

PERBAIKAN *FREENESS* DAN MUTU KERTAS BEKAS MENGUNAKAN *CELLULOSE BINDING DOMAIN* DARI ENDOGLUKANASE Egl-II

Rina Masriani¹, Taufan Hidayat, Henggar Hardiani
Balai Besar Pulp dan Kertas 1, Jl. Raya Dayeuhkolot No. 132 Bandung
¹ rina.masriani@gmail.com

Diterima : 5 Mei 2014, Revisi akhir : 8 Oktober 2014, Disetujui terbit : 3 November 2014

FREENESS AND WASTE PAPER QUALITY IMPROVEMENT USING CELLULOSE-BINDING DOMAIN OF ENDOGLUCANASE Egl-II

ABSTRACT

The objective of this research is improving the freeness of waste paper stock and paper quality by using the Cellulose Binding Domain (CBD) of endoglucanase Egl-II. CBD has been separated from endoglucanase Egl-II by proteolysis method. CBD has a molecular weight of approximately 21 kD. The produced CBD contained 0.04 mg / mL protein and did not show the total enzyme activity. Waste paper disintegrated using Niagara beater with no load at the consistency of 1.5%. CBD was applied to the refined waste paper fibers with a freeness of 200 mL CSF (Canadian Standard Freeness). The dosages of CBD used for waste paper treatment were 0.2 and 0.3 mg CBD/g of oven-dried pulp. The result shows that this treatment increases the freeness of fibers by 140 mL CSF (70%). CBD also increases the amount of removed water from the fibers from 290 mL to 390 mL and 370 mL, respectively, using the dynamic drainage jar (DDJ) measurement. The cellobiose assay of the waste paper filtrate treated with CBD shows no sugar dissolution, which indicates no cellulose degradation. The tear index of paper produced by treatment with CBD shows insignificant change. The Concora Medium Test (CMT) of paper produced by treatment with CBD has higher tensile index, burst index, and ring crush.

Keywords: cellulose-binding domain, endoglucanase Egl-II, freeness improvement, waste paper

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperbaiki *freeness* dari stok kertas bekas dan mutu lembaran kertas yang dihasilkan dengan menggunakan *Cellulose Binding Domain* (CBD) dari endoglukanase Egl-II. CBD yang digunakan merupakan hasil pemisahan dari endoglukanase Egl-II dengan metode proteolisis. CBD ini memiliki berat molekul sekitar 21 kD. CBD yang dihasilkan mengandung kadar protein sebesar 0,04 mg/mL dan tidak terdeteksi adanya aktivitas total enzim. Kertas bekas diuraikan dengan menggunakan Niagara beater tanpa beban pada konsistensi 1,5%. CBD diaplikasikan pada serat kertas bekas yang telah digiling dan memiliki *freeness* 200 mL CSF (*Canadian Standard Freeness*). Dosis CBD yang digunakan untuk perlakuan terhadap serat kertas bekas adalah 0,2 dan 0,3 mg CBD/g pulp kering-oven. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan dengan CBD meningkatkan *freeness* bubur serat kertas bekas sebesar 140 mL CSF (70%). CBD juga meningkatkan volume air yang dihilangkan dari serat kertas bekas dari 290 mL menjadi 390 mL dan 370 mL menggunakan pengukuran *dynamic drainage jar* (DDJ). %FPR meningkat dari 98,80% menjadi 99,77%. Pengujian selobiosa terlarut pada filtrat serat kertas bekas yang telah mengalami perlakuan dengan CBD memperlihatkan tidak ada gula terlarut, artinya tidak ada degradasi selulosa menjadi gula terlarut. Indeks sobek dari kertas yang dihasilkan melalui perlakuan dengan CBD memperlihatkan tidak ada perubahan yang signifikan. Nilai *tensile index*, *burst index*, *ring crush* dan *Concora Medium Test* (CMT) dari kertas yang dihasilkan melalui perlakuan dengan CBD meningkat.

Kata kunci: *cellulose-binding domain*, endoglukanase Egl-II, perbaikan *freeness*, kertas bekas

PENDAHULUAN

Penelitian tentang perbaikan mutu kertas bekas merupakan penelitian yang perlu dilakukan karena kertas bekas merupakan sumber bahan baku yang penting saat ini pada industri kertas baik tingkat nasional maupun internasional. Beberapa pabrik kertas di Indonesia, diantaranya PT. Fajar Paper dan PT Aspec Kumbong, saat ini telah 100% menggunakan kertas bekas sebagai bahan baku. Menurut Direktorat Jenderal Industri Agro dan Kimia (2011), kebutuhan kertas bekas untuk industri kertas nasional pada tahun 2010 adalah sekitar 6,7 juta ton per tahun, sekitar 4,3 juta ton dipasok dari pengumpulan kertas bekas lokal, sisanya sekitar 2,4 juta ton berasal dari kertas bekas impor. Kelebihan serat kertas bekas dibandingkan serat *virgin* sebagai bahan baku kertas adalah harga yang jauh lebih murah dan sudah mengandung bahan kimia kertas sehingga penggunaan bahan kimia pada pembuatan kertas dapat jauh dikurangi. Peningkatan penggunaan kertas bekas sebagai bahan baku kertas lebih ramah terhadap lingkungan karena satu ton pembuatan kertas dari serat kertas bekas dapat menghemat 25-30 m³ air, 20-30 pohon, sekitar 4000 kWh listrik dan menurunkan polusi lingkungan karena hanya sedikit menggunakan bahan kimia jika dibandingkan pembuatan kertas dari serat *virgin* (Dienes, 2006). Sedangkan kelemahannya adalah mutu kertas yang dihasilkan lebih rendah dan laju penghilangan airnya lebih lambat jika dibandingkan serat *virgin* (Pala, dkk., 2001; Dienes, 2006).

Kertas bekas yang banyak digunakan sebagai bahan baku adalah kotak karton gelombang bekas (kardus/boks) dengan kualitas rendah, yaitu kardus kemasan mie instan. Kardus kemasan mie instan dibentuk dari karton gelombang muka ganda atau dinding tunggal (*single wall*) yang terdiri dari 2 kertas lainer (L1 dan L2) dan 1 kertas medium bergelombang (M) dengan gramatur L1/M/L2 adalah 125GSM/112GSM/125GSM. Hasil survei ke beberapa pabrik boks di Indonesia, yang secara praktis menggolongkan kualitas kotak karton gelombang berdasarkan penggunaannya. Hal ini ditentukan karena persyaratan spesifikasi untuk kotak karton gelombang diantaranya adalah berat maksimal kotak beserta isinya. Semakin berat isi kotak karton gelombang maka diperlukan kotak karton gelombang dengan kualitas yang semakin tinggi, dan semakin ringan isi kotak

karton gelombang dapat digunakan kotak karton gelombang dengan kualitas yang lebih rendah. Berdasarkan hal tersebut maka penggolongan kotak karton gelombang dari kualitas tertinggi ke kualitas terendah adalah sebagai berikut:

1. Kotak karton gelombang untuk kemasan margarin/tembakau
2. Kotak karton gelombang untuk kemasan oli
3. Kotak karton gelombang untuk kemasan makanan (coklat)
4. Kotak karton gelombang untuk kemasan yang bersifat umum
5. Kotak karton gelombang untuk kemasan mie/ makanan ringan
6. Karton gelombang untuk *divider*/pemisah gelas.

Untuk mengatasi kelemahan kertas bekas dapat digunakan *cellulose binding domain* (CBD) pada proses pembuatan kertas dari bahan baku serat kertas bekas. CBD memiliki potensi aplikasi sebagai aditif dalam industri kertas karena CBD dapat memodifikasi serat polisakarida pada kapas, kayu atau kertas (Lemos, dkk., 2000; Levy dan Shoseyov, 2002). Menurut Pala, dkk. (2001), perlakuan pulp dengan CBD meningkatkan laju drainase dan indeks ketahanan pulp kertas (khususnya indeks tarik dan indeks retak) yang simultan dibandingkan dengan kontrol. Pada dosis yang lebih rendah (0,4 -1,4 mg protein/g kering oven pulp), meningkatkan drainase sebesar 14%, 9% indeks retak dan 7% indeks tarik). Menurut Machado, dkk. (2009), aplikasi *carbohydrate binding module* (CBM3) dari *Clostridium thermocellum*scaffolding protein (CipA) pada pulp *E. globulus* meningkatkan indeks retak, indeks tarik, menurunkan *permeability* dan tidak ada efek terhadap indeks sobek.

Hasil BLAST(P) endoglukanase Egl-II menunjukkan modular enzim ini tersusun dari signal peptida (1-29), *catalytic domain* (48-301) dari *glycosyl hydrolase* famili 5 (GH5) dan *substrate binding domain* (356-437) dari *cellulose binding module* 3 (CBM 3) (Nurachman, dkk., 2010). CBD dari endoglukanase Egl-II dapat dipisahkan dengan metode proteolisis (Masriani, dkk., 2013). CBD atau *cellulose binding module* (CBM) adalah modul fungsional dari gen *carbohydrate-active enzyme* yang berfungsi mempromosikan adsorpsi enzim ke ke kristal selulosa tak larut (Henrissat dan Davies, 2000; Carrard, G., dkk. 2000). Menurut Tormo dkk (1996), *binding domain* ini adalah domain yang berbeda dari enzim bebas, terhubung dengan satu

atau lebih katalitik domain. Ada juga CBD yang merupakan subunit dengan ciri-ciri tersendiri yang tergabung dengan domain non katalitik tambahan yang disebut *cellulosome*. CBD mempunyai peran penting dalam mediasi pengikatan enzim selulolitik atau mikroorganisme penghasilnya ke permukaan substrat selulosa, melakukan gangguan non hidrolitik pada serat selulosa. Tahap ini merupakan titik inisiasi pada proses degradasi selulosa (Tormo dkk, 1996). Protein ini akan mengikat permukaan serat, dengan memodifikasi permukaan atau sifat antarmuka dari serat (Henrissat dan Davies, 2000). Kelebihan dari protein ini dalam memperbaiki sifat kertas bekas adalah tidak ada degradasi selulosa terjadi selama proses modifikasi serat. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperbaiki *freeness* dari stok kertas bekas dan mutu lembaran kertas yang dihasilkan dengan menggunakan CBD dari endoglukanase Egl-II.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Endoglukanase Egl-II diekspresi oleh *Bacillus megaterium* yang membawa plasmid PMM_{1525-eglII} secara ekstrasel. *B. megaterium* ini diperoleh dari Laboratorium Biokimia, Institut Teknologi Bandung. Cellulase dari *Aspergillus niger*, (Sigma, Index-No. : 647-002-00-3). Bahan-bahan kimia p.a yang terdiri dari tripton, ekstrak ragi, NaCl, tetrasiklin, pepton, xilosa, *bovine serum albumin* (BSA), karboksi metil selulosa, asam dinitrosalisilat, selobiosa, *Bradford reagent*, papain dari *papaya latex* (Sigma Co. Ltd), dan air destilat. *Polysulfone membrane* (PM) dengan ukuran pori 10 kDa, 30 kDa and 50 kDa. Sampel kertas bekas yang digunakan adalah kardus bekas dengan kualitas rendah yang diperoleh secara acak dari daerah Baleendah dan Dayeuhkolot, Kabupaten Bandung, Jawa Barat.

Metode

Produksi, Uji Aktivitas, dan Uji Kadar Protein Endoglukanase Egl-II

Endoglukanase Egl-II dibuat sesuai dengan metode produksi menurut Masriani dan Nurachman (2012); MoBiTec (2008). Pemekatan endoglukanase dilakukan menggunakan metode ultrafiltrasi (Lestari, dkk., 2000; Masriani,

dkk., 2013). Aktivitas endoglukanase Egl-II dalam menghidrolisis karboksi metil selulosa (CMC) ditentukan dari jumlah gula pereduksi yang dilepas. Kondisi inkubasi CMC oleh endoglukanase Egl-II mengacu pada kondisi menurut Masriani dan Nurachman (2012). Kadar gula pereduksi yang dilepas ditentukan dengan pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS) menggunakan selobiosa sebagai standar (Miller, 1959). Masing-masing pengukuran absorbansi dilakukan tiga kali (triplo). Satu unit aktivitas endoglukanase Egl-II didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu melepaskan 1 μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi reaksi. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai unit aktivitas per mg protein. Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford menggunakan BSA sebagai standar (Bradford, 1976). Masing-masing pengukuran absorbansi dilakukan tiga kali (triplo).

Digestasi Endoglukanase Egl-II dan Pemisahan CBD dari Endoglukanase Egl-II dengan Cara Ultrafiltrasi

Digestasi endoglukanase Egl-II dilakukan dengan menggunakan enzim papain. Menurut Masriani dkk. (2013), perbandingan endoglukanase Egl-II/papain yang optimum adalah 50:1 (w/w). Kondisi ini diperoleh dengan cara mencampurkan larutan papain (1 mg/mL) dan 100 mL *crude* endoglukanase Egl-II (0,0533 mg/mL). Campuran diagitasi selama 4 jam pada temperatur $\pm 23^{\circ}\text{C}$ (Lemos, dkk., 2000; Yokota, dkk., 2008). Protein hasil digestasi dipisahkan dengan cara ultrafiltrasi. Menurut Masriani, dkk. (2013), hasil ultrafiltrasi terdiri dari dua bagian yaitu *permeate* yang berisi CBD dan *feed* yang berisi campuran CD-CBD-(Egl-II). Kadar protein *permeate* dan *feed* hasil ultrafiltrasi ditentukan dengan metode Bradford menggunakan BSA sebagai standar (Bradford, 1976). Pada *permeate* dan *feed* hasil ultrafiltrasi juga dilakukan uji aktivitas endoglukanase Egl-II. CBD dan campuran CD-CBD-(Egl-II) digunakan sebagai aditif pada perlakuan serat kertas bekas sebelum dibuat lembaran.

Aplikasi CBD dari Endoglukanase Egl-II untuk Perbaikan Mutu Kertas Bekas

Bubur serat kertas bekas disiapkan sesuai prosedur menurut Masriani dan Nurachman

(2012). *Freeness* awal kertas bekas adalah 490 mL CSF (*Canadian Standard Freeness*). Bubur serat kertas bekas yang siap digunakan adalah bubur dengan *freeness* 200 mL CSF dan konsistensi 3%.

Sebelum dibuat lembaran kertas, pada bubur serat kertas bekas dilakukan perlakuan menggunakan aditif. Aditif yang digunakan adalah CBD dan campuran CD-CBD-(Egl-II). Dosis aditif dihitung berdasarkan mg protein aditif per g pulp kering-oven. Dosis aditif yang digunakan adalah 0,2 mg CBD/g pulp kering-oven; 0,3 mg CBD/g pulp kering-oven; 0,2 mg CD-CBD-(Egl-II)/g pulp kering-oven; 0,4 mg CD-CBD-(Egl-II)/g pulp kering-oven; dan dilakukan perlakuan blanko. Perlakuan bubur serat kertas bekas dengan aditif dilakukan pada suhu 50°C, kecepatan putaran 150 rpm, dan waktu perlakuan selama 30 menit. Perlakuan dihentikan dengan cara mendidihkan campuran selama 5 menit. Perlakuan blanko dilakukan dengan cara yang sama, tetapi tanpa menggunakan aditif.

Sebelum dan sesudah perlakuan dengan aditif dilakukan pengukuran angka *freeness* dan volume penghilangan air dengan wadah dinamik drainase, penentuan kadar *finer*, dan uji kadar selobiosa. Pengukuran angka *freeness* dan volume penghilangan air dengan wadah dinamik drainase serta penentuan kadar *finer* dilakukan untuk mengetahui pengaruh CBD terhadap retensi dan drainase stok bubur kertas. Pengukuran angka *freeness* dilakukan sesuai prosedur menurut Masriani dan Nurachman (2012). Volume penghilangan air dengan wadah dinamik drainase dilakukan sesuai prosedur menurut Masriani (2011). Uji kadar selobiosa dilakukan dengan pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS) (Miller, 1959) untuk mengetahui pengaruh CBD terhadap degradasi selulosa sebagai komponen kimia utama pada kertas bekas menjadi gula-gula terlarut. Uji kadar *finer* dilakukan untuk mengetahui persentase serat selulosa halus yang lolos pada saat pembuatan kertas. Pengaruh perlakuan dengan CBD dan campuran CD-CBD-(Egl-II) dibandingkan terhadap blanko.

Pembuatan Lembaran Kertas dan Pengujian Sifat Fisik Lembaran Kertas

Tahap pembuatan lembaran kertas meliputi pembuatan lembaran basah, pengepresan, dan

pengeringan lembaran. Pembuatan lembaran ini dilakukan dengan mengacu pada SNI 14-0489-1989. Untuk setiap variabel dibuat 6 (enam) lembaran kertas.

Lembaran kertas yang dihasilkan ditentukan gramturnya berdasarkan SNI ISO 536:1995 Kertas dan karton – Cara uji gramatur. Penentuan nilai indeks retak mengacu pada metode SNI ISO 2758:2001 Kertas – Cara uji ketahanan retak. Nilai indeks retak dihitung dari nilai ketahanan retak kertas, dalam kiloPaskal, dibagi dengan gramatur. Penentuan nilai indeks tarik mengacu pada metode SNI ISO 1924-2: 2010 Kertas dan karton – Cara uji sifat tarik – Bagian 2: Metode kecepatan elongasi tetap. Nilai indeks tarik dihitung dari nilai ketahanan tarik (dinyatakan dalam kiloNewton per meter) dibagi dengan gramatur. Penentuan nilai indeks sobek mengacu pada metode SNI ISO 0436:2009 Kertas – Cara uji ketahanan sobek – Metode Elmendorf. Nilai indeks sobek dihitung dari nilai ketahanan sobek dibagi dengan gramatur. Penentuan nilai ketahanan tekan lingkaran (*ring crush tester/RCT*) mengacu pada metode SNI ISO 12192:2010 Kertas dan karton – Ketahanan tekan – metode tekan lingkaran. Penentuan nilai ketahanan tekan datar (*Concora medium test/CMT*) mengacu pada metode SNI ISO 7263:2010 Kertas medium – Cara uji ketahanan tekan datar setelah penggelombang di laboratorium. Masing-masing pengukuran dilakukan 10 (sepuluh) kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Produksi, Pemekatan, Digestasi Endoglukanase Egl-II dan Pemisahan Cellulose Binding Domain dari Endoglukanase Egl-II

Produksi endoglukanase Egl-II dilakukan berdasarkan metode menurut Masriani dan Nurachman (2012) dan metode pemekatan endoglukanase Egl-II dan pemisahan CBD dilakukan menurut Masriani, dkk. (2013). Untuk mengetahui kualitas endoglukanase Egl-II hasil produksi dan hasil pemekatan telah dilakukan uji aktivitas total, kadar protein, dan aktivitas spesifik. Pada uji aktivitas enzim, satu unit aktivitas endoglukanase Egl-II didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu melepaskan 1 μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi reaksi. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai unit aktivitas per mg protein. Data

kadar protein endoglukanase Egl-II diperlukan untuk menentukan jumlah enzim papain yang ditambahkan untuk proses digestasi. Data aktivitas total, kadar protein, dan aktivitas spesifik setelah proses pemisahan hasil digestasi endoglukanase Egl-II diperlukan untuk re-identifikasi protein yang terdapat pada *feed* dan *permeate*. Menurut Masriani, dkk. (2013), hasil ultrafiltrasi terdiri dari dua bagian, yaitu *permeate* yang berisi CBD dan *feed* yang berisi campuran CD-CBD-(Egl-II). Data kadar protein diperlukan untuk menentukan dosis CBD yang digunakan pada perlakuan bubur serat kertas bekas.

Crude endoglukanase Egl-II memiliki aktivitas total 0,05 Unit/mL dan aktivitas spesifik 0,49 Unit/mg protein. Pemekatan dengan metode ultrafiltrasi meningkatkan aktivitas total enzim menjadi 2,39 Unit/mL atau meningkat 48 kali, meningkatkan kadar protein dari 102,0 µg/ml menjadi 980,7 µg/ml atau meningkat 10 kali serta aktivitas spesifik meningkat dari 0,49 Unit/mg protein menjadi 2,44 Unit/mg protein atau meningkat 5 kali. Sementara selulase komersial dari *Aspergillus niger* memiliki aktivitas spesifik ~0,8 Unit/mg. CBD yang dihasilkan mengandung kadar protein sebesar 40 µg/ml atau 0,04 mg/mL dan tidak menunjukkan adanya aktivitas total enzim, artinya hasil pemisahan CBD murni, tidak mengandung *catalytic domain* (CD). Sedangkan *feed* memiliki aktivitas total enzim yang lebih tinggi dibandingkan *crude* endoglukanase Egl-II, artinya CD telah terpisah dari *permeate* (CBD) ke dalam *feed*, bercampur dengan *crude* Egl-II yang telah terpekatkan sehingga aktivitas spesifiknya menjadi meningkat dari 0,49 Unit/mg menjadi 0,74 Unit/mg.

Aplikasi Cellulose Binding Domain dari Endoglukanase Egl-II untuk Perbaikan Mutu Kertas Bekas

Freeness awal serat kertas bekas yang digunakan adalah 490 mL CSF. CBD diaplikasikan pada serat kertas bekas yang telah digiling, memiliki *freeness* 200 mL CSF dan konsistensi 3%. Hasil aplikasi CBD dan campuran CD-CBD-(Egl-II) pada bubur serat kertas bekas dapat dilihat pada Tabel 2. Pengukuran angka *freeness* dan volume penghilangan air dengan wadah dinamik drainase dilakukan untuk mengetahui pengaruh CBD terhadap drainase stok bubur kertas. Uji kadar *fines* dilakukan untuk mengetahui persentase serat selulosa halus yang lolos pada saat pembuatan kertas. Uji kadar selobiosa dilakukan untuk mengetahui pengaruh CBD terhadap degradasi selulosa sebagai komponen kimia utama pada kertas bekas menjadi gula-gula terlarut.

Aplikasi CBD pada dosis 0,2 dan 0,3 mg CBD/g kering oven pulp kertas bekas meningkatkan *freeness* sebesar 140 mL CSF. CBD juga meningkatkan volume air yang dihilangkan dari bubur serat kertas bekas dari 290 mL menjadi 390 mL dan 370 mL pada pengukuran menggunakan *dynamic drainage jar* (DDJ). Uji kadar gula selobiosa pada filtrat pulp kertas bekas yang telah mengalami perlakuan dengan CBD bernilai 0,00% menunjukkan tidak ada gula terlarut, artinya perlakuan dengan CBD tidak menyebabkan degradasi selulosa menjadi gula-gula terlarut. Kadar selobiosa terlarut artinya perlakuan dengan CBD dan mix CD dan Egl-II memodifikasi serat tanpa menyebabkan

Tabel 1. Nilai Aktivitas Total, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik *Crude* Endoglukanase Egl-II, Endoglukanase Egl-II Hasil Pemekatan, Selulase Komersial, dan Hasil Pemisahan CBD

Contoh	Aktivitas Total Enzim (Unit/ml)	Kadar Protein (µg/ml)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg protein)
<i>Crude</i> Endoglukanase Egl-II	0,05	102,0	0,49
Endoglukanase Egl-II Hasil Pemekatan	2,39	980,7	2,44
Selulase Komersial dari <i>Aspergillus niger</i>	-	-	0,8
CBD	0,00	40	-
Campuran CD-CBD-(Egl-II)	0,32	430	0,74

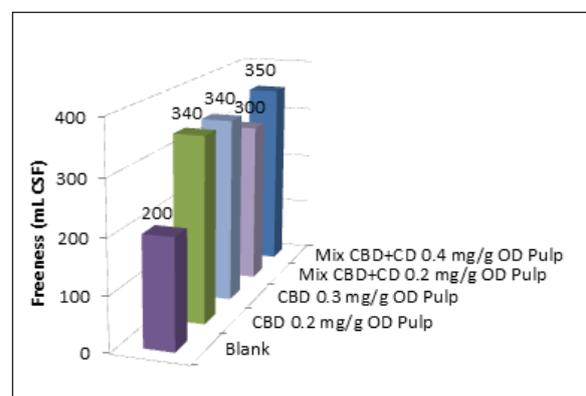
Tabel 2. Hasil Aplikasi CBD terhadap Bubur Serat Kertas Bekas Dibandingkan Dengan Blanko dan SNI 14-0094-2006 Spesifikasi Kertas Medium

Parameter Uji	Satuan	Blanko	CBD		Campuran CD-CBD- (Egl-II)		SNI Kertas Medium	
			0,2 mg/g OD Pulp	0,3 mg/g OD Pulp	0,2 mg/g OD Pulp	0,4 mg/g OD Pulp	Kelas A	Kelas B
Selobiosa terlarut	(%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
<i>Freeness</i>	(mL CSF)	200	340	340	300	350	-	-
DDJ	(mL)	290	390	370	340	320	-	-
FPR	(%)	98,80	99,77	99,70	99,09	99,47		
Gramatur	(g/m ²)	117	112	111	114	108	112,0	112,0
Bulk	(cm ³ /g)	1,54	1,73	1,62	1,53	1,56	1,54 - 1,82	1,54 - 1,82
<i>Tensile strength</i>	(N/m)	3558	3790	3711	3972	3338	3190	2790
<i>Tensile index</i>	(Nm/g)	30,5	33,9	33,3	34,7	30,9	-	-
<i>Burst strength</i>	(kPa)	196	198	202	228	193	-	-
<i>Burst index</i>	(kPa. m ² /g)	1,68	1,77	1,81	1,99	1,78	-	-
<i>Tear strength</i>	(mN)	720	689	686	710	605	-	-
<i>Tear index</i>	(mNm ² /g)	6,2	6,2	6,2	6,2	5,6	-	-
RCT	(N)	63	69	70	74	61	110	77
CMT	(N)	85	87	93	102	81	159	142

degradasi berlebihan yang dapat menyebabkan lepasnya selobiosa dari serat selulosa karena terhidrolisis menjadi selobiosa terlarut. Menurut Pala, dkk. (2001), perbaikan mutu kertas terjadi karena CBD mengikat permukaan serat, dengan memodifikasi permukaan/sifat antarmuka dari serat, mempengaruhi sifat teknis dari pulp dan kertas. Kelebihan CBD adalah mengurangi efek *peeling* mekanis dari permukaan serat yang memperburuk karakteristik pulp akhir. Pengukuran degradasi selulosa mengungkapkan bahwa tidak ada gula terlarut yang terdeteksi selama perlakuan pulp dengan CBD, yang memungkinkan kita untuk memastikan bahwa modifikasi serat tidak terkait dengan hidrolisis enzimatis.

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa perlakuan dengan CBD meningkatkan semua parameter uji sifat fisik kertas yang diukur jika dibandingkan dengan blanko. Jika dibandingkan dengan SNI 14-

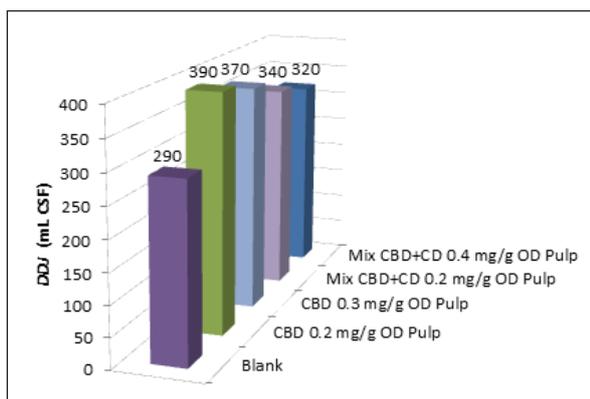
0094-2006 Spesifikasi kertas medium perlakuan dengan CBD sudah memenuhi spesifikasi SNI untuk parameter bulk dan ketahanan tarik namun belum dapat memenuhi nilai mutu ketahanan tekan lingkaran dan ketahanan tekan datar.



Gambar 1. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Freeness*

Pada Gambar 1 dapat dilihat pengaruh perlakuan CBD terhadap *freeness*. Perlakuan dengan CBD meningkatkan *freeness* sebesar 140 ml dibandingkan *freeness* awal (70%). Menurut Pala, dkk. (2001), perlakuan pulp dengan CBD pada dosis 0,4 -1,4 mg protein/g pulp kering-oven, meningkatkan drainase sebesar 14%. Pada penelitian ini kenaikan *freeness* yang dicapai jauh lebih tinggi karena menggunakan CBD yang lebih murni (Masriani, dkk., 2013) jika dibandingkan hasil penelitian Pala, dkk. (2001) yang memisahkan CBD dari selulase *Trichoderma reesei* dan CBD yang digunakan masih memiliki aktivitas katalitik, artinya belum terpisah secara murni. Menurut Machado, dkk. (2009), CBM dapat meningkatkan ikatan antar serat karena CBM dapat teradsorpsi ke selulosa secara reversibel, mampu berpindah dari serat selulosa yang satu dan ke serat selulosa yang lainnya dalam suspensi selulosa dan telah dibuktikan dengan metode pelabelan menggunakan fluorochrome FITC (*fluorescein isothiocyanate*) dan TRITC (*tetramethylrodamine*).

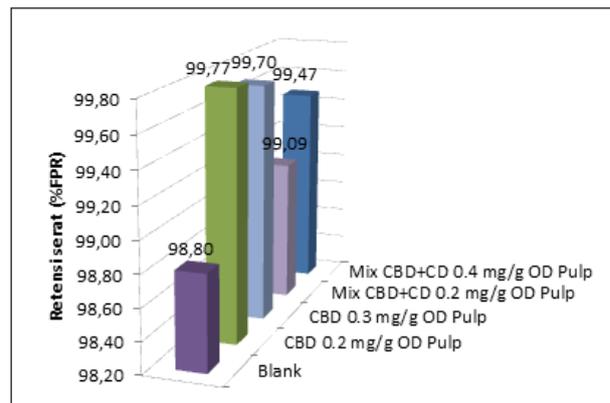
Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa perlakuan dengan CBD meningkatkan volume air yang dihilangkan dari serat kertas bekas sampai 134% jika dibandingkan dengan blanko. Pengukuran volume penghilangan air dengan wadah dinamik drainase dilakukan karena metode ini lebih mendekati kondisi drainase stok bubur kertas yang sebenarnya seperti pada mesin kertas.



Gambar 2. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap DDJ

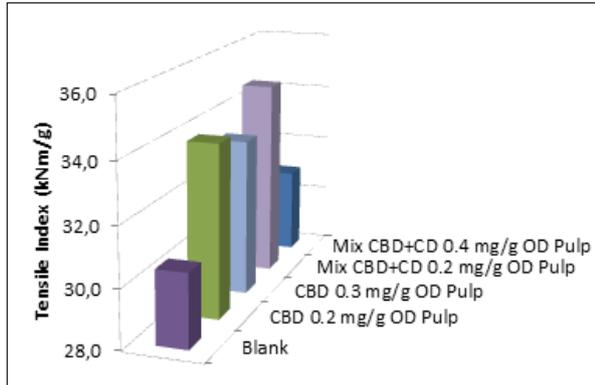
Perlakuan dengan CBD 0,2 mg/g OD pulp meningkatkan retensi serat dari 98,80% menjadi 99,77% (naik 0,97%) (Gambar 3). Retensi serat meningkat karena kemampuan pengikatan

CBM yang tinggi terhadap selulosa sehingga meningkatkan ikatan antar serat. Menurut Yokota, dkk. (2009), CBM yang diturunkan dari selulase *T.viride* dan *T.reesei* (TvCBM, TrCBM) dan CBM yang diturunkan dari xylanase *T. lanuginosus*, (TICBM), dan secara kovalen dikonjugasi dengan anionik poliakrilamida (A-PAM) meningkatkan retensi aditif pada pembuatan lembaran kertas dari HBKP (*hardwood bleached kraft pulp*) sebesar 1,6 mg/g (0,16%), 3,5 mg/g (0,35%) dan 1,5 mg/g (0,15%). Sementara pada SBKP (*softwood bleached kraft pulp*) peningkatan retensi yang terjadi adalah sebesar 2,2 mg/g (0,22%), 2,3 mg/g (0,23%) dan 0,1 mg/g (0,01%). Dosis CBM-A-PAM yang digunakan pada HBKP adalah 0,15% (w/v) dan pada SBKP 0,4% (w/v) berdasarkan berat kering pulp. CBM dari selulase lebih efektif dalam meningkatkan retensi serat dibandingkan CBM dari xylanase karena kandungan selulosa dalam serat lebih tinggi jika dibandingkan dengan kandungan xylan.



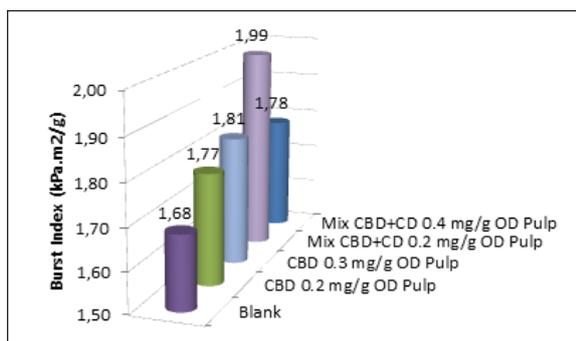
Gambar 3. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap Retensi Serat

Perlakuan dengan CBD 0,2 dan 0,3 mg/g OD pulp meningkatkan indeks tarik dari 30,5 kNm/g menjadi 33,9 kNm/g dan 33,3 kNm/g atau sebesar 11% dan 9% dibandingkan dengan blanko (Gambar 4). Karena CBD meningkatkan ikatan antar serat maka berpengaruh terhadap peningkatan indeks tarik lembaran kertas. Menurut Machado, dkk. (2009), aplikasi CBM3 dari *Clostridium thermocellum* scaffolding protein (CipA) pada pulp *E. globulus* meningkatkan indeks tarik dari 43 kNm/g menjadi 45 kNm/g atau meningkat sebesar 4,44%.



Gambar 4. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Tensile Index* (Indeks Tarik)

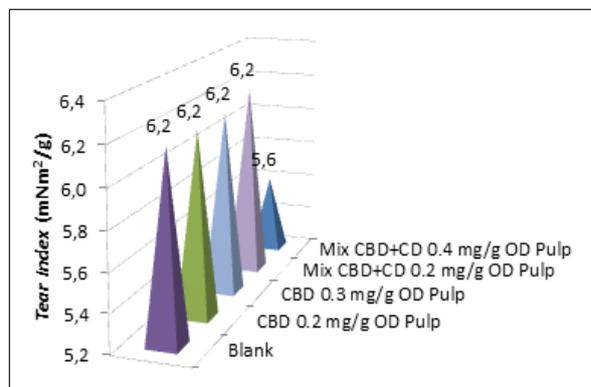
Tujuan utama penggunaan CBD pada pembuatan kertas dari bahan kertas bekas adalah untuk meningkatkan *freeness* tanpa menurunkan kualitas kertas yang dihasilkan. Seperti telah dikemukakan sebelumnya, ternyata perlakuan dengan CBD selain dapat meningkatkan *freeness* juga dapat meningkatkan indeks tarik dan pada Gambar 5 juga dapat dilihat bahwa perlakuan dengan CBD 0,2 dan 0,3 mg/g OD pulp meningkatkan indeks retak dari 1,68 kPa.m²/g menjadi 1,77 kPa.m²/g dan 1,81 kPa.m²/g atau meningkat sebesar 5% dan 8% dibandingkan dengan blanko. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Machado, dkk. (2009), aplikasi CBM3 dari *Clostridium thermocellum* scaffolding protein (CipA) pada pulp *E. globulus* meningkatkan indeks retak dari 2,7 kPa.m²/g menjadi 2,8 kPa.m²/g atau meningkat sebesar 3,7%.



Gambar 5. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Burst Index* (Indeks Retak).

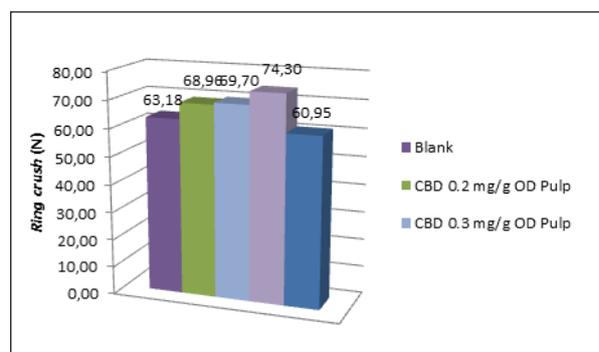
Indeks sobek dipengaruhi oleh panjang serat. Perbaikan *freeness* dengan menggunakan campuran berbagai jenis selulase berdampak buruk berupa terjadinya degradasi serat (Pala, dkk., 2001; Dienes, 2006). Perlakuan dengan

CBD diharapkan tidak menyebabkan terjadinya degradasi serat atau turunnya indeks sobek. Pada Gambar 6 nampak bahwa perlakuan dengan CBD tidak mengubah indeks sobek, fakta ini didukung dengan tidak terdeteksinya selobiosa terlarut pada filtrat pulp kertas bekas (Tabel 2). Perlakuan dengan campuran CD-CBD-(Egl-II) 0,4 mg/g OD pulp menurunkan indeks sobek dari 6,2 mNm²/g menjadi 5,6 mNm²/g artinya telah terjadi degradasi serat sedangkan pada dosis lebih rendah (0,2 mg/g OD pulp) hidrolisis serat kertas bekas masih terkendali.



Gambar 6. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Tear Index* (Indeks Sobek).

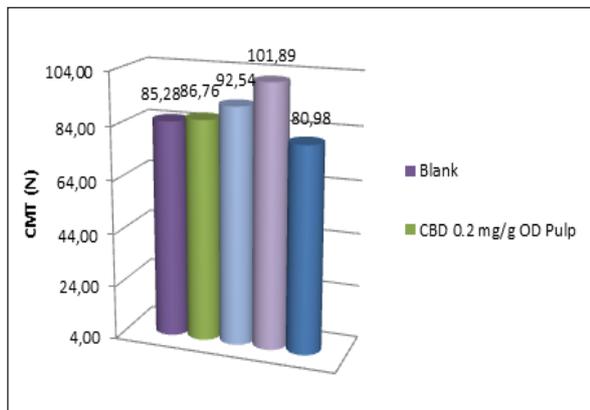
Perlakuan serat kertas bekas dengan CBD meningkatkan nilai ketahanan tekan lingkar dari 63,18 N menjadi 68,96 N dan 69,70 N karena CBD meningkatkan kekuatan kertas (Gambar 7). Nilai ketahanan tekan lingkar dapat digunakan untuk memprediksi ketahanan tekan kotak karton gelombang (Markstorm, 2006).



Gambar 7. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Ring Crush* (Ketahanan Tekan Lingkar)

Sama halnya dengan ketahanan tekan lingkar, perlakuan serat kertas bekas dengan CBD meningkatkan nilai ketahanan tekan

datar dari 85,28 N menjadi 86,76 N dan 92,54 N (Gambar 8). CMT adalah parameter mutu untuk menentukan kualitas kertas medium yang digunakan sebagai *fluting medium* pada kotak karton gelombang.



Gambar 8. Pengaruh Perlakuan CBD terhadap *Concora Medium Test (CMT)* atau Ketahanan Tekan Datar

KESIMPULAN

Dosis CBD yang digunakan untuk perlakuan terhadap serat kertas bekas adalah 0,2 dan 0,3 mg CBD/g of oven dried pulp. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan dengan CBD meningkatkan *freeness* bubur serat kertas bekas sebesar 140 mL CSF (70%). CBD juga meningkatkan volume air yang dihilangkan dari serat kertas bekas dari 290 mL menjadi 390 mL dan 370 mL menggunakan pengukuran *dynamic drainage jar (DDJ)*. %FPR meningkat dari 98,80% menjadi 99,77%. Pengujian selobiosa terlarut pada filtrate serat kertas bekas yang telah mengalami perlakuan dengan CBD memperlihatkan tidak ada gula terlarut, artinya tidak ada degradasi selulosa menjadi gula terlarut. Indeks sobek dari kertas yang dihasilkan melalui perlakuan dengan CBD memperlihatkan tidak ada perubahan yang signifikan. Nilai *Tensile index*, *burst index*, *ring crush* dan CMT dari kertas yang dihasilkan melalui perlakuan dengan CBD meningkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui DIPA 2013 BBPK, Kementerian Perindustrian. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Cucu, Enung F. M., Dadang S. A., Sonny K. W., Nena, dan

seluruh karyawan BBPK yang telah mendukung penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan ke Laboratorium Biokimia, Institut Teknologi Bandung yang telah menyediakan *Bacillus megaterium* yang membawa plasmid PMM_{1525-egII}

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 248-254
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H., Beguin, P., 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 (19): 10342-10347
- Dienes, D., 2006, "Effect of cellulase enzymes on secondary fiber properties". *Ph. D. Thesis*, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary
- Direktorat Jenderal Industri Agro dan Kimia (Ditjen IAK), 2011. *Roadmap Industri Kertas*, Kementerian Perindustrian, Jakarta
- Henrissat, B., Davies, G. J., 2000. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology*, Vol. 124, 1515-1519.
- Lemos, M. A., Teixeira, J. A., Mota, M., Gama, F. M., 2000. A simple method to separate cellulose-binding domains of fungal cellulases after digestion by protease. *Biotechnology Letters*. Vol. 22: 703-707
- Lestari, P., Richana, N., Murdiyatmo, U., 2000. Pemurnian α -Amilase *Bacillus stearothermophilus* dengan Membran Ultrafiltrasi. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. Vol. 5(1) : 10-14.
- Levy, I. dan Shoseyov, O., 2002. Cellulose-binding domains Biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. Vol. 20 : 191-213
- Machado, J., Araujo, A., Pinto, R., Gama, F. M., 2009. Studies on the interaction of the carbohydrate binding module 3 from the *Clostridium thermocellum* CipA scaffolding protein with cellulose and paper fibres. *Cellulose*. Vol. 16, 817-824
- Markstrom, H. 2005. *Testing Methods and Instruments for Corrugated Board*. AB Lorentzen & Wettre, Swedia
- Masriani, R., 2011, "Aplikasi Rekombinan Endoglukanase EgII untuk Modifikasi Serat Kertas Bekas", *Tesis*, Institut Teknologi Bandung, Bandung

- Masriani, R. dan Nurachman, Z., 2012. Modifikasi serat kertas bekas menggunakan endoglukanase Egl-II. *Jurnal Selulosa*. Vol. 2, No. 2, 53-60
- Masriani, R., Hidayat, T., Trisulo, D. C., 2013. Pemisahan *Cellulose-Binding Domain* dari Endoglukanse Egl-II dengan Metode Proteolisis. *Jurnal Selulosa*. Vol. 3, No. 1, 35-42
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 : 426-428
- MoBiTec, 2008. *Bacillus megaterium* Protein Expression System, Molecular Biologische Technologie. Jerman.
- Nurachman, Z., Kurniasih, S.D., Puspitawati, F., Hadi, S., Radjasa, O. K., Natalia, D., 2010. Cloning of the Endoglucanase Gene from a *Bacillus amyloliquefaciens* PSM 3.1 in *Escherichia coli* Revealed Catalytic Triad Residues Thr-His-Glu. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (4): 268-274.
- Pala, H. , Lemos, M. A., Mota, M., Gama, F. M.. 2001. Enzymatic upgrade of old paperboard containers. *Enzyme and Microbial Technology*. 29 : 274-279.
- Wittchen, K.D. dan Meinhardt, F. 1995. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 871-877.
- Yokota, S., K. Matsuo, T. Kitaoka, H. Wariishi, 2008. Specific interaction acting at a cellulose-binding domain/cellulose interface for papermaking application. *BioResources* 3(4): 1030–1041.
- Yokota, S., K. Matsuo, T. Kitaoka, H. Wariishi, 2009. Retention and Paper-Strength Characteristics of Anionic Polyacrylamides Conjugated with Carbohydrate-Binding Modules. *BioResources*, Vol.4 (1), 234–244.