



## BIOSOLUBILISASI BATUBARA LIGNIT : AKTIVITAS ENZIM MNP, LAC DAN LIP ISOLAT KAPANG INDIGENUS BATUBARA

<sup>1)</sup>Irawan Sugoro, <sup>2)</sup>D. Sasongko, <sup>3)</sup>D. Indriani dan <sup>3)</sup>P. Aditiawati  
<sup>1)</sup> Pusat Aplikasi Teknologi Radiasi – BATAN Jakarta Selatan  
<sup>2)</sup> Departemen Teknik Kimia – Institut Teknologi Bandung  
<sup>3)</sup> Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati - Institut Teknologi Bandung

[irawansugoro@gmail.com](mailto:irawansugoro@gmail.com)

Biosolubilisasi batubara adalah proses pencairan batubara dengan memanfaatkan mikroorganisme. Salah satu faktor konversi padatan batubara menjadi cairan adalah aktivitas enzim. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim 4 isolat kapang (kode B2, B3, B4 dan B5) hasil isolasi dari batubara selama proses biosolubilisasi. Biosolubilisasi dilakukan dengan menggunakan medium MSS+ (MSS + sukrosa 0,1% + ekstrak ragi 0,01% + 5% lignit) dan inkubasi dilakukan pada suhu ruang dan agitasi 150 rpm. Parameter yang diamati meliputi aktivitas enzim (MnP, Lac, LiP dan esterase). Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat kapang mampu tumbuh dalam media yang mengandung batubara dengan tingkat solubilisasi yang berbeda. Proses biosolubilisasi batubara keempat isolat kapang hanya melibatkan enzim ekstraselular LiP dan MnP serta esterase, sedangkan lakase tidak terdeteksi. Aktivitas enzim MnP tertinggi pada isolat kapang dari batubara terjadi pada isolat B4 sebesar 0,56 IU/ml pada hari ke-14 dan LiP sebesar 0,42 IU/ml pada ke-21. Aktivitas enzim esterase isolat-isolat kapang hasil isolasi dari batubara memiliki pola yang berbeda dalam menghidrolisis FDA, tetapi semua isolat mencapai puncak tertinggi pada hari ke-28 dengan kisaran 7,48 – 12,17 µg. Aktivitas enzim esterase isolat-isolat kapang hasil isolasi dari batubara memiliki pola yang berbeda dalam menghidrolisis FDA, tetapi semua isolat mencapai puncak tertinggi pada hari ke-28 dengan kisaran 7,48 – 12,17 µg.

**Kata kunci :** Biosolubilisasi, batubara, kapang, aktivitas enzim

### PENDAHULUAN

Biosolubilisasi merupakan teknologi pencairan batubara dengan memanfaatkan mikroba seperti bakteri dan jamur. Produk yang dihasilkan diharapkan dapat digunakan sebagai sumber energi atau bahan baku industri. Pengubahan batubara menjadi bentuk cair akan memudahkan distribusi dan saat pengaplikasiannya. Penelitian biosolubilisasi diawali dengan ditemukannya mikroba pendegradasi batubara yang pertama kali dilaporkan oleh Fakoussa pada tahun 1981 (Fakoussa, 1981 dalam Cohen dan Gabriele, 1982).

Sejak saat itu, sejumlah bakteri dan fungi yang memiliki kemampuan mengsolubilisasi batubara ditemukan. Dalam perkembangannya, fungi dari kelompok kapang yang banyak digunakan untuk mengsolubilisasi batubara, karena memiliki enzim pendegradasi lignin yang merupakan komponen asal pembentuk batubara. Jenis batubara yang menjadi bahan untuk biosolubilisasi adalah dari jenis kualitas rendah seperti lignit (Fakuossa dan Hofrichter, 1999). Prosesnya melibatkan mekanisme enzimatik (Hofrichter dan Fritche, 1997), produksi alkalin (Quigley dkk., 1989), biosurfaktan (Polman dkk., 1991) dan khelat (Cohen dkk., 1990 dan Fredrickson dkk., 1990).

Produk yang rendah dan dibutuhkannya waktu konversi yang lama serta karakteristik produk yang bervariasi menjadi hambatan pengembangan biosolubilisasi batubara (Yin dkk., 2009). Hal tersebut terjadi karena 2 hal mendasar yang mempengaruhi biosolubilisasi, yaitu struktur batubara dan mikroba. Struktur batubara yang kompleks dan karakteristik batubara di setiap daerah yang berbeda-beda akan mempengaruhi pertumbuhan mikroba pengsolubilisasi, sedangkan mikroba berperan sebagai katalis atau penghasil enzim pengsolubilisasi (Fakoussa dan Hofrichter, 1999).

Fokus penelitian yang berkembang saat ini adalah mencoba menemukan mikroba yang tepat dan mengisolasi enzim pengsolubilisasi batubara. Mikroba yang berpotensi dan enzim pengsolubilisasi batubara dapat diketahui berdasarkan produk yang dihasilkannya (Fakuossa dan Hofrichter, 1999). Isolasi dilakukan dengan sumber yang berasal dari batubara kualitas rendah dan tanah sekitar pertambangan batubara. Kapang indigenus merupakan kapang penghuni asli suatu habitat atau substrat. Pemanfaatan kapang indigenus diharapkan dapat memudahkan saat pengaplikasian, karena secara alamiah telah teradaptasi dengan substrat batubara.

Hasil penelitian yang dilakukan Sugoro dkk. (2012), telah diperoleh sebanyak 4 isolat kapang dari batubara dan diketahui berpotensi sebagai agen biosolubilisasi batubara. Salah satu tahapan untuk memperoleh kapang yang paling berpotensi adalah dengan mengetahui aktivitas enzim. Enzim-enzim yang diketahui berperan dalam biosolubilisasi batubara adalah lignin peroksidase (LiP), lakase (Lac), manganperoksidase (MnP) dan esterase. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim ekstraselular dari ke-4 isolat kapang.

## METODOLOGI

**Bahan.** Kapang yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 8 buah dengan kode B2, B3, B4, dan B5 yang merupakan hasil isolasi dari area pertambangan batubara di Sumatera Selatan. Media yang digunakan adalah SDA + (saboraud dextrose agar+ serbuk batubara 0,01%) untuk peremajaan dan produksi spora kapang dan MSS + (Mineral Salt Solution + sukrosa 0,01% + serbuk batubara 5%) untuk biosolubilisasi batubara.

**Biosolubilisasi batubara.** Kultur inokulum spora sebanyak 10 % v/v ( $10^8$  sel/ml) diinokulasikan ke dalam 250 ml medium MSS+ dan diinkubasi menggunakan *shaking incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu ruang selama 28 hari. Pencuplikan sampel kultur dilakukan pada hari ke-0, 1, 3, 7, 14, 21 dan 28 untuk dilakukan pengamatan pH medium, kolonisasi miselia kapang, FDA terhidrolisis, aktivitas enzim MnP, LiP dan lakase.

**Aktivitas enzim.** Aktivitas enzim lakase, Mn-P dan LiP diukur dengan menggunakan supernatan kultur kapang. Aktivitas enzim lakase diukur berdasarkan oksidasi 500  $\mu$ M buffer ABTS yang mengandung 50 mM buffer sodium tartrat (pH 4.5) dan nilai absorbansi diukur pada  $\lambda_{420 \text{ nm}}$ . Aktivitas enzim peroksidase diukur dengan menambahkan dalam larutan di atas  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan konsentrasi akhir sebesar 100 mM dan nilai absorbansi yang terukur merupakan penjumlahan dengan aktivitas enzim lakase. Aktivitas enzim LiP dan Mn-P diukur dengan menggunakan substrat veratril alkohol dan phenol red dengan penambahan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kirk dkk., 1986).

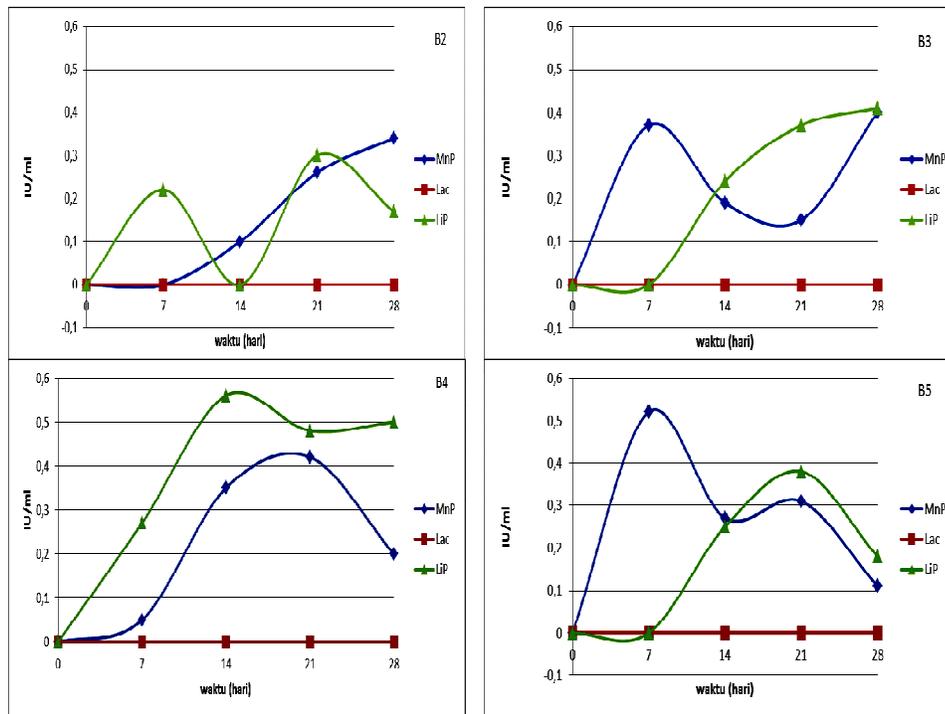
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran aktivitas enzim menunjukkan hasil positif untuk enzim MnP dan LiP untuk semua isolat kapang dari batubara, tetapi negatif untuk lakase (Gambar 1). Hal ini berbeda dengan hasil pengujian kualitatif enzim ekstraselular. Beberapa kapang mengindikasikan mampu menghasilkan enzim lakase dan beberapa isolat kapang tidak mampu menghasilkan enzim MnP dan LiP (Sugoro dkk., 2012). Tidak terdeteksinya enzim lakase karena substrat yang digunakan dalam uji biosolubilisasi adalah batubara hasil pra-perlakuan autoklaf, sedangkan substrat pengujian kualitatif enzim ekstraselular adalah tanin. Hal ini menyebabkan batubara menghasilkan senyawa yang menghambat kerja enzim lakase. pH optimum aktivitas enzim lakase berkisar 3,5 – 7,0 (Akhtar dkk., 1997), sedangkan pH medium selama biosolubilisasi di bawah 3,5 (Sugoro dkk., 2012). Pra-perlakuan autoklaf dapat menyebabkan enzim-enzim yang negatif saat uji kualitatif enzim ekstraselular menjadi positif terdeteksi.

Pola aktivitas enzim MnP dan LiP setiap kapang cenderung sama. Hal ini didukung hasil pengujian statistik yang menunjukkan pola perubahan aktivitas enzim MnP, Lac dan LiP tidak berbeda untuk setiap isolat kapang hasil isolasi dari tanah dan batubara ( $p \leq 0,05$ ). Perbedaan terjadi pada kemampuan setiap isolat kapang dalam menghasilkan enzim MnP dan LiP, karena jenis kapang yang berbeda dan sifat batubara yang heterogen dan kompleks. Adanya aktivitas enzim tersebut menyebabkan terjadinya perubahan pH medium, absorbansi fenolik dan aromatik, asam humat dan fulvat. Secara umum, aktivitas enzim LiP dan MnP isolat kapang dari tanah lebih tinggi dibandingkan dengan batubara. Akan tetapi, hasil ini tidak berhubungan dengan tingkat biosolubilisasi relatif (fenolik dan aromatik terkonjugasi) yang menunjukkan bahwa tingkat biosolubilisasi relatif tertinggi terjadi pada isolat kapang dari batubara. Hal ini karena adanya aktivitas enzim selain MnP, Lac dan LiP yang terlibat dalam biosolubilisasi.

Aktivitas enzim MnP dan LiP pada semua isolat kapang hasil isolasi dari tanah mengalami kenaikan setelah inkubasi, sedangkan pada isolat kapang hasil isolasi dari

batubara hanya terjadi pada B4. Perbedaan ini terjadi karena isolat tanah dari tanah telah teradaptasi dalam memanfaatkan substrat lignin tumbuhan, sedangkan isolat kapang dari batubara berasal dari spora yang dorman. Aktivitas enzim MnP tertinggi pada isolat kapang dari batubara terjadi pada isolat B4 sebesar 0,56 IU/ml pada hari ke-14 dan LiP sebesar 0,42 IU/ml pada ke-21. Laju tertinggi aktivitas enzim LiP terjadi pada isolat kapang T5 sebesar 0,033 IU/ml/hari dan MnP terjadi pada isolat kapang B4 sebesar 0,050 IU/ml/hari.



Gambar 1. Aktivitas enzim MnP, LiP dan lakases biosolubilisasi batubara oleh kapang B2, B3, B4, dan B5 dalam medium MSS+ yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 150 rpm.

Hasil pengujian aktivitas enzim LiP, MnP dan lakase yang terdeteksi tidak sesuai dengan hasil pengukuran tingkat biosolubilisasi senyawa fenolik dan aromatik (Sugoro dkk., 2012). Kenaikan aktivitas enzim LiP seharusnya menyebabkan tingkat biosolubilisasi pada senyawa fenolik dan aromatik mengalami kenaikan, sedangkan kenaikan aktivitas MnP menyebabkan hal sebaliknya. Enzim LiP menyebabkan terputusnya senyawa-senyawa non fenolik penyusun batubara dan MnP memecah ikatan fenolik (Silva-Stenico dkk., 2007). Keterlibatan enzim-enzim lain dan sifat batubara yang heterogen menjadi penyebab terjadinya hal tersebut. Selain itu, karena jenis kapang yang digunakan berbeda yang berarti kemampuan metabolismenya pun berbeda.

Penelitian yang dilakukan oleh Laborda dkk. (1999) dengan menggunakan kapang *Trichoderma* sp. dan *Penicillium* sp. menunjukkan bahwa jenis batubara

mempengaruhi tingkat solubilisasi dan aktivitas enzim. Tingkat biosolubilisasi tertinggi pada kapang *Trichoderma* sp. terjadi pada jenis batubara subbituminus dan lignit, sedangkan *Penicillium* sp. terjadi pada bituminus dan lignit. Aktivitas enzim yang terdeteksi pada kapang *Trichoderma* sp. adalah MnP, fenoloksidase dan esterase untuk jenis batubara lignit, subbituminus dan antrasit, sedangkan *Penicillium* sp. hanya MnP dan fenoloksidase (Laborda dkk., 1999).

Ada dua jenis enzim yang terlibat dalam proses biosolubilisasi batubara, yaitu enzim hidrolisis dan enzim oksidatif. Enzim oksidatif merupakan komponen utama yang terlibat dalam proses biosolubilisasi batubara. Beberapa contoh enzim oksidatif antara lain enzim katekol-2,3-dioksigenase, enzim katekol-1,2-oksigenase (Silva-Stenico dkk., 2007), dan enzim fenoloksidase (Tao dkk.2009). Beberapa enzim terlibat di dalam proses biosolubilisasi batubara, antara lain enzim peroksida ekstraseluler seperti Manganperoksidase (Laborda, dkk., 1997; Laborda dkk., 1999; Siva-Stenico dkk.,2007), enzim ligninase, enzim esterase (Laborda dkk., 1997), enzim fenoloksidase (Laborda dkk., 1997; Tao dkk., 2009), enzim 9-florenol dehidrogenase (Silva-Stenoco dkk., 2007), enzim lakase (Tao dkk., 2009; Laborda dkk., 1999), dan enzim fenolhidroksilase (Silva-Stenico dkk., 2007).

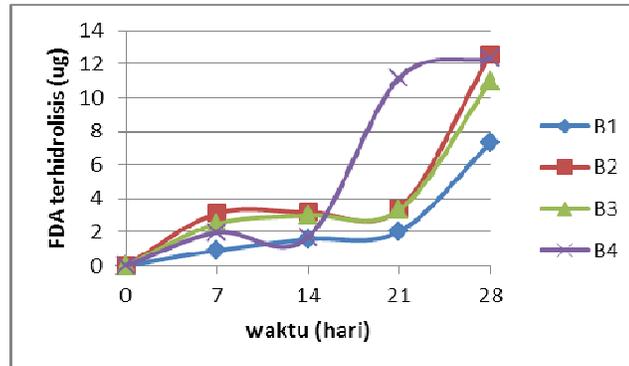
Tidak semua kapang menghasilkan ketiga jenis enzim sekaligus. Kapang *Trametes vesicolor* dan *Phanerochaete chrysosporium* hanya menghasilkan LiP dan MnP (Srivivasan dkk., 1995). *P. chrysosporium* BKM-F1767 menunjukkan aktivitas enzim menyerupai lakase), sedangkan *Ceriporiopsis subvermispora* hanya menghasilkan MnP dan lakase, dan *Phlebia ochraceofulva* hanya menghasilkan LiP and lakase.

Aktivitas biosolubilisasi dapat pula terjadi akibat adanya peran enzim esterase yang dihasilkan kapang (Fakuossa dan Hofrichter, 1999). Keberadaan enzim esterase dapat diketahui dengan pengukuran fluoresen diasetat (FDA) terhidrolisis. Selain oleh enzim esterase, FDA dapat terhidrolisis oleh enzim lipase dan protease. Aktivitas dari enzim menghasilkan senyawa yang berpendar berwarna kuning (Breeuwer, 1996). Struktur senyawa FDA memiliki kemiripan dengan bagian struktur batubara, yaitu adanya gugus ester dan aromatik sehingga dapat dijadikan model senyawa.

Hasil pengukuran FDA terhidrolisis oleh isolat-isolat kapang hasil isolasi dari batubara dapat dilihat pada Gambar 2. Isolat kapang hasil isolasi dari batubara memiliki pola yang berbeda dalam menghidrolisis FDA. Hasil uji statistik menunjukkan pola perubahan FDA terhidrolisis yang tidak berbeda untuk isolat-isolat kapang hasil isolasi batubara ( $p \leq 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan isolat kapang dari batubara dalam menghasilkan enzim ekstraselular tidak berbeda. Perbedaan kemampuan biosolubilisasi tidak dipengaruhi oleh enzim ekstraselular tetapi mungkin

dipengaruhi oleh perbedaan kemampuan menghasilkan enzim-enzim ekstraselular seperti LiP, MnP, lakase dan esterase.

Isolat-isolat kapang hasil isolasi dari batubara memiliki pola yang berbeda dalam menghidrolisis FDA, tetapi semua isolat mencapai puncak tertinggi pada hari ke-28 dengan kisaran 7,48 – 12,17 µg. Isolat kapang B2, B3 dan B4 mengalami peningkatan hingga hari ke-7 setelah inkubasi dan setelah itu mengalami penurunan hingga hari ke-21 untuk isolat kapang B2 dan B3, sedangkan isolat kapang B4 hingga hari ke-14. Selanjutnya mengalami peningkatan hingga hari ke-28.



Gambar 2. Perubahan nilai FDA terhidrolisis oleh kapang T1, T2, T4, T5, B2, B3, B4, dan B5 dalam medium MSS+ yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 150 rpm.

FDA yang terhidrolisis berkaitan dengan aktivitas enzim esterase. Enzim ini berperan dalam memutus ikatan ester yang banyak terdapat pada batubara. Struktur batubara yang terbuka dan lebih sederhana akibat aktivitas enzim esterase menyebabkan enzim seperti LiP, MnP dan lakase menjadi lebih mudah bekerja. Kapang-kapang yang diketahui menghasilkan enzim esterase dan mampu menghidrolisis FDA adalah *Trichoderma* sp dan *Penicillium* sp. (Holker dkk., 1999).

## KESIMPULAN

Keempat kapang mampu tumbuh dalam media yang mengandung batubara dengan tingkat solubilisasi yang berbeda. Proses biosolubilisasi batubara keempat isolat kapang hanya melibatkan enzim ekstraselular LiP, MnP dan esterase, sedangkan lakase tidak terdeteksi. Aktivitas enzim MnP tertinggi pada isolat kapang dari batubara terjadi pada isolat B4 sebesar 0,56 IU/ml pada hari ke-14 dan LiP sebesar 0,42 IU/ml pada ke-21. Aktivitas enzim esterase isolat-isolat kapang hasil isolasi dari batubara memiliki pola yang berbeda dalam menghidrolisis FDA, tetapi semua isolat mencapai puncak tertinggi pada hari ke-28 dengan kisaran 7,48 – 12,17 µg.

## DAFTAR PUSTAKA

Akhtar, M., Blanchette, R.A. dan Kirk, T.K. (1997). Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of Wood. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 57, 138-14.

- Cohen, M.S. dan Gabriele, P.D. (1982). Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poriamonticola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 23–27.
- Cohen, M.S., Feldman, K.A., Brown, C.S. dan Gray, E.T. (1990). Isolation and Identification of the Coal Solubilizing Agent Produced by *Trametes versicolor*. *Applied of Environmental Microbiology*, 56, 3285–3294.
- Fakoussa, R.M. dan Hofrichter, M. (1999). Biotechnology and Microbiology of Coal Degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 25–40.
- Fredrickson, J.K., Stewart, D.L., Campbell, J.A., Powell, M.A., McMulloch, M., Pyne, J.W. dan Bean, R.M. (1990). Biosolubilization of Low Rank Coal by *Trametes versicolor* Siderophore-like Product and Other Complexing Agents. *Journal India Microbiology*, 5, 401–406.
- Hofrichter, M. dan Fritche, W. (1997). Depolymerization of Low Rank Coal by Extracellular Fungal Enzyme Systems. II. The Ligninolyticenzymes of the Coal-Humic-Acid-Degrading Fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Applied of Microbiology Biotechnology*, 47, 419–424.
- Holker, U., Fakoussa, R.M. dan Hofer, M. (1997). A test System to Analyze the Complex Physiological States of Coal Solubilizing Fungi. *Fuel Proceeding Technology*. 52, 65 – 7.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. dan Farrell, F.R. (1986). Production of Multiple Ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of Selected Growth Conditions and Use of Mutant Strain. *Enzyme Microbiology Technology*, 8, 27–32.
- Laborda, F. Moistrol, I.F., Luna, N. dan Fernandez, M. (1999). Process of Liquefaction/Solubilization of Spanish Coal by Microorganism. *Applied of Microbiology Biotechnology*, 52, 49-56.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta.
- Polman, J.K., Breckenridge, C.R. dan Quigley, D.R. (1991). Characterisation of Bacteria which Degrade Lignite Coal, *Abstract of General Meeting American Society for Microbiology 91 Meet.*, 262.
- Quigley, D.R., Wey, J.E., Breckenridge, C.R., dan Stoner, D.L. (1988). The Influence of pH on Biological Solubilization of Oxidized Low-rank Coal. *Res. Recycl. Conservation*, 1, 163–174.
- Silva-Stenico ME, Vengadajellum CJ, Janjua HA, Harrison STL, Burton SG, Cowan DA. (2007). *Degradation of low rank coal by Trichoderma atroviride ES11*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:625–631
- Sugoro, I. Pikoli M.R. Kuraesin T., dan Aditiawati, P. 2009. Isolasi dan Seleksi Kapang Pengsolubilisasi Batubara. *Jurnal Biologi dan Lingkungan Al-Kauniyah UIN Syahid*, 2, 34-40.
- Sugoro, I., D. Indriani, D. Sasongko & P. Aditiawati. (2012). Isolasi dan Seleksi Kapang dari Pertambangan Batubara di Sumatera Selatan. *Jurnal Biota*. Unika Atmajaya. Yogyakarta
- Tao, X.X., Pan, L.Y., Shi, K.Y., Chen, H., Yin, S.D., dan Luo, Z.F. (2009). Bio-solubilization of Chinese Lignite I : Extracellular Protein Analysis. *Mining Science and Technology*, (19) 358-362.
- Yin, S.D., Tao, X.X. dan Shi, K.Y. (2009). Bio-solubilization of Chinese Lignite II: Protein Adsorption onto the Lignite Surface. *Mining Science and Technology*, 19, 363 –368.