

Pengaruh Komposisi Medium pada Tahap Solventogenik dalam Produksi Biobutanol dari Fermentasi Glukosa menggunakan *Clostridium acetobutylicum* B530

Dita Grinanda^{1,b)} dan Elvi Restiawaty ^{1,2,a)}

¹Program Studi S-1 Rekayasa Hayati
Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB)
Jl. Let. Jen. Purn. Dr. (HC) Mashudi, No.1 Sumedang-Jawa Barat, Indonesia

²Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung (ITB)
Jl. Ganesha no.10 Bandung, Indonesia, 40132

^{a)} erestiawaty@sith.itb.ac.id (corresponding author)

^{b)} dita_grinanda@students.itb.ac.id

Abstrak

Proses produksi biobutanol dapat dilakukan melalui proses fermentasi gula oleh *Clostridium* sp. Pada proses industri, aplikasi fermentasi ini sering mengalami kendala karena perolehan butanol yang rendah dan biaya nutrisi untuk pertumbuhan agen hayati yang cukup tinggi. Salah satu upaya yang dilakukan untuk menekan kendala-kendala tersebut adalah dengan menggunakan medium fermentasi yang dimodifikasi. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi berupa penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan peniadaan komponen ekstrak daging sapi dalam medium fermentasi reinforced clostridial media (RCM). Penambahan ion besi dengan konsentrasi tertentu dapat mempengaruhi pembentukan asetil ko-A yang diperlukan dalam proses sintesis produk-produk fermentasi. Peniadaan komponen ekstrak daging sapi dalam medium fermentasi dilakukan karena memiliki harga relatif mahal, perlakuan ini menyebabkan fase lag bakteri menjadi lebih lama dari kontrol, namun tidak memberikan perbedaan signifikan terhadap laju pertumbuhan spesifik, yaitu $0,369 \text{ jam}^{-1}$ (kontrol) dan $0,255 \text{ jam}^{-1}$ (modifikasi). Pada penelitian ini, diperoleh produk solventogenik berupa etanol dengan konsentrasi $0,452 \text{ g/L}$ dan $0,317 \text{ g/L}$ masing-masing pada medium fermentasi kontrol dan modifikasi. Produk butanol belum terdeteksi, diduga karena konsentrasi asam butirat dan tekanan parsial gas di dalam sistem fermentasi belum mencukupi untuk pembentukan butanol.

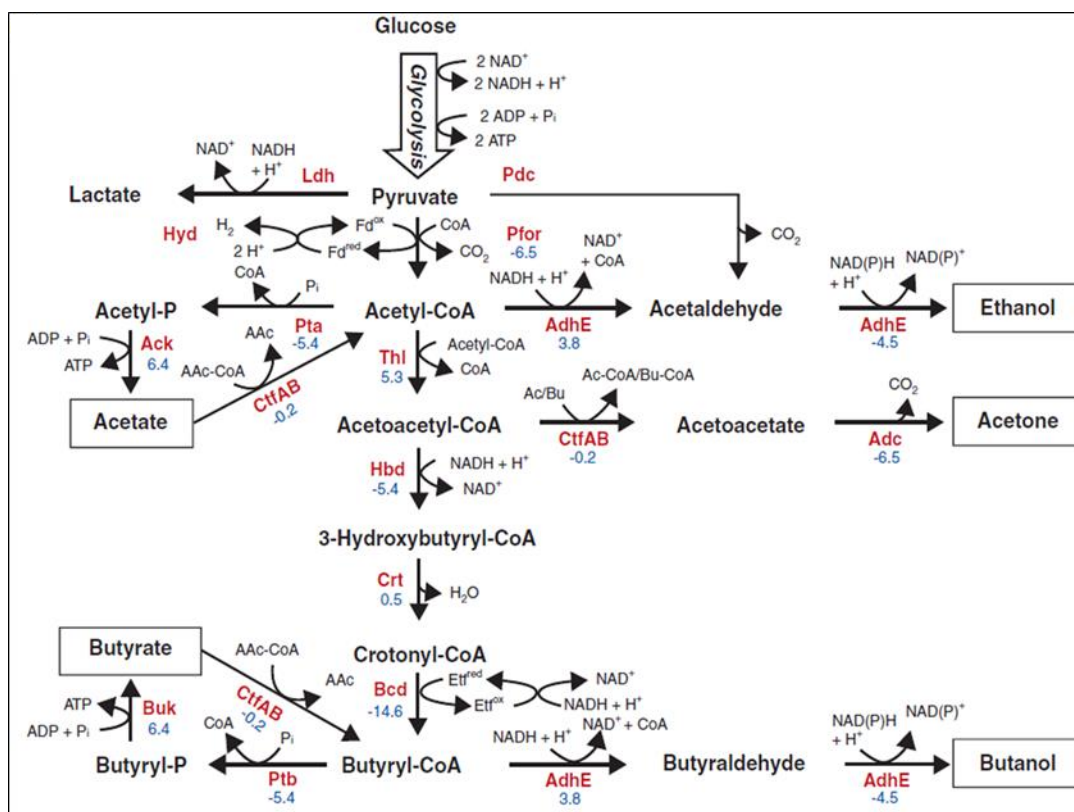
Kata-kata kunci: *Clostridium acetobutylicum*, solventogenik, glukosa, ion besi, asam butirat

PENDAHULUAN

Menipisnya ketersediaan bahan bakar fosil dan polusi terhadap lingkungan meningkatkan ketertarikan dan usaha para peneliti untuk menemukan sumber energi terbarukan yang ramah lingkungan. Biobutanol merupakan senyawa kimia yang menjanjikan sebagai alternatif bahan bakar karena memiliki karakteristik yang hampir sama dengan bensin dari segi kandungan energi, angka oktan, dan *air-fuel ratio*. Hal ini menyebabkan butanol dapat dicampur dengan bensin dalam konsentrasi tinggi dan bahkan dapat digunakan langsung pada mesin tanpa perlu modifikasi [1]. Selain itu, butanol memiliki beberapa keunggulan dibanding *biofuel* lain seperti metanol dan etanol, yaitu butanol lebih tidak korosif dan lebih aman untuk dicampur

dengan bensin, karena memiliki nilai tekanan uap yang jauh lebih rendah namun mengandung konten energi yang lebih tinggi [2].

Biobutanol dihasilkan melalui proses fermentasi aseton-butanol-etanol (ABE) oleh bakteri solventogenik clostridia dari genus *Clostridium* sp., dengan perbandingan perolehan 3:6:1 [3]. Karakteristik khas dari fermentasi bakteri solventogenik adalah adanya dua tahap fermentasi, asidogenik dan solventogenik. Tahap awal, yaitu asidogenik terjadi selama fase pertumbuhan eksponensial sel. Pada tahap ini, gas CO₂ dan H₂ serta senyawa asam, yaitu asam asetat dan asam butirat dihasilkan dalam jumlah banyak sehingga menyebabkan suasana asam pada medium. Oleh karena itu, sebagai bentuk pertahanan sel, metabolisme bakteri masuk ke tahap kedua, yaitu solventogenik, senyawa asam ter-reasimilasi dan digunakan kembali sebagai prekursor dalam pembentukan ABE [4,5]. Alur metabolisme dan tahap fermentasi pada *Clostridium* sp. ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Alur metabolisme pada *Clostridium* sp. [4]

Produk yang dihasilkan selama tahap asidogenik (H₂, asam asetat, dan asam butirat) memegang peranan penting dalam produksi senyawa akhir (aseton-butanol-etanol) karena berfungsi sebagai prekursor. Berbagai cara telah diupayakan untuk meningkatkan perolehan produk akhir, antara lain dengan mengatur kondisi fermentasi seperti pH, temperatur, dan kandungan nutrisi pada medium fermentasi. Fermentasi pada pH 4,5 dan rentang temperatur 33°C-37°C merupakan kondisi optimum untuk produksi biobutanol [1,6]. Apabila pH medium berada di bawah 4,5 sebelum senyawa asam dari tahap asidogenik cukup diproduksi, akan menyebabkan tahap solventogenik berlangsung sangat singkat dan tidak produktif. Pengaruh komponen nutrisi pada fermentasi biobutanol oleh bakteri *C. acetobutylicum* diketahui dengan cara melakukan pengurangan atau penambahan nutrisi dalam medium. Penambahan ion Fe, Mg, Mn, dan K dengan konsentrasi tertentu pada medium fermentasi dapat meningkatkan produksi biobutanol [7].

Pada proses industri, aplikasi fermentasi ini sering mengalami kendala karena perolehan butanol yang rendah dan biaya produksi yang cukup tinggi. Pemilihan komponen medium fermentasi dan rekayasa metabolisme menjadi alternatif solusi untuk menekan hambatan ini [8,9,10]. Oleh karena itu, dalam rangka menentukan komposisi medium fermentasi yang tepat baik dari segi ekonomi maupun perolehan untuk produksi biobutanol, pada penelitian ini dilakukan modifikasi pada medium fermentasi. Modifikasi yang dilakukan adalah meniadakan komponen ekstrak daging sapi dan penambahan zat besi dalam bentuk

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Ekstrak daging sapi berperan sebagai sumber nitrogen dan vitamin pada medium fermentasi *reinforced clostridial media* (RCM), peniadaan komponen ini dilakukan karena memiliki harga relatif mahal. Perlakuan ini diduga akan menyebabkan bakteri mengalami fase lag yang lebih lama karena nutrisi pada medium fermentasi akan menjadi lebih miskin dibanding dengan medium sebelumnya. Ion besi diperlukan dalam pembentukan enzim ferredoxin; enzim kunci dalam pembentukan asetil ko-A, prekursor awal dalam tahap sintesis semua produk metabolisme sel, sehingga penambahan senyawa ini diduga akan meningkatkan perolehan produk [11,12]. Fokus penelitian ini adalah mengkaji pengaruh medium modifikasi terhadap perolehan produk ABE (aseton-butanol-etanol) dari fermentasi glukosa.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme dan Pemeliharaan

Kultur bakteri *Clostridium acetobutylicum* B530 diperoleh dari ARS (*Agricultural Culture Collection*) *Culture Collection* (NRRL), USA. Bakteri ditumbuhkan pada medium RCM dalam keadaan anaerob pada temperatur 37°C . Inokulum disiapkan dengan menginkubasi *C. acetobutylicum* B530 selama 24 jam dengan temperatur 37°C dalam botol serum 50 ml pada kondisi anaerob. Penyimpanan biakan dilakukan pada agar miring yang disimpan pada 4°C dan medium diperbarui setiap 14 hari.

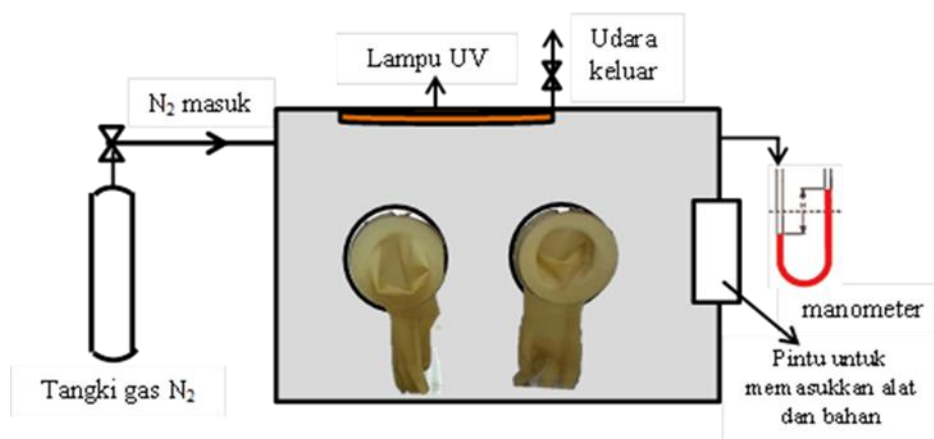
Fermentasi

Pada penelitian ini digunakan glukosa sebagai sumber karbon dan RCM sebagai medium fermentasi dengan komposisi per liter nya adalah: 10 g ekstrak daging sapi (Oxoid, Inggris), 10 g pepton (*Bio Basic Inc.*, Kanada), 5 g glukosa (*Bio Basic Inc.*, Kanada), 5 g NaCl (*Bio Basic Inc.*, Kanada), 3 g ekstrak ragi (Himedia, India), 3 g CH_3COOH (*Bio Basic Inc.*, Kanada), 1 g pati terlarut (*Bio Basic Inc.*, Kanada), dan 0,5 g L-sistein HCl (*Bio Basic Inc.*, Kanada) (pH akhir medium : 6,8). Variasi komponen medium yang digunakan pada proses fermentasi ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Variasi Medium Fermentasi

Kelompok	Medium
Kontrol	Kontrol
A	RCM tanpa ekstrak daging sapi + 10 ppm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Volume kerja fermentasi adalah 20 ml dalam botol serum 30 ml. Sterilisasi medium dilakukan melalui proses autoklaf ($P=1,5 \text{ kg/cm}^2$; $T=121^\circ\text{C}$; $t=20$ menit). Selain untuk sterilisasi medium, proses autoklaf juga berperan untuk menciptakan kondisi anaerob pada medium. Inokulasi dilakukan di dalam *anaerobic chamber* yang sebelumnya telah dipurging dengan gas N_2 selama 15 menit [13]. Skema *anaerobic chamber* ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Skema *anaerobic chamber*

Proses inokulasi dilakukan dengan memasukkan inokulum (10% v/v) ke dalam medium dengan menggunakan *syringe* [7]. Kultur diinkubasi pada temperatur 37°C dengan lama waktu fermentasi 120 jam.

Pada 20 jam pertama, proses fermentasi akan menghasilkan gas CO₂ dan H₂, pada penelitian ini, gas tersebut dikeluarkan secara berkala menggunakan *syringe* agar tekanan dalam botol serum tidak terlalu tinggi.

Pengukuran Densitas Sel dan Pertumbuhan Sel.

Pengukuran densitas sel dilakukan dengan pengukuran *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer optima SP-300 pada panjang gelombang (λ) sebesar 600 nm. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan dengan mengalurkan berat kering sel terhadap waktu. Berat kering sel diperoleh dengan mengkorelasikan nilai OD₆₀₀ terhadap berat kering sel pada beberapa konsentrasi. Berat kering diperoleh dari sampel fermentasi yang telah dipisahkan dengan metode sentrifugasi (eppendorf 5430 R) pada 6000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dioven pada temperatur 60°C dan ditimbang hingga diperoleh massa konstan [14].

Pengukuran pH

Pengukuran pH sampel supernatan dilakukan pada waktu-waktu tertentu. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter *eutech instruments* pH 510.

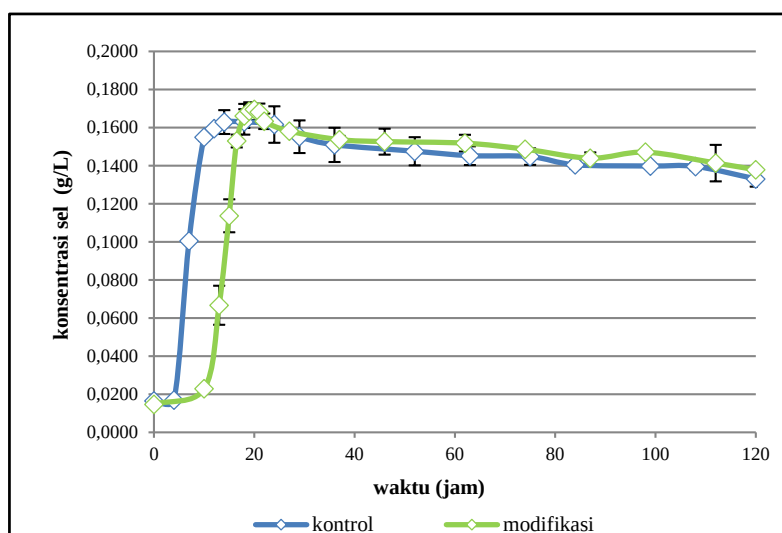
Analisis

Konsentrasi glukosa dan produk hasil fermentasi, dianalisis menggunakan HPLC *refractive index detector* (RID) *Waters* 2414 dengan kolom Aminex HPX87H (biorad, CA) *autosampler* waters 2707. Temperatur yang digunakan adalah 60°C dengan fasa gerak H₂SO₄ 0,005 M dan laju alir 0,6 ml/menit.

HASIL DAN DISKUSI

Pengaruh Medium Fermentasi Modifikasi pada Kinetika Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri pada fermentasi glukosa ditunjukkan pada gambar 3. Pada medium kontrol, fase lag terjadi pada 4 jam pertama dan selanjutnya masuk fase eksponensial hingga jam ke-10 sebelum akhirnya mencapai fase deselerasi. Berbeda dengan medium fermentasi kontrol, fase lag pada medium modifikasi terjadi lebih lama, yakni mencapai 12 jam, kemudian dilanjutkan fase eksponensial sampai sekitar jam ke-18 hingga akhirnya mencapai fase deselerasi.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan sel pada fermentasi glukosa dengan medium kontrol dan modifikasi (data merupakan rata-rata dari dua kali pengulangan)

Ekstrak daging sapi pada medium fermentasi RCM berperan sebagai sumber nitrogen dan vitamin. Nitrogen diperlukan sebagai unsur penyusun asam amino, asam nukleat, dan koenzim. Ketiadaan ekstrak

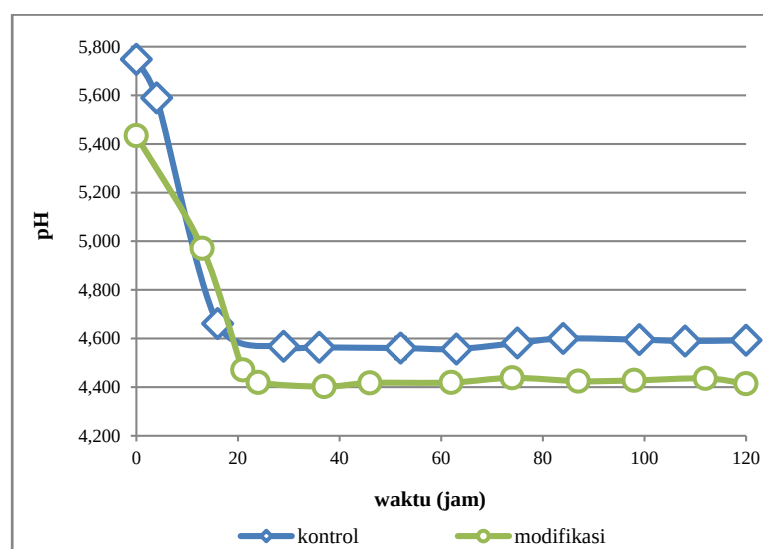
daging sapi pada medium fermentasi akan menyebabkan medium menjadi lebih “miskin” dibanding medium kontrol. Hal ini menyebabkan sel bakteri dalam medium fermentasi modifikasi membutuhkan waktu adaptasi terlebih dahulu, sehingga fase lag pada keadaan ini mencapai ± 12 jam karena berada pada lingkungan baru dengan kondisi nutrisi yang terbatas. Modifikasi pada medium fermentasi tidak memberikan pengaruh signifikan pada laju pertumbuhan spesifik (μ) dan waktu penggandaan jika dibandingkan terhadap kontrol. Hal ini dapat dilihat dari kecenderungan kemiringan kurva pada fase logaritmik pertumbuhan sel. Kinetika pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada tabel 2. Waktu penggandaan yang diperoleh pada medium kontrol sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang menyatakan bahwa waktu penggandaan pada bakteri solventogenik berada pada rentang 1,15-2,93 jam [15].

Tabel 2. Kinetika pertumbuhan *C.acetobutylicum* B530 dengan sumber karbon glukosa

Medium	μ (jam ⁻¹)	τ (jam)
Kontrol	0,369	1,870
Modifikasi	0,255	2,718

Perubahan Nilai pH Medium selama Proses Fermentasi

Selama proses fermentasi *C.acetobutylicum* B530, terjadi penurunan pH pada semua variasi medium yaitu dari 5,5 ke 4,5 (setelah ± 20 jam inkubasi). Setelah sel masuk ke fase deselerasi (setelah jam ke-20 hingga jam ke-120), tidak terjadi kenaikan signifikan pada pH medium. Pada akhir fermentasi, diperoleh pH medium sebesar $4,593 \pm 0,023$ (kontrol) dan $4,414 \pm 0,016$ (modifikasi). Kurva penurunan pH ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Kurva perubahan pH pada medium kontrol dan modifikasi (data merupakan rata-rata dari dua kali pengulangan)

Penurunan pH terjadi karena sel memproduksi senyawa asam berupa asam asetat dan asam butirat [5]. Fenomena ini membuktikan bahwa tahap asidogenik terjadi selama fase pertumbuhan eksponensial sel yang ditandai dengan adanya penurunan pH pada awal proses fermentasi [4]. Berdasarkan hasil yang diperoleh, adanya modifikasi pada medium fermentasi tidak memengaruhi kecenderungan perubahan pH pada fermentasi tetes tebu. Penurunan pH pada medium fermentasi memicu sel melakukan bentuk pertahanan dengan melakukan proses solventogenik. Selain itu, pH rendah merupakan salah satu prasyarat kondisi yang harus dipenuhi agar *C. acetobutylicum* dapat melakukan proses solventogenik. Beberapa literatur menyatakan bahwa kondisi pH optimum untuk proses solventogenik adalah 4,5 [1,4,12].

Pengaruh Medium Modifikasi pada Produk Fermentasi

Produk utama fermentasi dengan bakteri solventogenik adalah aseton, butanol, dan etanol, namun pada penelitian yang telah dilakukan hanya berhasil dihasilkan etanol sebagai produk akhir fermentasi. Hasil fermentasi ditabulasikan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil fermentasi glukosa pada medium kontrol dan modifikasi

Produk (g/L)	Kontrol	Modifikasi
Aseton	Tidak terdeteksi	
Butanol		
Etanol	0,452	0,317

Tidak terdapat perbedaan signifikan pada konsentrasi etanol yang diperoleh pada kedua medium. Penambahan senyawa besi dalam bentuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada medium fermentasi dilakukan untuk meningkatkan pembentukan enzim ferredoxin, karena enzim ini tersusun dari senyawa ion besi dan sulfur. Enzim ini bekerja secara anaerob untuk mengoksidasi asam piruvat menjadi asetil ko-A, prekursor utama dalam sintesis produk [11]. Pada tahap ini, diduga penambahan senyawa besi belum optimal, sehingga hasil dari produk fermentasi dengan medium modifikasi masih belum optimal.

Pada penelitian ini belum diperoleh produk utama, yaitu butanol. Hal ini diduga disebabkan oleh kurangnya konsentrasi senyawa prekursor yang dihasilkan selama tahap asidogenik, seperti asam butirat dan gas hidrogen (H_2). Asam butirat diperlukan sebagai prekursor terbentuknya butanol, diperlukan minimal 2 g/L asam butirat untuk memulai tahap solventogenik [16]. Selama tahap awal fermentasi, gas yang terbentuk diambil berkala menggunakan *syringe* untuk mengurangi tekanan dalam botol serum. Perlakuan ini menyebabkan gas hidrogen yang diperlukan untuk proses sintesis produk akhir juga ikut terambil, sehingga tekanan parsial gas H_2 di dalam sistem kerja menjadi berkurang.

KESIMPULAN DAN REKOMENDASI

Medium fermentasi modifikasi, yaitu RCM tanpa ekstrak daging sapi dengan penambahan ion besi dapat digunakan sebagai medium fermentasi karena tidak memberikan perbedaan signifikan pada kinetika pertumbuhan sel dan perolehan produk terhadap kontrol. Lebih lanjut, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh penambahan ion besi dalam konsentrasi yang lebih tinggi dan senyawa untuk menyerap gas karbon dioksida serta metode untuk menangkap gas H_2 yang dihasilkan selama tahap asidogenik serta dilihat pengaruhnya terhadap produk solventogenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ARS (*Agricultural Culture Collection*) Culture Collection (NRRL), USA atas strain yang dihibahkan dan Program Riset ITB atas dana penelitian.

REFERENSI

1. Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., dan Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-228.
2. Al-Shorgani, N. K. N., Ali, E., Kalil, M. S., dan Yusoff, W. M. W. (2012). Bioconversion of butyric acid to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a limited nutrient medium. *BioEnergy Research*, 5(2), 287-293.
3. Green, E. M. (2011). Fermentative production of butanol the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 337-343.
4. Lütke-Eversloh, T. dan Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5), 634-647.
5. Jang, Y. S., Lee, J. Y., Lee, J., dkk. (2012). Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *MBio*, 3(5).
6. Tsai, T. Y., Lo, Y. C., dan Chang, J. S. (2014). Effect of medium composition and pH control strategies on butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Energy Procedia*, 61, 1691-1694.
7. Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H., dan Gay, R. (1982). Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), 1318-1324.

8. Jones, D. T. dan Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484.
9. Tashiro, Y. dan Sonomoto, K. (2010). Advances in butanol production by clostridia. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Microbiology Book Series, number# 2), 1383-1394.
10. Kótai, L., Szépvölgyi, J., Szilágyi, M., Zhibin, L., Baiquan, C., Sharma, V., dan Sharma, P. K. (2013). Biobutanol from renewable agricultural and lignocellulose resources and its perspectives as alternative of liquid fuels. *In-Tech* (pp. 199-262).
11. Durán-Padilla, V. R., Davila-Vazquez, G., Chávez-Vela, N. A., Tinoco-Valencia, J. R., dan Jáuregui-Rincón, J. (2014). Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. *Biofuel Research Journal*, 1(4), 129-133.
12. Ezeji, T. C., Qureshi, N., dan Blaschek, H. P. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 220-227.
13. Purwadi, R., Rasrendra, C.B., Restiawaty, E., Sukma, M.S., dan Chintyarani, A.M. (2015). Pengembangan metode kultivasi Solventogenic clostridia untuk proses produksi biobutanol. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2015, Yogyakarta, 12-13 Oktober 2015.
14. Fond, O., Matta-Ammouri, G., Petitdemange, H., dan Engasser, J. M. (1985). The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 195-200.
15. Sillers, R., Chow, A., Tracy, B., dan Papoutsakis, E. T. Metabolic engineering of the nonsporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metabolic Engineering* 6 (2010), 321-332.
16. Yang, S. T. (2008). *U.S. Patent No. 20,080,248,540*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.