poin. Sigoiot dkk. (2005), menggunakan lakase dan mediator *N-hydroxybenzotriazole* (HBT) untuk pemutihan pulp rami yang memiliki bilangan kappa 11 dan 28. Penggunaan lakase ini menurunkan bilangan kappa dan meningkatkan derajat putih seperti terlihat pada Tabel 1.

Lakase yang digunakan pada pemutihan pulp memiliki berat molekul sekitar 60-80 kDa. Enzim ini tidak dapat menembus terlalu dalam pada komponen kayu lignin karena potensial

redoksnya rendah (0,5 – 0,8 V), sehingga tidak dapat mengoksidasi gugus non-fenol lignin yang memiliki potensial redoks lebih tinggi (> 1,5 V). Keterbatasan tersebut menyebabkan lakase hanya dapat mengoksidasi gugus fenol lignin. Oleh karena itu, lakase sering diaplikasikan dengan mediator oksidasi, suatu molekul kecil yang dapat memperluas pengaruh lakase pada oksidasi gugus non-fenol lignin. Proses tersebut dikenal sebagai *Laccase Mediator System* (LMS), lakase awalnya mengoksidasi mediator kemudian berdifusi ke dalam dinding sel dan mengoksidasi lignin yang tidak diakses lakase. Beberapa mediator yang dapat digunakan diantaranya *hydroxyanthranilic acid* (HAA), *2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)* (ABTS), *N-hydroxybenzotriazole* (HBT), *N-hydroxyphthamide* (HPI), *violuric acid* (VA), *N-hydroxyacetanilide* (NHA), *methyl ester of 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic-acid* (*syringic acid*) dan *2,2,6,6-tetramethylpiperidine* (TEMPO) (Riva, 2005).

Berdasarkan informasi tersebut maka penelitian ini difokuskan pada penggunaan bioreaktor imersi berkala (*temporary immersion bioreactor*) termodifikasi untuk memproduksi lakase yang akan digunakan pada proses pemutihan pulp kimia. Bioreaktor yang digunakan merupakan modifikasi bioreaktor imersi yang digunakan oleh Couto dkk (2004). Bioreaktor terdiri atas dua kompartemen. Periode perendaman dan pengosongan dengan memanfaatkan gaya gravitasi sedangkan medium cair selalu merendam kultur jamur.

Tabel 1. Hasil pemutihan pulp menggunakan lakase

Enzim	Bilangan kappa 11		Bilangan kappa 28	
	Derajat Delignifikasi ^a	Kenaikan Derajat putih ^b	Derajat Delignifikasi	Kenaikan Derajat putih
<i>Rec-laccase</i> +HBT, 12 j	88	37	48	10
<i>Wild-laccase</i> +HBT, 12 j	84	35	50	14
<i>Wild-laccase</i> +HBT, 4 j	71	26	36	14

^a persentase penurunan bilangan kappa

^b selisih derajat putih akhir dengan derajat putih awal

Sumber : Sigoiot dkk., 2005

BAHAN DAN METODA

Bahan dan alat

A. Produksi lakase

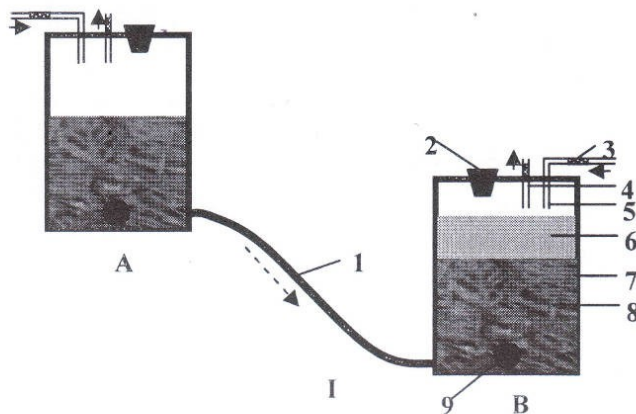
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur pelapuk putih *Marasmius sp.*, bulustru dan medium Kirk. Jamur *Marasmius sp* dipelihara pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam cawan petri dan tabung reaksi. Jamur ini diperoleh dari Pusat Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung. Bulustru (Jawa: gambas) merupakan serat buah oyong (*luffa*) yang dikeringkan. Medium Kirk adalah medium yang digunakan untuk merendam bulustru dan memproduksi lakase dalam bioreaktor. Komposisi medium Kirk disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Medium Kirk

Bahan	Komposisi, g/L
Glukosa	4,286
KH ₂ PO ₄	1,714
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,429
CaCl ₂	0,086
Natrium asetat	2,314
Diammonium tartrat	0,429
MnCl ₂	0,021
Eksfrak ragi	0,257
CuSO ₄ . 7H ₂ O	0,011
H ₂ MoO ₄	0,007
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,010
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,006
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,007

Sumber : Nuske dkk., 2001

Peralatan utama yang digunakan antara lain cawan petri berukuran diameter 9 cm dan tabung reaksi untuk memelihara kultur jamur *Marasmius sp.*, *autoclave* untuk sterilisasi peralatan dan medium, bioreaktor untuk memproduksi enzim, spektrofotometer Genesis 10 UV-Visible untuk analisis aktivitas enzim, *laminar air flow cabinet* untuk tempat inokulasi pada pemeliharaan jamur dan produksi enzim agar kondisi terjaga tetap aseptis.



Gambar 1. Skema Bioreaktor Imersi Berkala Termodifikasi

B. Proses pemutihan pulp dengan lakase

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah pulp belum putih, ekstrak kasar lakase dan bahan kimia pemutih meliputi klordioksida dan natrium hidroksida serta air demin untuk mencuci pulp. Pulp yang digunakan berasal dari kayu *Acacia mangium* hasil pemasakan proses kraft yang memiliki bilangan kappa 20. Sediaan pulp ini diperoleh dari Laboratorium Pemasakan Balai Besar Pulp dan Kertas, Departemen Perindustrian, Bandung. Ekstrak kasar yang digunakan adalah hasil produksi optimum (aktivitas tertinggi yaitu 457,6 U/L) pada percobaan produksi lakase.

Peralatan yang digunakan selama proses pemutihan adalah *waterbath* untuk mengatur suhu proses pemutihan, pompa vakum untuk mengurangi kadar air pulp hasil proses pemutihan.

METODA

A. Produksi lakase

a. Konfigurasi bioreaktor

Satu set bioreaktor terdiri atas dua kompartemen berbentuk segi empat yang terbuat dari kaca dan terhubung dengan selang silikon. Ukuran bioreaktor adalah tinggi 15 cm, panjang 10 cm dan lebar 10 cm. Tiap bioreaktor diisi *Marasmius sp.* yang terimobilisasi sedemikian rupa sehingga ketinggian kultur dalam bioreaktor adalah 8 cm. Salah satu kompartemen dapat digerakkan naik dan turun dengan menggunakan mesin penggerak yang diatur waktunya sesuai variasi waktu imersi yang digunakan. Pergerakan naik turun kompartemen ini mengakibatkan medium Kirk (medium selektif untuk jamur pelapuk putih memproduksi lakase) dapat berpindah dari satu kompartemen ke kompartemen lainnya.

- Keterangan :
- A, B : kompartemen
 - 1. Selang silikon
 - 2. Tempat penggantian medium
 - 3. Saringan udara
 - 4. keluaran udara
 - 5. pemasukan udara
 - 6. Medium Kirk
 - 7. Kaca bioreaktor
 - 8. Kultur jamur
 - 9. Tempat pemanenan ekstrak kasar
 - : aliran udara
 - > : aliran medium
 - I : pengosongan kompartemen A, perendaman kompartemen B

b. Persiapan/pembuatan media imobilisasi

Sebelum digunakan, bulustru dengan luas kurang lebih 900 cm² dipotong dengan ukuran sekitar 5 cm x 5 cm dan direndam dalam medium Kirk selama 15 menit. Bulustru yang telah mengandung medium Kirk kemudian ditempatkan dalam plastik tahan panas dan disterilisasi. Setelah dingin bulustru tersebut selanjutnya diinokulasi dengan kultur *Marasmius* sp. yang telah tumbuh dengan baik pada medium agar. Satu kantong plastik bulustru diinokulasi dengan satu cawan petri (diameter 9 cm) kultur *Marasmius* sp. yang berumur 5 hari dalam media PDA dipotong-potong dengan ukuran 1 cm x 1 cm hari secara aseptis. Bulustru ini selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) selama kurang lebih 10 hari untuk mendapatkan pertumbuhan *Marasmius* sp. yang baik.

c. Kultivasi jamur *Marasmius* sp.

Kultivasi *Marasmius* sp. untuk memproduksi lakase dilakukan dengan memasukkan satu kantong kultur *Marasmius* sp. terimobilisasi pada bulustru pada masing-masing kompartemen bioreaktor. Kemudian ke dalam satu kompartemen dimasukkan 700 mL medium Kirk steril yang mengandung lindi hitam dengan persentase 0,4% (v/v). Komposisi medium Kirk (Nüske dkk, 2001) disajikan pada Tabel 2. Kultivasi dilakukan pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) dan pH 4,5 dengan aerasi pada *head space* bioreaktor secara terus menerus menggunakan aerator. Bioreaktor kemudian dijalankan sehingga kultur jamur pada salah satu kompartemen akan terendam selama 15 menit dan pada kompartemen lainnya akan mendapat suplai udara juga selama 15 menit. Dengan demikian setiap kompartemen akan mengalami perendaman dan kontak dengan udara selama 15 menit atau periode 30 menit. Proses kultivasi ini dilakukan selama tiga hari (siklus pertama) dan kemudian dipanen dengan cara mengeluarkan seluruh medium kultur. Kemudian kultivasi siklus kedua langsung dilakukan dengan cara menambahkan 700 mL medium Kirk yang baru. Metode kultivasi yang sama juga diterapkan untuk waktu imersi 12 jam dan 24 jam.

d. Ekstraksi lakase

Pada setiap akhir kultivasi, enzim dipanen dengan melalui tempat pemanenan (lihat Gambar 1). Enzim yang diperoleh relatif sedikit mengandung pengotor karena adanya imobilisasi jamur pada bulustru. Proses pemisahan pengotor dari enzim dilakukan dengan cara pengendapan. Enzim yang telah dipanen diberi larutan 0,5% natrium benzoat untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme. Sebelum enzim ini digunakan maka harus disimpan dalam refrigerator dengan suhu 4°C.

e. Analisis aktivitas lakase

Selama kultivasi dilakukan pengambilan contoh setiap 24 jam untuk dilakukan pengukuran aktivitas lakase. Pengambilan contoh menggunakan pipet volume 25 mL secara aseptis. Penentuan aktivitas lakase dilakukan menurut Bourbonnais and Paice (1990) sebagai berikut: Larutan 0.4 mM (ABTS) dalam buffer sodium asetat (pH 4.5) sebanyak 1160 μL dimasukkan ke dalam kuvet 1,5 ml, selanjutnya ke dalam kuvet dimasukkan 40 μL sampel dan dikocok agar tercampur homogen. Kemudian absorbansi radikal kation diamati pada panjang gelombang 420 nm ($\epsilon_{\text{mM}} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) selama lima menit menggunakan spektrofotometer. Perubahan absorbansi radikal kation diamati setiap menit. Aktivitas lakase dinyatakan sebagai International Unit (IU) per liter, dengan 1 IU didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengoksidasi 1 μmol ABTS tiap menit.

B. Percobaan pemutihan pulp

a. Perlakuan awal menggunakan enzim

Percobaan pemutihan pulp dilakukan dengan menggunakan ekstrak kasar lakase dari jamur *Marasmius* sp. Percobaan dilakukan dengan variasi kondisi pemutihan seperti disajikan pada Tabel 3.

Pada masing-masing perlakuan digunakan 30 gram (berat kering) pulp belum putih. Pada perlakuan (P-3), (P-4) dan (P-5) ditambahkan 207,2 mL (= 94,8 U) ekstrak kasar lakase sehingga konsistensi pulp 10%. Kemudian pada perlakuan P-3, P-4 dan P-5 disuplai udara menggunakan aerator. Pada akhir perlakuan enzim, seluruh pulp dikeluarkan kemudian

Tabel 3. Kondisi pemutihan menggunakan ekstrak kasar lakase

Kondisi proses	Perlakuan awal pemutihan				
	P-1 (-)	P-2 (D ₀ -E-D ₁)	P-3 (L-D ₀ -E-D ₁)	P-4 (L-D ₀ -E-D ₁)	P-5 (L-D ₀ -E-D ₁)
Waktu	-	-	6 jam	6 jam	6 hari
Suhu, °C	-	-	45	45	Ruang (28)
Konsistensi, %	-	-	10	10	10
Dosis mediator ABTS	-	-	-	500 g/ton pulp	-

L : perlakuan awal menggunakan ekstrak kasar lakase
 D₀-E-D₁ : pemutihan lanjutan menggunakan bahan kimia
 D₀, D₁ : pemutihan menggunakan klordioksida
 E : pemutihan menggunakan sodium hidroksida

dicuci dengan menggunakan air sampai bersih, diperas dan ditentukan kadar airnya untuk digunakan sebagai dasar pada proses pemutihan berikutnya.

b. Pemutihan lanjutan

Setelah proses perlakuan awal menggunakan ekstrak kasar lakase, proses pemutihan dilanjutkan dengan menggunakan bahan kimia pemutih dengan tahapan D₀-E-D₁. Tahapan D₀ merupakan pemutihan menggunakan klordioksida dengan kondisi proses pemutihan tahap ini dapat dilihat pada Tabel 4. Pulp yang dihasilkan dari proses pertama kemudian diekstraksi menggunakan NaOH (Tahapan E). Pulp yang dihasilkan dari proses ekstraksi ini kemudian diputihkan kembali dengan menggunakan klordioksida lagi (Tahapan D₁). Proses pemutihan menggunakan bahan kimia ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kondisi pemutihan lanjutan *)

Kondisi	Tahapan		
	D ₀	E	D ₁
Konsistensi (%)	10	10	10
Suhu (°C)	60	75	75
Waktu (menit)	60	60	180
ClO ₂ (%)	0.84	-	1
NaOH (%)	-	1	-

*) Perlakuan pemutihan ini hanya diterapkan pada sediaan pulp perlakuan P-2, P-3, P-4 dan P-5

c. Analisis pulp hasil pemutihan

Parameter yang digunakan untuk mengukur keberhasilan penggunaan pada proses pemutihan pulp adalah derajat putih. Analisis derajat putih dilakukan berdasarkan cara uji derajat putih kertas dan karton (SNI 14-4733-

1998). Derajat putih ditentukan berdasarkan faktor pantul intrinsik yang diukur menggunakan reflektometer.

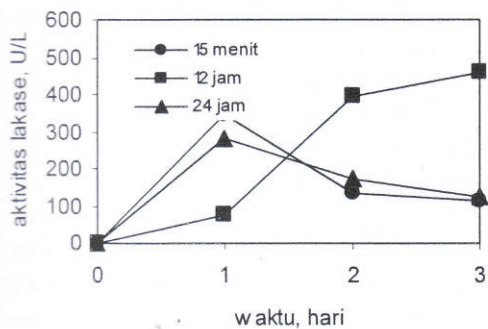
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Produksi lakase

Pada produksi enzim digunakan teknik imobilisasi jamur. Imobilisasi *Marasmius* sp. dilakukan pada bulustru agar kultur jamur tidak terbawa aliran medium pada saat pengosongan bioreaktor, yang dikhawatirkan akan menyumbat saluran. Imobilisasi *Marasmius* sp. ini memungkinkan luas kontak kultur dengan oksigen akan meningkat dan menurunkan hambatan transfer massanya. Pemandangan medium cair dengan memanfaatkan beda ketinggian bioreaktor akan mengurangi tegangan geser yang dialami oleh kultur jamur. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Prasad dkk. (2005) bahwa oksigen merupakan salah satu faktor penting dalam produksi enzim lignolitik oleh jamur pelapuk putih dan agitasi mekanis yang menyebabkan tegangan geser pada kultur merupakan penghambat produksi enzim tersebut.

Hasil percobaan pada siklus pertama disajikan dalam Gambar 2. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada variasi waktu imersi 15 menit, aktivitas lakase meningkat sampai 348,4 U/L setelah satu hari kultivasi, kemudian menurun menjadi 133,5 U/L pada hari ke dua dan 112,7 U/L pada hari ke tiga. Pola peningkatan aktivitas lakase tersebut terlihat sama pada kultur *Marasmius* sp. yang ditumbuhkan dengan waktu imersi 24 jam. Namun pola peningkatan aktivitas lakase tersebut tidak tampak pada perlakuan waktu imersi 12 jam.

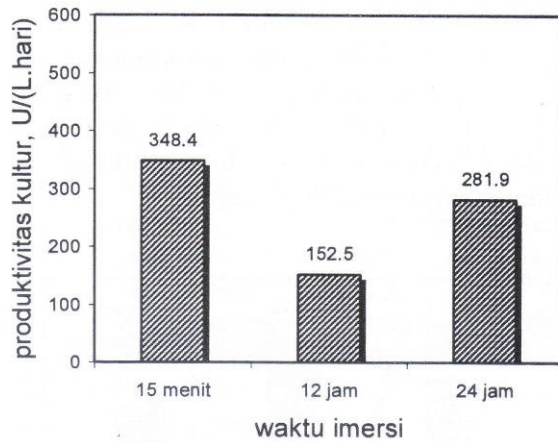
Aktivitas maksimum lakase untuk siklus pertama dapat dilihat pada Gambar 2. Terlihat bahwa aktivitas maksimum lakase diperoleh pada kultur *Marasmius* sp. dengan waktu imersi 12 jam, yaitu sebesar 457,6 U/L dan diikuti berturut-turut oleh kultur *Marasmius* sp. dengan waktu imersi 15 menit (348,4 U/L) dan 24 jam (281,9 U/L). Diperkirakan waktu imersi 12 jam menyebabkan *Marasmius* sp. lebih optimal memanfaatkan nutrisi dan oksigen selama kultivasi. Kultur dengan waktu imersi 12 jam menghasilkan lakase lebih tinggi dibandingkan kultur dengan waktu imersi 15 menit dan 24 jam, namun produktivitas kultur tersebut tidak menunjukkan nilai yang paling tinggi. Produktivitas merupakan salah satu variabel penting pada suatu proses produksi karena hal ini berkaitan dengan biaya produksi suatu produk. Gambar 3 menunjukkan bahwa kultur *Marasmius* sp. dengan waktu imersi 15 menit menunjukkan produktivitas yang paling tinggi yaitu 348,4 U/(L.hari) diikuti oleh kultur dengan waktu imersi 24 jam (281,9 U/(L.hari)) dan 12 jam (152,5 U/(L.hari)). Hal ini karena pencapaian aktivitas maksimum pada waktu imersi 12 jam diperoleh pada hari ke tiga. Sementara itu, aktivitas maksimum untuk waktu imersi 15 menit dan 24 jam diperoleh pada hari pertama. Produktivitas ditentukan berdasarkan waktu, sehingga produktivitas maksimum diperoleh pada waktu imersi 15 menit.



Gambar 2. Aktivitas lakase pada siklus pertama

Pada percobaan ini kultivasi *Marasmius* sp. dengan metode *temporary immersion* dilakukan dua siklus untuk mengetahui kinerja kultur pada siklus berikutnya. Pada akhir siklus pertama (hari ketiga), medium kultur dikeluarkan dan diganti untuk memulai siklus kedua dan kultivasi dilakukan selama tiga hari. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa

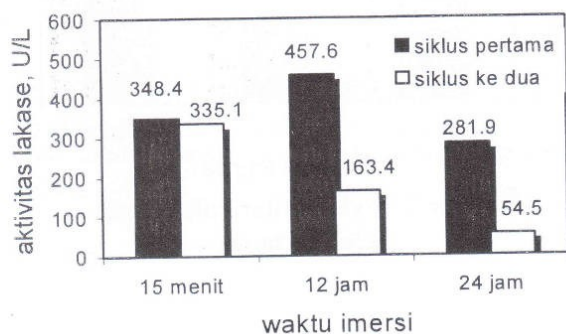
aktivitas lakase pada semua kultur mengalami penurunan setelah aktivitas maksimum lakase dicapai (Gambar 4).



Gambar 3 Produktivitas kultur pada siklus pertama

Dari Gambar 4 terlihat bahwa produksi lakase pada siklus kedua lebih rendah dibandingkan siklus pertama. Persentase penurunan tertinggi produksi lakase pada siklus kedua terjadi pada kultur dengan waktu imersi 24 jam (80,66%) kemudian diikuti oleh kultur dengan waktu imersi 12 jam (64,30%) dan 15 menit (3,83%). Penurunan produksi lakase pada siklus kedua dapat disebabkan karena biomassa aktif dalam kultur jamur berkurang karena ada biomassa yang mati atau tua sehingga tidak menghasilkan lakase. Kemungkinan penyebab lainnya adalah kultur jamur pada siklus pertama telah berhasil mendegradasi lignin pada media imobilisasi (bulustru) sehingga selulosa dan hemiselulosa dapat diakses sebagai sumber karbon. Menurut Ten Have dan Teunissen (2001), tujuan akhir degradasi lignin adalah untuk mencapai holoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) karena merupakan sumber karbon yang mudah digunakan dibandingkan dengan lignin. Keberhasilan mencapai holoselulosa akan memicu *Marasmius* sp. untuk menghasilkan selulase dan hemiselulase. Produksi selulase dan hemiselulase mengakibatkan terjadinya kompetisi sistem produksi enzim di dalam sel *Marasmius* sp. sehingga produksi lakase menurun. Aktivitas maksimum lakase yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 457,6 U/L. Pada tabel 5, dapat dilihat aktivitas maksimum lakase yang diperoleh oleh peneliti lain yang nilainya berkisar antara 65 U/L sampai dengan 61900 U/L. Dengan demikian aktivitas maksimum

lakase yang diperoleh pada penelitian ini masih berada pada kisaran tersebut. Namun nilainya masih relatif kecil dibandingkan aktivitas maksimum pada Tabel 5. Perbedaan aktivitas maksimum lakase yang diperoleh karena adanya perbedaan jenis reaktor, jenis kultivasi dan inducer yang digunakan. Lakase yang diperoleh pada penelitian ini masih berupa enzim kasar. Bila enzim kasar ini dimurnikan maka aktivitasnya dapat ditingkatkan.

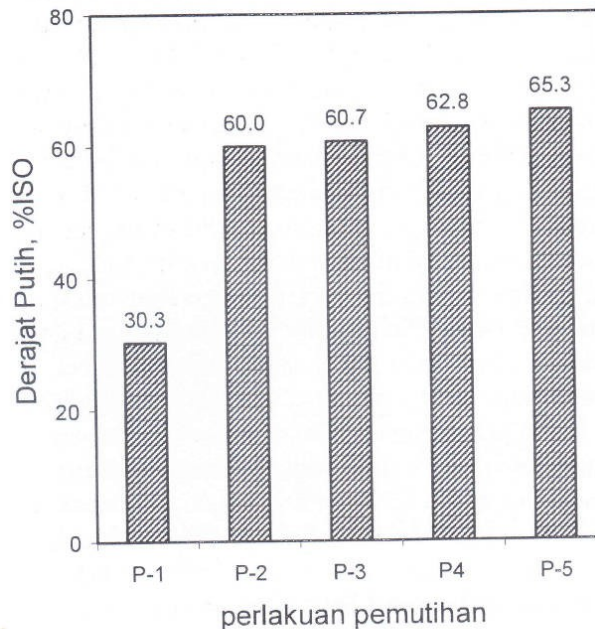


Gambar 4. Aktivitas maksimum lakase

B. Penggunaan enzim untuk pemutihan pulp

Hasil percobaan penggunaan lakase untuk pemutihan pulp dapat dilihat pada Gambar 5. Seperti yang terlihat pada Gambar 5 setelah melalui proses pemutihan secara kimia derajat putih pulp yang awalnya hanya 30,3% ISO (P-1) dapat meningkat hingga 65,3% ISO. Proses pemutihan kimia ini meningkatkan derajat putih pulp yang tidak mendapatkan perlakuan awal (P-2) menjadi 60,0% ISO (P-2). Derajat putih yang diperoleh pada proses pemutihan kimia terhadap pulp yang mendapatkan perlakuan awal penggunaan enzim selama enam jam, pada suhu 45°C tanpa bantuan mediator ABTS adalah 60,7% ISO (P-3). Pada kondisi proses pemutihan yang sama tetapi ada penambahan mediator ABTS diperoleh derajat putih pulp sebesar 62,8% ISO. Proses pemutihan kimia terhadap pulp yang mendapatkan perlakuan awal penggunaan enzim selama enam hari menjadi 65,3% ISO. Bila dibandingkan dengan proses pemutihan yang hanya menggunakan bahan kimia pemutih (P-2) maka penggunaan lakase untuk perlakuan P-3, P-4 dan P-5 mampu meningkatkan derajat putih masing masing sebesar 0,7; 2,8 dan 5,3 poin. Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan enzim selama perlakuan awal pemutihan dapat meningkatkan kinerja proses pemutihan secara kimia.

Demikian pula pemutihan pulp menggunakan ekstrak kasar lakase dengan bantuan ABTS juga mampu meningkatkan kinerja proses pemutihan.



Gambar 5. Derajat putih lembaran pulp

C. Kemungkinan diterapkan di industri

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lakase dapat diproduksi menggunakan bioreaktor imersi berkala termodifikasi. Jamur pelapuk putih *Marasmius* sp. merupakan jamur asli Indonesia sehingga mudah diperoleh. Lakase yang dihasilkan masih berupa ekstrak kasar karena belum melalui tahap pemurnian. Walaupun masih berupa ekstrak kasar namun dapat digunakan untuk meningkatkan derajat putih pulp selama proses pemutihan pulp. Peningkatan derajat putih oleh enzim dapat menurunkan penggunaan bahan kimia pemutih klordioksida yang masih banyak digunakan industri pulp di Indonesia. Dengan demikian limbah proses pemutihan berupa senyawa organik terklorinasi yang bersifat toksik dan bioakumulatif bagi biota air dapat dikurangi.

KESIMPULAN

1. Aktivitas maksimum lakase sebesar 457,6 U/L diperoleh pada kultur *Marasmius* sp. dengan waktu imersi 12 jam
2. Lakase yang diperoleh pada siklus kedua lebih rendah dibandingkan siklus pertama.

3. Penggunaan ekstrak kasar lakase selama enam hari pada suhu ruang dapat meningkatkan derajat putih sebesar 5,3 poin. Penggunaan ekstrak kasar lakase dengan bantuan mediator ABTS selama enam jam pada suhu 45°C mampu meningkatkan derajat putih sebesar 2,8 poin sedangkan tanpa bantuan mediator ABTS hanya mampu meningkatkan derajat putih sebesar 0,7 poin.

Daftar Pustaka

- Bajpai, P., 1999. *Application of enzymes in the pulp and paper industry*, Biotechnol. Prog., 15, 147-157
- Böhmer, U., Suhardi S. H. and Bley, T., 2006, *Decolorization reactive textile dyes with white-rot fungi by temporary immersion cultivation*, Engineering in Life Sciences, 6, 417 – 420.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., 1990. *Demethylation and delignification of kraft pulp by Trametes versicolor laccase in the presence of ABTS*, Applied Microbial Biotechnology, 36: 823-827
- Couto, S.R., dan Toca-Herrera, J.L., 2007. *Laccase production at reactor scale by filamentous fungi*. Biotechnology Advances 25, 558–569
- Couto, S.R., Lopez, Elena., Sanroman. 2006. *Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors*. Journal of Food Engineering. 74, 263–267
- Couto, S.R., Sanroman, M.A., Hofer, D., Gübitz, G.M., 2004. *Production of laccase by Trametes hirsuta grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory*. Engineering in Life Science. 4, 233-238
- Hess J, Leitner C, Galhaup C, Kulbe KD, Hinterstoisser B, Steinwender M, 2002. *Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus Trametes multicolor*. Appl Biochem Biotech. 23rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 98–100, 229–41.
- Kenealy, W.R., Jeffries, T.W., 2003. *Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments dalam Wood Deterioration and Preservation : Advance in Our Changing World*, Bab 12, Goodell, B, Nicholas, D.D., Schultz, T.P., Editor, New York, 2003:210-239 Lindsay K dan Smith D.W, 2002. *Concern about AOX*, Environmental Engineering Program. University of Alberta, 2002
- Luke AK, Burton S.G., 2001. *A novel application for Neurospora crassa: progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols*. Enzyme Microb Technol, 29, 348–5
- Nüske, J., Scheibner, K, Dornberger, U., Hofrichter, M., 2001. *Large scale production of manganese-peroxidase using whit-rot fungi*. Proceedings of the 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 4-8 June, Helsinki, Finland.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J., 2002. *Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. Int. Microbial, 5, 53 – 63
- Prasad, K.K., Mohan, S.V., Bhaskar, Y.V., Ramanaiah, S.V., Babu, V.L., Pati, B.R., Sarma, P.N., 2005. *Laccase production using Pleurotus ostreatus 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors : influence of culture condition*. The Journal of Microbiology. 43, 301-307
- Riva, S., 2005. *Laccases : blue enzymes for green chemistry*. TRENDS In Biotechnology. 24, 119 – 226
- van der Merwe, J.J., 2002. *Production of Laccase by The White-Rot Fungus Pycnoporus sanguineus*. Master Thesis, University of the Free State, Bloemfontein.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Recorda, E., Asthera, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F., Martínez, A.T., 2005. *Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps*. Journal of Biotechnology. 115, 333–343
- Ten Have, R., Teunissen, P.J.M., 2001. *Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi*, Chem. Rev. 101, 3397-3413

Tabel 5. Konsentrasi maksimum lakase pada berbagai penelitian

Spesies jamur	Jenis reaktor	Jenis kultivasi	Inducer	Aktivitas maksimum (U/L)	Peneliti
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Packed bed	Imobilisasi pada nilon	-	270	Schlephake dkk. (2000)
<i>Trametes pubescens</i>	Stirred tank (15 L)	Sel bebas	CuSO ₄	61900	Galhaup and Haltrich (2001)
<i>Neurospora crassa</i>	Capillary membrane	Imobilisasi pada membran	-	10000	Luke and Burton (2001)
<i>T. multicolor</i>	Stirred tank	Sel bebas	CuSO ₄ , gliserol	-	Hess dkk. (2002)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Benchtop (3 L)	Sel bebas	OMW	65	Aggelis dkk. (2003)
<i>Irpex lacteus</i>	Packed bed (27 mL)	Imobilisasi pada PUF	-	-	Kasinath dkk. (2003)
<i>Panus tigrinus</i>	Stirred tank (2 L)	Sel bebas	OMW	4600	Fenice dkk. (2003)
<i>P. tigrinus</i>	Air-lift (2.5 L)	Submerged fermentation	OMW	4300	Fenice dkk. (2003)
<i>P. tigrinus</i>	Rotatory drum (1.3 L)	SSF pada potongan batang maize	OMW	1309	Fenice dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Air-lift (2 L)	Sel bebas	Xylidine, Tween 80	1676	Rancano dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Immersion (2.5 L)	SSF pada kulit barley	Tween 80	600	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Immersion (2.5 L)	SSF pada nilon	Tween 80	229	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Expanded bed (0.3 L)	SSF pada kulit barley	Tween 80	600	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Expanded-bed (0.3 L)	SSF pada nilon	Tween 80	126	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Tray (1 L)	SSF pada kulit barley	Tween 80	3500	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Tray (1 L)	SSF pada nilon	Tween 80	343	Rodriguez Couto dkk. (2003)
<i>T. versicolor</i>	Fluidized (1.5 L)	Sel bebas	-	1685	Blanquez dkk. (2004)
<i>T. hirsuta</i>	Fixed bed	Imobilisasi pada spon stainless steel	CuSO ₄	2206	Rodriguez Couto dkk. (2004a)
<i>T. hirsuta</i>	Immersion (0.5 L)	Imobilisasi pada spon stainless steel	CuSO ₄	4892	Rodriguez Couto dkk. (2004a)
<i>T. hirsuta</i>	Air-lift (2 L)	Imobilisasi pada Ca-alginate	Veratryl alcohol	1043	Dominguez dkk. (2005)
<i>T. hirsuta</i>	Immersion (0.5 L)	SSF pada biji buah anggur	-	18715	Rodriguez Couto dkk. (2006)
<i>T. hirsuta</i>	Tray (0.2 L)	SSF pada nilon	-	6898	Rodriguez Couto dkk. (2006)
<i>T. hirsuta</i>	Tray (0.2 L)	SSF pada biji buah anggur	-	12877	Rodriguez Couto dkk. (2006)
<i>T. hirsuta</i>	Air-lift (6 L)	Sel bebas	CuSO ₄ , gliserol	19400	Rodriguez Couto dkk. (2006)

SSF : Solid State Fermentation; OMW : Olive Mill Wastewater; PUF : Polyurethane Foam

Sumber : Couto dkk, 2006