

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI USUS
LARVA KUMBANG TANDUK (*Oryctes rhinoceros* L.) SERTA
APLIKASINYA DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE ENZYME
FROM THE GUT OF HORN BEETLE LARVAE (*Oryctes rhinoceros* L.)
AND THEIR APPLICATION IN THE PRODUCTION OF BHIIOETANOL
FROM EMPTY OIL PALM BUNCHES

**RISKAWATI
H012202004**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI USUS
LARVA KUMBANG TANDUK (*Oryctes rhinoceros* L.) SERTA
APLIKASINYA DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Kimia

Disusun dan diajukan oleh

**RISKAWATI
H012202004**

Kepada

**PROGRAM MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

TESIS

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI USUS
LARVA KUMBANG TANDUK (*Oryctes rhinoceros* L.) SERTA
APLIKASINYA DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

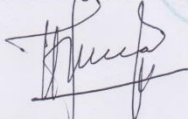
RISKAWATI

NIM: H012202004

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Kimia Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 14 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

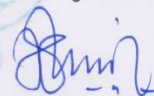
Menyetujui

Pembimbing Utama

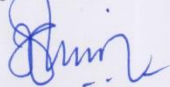


Dr. Seniwati Dali, M.Si
NIP. 195812311988032003

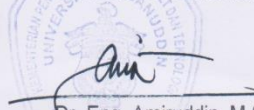
Pembimbing Pendamping



Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 196203201987112001

Ketua Program Studi
Magister Kimia

Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 196203201987112001

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin

Dr. Eng. Amiruddin, M.Si
NIP. 197205151997021002

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN KELIMPAHAN HAK CIPTA**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riskawati
Nim : H012202004
Program Studi : Kimia

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Usus Larva Kumbang Tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.) Serta Aplikasinya dalam Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Dr. Seniwati Dali, M.Si sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal Molekul sebagai artikel dengan judul "*Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from Gut of Horn Beetle Larvae (Oryctes rhinoceros L.)*".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 14 Agustus 2023



Riskawati
NIM: H012202002

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI USUS LARVA KUMBANG TANDUK (*Oryctes rhinoceros* L.) SERTA APLIKASINYA DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains. Shalawat dan salam kepada Nabi besar Muhammad S.A.W.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian tesis ini, terutama kepada Ibu **Dr. Seniwati Dali, M.Si.** selaku penasehat utama dan Ibu **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si.** selaku penasehat pertama, yang sekaligus sebagai peran orang tua di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan arahan yang baik, terutama dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak **Dr. Eng Amiruddin, S.Si., M.Si.** selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.
2. Ibu **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku ketua program studi S2 Ilmu Kimia Universitas Hasanuddin, beserta dosen dan staf yang telah membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan pendidikan ini.
3. Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S., Bapak Dr. Maming, M.Si., dan Ibu Dr. Sitti Fauziah, S.S.i., M.Si., selaku komisi penilai, terima kasih atas masukan berupa kritik dan saran yang telah diberikan demi penyempurnaan penulisan tesis.
4. Ibu Dr. Maswati Baharuddin, M.Si., selaku Dosen Bidang Biokimia UIN ALauddin Makassar atas masukan dan arahan selama melakukan penelitian beserta seluruh Analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk Ibu Fitria Azis, S.Si. selaku analis Laboratorium Biokimia UIN Alauddin Makassar, atas bantuan serta arahnya selama penelitian berlangsung. Terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.

5. Bapak Irsan dan Ibu Riski Mahira, S.Si., selaku staf Program Studi S2 Kimia yang selalu membantu dan memberikan masukannya dalam penyelesaian administrasi.
6. Rekan partner peneliti Biokimia Sahrani, Terima kasih atas bantuan yang tak terhingga.
7. Direktur, Partner kerja serta teman-teman Angkatan Pascasarjana Kimia 2020 Genap, terima kasih atas kerjasama, semangat, dan penghibur dikala suka dan duka.
8. Ucapan terima kasih kepada analis Laboratorium Penelitian RS Universitas Hasanuddin yang telah membimbing dan memberi arahan selama penelitian berlangsung serta semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian ini, terima kasih.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayah Bapak Jufri dan Ibu Nurfaikah, atas segala do'a serta motivasi yang tidak mengenal kata lelah. Suamiku, Muhammad Ischak, S.Sos., M.Sos. dan Anakku Afizah Ghania Ischak yang senantiasa mendukung, mendampingi dan menjadi penyemangat selama proses penyelesaian. Saudara(i)ku Supriadi, Musdalifah, S.Pd., M.Pd., Nur Taufiq, Risno, S.Pd., M.Pd. yang senantiasa memberi semangat, juga membantu dalam hal finansial. Begitupun kepada saudara(i) ipar Irmawati, S.Ak., Sriwahyuningsih, S.Pd., Hj. Rahmawati dan Marhalim umar, S.Pd. yang telah membantu dan mendukung proses penyelesaian. Semoga Allah senantiasa meridhoi, melimpahkan rahmat-Nya berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah.

Penulis sadar bahwa laporan tesis ini tidak sempurna dan banyak kekurangan baik materi maupun teknik penulisannya, karena sejatinya kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Oleh karena itu, penulis berharap saran dan kritikan yang bersifat membangun dari pembaca, dan semoga dapat memberikan manfaat bagi siapa saja dalam pengembangan ilmu pengetahuan kimia khususnya bidang biokimia.

Makassar, 14 Agustus 2023

Penulis

ABSTRAK

Riskawati. *Isolasi dan karakterisasi enzim selulase dari usus larva kumbang tanduk (oryctes rhinoceros L.) Serta aplikasinya dalam produksi bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit*
(dibimbing oleh Seniwati Dali dan Hasnah Natsir)

Isolasi dan karakterisasi bakteri selulolitik penghasil enzim selulase dari sumber usus larva kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros L.*). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesies isolat, mengisolasi, mengidentifikasi bakteri simbiosis dari usus larva kumbang tanduk, dan mengkarakterisasi enzim selulase serta mengaplikasikan dalam produksi bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit sebagai bahan baku. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan meliputi isolasi dan skrining bakteri, karakterisasi isolat bakteri secara makroskopik dan mikroskopik, uji biokimia isolat bakteri terpilih, uji aktivitas enzim, pengukuran kadar protein, pemurnian, karakterisasi enzim selulase dan aplikasi enzim selulase ekstrak kasar. Hasil isolasi dan skrining bakteri dari usus larva kumbang tanduk diperoleh 5 isolat bakteri teridentifikasi mampu menghasilkan enzim selulase berdasarkan karakteristik. Isolat bakteri terpilih yaitu PES3 dan PES5 termasuk spesies *Acinetobacter junii* dan *Pseudomonas guguanensis*. Enzim selulase ekstrak kasar dikarakterisasi dan diperoleh kondisi optimum pada pH, suhu 65°C dengan konsentrasi pati 4%. Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh kadar etanol dengan waktu retensi 1,275 yaitu estimasi area sekitar 0,6%.

Kata Kunci : *Acinetobacter junii*, bioetanol, *O. rhinoceros*, *pseudomonas guguanensis*, selulosa.

ABSTRACT

Riskawati. *Isolation and characterization of cellulase enzymes from the gut of horn beetle larvae (Oryctes rhinoceros L.) and its application in the production of bioethanol from empty oil palm bunches*
(supervised by Seniwati Dali and Hasnah Natsir)

Isolation and characterization of cellulolytic bacteria producing cellulase enzymes has been carried out from the intestinal source of horn beetle larvae (*Oryctes rhinoceros* L.). This study aims to determine isolate species, identify symbiont bacteria from gut of horn beetle larvae, and characterize cellulase enzymes and apply in the production of bioethanol from empty oil palm bunches as raw materials. This research was carried out in several stages including isolation and screening of bacteria, macroscopic and microscopic characterization of bacterial isolates, biochemical test of selected bacterial isolates, enzyme activity test, measurement of protein levels, purification, characterization of cellulase enzyme and application of crude extract cellulase enzyme. The results of isolation and screening of bacteria from the intestines of horn beetle larvae obtained 5 isolates of bacteria indicated to be able to produce cellulase enzymes based on characteristics. The selected bacterial isolates PES3 and PES5 include the species *Acinetobacter junii* and *Pseudomonas guguanensis*. The crude extract cellulase enzyme was characterized and obtained optimum conditions at pH 8, temperature 65°C with starch concentration of 4%. Based on the measurement result obtained ethanol content with a retention time of 1.275 which is an estimated area of about 0.6%.

Keyword: *Acinetobacter junii*, bioethanol, *O. rhinoceros*, *pseudomonas guguanensis*, cellulose.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Larva Kumbang Tanduk (<i>Oryctes rhinoceros</i> L.).....	6
2.2. Bakteri Selulolitik.....	8
2.3. Ensim Selulase.....	9
2.4. Selulosa.....	12
2.5. Kelapa Sawit (<i>Elaeis guineensis</i> J.).....	14
2.6. Tahap Fraksinasi dengan ammonium sulfat dan Dialis.....	16

2.7. Bioetanol.....	17
2.8. Kerangka Pikir dan Hipotesis.....	19

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu Dan Tempat Penelitian	21
3.2. Alat dan Bahan.....	21
3.2.1. Alat Penelitian.....	21
3.2.2. Bahan Penelitian	22
3.3. Prosedur Kerja.....	22
3.3.1. Pengambilan Sampel Larva Kumbang Tanduk.....	22
3.3.2. Pembuatan Media.....	23
3.3.3. Isolasi Bakteri Simbion Penghasil Enzim Selulase	24
3.3.4. Pemurnian Isolat Bakteri Penghasil Selulase	24
3.3.5. Skrining Isolat Bakteri Selulolitik.....	24
3.3.6. Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri Secara Makroskopik.....	25
3.3.7. Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Enzim Selulase Secara Mikroskopik.....	25
3.3.8. Uji Biokimia Isolat Bakteri Simbion Larva Kumbang Tanduk Terpilih (PES1, PES2, PES3, PES4, PES5).....	26
3.3.9. Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Larva Kumbang Tanduk PES3 dan PES5.....	27
3.3.10. Produksi Enzim Selulase.....	29
3.3.11. Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Larva Kumbang Tanduk.....	29
3.3.12. Fraksinasi Enzim Selulase dari Bakteri Simbion Larva Kumbang Tanduk dengan ammonium sulfat.....	29
3.3.13. Dialisis Enzim Selulase dengan Membran Selofan.....	30
3.3.14. Uji Aktivitas Enzim Selulase.....	30

3.3.15. Pengukuran Kadar Protein.....	31
3.3.16.. Produksi Bioetanol dari Hidrolisis TKKS dengan Selulase	31
3.3.17. Karakterisasi Bioetanol	32
BAB IV PEMBAHASAN	
4.1. Hasil Isolasi dan Karakter Morfologi dari Usus Larva Kumbang Tanduk (<i>Oryctes rhinoceros</i>).....	33
4.2. Skrining dan Uji Kualitatif Bakteri Selulolitik Penghasil Enzim Selulase dari Usus Larva Kumbang Tanduk	34
4.3. Karakteristik Fisiologi dan Biokimia Isolat Bakteri dari Usus Larva Kumbang Tanduk	37
4.4. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri <i>Pseudomonas guguanensis</i>	40
4.5. Identifikasi Gen 16S rRNA Molekular Assay Bakteri Selulolitik PES3 dan PES5	41
4.6. Karakterisasi Enzim Selulase Ekstrak Kasar.....	45
4.7. Fraksinasi ekstrak kasar enzim selulase dari bakteri <i>P. guguanensis</i> PES5 dengan ammonium Sulfat.....	49
4.8. Aplikasi Enzim Selulase Ekstrak Kasar (<i>Pseudomonas guguanensis</i>) dalam produksi bioetanol dari Limbah TKKS.....	50
4.9. Karakterisasi Bioetanol dari TKKS.....	53
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	56
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Hasil karakterisasi morfologi isolat bakteri terpilih	34
2.	Hasil pengamatan indeks selulolitik dengan pewarnaan congo red	36
3.	Hasil uji biokimia isolat terpilih penghasil enzim selulase	38
4.	Aktivitas enzim selulase isolat terpilih dengan Metode DNS	40
5.	Aktivitas spesifik ekstrak kasar dan hasil pemurnian enzim selulase dari bakteri <i>Pseudomonas guguansensis</i>	50
6.	Hasil produksi bioetanol dari beberapa penelitian dengan berbagai sumber bahan baku	55

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Larva kumbang tanduk (<i>Oryctes rhinoceros</i> L.)	6
2. Siklus hidup <i>Oryctes rhinoceros</i> L.	7
3. Deskripsi skematik pemecahan struktur selulosa dengan tiga jenis selulase	11
4. Struktur selulosa ikatan alfa	13
5. Struktur selulosa ikatan beta	13
6. Buah kelapa sawit	15
7. Tandan kosong kelapa sawit	15
8. Persentase produksi bioetanol dunia	17
9. Skema kerangka piker penelitian	20
10. Hasil pewarnaan zona bening dengan congo red	35
11. Ikatan antara congo red dan selulosa	36
12. Hasil pewarnaan gram isolat dengan perbesaran 1000x	37
13. Reaksi hidrolisa laktosa menjadi galaktosa dan glukosa	40
14. Reaksi DNS dengan gula pereduksi pada uji aktivitas enzim selulase	41
15. Hasil PCR isolate PES3 dan PES5 menggunakan primer 16S rRNA	42
16. Pohon filogenetik isolate PES3 yang diperoleh database NCBI berdasarkan urutan Gen 16S rRNA	43
17. Pohon filogenetik isolate PES5 yang diperoleh database NCBI berdasarkan urutan Gen 16S rRNA	43
18. Pengaruh pH terhadap aktivitas selulase pada suhu 37 °C	45
19. Pengaruh suhu terhadap aktivitas selulase pada pH 8	46
20. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas selulase pada pH 8, suhu 65 °C	48
21. Mekanisme pemutusan lignin	51
22. Spektra FTIR hasil IR bioetanol dari TKKS	53
22. Kromatogram GC-MS bioetanol hasil fermentasi glukosa	

TKKS pada waktu retensi 1.275	54
-------------------------------	----

DAFTAR LAMPIRAN

1. Bagan kerja isolasi dan skrining bakteri simbion dari larva kumbang tanduk	63
2. Bagan kerja karakterisasi bakteri penghasil selulase secara makroskopik, mikroskopik, dan uji biokimia	64
3. Bagan kerja produksi enzim selulase	65
4. Penentuan dan perhitungan aktivitas enzim selulase secara kuantitatif	66
5. Bagan kerja pemurnian enzim selulase	68
6. Penentuan dan perhitungan aktivitas enzim dan kadar protein selulase setelah pemurnian	71
7. Bagan kerja karakterisasi enzim selulase dari larva kumbang tanduk	74
8. Bagan kerja aplikasi enzim selulase ekstrak kasar dalam produksi bioetanol dari Tkks	74
9. Hasil karakterisasi bioetanol	76
10. Tabel kejenuhan ammonium sulfat pada suhu 4 °C	78
11. Hasil sequencing 16S rRNA reserved dari bakteri isolat PES3 dan PES5	79
12. Lampiran Gambar	81

DAFTAR ARTI SINGKATAN

SIMBOL/SINGKATAN	ARTI/KETERANGAN
BLAST	<i>Basic Local Aligmnet Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CPO	<i>Crude Palm Oil</i>
DNS	Dinitrosalysilic Acid
EBT	Energi Baru dan Terbarukan
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetat
Fp	Faktor Pengenceran
MR-VP	Methyl red- Voges proskaeur
mU	Mili Unit
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PES	Penghasil Enzim Selulase
rRNA	Ribosome ribonucleid acid
SCA	Simon Citrate Agar
SHF	<i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>
TKKS	Tandan Kosong Kelapa Sawit
TSIA	Triple Sugar Iron Agar
U	Unit

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Energi baru terbarukan (EBT) dunia masih didominasi oleh negara maju, baik sektor publik maupun swasta. Indonesia sebagai negara berkembang masih memiliki ketergantungan terhadap sumber bahan bakar konvensional batu bara dan minyak mentah. Hal tersebut salah satu penyebab terjadinya polusi udara dan menipisnya sumber daya tak terbarukan (Gohain, dkk., 2021). Produksi minyak bumi selama 10 tahun terakhir menunjukkan kecenderungan menurun, dari 346 juta barel pada tahun 2009 menjadi sekitar 283 juta barel di tahun 2018. Penurunan produksi tersebut disebabkan oleh sumur-sumur produksi utama minyak bumi yang umumnya sudah tua, sementara produksi sumur baru relatif masih terbatas (Dikin, dkk., 2019).

Berkurangnya produksi energi fosil terutama minyak bumi serta komitmen global dalam pengurangan emisi gas rumah kaca, mendorong pemerintah untuk meningkatkan peran energi baru dan terbarukan secara terus menerus sebagai bagian dalam menjaga ketahanan dan kemandirian energi. Sesuai PP No. 79 Tahun 2014 tentang Kebijakan Energi Nasional, target energi baru dan terbarukan pada tahun 2020 paling sedikit 23% dan 31% pada tahun 2025. Indonesia mempunyai potensi energi baru terbarukan (EBT) yang cukup besar untuk mencapai target energi baru primer tersebut (Dikin, dkk., 2019). Biofuel adalah salah satu EBT yang berasal dari hasil pengolahan biomassa yang sering disebut energi hijau karena asal usul emisinya yang ramah lingkungan sehingga mengurangi terjadinya pemanasan global, adapun jenis biofuel yang umum digunakan saat ini yaitu biodiesel dan bioetanol (Sudiyani, dkk., 2019).

Bioetanol terbuat dari gula atau pati-patian yang biasa disebut sebagai bioetanol generasi pertama, namun bahan-bahan yang digunakan bersumber dari bahan pangan dan pakan, sehingga dapat berdampak pada harga bahan pangan pokok yang melambung tinggi menyebabkan hasil yang diperoleh tidak bernilai ekonomis. Solusi baru yang ditemukan dapat dilihat pada beberapa

peneliti yaitu adanya bahan bakar alternatif dari biomassa lignoselulosa atau biasa disebut bioetanol generasi kedua. Lignoselulosa adalah bagian terbanyak dari suatu tanaman yang tersusun dari hemiselulosa, selulosa, dan lignin serta sedikit kandungan ekstraktif (Putri dan Utami, 2017). Telah banyak yang memanfaatkan limbah biomassa untuk produksi bioetanol, seperti pembuatan bioetanol dari jerami padi menggunakan perbandingan metode sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS) dan metode hidrolisis dan fermentasi terpisah menggunakan delignifikasi asam (Puspitasari, dkk., 2018), produksi bioetanol dari tongkol jagung (Sihotang, dkk., 2018), pembuatan bioetanol dari pelepah kelapa sawit (Ahmad, dkk., 2020), dan produksi bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit menggunakan hidrolisis enzimatis dengan enzim selulase dengan metode pemurnian adsorpsi berupa zeolit (Anugrah, dkk., 2020). Menurut Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pertamina dan lembaga terkait bahwa salah satu sumber selulosa yang saat ini dianggap memiliki potensi besar sebagai penghasil bioetanol adalah limbah tandan kosong kelapa sawit (TKKS).

Tandan Kosong Kelapa Sawit adalah limbah industri pengolahan kelapa sawit yang masih banyak menumpuk terutama pada lahan kebun kelapa sawit tersebut. Setiap tandan mengandung 62-70% buah dan sisanya adalah tandan kosong yang belum termanfaatkan secara optimal (Kamal, 2015: 63). TKKS mengandung senyawa kimia yaitu 45,95% selulosa, 22,85% hemiselulosa dan lignin sebesar 16,49% (Sidebang, 2008). Produksi bioetanol dari limbah TKKS melalui beberapa proses, salah satunya adalah tahap pretreatment untuk memisahkan lignin dari selulosa (Anugrah dkk., 2010).

Selulosa merupakan polimer dari β -glukosa dengan ikatan β -1-4 antara unit-unit glukosa. Selulosa dapat ditemukan pada dinding sel dan serat tumbuhan, menurut penelitian Mood, dkk. (2013) beberapa jenis biomassa dengan kadar selulosa tinggi yaitu, batang jagung 25,43%, bonggol jagung 33,10%, batang tembakau 51,55%, jerami padi 33-38%, kedelai 33%, ampas tebu 44,43% dan TKKS sebesar 40,52%. Mikrofibril selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian kristal dan sisanya bagian amorf. Ikatan β -1,4-glikosida pada selulosa dapat dihidrolisis secara kimiawi menggunakan asam maupun secara enzimatis dengan selulase (Anugrah, dkk., 2020). Menurut seorang peneliti yang melakukan riset pada salah satu pabrik bioetanol di daerah Sumatra, bioetanol

dari bahan baku TKKS dengan proses hidrolisis enzim dan fermentasi menghasilkan kadar etanol sebesar 99,5% (Pratiwi, 2018).

Enzim selulase merupakan jenis enzim yang banyak digunakan dan memiliki nilai ekonomi tinggi dan prospek penjualan yang cukup besar pada pasar global. Besarnya potensi tersebut menjadikan permintaan terhadap enzim ini meningkat pesat. Oleh karena itu, para ilmuwan terus melakukan riset untuk memperoleh sumber selulase baru serta terus melakukan inovasi teknologi enzimatisnya. Selulase memungkinkan pelepasan selobiosa dan glukosa (Nunes, 2018), sehingga mampu menghidrolisis kandungan selulosa menjadi glukosa dengan cara memutuskan ikatan 1,4- β -glikosidik. Enzim selulase secara anaerob dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol yaitu perubahan biomassa menjadi biofuel dengan proses fermentasi atau dapat digunakan pada proses pembuatan alkohol sebagai pengganti bahan kimia yang mengandung selulosa (Nadhifah, 2021).

Sifat dari enzim selulase dan enzim lainnya adalah spesifik terhadap substrat sehingga reaksi kimia yang terjadi akan menghasilkan produk sesuai dengan spesifisitas enzim dengan substratnya. Selain itu, aktivitas dari enzim selulase dipengaruhi oleh beberapa sifat seperti pH, suhu, substrat dan konsentrasi enzim (Chasanah, dkk., 2013). Bakteri penghasil enzim selulase ini dapat ditemukan atau diisolasi dari berbagai sumber yang ada di alam, seperti hewan, tumbuhan, jamur, alga, maupun mikroorganisme lainnya (Nunes, 2018).

Bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase dapat diisolasi dari beberapa jenis makhluk hidup, seperti pada keong sawah *Pila ampullacea* (Hamzah, 2018), produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger* (Purkan, dkk., 2015), dan penelitian sebelumnya oleh Sijabat (2018) yaitu produksi enzim pada rayap jenis insekta, dijelaskan bahwa kemampuan rayap dalam mendegradasi selulosa ini dimungkinkan karena keberadaan bakteri selulolitik dalam ususnya.

Pencernaan dan penyerapan bahan makanan berlangsung pada bagian saluran pencernaan yang dibagi tiga: usus depan, usus tengah, usus belakang, proses pencernaan makanan berlangsung di usus belakang, di bagian ini terdapat sejumlah bakteri simbiosis yang mengeluarkan enzim selulase untuk menguraikan selulosa (Sijabat, 2018). Simbiosis ini terjadi secara seimbang, dimana saluran pencernaan tersebut merupakan tempat hidup bagi bakteri selulolitik dan mampu melanjutkan metabolisme kehidupannya dari hasil selulosa

yang dihidrolisisnya berupa glukosa (Ristiati dkk., 2016). Hal yang sama juga dapat ditemukan pada jenis insekta lain seperti larva kumbang tanduk yang mengandung bakteri selulolitik pada bagian usus belakang (Maysaroh, 2018).

Larva kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros*) adalah serangga hama yang dapat menyebabkan kerusakan pada tanaman bahkan menyebabkan penurunan produksi kelapa sawit (Sijabat, 2018). Serangga ini juga mengkonsumsi bahan batang tanaman dan tandan kosong sehingga dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan pada tanaman (Susanto, 2005). Larva ini berkembang biak atau bertelur di tempat sampah, daun-daun yang telah membusuk dan mengering, cercaan sampah dari kayu palem (Bedford, 2013), tandan kosong kelapa sawit (Maysaroh, 2018), batang kelapa yang telah membusuk, dan serbuk kayu yang dekat dengan pohon kelapa (Moore, 2011).

Hasil dari penelitian sebelumnya menemukan bahwa terdapat dua spesies bakteri pada larva *Oryctes rhinoceros* yaitu *Bacillus siamensis* dan *Bacillus stratosphericus* yang digunakan sebagai pengomposan limbah biomassa, karena kemampuan mikroba tersebut sebagai penghasil enzim selulase (Sijabat, 2018). Dini, dkk., (2018) telah melakukan isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dan lignolitik dari usus *Oryctes rhinoceros* pada tandan kosong kelapa sawit dan menemukan adanya genus *Bacillus* sp. kemudian digunakan sebagai bakteri pengomposan. Hal tersebut menjelaskan bahwa bakteri yang terkandung pada larva yang sama, namun sumber makanan atau selulosa yang dikonsumsi berbeda akan menghasilkan jenis bakteri yang berbeda. Berdasarkan uraian tersebut, maka dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi enzim selulase dari larva kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.), kemudian enzim yang diperoleh diaplikasikan untuk menghidrolisis limbah TKKS dalam produksi bioetanol.

1.2 Rumusan Masalah

1. spesies mikroba apa pada larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.) yang mampu menghasilkan enzim selulase?
2. bagaimana aktivitas dan karakteristik enzim selulase yang dihasilkan dari mikroba larva kumbang tanduk (*O.rhinoceros* L.)?

3. bagaimana potensi enzim selulase dari mikroba larva kumbang tanduk dalam menghidrolisis TKKS menjadi bioetanol?
4. berapa kadar bioetanol yang dihasilkan dari hidrolisis TKKS menggunakan enzim selulase?

1.3 Tujuan Penelitian

1. melakukan isolasi dan identifikasi untuk mengetahui spesies mikroba dari larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.) yang mampu menghasilkan enzim selulase.
2. melakukan uji aktivitas dan karakterisasi enzim selulase dari larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.).
3. menganalisis potensi enzim selulase dalam menghidrolisis TKKS untuk menghasilkan bioetanol.
4. Melakukan pengukuran kadar bioetanol yang dihasilkan dari hidrolisis TKKS menggunakan enzim selulase

1.4 Manfaat Penelitian

1. memberikan informasi bahwa larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.) mengandung bakteri selulolitik penghasil enzim selulase.
2. memberikan informasi bahwa enzim selulase dapat digunakan untuk menghidrolisis limbah biomassa TKKS dalam produksi bioetanol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Larva Kumbang Tanduk (*Oryctes rhinoceros*)

Kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.) termasuk hama pada tanaman kelapa sawit karena menggerek pangkal tajuk tanaman dan dapat mematikan tanaman. Peningkatan populasi *Oryctes rhinoceros* dipengaruhi oleh ketersediaan tempat berkembang biaknya yaitu pada kotoran hewan, sampah organik, batang kelapa yang sudah lapuk dan sisa-sisa batang tebu merupakan sumber bahan organik dan tempat berkembang biak yang disukai hama *O. rhinoceros*. Oleh sebab itu, ledakan populasi sering terjadi di pekebunan kelapa yang kotor (Sasaw, dkk: 2008).



Gambar 1. Larva Kumbang Tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.)

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insekta
Ordo	: Coleoptera
Famili	: Scarabaeidae
Genus	: <i>Oryctes</i>
Spesies	: <i>Oryctes rhinoceros</i> L.

Larva *O. rhinoceros* lebih menyukai Media serbuk kelapa dengan kombinasi kotoran sapi untuk berkembang biak dibandingkan dengan serbuk kayu yang dikombinasikan dengan kotoran sapi, populasi larva yang didapat pada perlakuan serbuk kelapa kombinasi kotoran sapi mencapai 2,98% (42 ekor larva) dan pada perlakuan serbuk kayu kombinasi kotoran sapi hanya mencapai 0,71% atau dapat dikatakan tidak ada populasi larva (Sasaw dkk., 2008). Kemampuan serangan *O. rhinoceros* yang diamati Jumlah dan varietas tanaman kelapa di tiga desa memiliki dominansi yang berbeda, yaitu ditemukan sebanyak 79% pada varietas kelapa (Pertami, 2016).

Siklus hidup kumbang tanduk sekitar 4-9 bulan, namun pada umumnya 4,7 bulan. Telur yang dihasilkan sekitar 30-70 butir, dan menetas setelah kurang lebih 12 hari. Telur yang berwarna putih, mula-mula bentuknya jorong, kemudian berubah agak membulat. Telur yang baru diletakkan panjangnya 3 mm dan lebar 2 mm (Vandaveer, 2004). Kumbang tanduk *Oryctes rhinoceros* menyebabkan kerusakan dengan cara melubangi pangkal pelepah muda pada tanaman (Silitonga, 2013).



Gambar 2. Siklus Hidup *Oryctes rhinoceros* L.
(Mohan, 2002)

Telur yang dihasilkan membentuk Stadia dan selanjutnya adalah larva yang menyerupai ulat, warna putih agak kekuningan, kaki (tungkai) bagian depan dan kepala atau caputnya berwarna coklat agak gelap. Usia larva secara keseluruhan berkisar antara 80-200 hari. Proses perubahan menjadi stadia pupa, sebelum itu terjadi fase diam yang disebut *pre-pupa* selama 8-13 hari. Pupa tersebut berwarna coklat agak cerah dengan model seperti serangga dewasa

(kumbang). Melalui masa pupa selama 17-30 hari, serangga ini berubah stadia menjadi serangga dewasa berupa kumbang dengan sayap depan mengeras (elytra). Kumbang dapat bertahan hidup kurang lebih 6-7 bulan dengan memakan bagian tanaman hidup, seperti pucuk sawit (Mohan, 2002).

2.2 Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik adalah jenis bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi substrat yang mengandung selulosa. Bakteri ini banyak ditemukan pada berbagai ekosistem di alam, seperti lahan pertanian, tanah gambut, saluran pencernaan ruminansia, sel tubuh maupun saluran pencernaan rayap, saluran pencernaan hewan invertebrata, serasah daun dan berbagai sumber bakteri lainnya (Slamet, 2016). Bakteri selulolitik mampu mengubah selulosa menjadi gula yang lebih sederhana untuk digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi metabolisme dan pertumbuhannya (Lehninger, 1982). Bakteri selulolitik diseleksi dengan menganalisis aktivitas enzim (screening enzimatis). Enzim selulase berperan dalam proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Selulosa terhidrolisis melalui sistem reaksi kompleks. Reaksi kompleks tersebut yakni transfer enzim kepermukaan substrat, adsorpsi enzim dan pembentukan kompleks substrat enzim, hidrolisis selulosa, transfer selodextrin glukosa serta selobiosa, kemudian terakhir hidrolisis selodextrin dan selobiosa menjadi glukosa (Asari, 2017).

Degradasi selulosa oleh mikroorganisme selulolitik menghasilkan serat, seperti yang disebutkan oleh Zimmerman (2004) bahwa serat alam yang mengandung lignoselulosa berasal dari kayu dan non-kayu (bambu, sisal, kenaf, rami, dan lain-lain) merupakan bahan baku yang memiliki ketersediaan sangat besar di muka bumi. Proses penguraian selulosa sangat bergantung pada keberadaan mikroorganisme seperti bakteri pendegradasi selulosa. Bakteri memiliki peranan penting dalam proses dekomposisi bahan organik. Aktivitas bakteri mampu meningkatkan ketersediaan unsur hara melalui proses mineralisasi karbon dan asimilasi nitrogen (Blum, 1988).

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang dapat mendegradasi selulosa. Beberapa bakteri pendegradasi selulosa adalah bakteri mesofilik dan termofilik aerobik (*Cellulomonas sp*, *Celvibrio sp*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora*

sp), bakteri mesofilik dan termofilik anaerobik (*Acentivibrio cellulolyticus*, *Biacteriodes cellulosolvent*, *Bacteriodes succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* dan *Clostridium termocellum*). Bakteri pendegradasi selulosa termofil dapat menghasilkan enzim selulase yang relatif stabil (tahan pada kondisi asam atau basa dan pada suhu tinggi hingga 90°C) (Bhat dan Bhat, 1997).

Menurut Meryandini, dkk., (2009), setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase berbeda, bergantung pada gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Pemanfaatan bakteri sebagai penghasil enzim dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan antara lain: biaya produksi murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, mempunyai kecepatan tumbuh tinggi serta mudah dikontrol, dan telah dikemukakan bahwa selulolitik ini termasuk bakteri yang memiliki pertumbuhan sangat cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi enzim lebih pendek (Baharuddin, dkk., 2014).

Penelitian sebelumnya yang dikemukakan oleh Hidayat (2013), bahwa bakteri selulolitik dapat diisolasi dari saluran pencernaan larva *Oryctes rhinoceros*, hasil identifikasi ditemukan jenis bakteri *Basillus pumilus* dan *Basillus subtilis*, *Basillus* sp. (Dini, dkk., 2018), Bakteri selulolitik juga dapat diisolasi dari ulat sutera (*Bombyx mori*) dengan hasil identifikasi yaitu terdapat bakteri *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* (Anand dkk., 2010). Isolasi bakteri selulolitik dari larva *cossus-cossus* dengan jenis bakteri *Basillus circulans* (Baharudddin M, dkk., 2016).

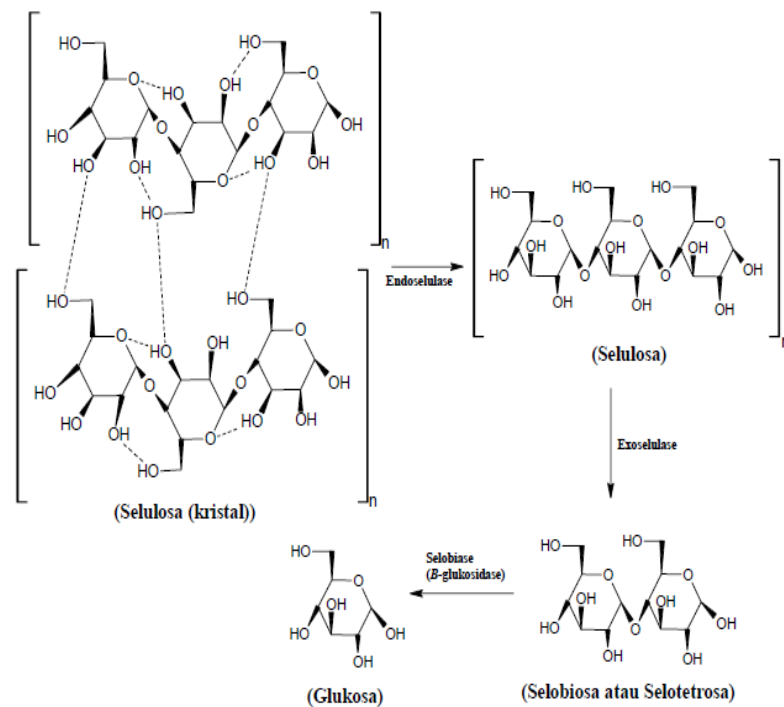
2.3 Enzim Selulase

Selulase salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroba di luar sel atau yang biasa disebut enzim ekstraseluler. Produksi enzim mikroorganisme dapat dikontrol untuk meningkatkan produktivitas enzim oleh mikroorganisme tersebut. Pada selulase yang akan dihasilkan bergantung pada hubungan kompleks yang melibatkan berbagai variasi faktor antara lain pH, ukuran inokulum, suhu, waktu pertumbuhan dan aditif medium. Selulosa mengandung polimer karbohidrat terbanyak dengan ikatan β (1- 4) glikosida. Selulosa dapat didegradasi oleh selulase yang diproduksi oleh jamur, bakteri, tumbuhan dan ruminansia (Safaria, dkk., 2013).

Enzim selulase dapat digunakan untuk membantu proses produksi kertas, kain, makanan, dan obat-obatan. Bidang lingkungan, enzim mampu menguraikan limbah tanaman hingga menghasilkan gula fermentasi. Selulase juga dapat diaplikasikan pada industri kertas yaitu untuk menghaluskan bubur kertas, sedangkan pada industri tekstil digunakan untuk menjaga warna dan kecerahan kain (Nadhifah, 2021).

Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan hidrolisis secara kimiawi dan fisik dalam hal spesifitas pemutusan rantai polimer pati dan selulosa. Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu, tekanan rendah, pH netral), serta proses enzimatik merupakan proses yang ramah lingkungan (Gunam, et al. 2011). Sifat enzim adalah spesifik terhadap substratnya sehingga reaksi kimia yang terjadi akan menghasilkan produk sesuai dengan spesifitas enzim dengan substrat. Enzim terdiri dari berbagai jenis dengan pemanfaatannya yang berbeda-beda (Susanti dan Fibriana, 2017). Enzim yang dapat digunakan untuk hidrolisis selulosa adalah enzim selulase.

Enzim selulase merupakan enzim yang sangat berperan penting dalam biokonversi limbah-limbah organik yang berselulosa menjadi glukosa, dan lain-lain (Susanti dan Fibriana, 2017). Ada tiga jenis enzim yang berperan dalam proses hidrolisis selulosa yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase dan 1,4- β -D-glukosidase (Baharuddin, dkk., 2014). Endo-1,4- β -D-glukanase adalah salah satu enzim yang berfungsi untuk memotong secara acak rantai-rantai glukosa sangat panjang menjadi pendek. Ekso-1,4- β -D-glukanase merupakan suatu enzim yang berfungsi memotong setiap ada dua rantai glukosa (selobiose) dan 1,4- β -D-glukosidase yaitu enzim yang berfungsi memotong selobiose menjadi potongan-potongan atau molekul-molekul glukosa yang paling sederhana (Irawati, 2016) seperti pada Gambar 3. Beberapa faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi proses kerja atau aktivitas dari enzim yaitu konsentrasi enzim, inhibitor, suhu, aktivator dan konsentrasi substrat. Suhu optimum untuk aktivitas selulase berbeda-beda bergantung pada lingkungan dan jenis mikroorganisme penghasil enzim tersebut (Bahri, dkk., 2012).



Gambar 3. Deskripsi Skematik Pemecahan Struktur Selulosa dengan Tiga Jenis Selulase (Saropah, dkk., 2012)

Selulase sebagai enzim hidrolitik, memasukkan molekul air ke dalam substrat dalam serangan nukleofilik. Ketiga jenis enzim (endoglukanase, eksoglukanase, -glukosidase) bekerja secara sinergis, menggunakan mekanisme kerja kimia yang sama, yaitu katalisis asam. Namun, jenis katalisis ini dapat terjadi dalam dua cara berbeda: mekanisme pembalik dan penahan. Jalur selulase bekerja bergantung pada jarak antara situs katalitik. Dalam mekanisme pembalik, tidak ada pembentukan kompleks enzim-substrat sepanjang reaksi. Hidrolisis dilakukan secara langsung dengan deprotonasi berurutan. Mekanisme penahan dilakukan oleh ujung karboksilat dari residu asam amino, yang bertindak sebagai basa nukleofilik dan menyerang ikatan glikosidik, memutuskan ikatan dan mengikat dirinya pada fraksi oligomer, membentuk kompleks enzim-substrat (Siquera, dkk., 2020).

Jenis substrat yang berbeda akan mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Nadhifah (2021) menggunakan uji aktivitas dengan tiga substrat yang berbeda, yaitu bekatul, dedak dan onggok. Hasil tertinggi diperoleh pada dedak, perbedaan disebabkan

karena kandungan selulosa yang terdapat pada substrat tidak sama. Konsentrasi substrat yang rendah menyebabkan sisi aktif enzim hanya menampung sedikit substrat, bila konsentrasi substrat diperbesar maka semakin banyak substrat yang akan bergabung pada sisi aktif enzim. Namun pada penelitian sebelumnya yang menggunakan konsentrasi substrat diatas 2,5% enzim akan mengalami kejenuhan artinya enzim telah dipenuhi dengan substrat (Irawati, 2016).

Karakteristik enzim yang lain juga mempengaruhi aktivitas enzim seperti suhu, pH dan lainnya. Suhu atau pH optimum untuk memproduksi selulase setiap mikroorganisme bervariasi walaupun mikroorganisme tersebut tergolong dalam spesies yang sama. Suhu optimum *Bacillus pumilus* dalam memproduksi selulase adalah 37°C (Shankhara, dkk., 2011), *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari ladang pertanian memiliki suhu optimum 45°C (Verma, dkk., 2012), *Bacillus subtilis* diisolasi dari kotoran sapi memiliki suhu optimum pada 75°C (Bai, dkk., 2012), *Bacillus* sp. dari tanah sawah memiliki suhu optimum pada 50°C, pH optimum pada 5-6. Enzim selulase yang diisolasi dari keong sawah *Pila ampullacea* memiliki suhu optimum pada 40°C, pH optimum yaitu 5,8 dengan konsentrasi substrat sebesar 2% (Hamzah, 2018).

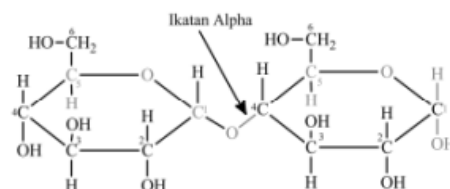
Perkembangan bioteknologi menyebabkan enzim telah banyak digunakan dalam industri pangan dan non pangan. Enzim selulase adalah salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan untuk mengolah limbah industri berselulosa menjadi glukosa, dan enzim ini banyak menarik minat dunia untuk memproduksi bioetanol, jika terjadi kekurangan bahan bakar minyak bumi. Penggunaan enzim dalam industri menuntut persyaratan tertentu antara lain enzim harus stabil pada suhu tinggi dan tahan pH ekstrim (Yanti, dkk, 2015).

2.4 Selulosa

Selulosa adalah komponen utama penyusun biomassa dan merupakan komponen dasar pada dinding sel dan serat yang tersusun dari 1,4- β -glukopiranosida yang memberi kekuatan akan serat. Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, namun bahan lignoselulosa dibagi menjadi tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin, yang mana selulosa dan hemiselulosa adalah komponen yang selalu ditemukan sekitar 70% pada semua biomassa yang terikat secara kuat dengan komponen

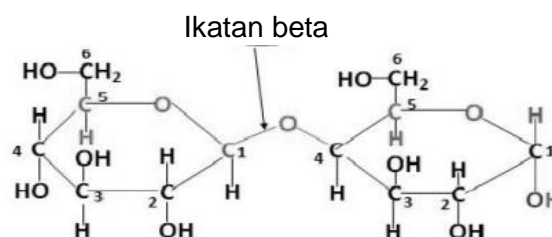
lignin melalui ikatan kovalen dan ikatan hidrogen, sehingga struktur sangat kuat dan tahan terhadap perlakuan yang diberikan (Vasic, dkk., 2021).

Molekul selulosa didalam tumbuhan tersusun dalam bentuk fibril yang terdiri atas beberapa molekul paralel yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit diuraikan (Moniriqsa, 2012). Selulosa dapat dibedakan atas tiga jenis berdasarkan derajat polimerisasi dan kelarutan dalam senyawa natrium hidroksida (NaOH), yaitu selulosa alfa, selulosa beta dan selulosa gamma. Selulosa dapat larut dalam asam pekat (seperti asam sulfat 72%) yang mengakibatkan terjadinya pemecahan rantai tidak larut dalam larutan NaOH 17,5% atau larutan basa kuat dengan derajat polimerisasi 600-1500. Selulosa alfa dipakai sebagai penduga dan atau penentu tingkat kemurnian selulosa. Selulosa alfa merupakan kualitas selulosa yang paling tinggi (murni). Selulosa alfa > 92% memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan baku utama pembuatan propelan dan atau bahan peledak, sedangkan selulosa yang memiliki kualitas bawah digunakan sebagai bahan baku pada industri kertas dan industri sandang/kain. Semakin tinggi kadar alfa selulosa, maka semakin baik mutu bahannya (Sulfida, 2020).



Gambar 4. Struktur selulosa ikatan alfa (Sulfida, 2020)

selulosa beta adalah jenis selulosa berantai pendek, larut dalam larutan NaOH 17,5% atau basa kuat dengan derajat polimerisasi 15-90, dapat mengendap bila dinetralkan. Adapun struktur beta selulosa pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur selulosa ikatan beta (Sulfida, 2020)

sedangkan Selulosa gamma adalah Selulosa yang sama dengan beta selulosa, tetapi derajat polimerisasinya kurang dari 15.

2.5 Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Tanaman kelapa sawit merupakan tanaman tropis berupa pohon yang memiliki batang lurus dari famili *Arecaceae* yang dikenal berasal dari amerika sebagai penghasil minyak (Rosa, 2012). Kelapa sawit memegang peranan penting sebagai pengembang devisa Negara karena merupakan bahan baku pengolahan yang menciptakan nilai tambah di dalam negeri ekspor CPO (Ahmad, 2011). Menurut Rosa (2012) bahwa taksonomi kelapa sawit adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Angiospermae
Ordo	: Monocotyledoneae
Keluarga	: Arecaceae
Sub keluarga	: Cocoideae
Genus	: <i>Elaeis</i>
Spesies	: <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.

Kelapa sawit membutuhkan media tanam yang mempunyai sifat fisik, kimia dan biologi yang baik. Secara umum media pembibitan kelapa sawit menggunakan tanah lapisan atas (topsoil) dengan ketebalan sekitar 10-20 cm dari permukaan tanah yang dicampur dengan pasir maupun bahan organik sehingga didapat media dengan kesuburan yang baik (Napera, 2020). Kelapa sawit termasuk tanaman monokotil yang terdiri atas batang yang lurus, tidak bercabang dan tidak mempunyai kambium, tinggi pohonnya dapat mencapai 15-20 m. Tanaman ini termasuk *monocious*, yaitu bunga jantan dan bunga betina berada pada satu pohon. serta memiliki daun yang diameternya bisa mencapai 5-7 m. Adapun bagian generatifnya yakni bunga yang tumbuh pada umur 12-14 bulan, tetapi baru ekonomis untuk di panen pada umur 2,5 tahun dan buah yang termasuk buah batu yang sessile (*sessile drup*), menempel dan menggerombol pada tandan buah. Jumlah buah per tandan dapat mencapai 1600 buah yang

berbentuk lonjong membulat dan memiliki panjang 2-3 cm dan berat 30 gram (Mangoensoekarjo dan Semangun, 2008).



Gambar 6. Buah kelapa sawit
(Suryana, dkk., 2007)

Kelapa sawit memiliki manfaat yang banyak selain digunakan sebagai bahan pembuatan minyak, juga digunakan sebagai energi alternatif atau bahan bakar pengganti (bioeful) (Masykur, 2013). Limbah cair hasil proses pengolahan kelapa sawit juga dapat digunakan sebagai gas metan dan pupuk cair (kamal, 2015) dan lain sebagainya. Salah satu limbah dari hasil pengolahan kelapa sawit yang dapat ditingkatkan nilainya adalah tandan kosong sawit.

Tandan kosong kelapa sawit (Gambar 7) menunjukkan salah satu limbah yang dihasilkan dari pengolahan kelapa sawit yang ditinjau dari ketersediaan buah segar sawit (Asmawit, 2011). Sebuah pabrik kelapa sawit dengan kapasitas 100 ribu ton tandan buah segar per tahun akan menghasilkan sekitar 6 ribu ton cangkang, 12 ribu ton serabut dan 23 ribu ton tandan buah kosong (Haji, 2013).



Gambar 7. Tandan kosong kelapa sawit
(Kamal, 2015).

Rata-rata produksi tandan kosong kelapa sawit berkisar 22% hingga 24% dari total berat tandan buah segar yang diproses di pabrik kelapa sawit

(Asmawit, 2011). Berdasarkan literatur hasil analisis laboratorium yang sudah ada, bahwa tandan kosong kelapa sawit ini banyak mengandung selulosa sebesar 41,30-46,50%, hemiselulosa sebesar 25,3-33,8% dan juga lignin sebanyak 27,60-32,50% serta mengandung glukosa (Kamal, 2015), sehingga tandan kosong berpotensi untuk dijadikan sebagai pupuk kompos yang kaya akan unsur hara seperti unsur N, P, K, dan Mg sesuai yang dibutuhkan tanaman (Nasution, 2014). Tandan kosong sawit dapat menjadi alternatif sumber bahan baku serat non-kayu untuk pulp dan kertas (Erwinsyah, dkk., 2015). Selain itu, hasil pirolisis tandan kosong kelapa sawit juga dapat menghasilkan asap cair yang mengandung senyawa fenol dari hasil degradasi lignin (Ali, dkk., 2014).

2.6 Tahap Fraksinasi dengan Amonium Sulfat dan Dialisis

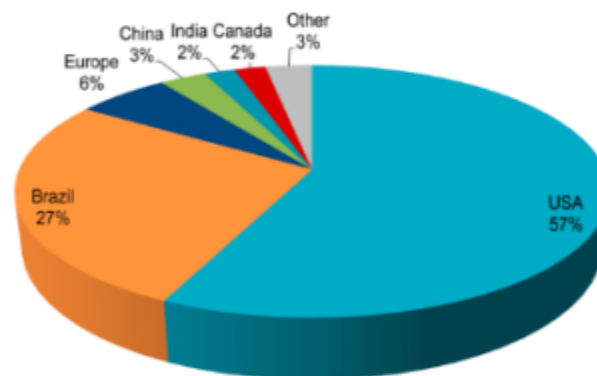
Purifikasi atau pemurnian enzim merupakan salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim. Beberapa metode purifikasi yang dapat dilakukan diantaranya adalah presipitasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Presipitasi amonium sulfat dilakukan untuk mengendapkan pengotor dan menjaga enzim tetap dalam keadaan terlarut, dengan menambahkan sedikit garam amonium sulfat, proses ini disebut *salting in*. Proses presipitasi dengan amonium sulfat sebaiknya diikuti dengan proses dialisis yang dapat menghilangkan sisa garam amonium sulfat dalam sampel (Sulyman, dkk., 2020).

Fraksi dengan aktivitas selulase tertinggi dimurnikan lebih lanjut, dan sisa garam amonium sulfat dihilangkan melalui teknik dialisis menggunakan membran selofan dalam buffer sitrat fosfat. Proses dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan protein enzim yang dimurnikan. Prinsip dialisis adalah difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Konsentrasi buffer di luar membran selofan lebih rendah daripada konsentrasi bufer di dalam membran selofan sehingga amonium sulfat dapat berdifusi ke luar membran selofan dan terpisah dari selulase. Pada tahap dialisis juga terjadi proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran melalui pori membran selofan. Pori ini memungkinkan molekul kecil, seperti pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melintasi membran, sedangkan molekul yang lebih besar, seperti enzim akan tertahan di dalam membran selofan (Sinatari, dkk., 2013).

Selulase yang telah dimurnikan digunakan untuk karakterisasi selanjutnya. Setiap tahap pemurnian selulase dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas spesifik selulase, sehingga dapat diketahui atau dibandingkan tingkat kemurnian pada setiap tahap pemurnian (Hamzah, 2018).

2.7 Bioetanol

Bioetanol (C_2H_5OH) adalah cairan biokimia dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme. Bioetanol merupakan sebuah bahan bakar alternatif yang diolah dari tumbuhan dengan cara fermentasi, dimana memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO_2 hingga 18% (Fauzi, 2011). Etanol (C_2H_5OH) adalah senyawa yang telah banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai pelarut, pencampur, antiseptik, bahan baku kimia, dan bahan bakar. Saat ini banyak pengembangan dalam pembuatan etanol yaitu terbuat dari berbagai bahan baku berupa tumbuh-tumbuhan yang disebut dengan bioetanol (Anugrah, dkk, 2010).



Gambar 8. Persentase produksi bioetanol dunia (Vasic, ddk., 2021)

Besarnya potensi biomassa, banyak yang melakukan perkembangan teknologi untuk konversi biomassa menjadi biofuel yang diketahui dapat menurunkan emisi karbon serta sebagai sumber terbarukan dari bahan organik. Gambar 8 menunjukkan bahwa USA adalah penghasil terbesar bioetanol yaitu 57%, diikuti oleh Brazil yaitu 27%, bagian eropa hanya mewakili sekitar 6%, sedangkan Negara lain masih sekitar 2-3% (Vasic, dkk., 2021).

Bioetanol terdiri atas beberapa macam berdasarkan bahan baku yaitu, bioetanol generasi pertama, bioetanol generasi kedua, dan bioetanol generasi ketiga. Bioetanol generasi pertama adalah yang bahan bakunya berasal dari bahan pertanian mengandung pati atau gula seperti jagung, singkong, gandum, dan tebu, bioetanol generasi kedua adalah yang bahan bakunya berasal dari bahan nabati mengandung holoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) tinggi, dan bioetanol generasi ketiga adalah yang bahan bakunya dari algae baik mikroalga ataupun makroalga (rumput laut). Bioetanol generasi pertama dikhawatirkan akan mengganggu kebutuhan pangan karena bahan bakunya berupa bahan pertanian yang mengandung gula, untuk mengatasi kekhawatiran itu maka bioetanol generasi kedua muncul dengan memanfaatkan bahan nabati yang mengandung selulosa dan hemiselulosa tinggi. Selulosa tidak dapat dicerna oleh manusia, dan banyak limbah pertanian yang memiliki kandungan selulosa tinggi, sehingga produksi bioetanol dari limbah pertanian tidak akan mengganggu kebutuhan pangan (Anugrah dkk., 2020).

Proses produksi bioetanol dimulai dengan delignifikasi biomassa yang akan dihidrolisis. Delignifikasi dilakukan dengan tujuan untuk melepaskan kristalin selulosa sehingga selulosa lebih mudah dihidrolisis dengan enzim yang memecah polimer polisakarida dan monomer gula serta menghilangkan kandungan lignin (Baharuddin, dkk., 2016). Tahap setelah delignifikasi adalah hidrolisis holoselulosa TKKS menjadi gula reduksi seperti glukosa. Hidrolisis bertujuan untuk memecah rantai polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi menggunakan yeast/ragi. Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) maupun enzimatik (Anugrah dkk., 2020).

Proses konversi material lignoselulosa menjadi etanol terbagi menjadi dua proses, yaitu proses SHF dan SSF. Proses SHF merupakan *Separate Hydrolysis and Fermentation*, yaitu proses dimana hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara terpisah (menggunakan reaktor yang berbeda). Sedangkan proses SSF merupakan *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, yaitu proses dimana hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara serempak (Puspitasari dkk., 2018). Semakin lama proses SFS dan konsentrasi ragi yang digunakan maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan dan waktu optimum pembentukan bioetanol semakin besar (Baharuddin dkk., 2016). Proses SSF ini dilakukan dengan menggunakan satu reaktor untuk proses hidrolisis dan

fermentasinya. Keuntungan dari proses ini adalah polisakarida yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakaridanya karena monosakaridanya langsung difermentasi menjadi etanol. Selain itu, penggunaan satu reaktor dalam prosesnya akan mengurangi biaya peralatan yang digunakan (Puspitasari, dkk., 2018).

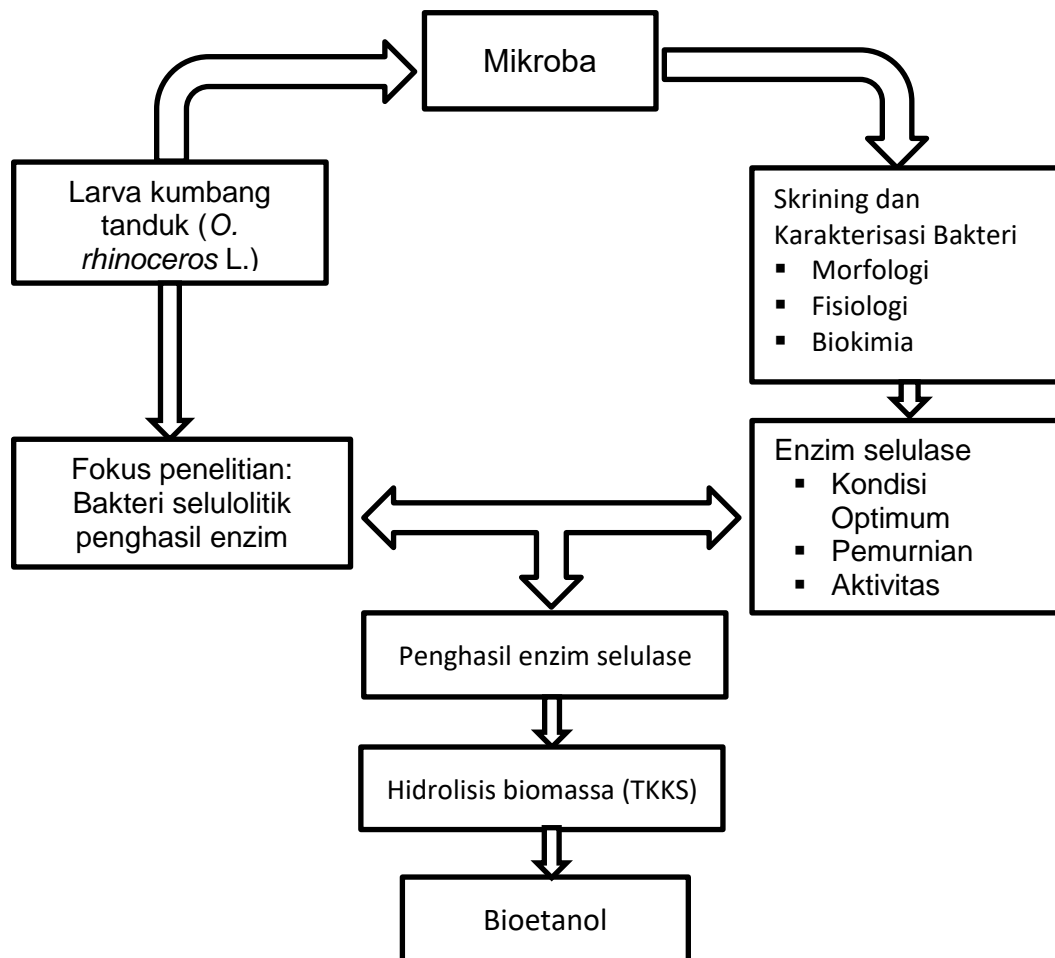
Bioetanol dapat diproduksi dengan menggunakan beberapa metode pada sumber biomassa yang sama ataupun berbeda, seperti penelitian yang dilakukan oleh Baharuddin dkk. (2016) yaitu produksi bioetanol dari jerami padi dengan menggunakan metode SFS (Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak) dengan menghasilkan kadar bioetanol tertinggi pada lama waktu fermentasi 7 hari yaitu 0,242% dan juga produksi bioetanol dari pohon dao dengan metode yang sama menghasilkan kadar bioetanol sebesar 0,978%. Produksi bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit melalui pretreatment asam dan menggunakan metode SFS, kadar etanol yang diperoleh sebesar 0,43 etanol/g selulosa.

2.8 Kerangka Pikir dan Hipotesis

2.8.1 Kerangka Pikir

Bahan bakar fosil di Indonesia semakin berkurang sehingga pemerintah dan masyarakat terus berupaya menghasilkan energi terbarukan. Salah satu solusi yang saat ini dikembangkan sebagai upaya untuk produksi energi terbarukan yaitu dengan memanfaatkan limbah biomassa untuk pembuatan bioetanol. Limbah biomassa yang dapat dimanfaatkan adalah tandan kosong kelapa sawit yang memiliki kandungan selulosa tinggi, selain itu dibutuhkan bantuan katalis untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Terdapat dua cara hidrolisis yang dapat dilakukan yaitu hidrolisis asam dan hidrolisis enzim.

Hidrolisis enzim lebih banyak digunakan karena bersifat ramah lingkungan. Enzim yang berfungsi untuk memutuskan ikatan 1,4-glikosidik pada selulosa adalah enzim selulase. Enzim tersebut dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, hewan, mikroorganisme dan lainnya, salah satunya yaitu dapat diisolasi dari larva kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros*) yang mengandung bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase dengan melalui beberapa tahapan proses. Berikut skema kerangka pikir penelitian yang disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Skema Kerangka Pikir Penelitian

2.8.2 Hipotesis

1. Spesies bakteri dari larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.) berbeda berdasarkan sumber selulosa yang dikonsumsi.
2. Enzim selulase dari mikroba larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros* L.) memiliki nilai aktivitas dan karakteristik tertentu.
3. Enzim Selulase dari larva kumbang tanduk (*O. rhinoceros*) memiliki potensi menghidrolisis TKKS dalam produksi bioetanol.
4. Bioetanol hasil hidrolisis TKKS menggunakan enzim selulase memiliki kadar etanol tertentu.