

## SELEKSI ISOLAT BAKTERI DAN OPTIMASI KONSENTRASI AWAL SUBSTRAT GLISEROL DALAM FERMENTASI ETANOL

Erny Qurotul Ainy

Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Email: qurotul.ainy@gmail.com

### ABSTRAK

Tingginya jumlah gliserol sebagai produk dari berbagai industri mensyaratkan adanya upaya pengolahan gliserol menjadi produk lain yang bernilai ekonomis. Pada penelitian ini dilakukan seleksi kemampuan beberapa isolat bakteri dalam mengkonversi gliserol menjadi etanol. Isolat yang diuji berupa isolat bakteri dari rumen sapi dan isolat dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi SITH ITB yaitu, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, dan *B. cereus*. Hasil penapisan menunjukkan terbentuknya etanol pada medium basal yang mengandung 0,5% (b/v) gliserol yang diinokulasi dengan *E. aerogenes*, *B. licheniformis*, dan *B. subtilis*, sedangkan isolat dari isi rumen sapi menunjukkan hasil yang negatif. Pada kondisi anaerob *E. aerogenes* menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 0,033 g/L dengan laju pembentukan etanol rata-rata sebesar 0,006 g/L/hari dan laju pertumbuhan rata-rata sebesar 0,0741/hari. Selanjutnya, kadar etanol tertinggi sebesar 0,036 g/L dicapai pada variasi kadar awal gliserol 1% (b/v) dengan laju pembentukan etanol rata-rata sebesar 0,008 g/L/hari dan laju pertumbuhan rata-rata sebesar 0,111/hari. Pada kondisi optimum (berdasarkan hasil-hasil percobaan sebelumnya) diperoleh etanol dengan kadar tertinggi 0,04 g/L yang setelah dikonfirmasi dengan analisis GC kadar etanol adalah sebesar 0,791 g/L.

**Kata Kunci:** konversi, gliserol, etanol

### PENDAHULUAN

Gliserol merupakan senyawa kimia yang digunakan secara luas dalam berbagai industri. Gliserol dengan tingkat kemurnian yang tinggi dihasilkan dari produksi gliserol secara sintetik melalui reaksi kimia terhadap senyawa turunan petroleum seperti propilena. Saat ini gliserol yang dibuat secara sintetik tidak lebih dari 10 % produksi total gliserol dunia, dan selebihnya adalah gliserol dari sumber alami (*natural glycerol*). *Natural glycerol* merupakan produk samping dari industri sabun, industri asam lemak dan industri metil ester (biodiesel) (Knoethe, 2000). Menurut Maneely (2006), pada tahun 2001, industri biodiesel menghasilkan gliserol sebesar 11% dari total produksi gliserol dunia dan industri biodiesel menjadi penghasil utama gliserol dunia karena peningkatan industri biodiesel untuk mengganti bahan bakar minyak. Tingginya produksi gliserol sebagai produk samping dari industri biodiesel, sabun, dan asam lemak memunculkan peluang untuk pemanfaatan lebih jauh dari produk samping tersebut. Salah satu alternatif pemanfaatannya adalah mengkonversi gliserol menjadi etanol.

Etanol merupakan senyawa yang bernilai jual cukup tinggi dan digunakan secara luas oleh industri farmasi, pertanian, kosmetik, makanan, serta dapat digunakan sebagai bahan bakar motor pengganti bensin (Ito *et al.*, 2005). Etanol biasanya dibuat dari minyak bumi. Selain dari minyak bumi, etanol juga dapat diproduksi secara biologis melalui proses fermentasi gula secara anaerob oleh beberapa jenis ragi atau bakteri. Gula yang dipakai umumnya berasal dari pati atau selulosa yang terdapat pada produk utama dan limbah pertanian seperti tebu, singkong, sagu, bungkil jagung, jerami, dan sisa-sisa potongan kayu yang telah diuraikan melalui reaksi hidrolisis enzimatis (Yusgiantoro, 2006). Gula yang berperan sebagai sumber karbon dan energi dalam proses fermentasi etanol dapat digantikan perannya oleh gliserol (Ito *et al.*, 2005). Menurut Yazdani dan Gonzales (2007) gliserol dapat digunakan sebagai bahan dalam produksi butanol dan etanol melalui proses fermentasi. Dengan demikian, gliserol yang tersedia dalam jumlah yang besar berpotensi untuk dikonversi menjadi etanol yang bernilai jual lebih tinggi.

Jarvis *et al.* (1997) berhasil mengisolasi *Klasiela planticola* dari isi rumen kijang yang mampu memfermentasi gliserol menjadi etanol dan asam format. Diperkirakan bahwa pada isi rumen hewan ruminansia yang lain juga dapat diperoleh isolat bakteri yang mampu menggunakan gliserol sebagai substrat dan memfermentasinya menjadi etanol. Oleh karena itu, dilakukan pula isolasi dan penapisan bakteri dari isi rumen sapi untuk memperoleh isolat bakteri yang dapat memfermentasi gliserol menjadi etanol.

Proses fermentasi gliserol menjadi etanol berlangsung secara anaerob. Berbagai literatur menunjukkan bahwa pada umumnya fermentasi gliserol menggunakan bakteri. Ito *et al.* (2005) menyebutkan bahwa pada proses fermentasi gliserol secara anaerob dengan menggunakan *Enterobacter aerogenes* dihasilkan produk utama berupa etanol dan hidrogen.

*Bacillus macerans* juga berpotensi mengkonversi gliserol menjadi etanol (Kuniardi dan Mar'atusholihat (2007); Maesyarah (2007). Spesies bakteri *Bacillus* yang lain diperkirakan juga mampu



memfermentasi gliserol menjadi etanol. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pula penapisan bakteri pengkonversi gliserol menjadi etanol terhadap beberapa bakteri *Bacillus* dan *Enterobacter* yang terdapat pada koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi SITH ITB.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahap, yaitu isolasi bakteri yang dapat menggunakan gliserol sebagai sumber karbon dari isi rumen sapi, penapisan bakteri yang dapat memfermentasi gliserol menjadi etanol, serta optimasi konsentrasi awal gliserol. Penapisan bakteri yang dapat memfermentasi gliserol menjadi etanol dilakukan terhadap isolat-isolat dari isi rumen sapi dan isolat dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi ITB.

Isolat terpilih dari hasil penapisan dibuat kurva pertumbuhannya pada medium basal + 0,5% (b/v) gliserol, secara anaerob pada suhu ruang. Kondisi anaerob didapatkan dengan metode *GasPak* (Cappucino dan Sherman, 1987).

Pada tahap fermentasi anaerob gliserol menjadi etanol pada medium basal pada suhu ruang, beberapa parameter dihitung yaitu jumlah sel dengan metode cawan hitung, perubahan pH dengan menggunakan pH-meter, dan kadar etanol yang terbentuk dianalisis dengan menggunakan metode titrasi dan selanjutnya dikonfirmasi dengan metode GC (Anonim, 1995<sup>a</sup>). Isolat dengan hasil fermentasi tertinggi digunakan pada tahap optimasi konsentrasi awal gliserol dengan memperhatikan pertumbuhan sel, penurunan pH, dan kadar etanol yang terbentuk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri Rumen

Terdapat lima isolat (R1, R2, R3, R4 dan R5) yang secara bergantian mendominasi pertumbuhan dalam medium basal agar dengan sumber karbon berupa gliserol. Isolasi dilakukan selama tujuh hari pada suhu ruang dengan kondisi anaerob. Pengamatan karakteristik morfologi koloni isolat dari isi rumen dan mikroskopis sel isolat dari isi rumen makroskopis menunjukkan bahwa kelima isolat tersebut berbeda jenisnya.

### Penapisan Isolat Bakteri yang Dapat Mengkonversi Gliserol Menjadi Etanol

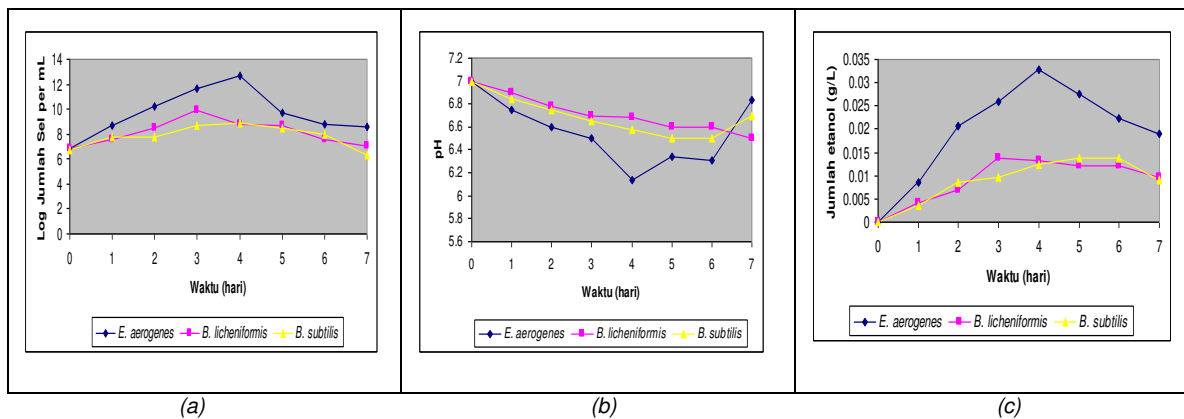
Hasil penapisan bakteri yang dapat memfermentasi gliserol menjadi etanol terhadap tiga isolat dominan dari isi rumen dan lima isolat dari koleksi kultur menunjukkan bahwa isolat yang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya etanol pada fermentasi gliserol adalah *B. licheniformis*, *B. subtilis*, dan *E. aerogenes*. Hasil analisis dengan GC menunjukkan bahwa etanol yang dihasilkan pada tahap penapisan ini oleh *B. licheniformis*, *B. subtilis*, dan *E. aerogenes* secara berturut-turut adalah 0,803 mg/L, 0,938 mg/L, dan 9,037 mg/L. Etanol yang terbentuk pada tahap ini sangat kecil karena kondisi fermentasi belum dioptimasi. Selanjutnya ketiga isolate tersebut digunakan pada tahap penelitian berikutnya.

### Seleksi Lanjutan Isolat yang dapat Mengkonversi Gliserol menjadi Etanol

Hasil pembuatan kurva tumbuh menunjukkan bahwa laju pertumbuhan terbaik *B. licheniformis*, *B. subtilis* dan *E. aerogenes* secara berturut-turut adalah sebagai berikut 0,0514 / jam yang dicapai pada jam ke-6; 0,0927 /jam pada jam ke-6; dan 0,1125 /jam dicapai pada jam ke-8. Oleh karena itu, pada tahap penelitian selanjutnya digunakan inokulum *B. subtilis* berumur 6 jam, *B. subtilis* berumur 6 jam dan *E. aerogenes* berumur 8 jam.

Bakteri *B. licheniformis*, *B. subtilis* dan *E. Aerogenes* menunjukkan kurva pertumbuhan yang berbeda pada jenis medium yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa proses metabolisme pada ketiga isolat tersebut berbeda. Urutan tingkat pertumbuhan ketiga isolat tersebut dari yang paling rendah sampai yang paling tinggi secara berurutan adalah sebagai berikut: *B. subtilis* dengan nilai rata-rata laju pertumbuhannya sebesar 0,058/hari; *B. licheniformis* dengan nilai rata-rata laju pertumbuhannya sebesar 0,069/hari, dan *E. aerogenes* dengan nilai rata-rata laju pertumbuhannya sebesar 0,0741/hari.





Gambar 1 (a) Pertumbuhan *B. licheniformis*, *B. subtilis*, dan *E. aerogenes*; (b) Perubahan pH; (c) Pembentukan etanol; dalam fermentasi pada medium basal + 0,5% (b/v) gliserol, jumlah inokulum 10% v/v dan kondisi lingkungan: pH awal medium 7, suhu ruang, anaerob.

Grafik pertumbuhan isolat didukung dengan pola penurunan pH yang berbeda pula. Pada medium yang diinokulasi dengan *E. aerogenes*, penurunan pH tampak lebih tajam dibandingkan dengan medium fermentasi yang diinokulasi dengan kedua jenis bakteri yang lain. *E. aerogenes* memiliki laju pertumbuhan tertinggi sehingga dalam waktu yang sama jumlah sel di dalam kultur meningkat jauh lebih cepat sehingga jumlah produk yang dihasilkan lebih banyak. Sebagian besar produk metabolisme gliserol berupa asam-asam organik, seperti asam butirat, asam format, asam asetat dan asam laktat (Barbirato *et al.*, 1997; Jarvis, *et al.*, 1997). Penurunan pH diperkirakan terjadi karena akumulasi produk yang bersifat asam.

Kadar etanol tertinggi diperoleh pada fermentasi gliserol oleh *E. aerogenes* yaitu sebesar 0,033 g/L pada hari ke-4 dengan laju pembentukan etanol rata-rata sebesar 0,006 g/L per hari. Sementara kadar etanol pada fermentasi gliserol oleh *B. subtilis* sebesar 0,012 g/L dengan laju pembentukan etanol rata-rata 0,0025 g/L per hari dan oleh *B. Licheniformis* sebesar 0,014 g/L dengan laju pembentukan etanol rata-rata 0,0026 g/L per hari.

### Optimasi Kadar Awal Gliserol

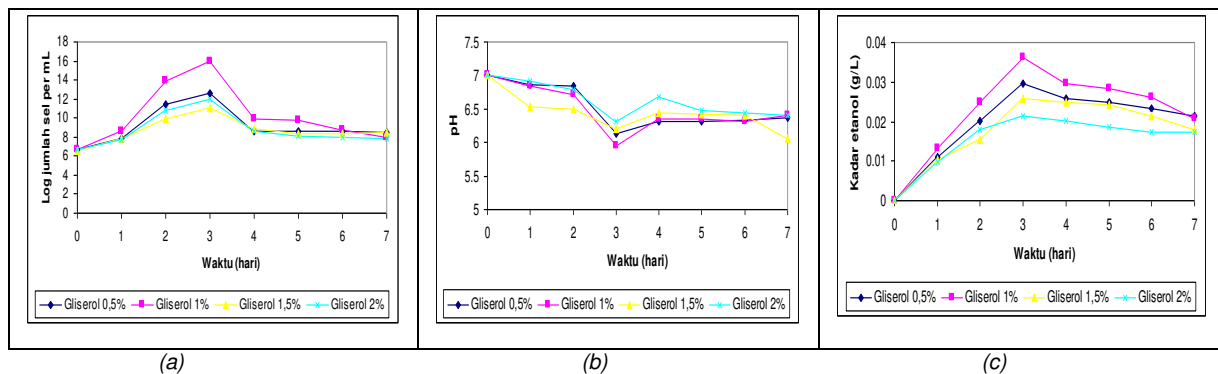
Pada tahap ini dilakukan perbandingan fermentasi gliserol menjadi etanol oleh *E. aerogenes* pada medium fermentasi dengan konsentrasi awal gliserol yang bervariasi yaitu 0,5% (b/v), 1,0% (b/v), 1,5% (b/v), dan 2,0% (b/v). Pemilihan variasi kadar gliserol ini berdasarkan pada penelitian Ito *et al.* (2005). Pada penelitian tersebut, ketika kadar awal gliserol 2,5% (b/v), konsumsi gliserol menurun dan mengakibatkan penurunan produk hidrogen dan etanol. Oleh karena itu, penggunaan gliserol yang lebih tinggi dikhawatirkan dapat menurunkan produksi etanol (Ito *et al.*, 2005).

Pola pertumbuhan *E. aerogenes* pada berbagai variasi konsentrasi awal gliserol, hampir sama. Laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada hari ke-2 untuk semua variasi. Pada hari ke-3 hingga hari ke-6, pertumbuhan sel mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-4 hingga hari ke-6, kadar nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan *E. aerogenes* telah menurun, sehingga terjadi kematian sel.

Laju pertumbuhan tertinggi sebesar 0,261/hari dicapai pada kadar gliserol 1,0% b/v. Sementara pada medium dengan konsentrasi awal gliserol 0,5%, laju pertumbuhan tertingginya adalah 0,208 /hari. Laju pertumbuhan sel pada medium fermentasi dengan konsentrasi awal gliserol 1,5% b/v dan 2,0% b/v jauh lebih rendah yaitu berturut-turut 0,1704/hari dan 0,1918/hari. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi inhibisi oleh gliserol yang berlebih terhadap proses pertumbuhan sel. Berdasarkan Ito *et al.* (2005), pertumbuhan sel, produksi etanol, dan gas H<sub>2</sub> menurun pada konsentrasi gliserol yang terlalu banyak. Mekanisme inhibisi pertumbuhan sel oleh gliserol pada *E. aerogenes* belum diketahui dengan pasti.

Penurunan pH yang terjadi selama proses fermentasi dari pH awal 7 menjadisekitar 6,0-6,4 pada hari ke-7. Data pH ini sesuai dengan data perubahan jumlah sel secara keseluruhan yang menunjukkan bahwa pada hari ke-0 sampai hari ke-3 terjadi kenaikan jumlah sel yang disertai dengan penurunan pH karena metabolit-metabolit yang bersifat asam. Kadar metabolit asam yang tinggi mempengaruhi viabilitas sel, sehingga terjadi penurunan jumlah sel mulai hari ke-3 hingga hari ke-7. Akumulasi produk basa dari hasil proses pelisisan sel yang telah mengakibatkan kenaikan pH pada hari ke-3 sampai hari ke-7.





Gambar 2 (a) Pertumbuhan *E. aerogenes*; (b) Perubahan pH medium; (c) Pembentukan etanol pada fermentasi gliserol oleh *E. aerogenes* dalam medium dengan konsentrasi awal gliserol yang bervariasi, jumlah inokulum 10% v/v dengan kondisi lingkungan: pH awal medium 7, suhu ruang, anaerob

Laju pembentukan etanol tertinggi sebesar 0,013 g/L per hari dicapai pada fermentasi dengan kadar gliserol 1,0 % (b/v) pada hari ke-4, yaitu sebesar 0,036 g/L. Penggunaan gliserol dengan konsentrasi awal 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% (b/v) tidak secara otomatis menghasilkan produk fermentasi dalam jumlah yang berlipat. Hal ini disebabkan beberapa faktor, seperti kondisi fisiologis sel yang mungkin berbeda dalam setiap kultur, sehingga hasil akhir metabolismenya pun berbeda pula. Pada kadar gliserol yang lebih tinggi, etanol yang dihasilkan lebih kecil. Kadar etanol tertinggi pada medium dengan kadar gliserol 1,5% (b/v) sebesar 0,026 g/L, sedangkan pada medium dengan kadar gliserol 2% (b/v) menghasilkan etanol sebesar 0,02 g/L. Hal ini menunjukkan adanya proses inhibisi oleh substrat terhadap produksi etanol pada kadar gliserol 1,5 % (b/v) dan 2,0 % (b/v).

Pada tahap-tahap optimasi fermentasi gliserol menjadi etanol oleh *E. aerogenes* yang telah dilakukan, tampak bahwa produksi etanol tertinggi yang diperoleh hanya sebesar 0,036 g/L pada medium dengan 1,0% (b/v) gliserol. Hasil konfirmasi analisis etanol dengan GC menunjukkan bahwa kadar etanol tertinggi yang diperoleh sekitar 0,791 g/L dengan *yield* sebesar 0,15. *Yield* etanol ini lebih rendah bila dibandingkan dengan yang diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Ito *et al.* (2005) yaitu sebesar 0,86 dengan menggunakan strain mikroba yang lain yaitu *E. aerogenes* HU-101 amobil. Perbedaan persentase kadar etanol ini mungkin diakibatkan oleh beberapa faktor, antara lain:

- E. aerogenes* yang digunakan pada proses fermentasi ini adalah strain lokal yang mungkin berbeda dengan strain yang digunakan pada penelitian Ito *et al.* (2005) yaitu *E. aerogenes* HU-101. Menurut McKane (1986) bakteri dengan sifat genetik (strain) yang berbeda, akan mempunyai kemampuan yang berbeda dalam melakukan hal yang sama.
- Suhu yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu ruang, sedangkan Ito (2005) menggunakan suhu 37°C pada penelitiannya. Menurut Buchanan dan Gibbons (1974), kisaran suhu untuk aktivitas *E. aerogenes* adalah 27-37°C. Perbedaan suhu yang digunakan dapat mempengaruhi aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam proses biokonversi gliserol menjadi etanol.
- Nutrisi mikroba merupakan faktor penting dalam proses fermentasi. Pada penelitian ini komponen nutrisi yang dioptimasi baru gliserol sebagai sumber karbon, sedangkan sumber nitrogen dalam medium fermentasi yaitu ekstrak ragi dan ammonium sulfat belum dioptimasi, sehingga perbandingan sumber karbon dan nitrogen (*CN ratio*) belum optimal.
- Ito menggunakan sel amobil, sedangkan dalam penelitian ini digunakan sel bebas. Sistem amobilisasi tidak hanya memudahkan terjadinya reaksi enzimatik, tapi juga dapat membantu kestabilan enzim sehingga enzim lebih resisten terhadap kemungkinan terdenaturasi (Black, 1999; Madigan *et al.*, 2006).

## KESIMPULAN

- Lima isolat dominan diperoleh dari limbah isi rumen sapi yaitu R1, R2, R3, R4, dan R5. Kelima isolate tersebut menunjukkan hasil negative dalam pengujian kemampuan memfermentasi gliserol menjadi etanol. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, dan *E. aerogenes* dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi SITH dapat mengkonversi gliserol menjadi etanol dengan kadar etanol yang terbentuk oleh masing-masing secara berurutan adalah 0,012 g/L, 0,014 g/L, dan 0,033 g/L.



2. Konsentrasi gliserol optimum yang digunakan pada fermentasi gliserol menjadi etanol oleh *E. aerogenes* adalah 1,0% (b/v) dengan produksi etanol tertinggi adalah 0,036 g/L yang setelah dikonfirmasi dengan GC diperoleh kadar etanol sebesar 0,791 g/L dengan yield sebesar 15%.

#### DAFTAR PUSTAKA

- AOAC International. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. US: AOAC.
- Barbirato, F., Astruc, S., Soucaille, P., Camarasa, P., Salmon, J. M., & Bories, A. (1997). Anaerobic Pathway of Glycerol Dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: Limitations and Regulations. *Applied Microbial Biotechnology*, 143, 2423-2432.
- Black, J. (1999). *Microbiology Principles and Explorations*. New Jersey: Prentice Hall Upper Saddle River.
- Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Cappucino, J. B., & Sherman, N. (1987). *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: The Benjamin Cummings Company, Inc.
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. (2005). Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 260-265.
- Jarvis, G. N., Moore, E. R., & Thieie, J. H. (1997). Formate and Ethanol are The Major Products of Glycerol Fermentation Produced by *Klebsiella planticola* Strain Isolated From Red Deer. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 166-174.
- Madigan, T. M., Martinko, J. M., & Parker, J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms (11 ed.)*. London: Pearson Prentice Hall.
- Maneely, T. (2006). *Glycerine Production and Utilization, Biodiesel One Day Course*. Idaho: Liberty Process Technology.
- McKane, L., & Kandel, J. (1986). *Microbiology Essentials and Application*. New York: McGraw Hill Book.
- Mcneil, B., & Harvey, L. M. (1990). *Fermentation a Practical Approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. New Jersey: Prentice-Hall International Editions.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol*, 18, 213-219.

#### DISKUSI

##### Penanya: Ni Wayan Sri Agustini - Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

Kenapa isolat mikroba diambil dari rumen sapi? Kenapa tidak diambil di limbah gliserol? Padahal lebih potensial.

##### Jawab:

Karena gliserol banyak dihasilkan di dinding sel tumbuhan yang dimakan oleh sapi sehingga tanaman yang dimakan oleh sapi akan tercerna di dalam rumen sapi melalui pencernaan secara kimiawi sehingga gliserol banyak terdapat di rumen

