

ISOLASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ETANOL DARI KOMPOS

Pujoyuwono Martosuyono dan Misgiyarta

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian

ABSTRAK

Bioetanol merupakan sumber energi alternatif pengganti minyak bumi dimasa depan. Keuntungan pemakaian bioetanol adalah dapat menurunkan tingkat polusi dan pemanasan global karena hasil pembakaran etanol tidak memberikan tambahan netto CO₂ pada lingkungan. Penurunan cadangan minyak bumi dunia juga memberikan kontribusi pada pemikiran untuk mencari sumber energi yang dapat terbarukan (*renewable resources*) seperti etanol. Satu isolat bakteri termofilik unggul telah diisolasi dari sampel kompos yang menunjukkan kemampuan untuk memproduksi etanol. Hasil identifikasi dengan sekuensing 16S rRNA menunjukkan isolat ini diklasifikasikan sebagai *Geobacillus thermoleovorans*, bakteri Gram positif berbentuk batang yang mampu tumbuh pada kisaran substrat yang luas, dengan suhu optimum pertumbuhan 60°C dan bersifat fakultatif anaerob. Pada fermentasi skala laboratorium menggunakan Erlenmeyer pada suhu 60°C, pH 7,0, kecepatan pengocokan 200 rpm dalam medium Thermophilic Mineral Medium (TMM) yang diperkaya dengan trace elements dan vitamin, isolat ini mampu memproduksi etanol mencapai 4.2 g/l sampai jam ke 48. Isolat ini juga menunjukkan aktivitas enzim *Pyruvate decarboxylase* (PDC), enzim kunci dalam produksi etanol, yang menunjukkan stabilitas yang tinggi terhadap pemanasan dengan meningkatnya aktivitas enzim tersebut pada pemanasan 60°C sebelum pengukuran aktivitasnya.

Kata kunci: bakteri termofil, etanol, *Geobacillus thermoleovorans*, kompos.

ABSTRACT

Bioethanol is an alternative energy source for substituting the fossil fuel in the future. The advantage of ethanol utilization as a fuel is the capability to reduce the pollution level and global warming since it recycles atmospheric carbon from renewable biomass such as cellulose, hemicellulose and starch, thus 'closing the carbon balance'. The ever-increasing use of petroleum produced for transportation has resulted in the rapid depletion of domestic fossil fuel reserves. This increase in demand and shortage of supplies has caused crude oil prices to soar. Due to high oil prices, the economics have changed in favor of using bioethanol as a renewable energy source to replace petroleum as a fuel. One isolate of thermophilic bacteria with the capability to produce ethanol had been isolated from compost sample. Identification by 16S rRNA sequencing reveal that the isolate is classified as *Geobacillus thermoleovorans*, a Gram positive bacteria, rod shape, grow on wide variety of substrates with optimum growing temperature 60°C, and facultative anaerobe. Laboratory scale fermentation in shake flask at 60°C, pH 7.0, agitation 200 rpm in Thermophilic Mineral Medium enriched with trace elements and vitamins, the isolate was able to produce 4.2 g/l ethanol after 48 hours. The enzyme assay of *Pyruvate decarboxylase*; the key enzyme in ethanol production system; was shown a thermostable character of the enzyme. Pre-incubation at 60°C prior to assay increasing the enzyme activity.

Keywords: Thermophilic bacteria, ethanol, *Geobacillus thermoleovorans*, compost.

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan bakar minyak yang terus meningkat untuk memenuhi kebutuhan energi dunia seperti transportasi menyebabkan cadangan minyak bumi semakin menipis. Kebutuhan yang terus meningkat yang diiringi dengan penyusutan suplai menyebabkan harga minyak bumi terus melambung mencapai tingkat harga yang mengganggu keseimbangan perekonomian dunia. Harga minyak bumi yang sangat melonjak dalam beberapa tahun terakhir ini telah menyebabkan krisis energi di hampir seluruh negara. Kelangkaan bahan bakar minyak akibat kesulitan pemerintah dalam mensubsidi biaya penggunaan bahan bakar minyak telah memicu antrean panjang hampir di seluruh Indonesia. Dalam jangka panjang hal ini dapat menyebabkan krisis yang mengancam stabilitas keamanan negara akibat keresahan masyarakat.

Bertolak dari kondisi tersebut, terdapat pemikiran untuk mencari sumber bahan bakar alternatif yang dapat mensubstitusi minyak bumi dalam pemakaian sehari-hari, terutama untuk penggunaan sebagai bahan bakar kendaraan bermotor dan industri. Salah satu alternatif yang potensial untuk dikembangkan adalah penggunaan bio-etanol (etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi bahan berpati oleh mikroorganisme) (Aristidou and Penttilä, 2000).

Banyak sekali keuntungan penggunaan bio-etanol sebagai bahan bakar alternatif pengganti minyak bumi. Faktor utama yang menjadi pertimbangan adalah pati sebagai substrat produksi bio-etanol merupakan sumber energi yang dapat terbarukan (*renewable resources*). Selain itu, penggunaan bahan bakar etanol dapat dikatakan tidak memberikan tambahan netto karbondioksida pada lingkungan karena CO₂ yang dihasilkan dari pembakaran etanol diserap kembali oleh tumbuhan dan dengan bantuan sinar matahari digunakan dalam proses fotosintesis. Pertimbangan ketiga adalah sebagai bahan bakar bio-etanol memiliki nilai oktan tinggi sehingga dapat digunakan baik sebagai bahan peningkat oktan (*octane enhancer*) menggantikan penggunaan senyawa eter dan penggunaan logam berat seperti Pb sebagai '*anti-knocking agent*' yang memiliki dampak buruk terhadap lingkungan. Dengan nilai oktan yang tinggi, maka proses pembakaran menjadi lebih sempurna dan emisi gas buang hasil pembakaran dalam mesin kendaraan bermotor lebih baik.

Sampai saat ini etanol diproduksi dengan teknik hidrasi katalitik etilena atau fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* (Lee, 1997). Etanol yang dihasilkan secara fermentasi oleh mikroorganisme dikenal dengan istilah bio-etanol. Kedua jenis mikroorganisme tersebut dikelompokkan dalam golongan mesofilik. Kelemahan kedua jenis mikroorganisme tersebut adalah kemampuan penggunaan substrat yang terbatas yaitu hanya menggunakan glukosa untuk memproduksi etanol. Selain itu dengan suhu pertumbuhan yang berkisar antara 30-37°C menyebabkan pemisahan produk membutuhkan suplai energi karena penyulingan etanol dilakukan pada suhu 70-80°C (Lynd, 1989).

Untuk mengatasi masalah tersebut dilakukan upaya untuk mencari alternatif mikroba termofilik yang pada umumnya memiliki karakteristik mampu menggunakan berbagai macam substrat. Kelebihan lain yang potensial dalam sistem termofilik ini adalah sifat fisik medium pada suhu reaksi tinggi (menurunnya viskositas dan tegangan permukaan, meningkatkan difusi dan kelarutan substrat) (Tolner, *et.al.*, 1997), kecepatan reaksi yang tinggi (Brock, 1985), tidak memerlukan sistem pendingin bioreactor, kemungkinan kontaminasi yang rendah, produk lebih tinggi, mengurangi suplai energi dalam pemisahan produk, dan kemungkinan untuk melakukan fermentasi secara simultan dari polisakarida menjadi etanol (Lynd, 1989).

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri termofilik yang mampu memproduksi etanol dan melakukan karakterisasi sifat-sifat fisiologis dan biokimianya.

BAHAN DAN METODE

Bahan.

1. Kompos. Kompos yang digunakan dalam penelitian ini adalah kompos dalam fase termogenik (suhu 60-80°C) berusia 2-6 bulan yang diperoleh dari lokasi pengomposan di Lucas Heights Landfill di Sydney, NSW, Australia. 2. Bahan kimia yang digunakan berkategori *pure analysis* (p.a) kecuali disebutkan secara khusus. 3. Peralatan yang digunakan adalah gas kromatografi (Packard, series 427), spektrofotometer Ultraspect 2000 (Pharmacia Biotech) yang dihubungkan dengan komputer dengan program Swift II untuk analisis enzim, PCR (Perkin Elmer 2400), ABI prism *DNA sequencer*, inkubator goyang, sentrifuse beckman J-21, perangkat ultrasonik, dan peralatan gelas yang lazim dipakai.

Metode

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri dari sampel kompos dilakukan dengan cara sebar langsung (*direct plating*) dan menggunakan media diperkaya (*enrichment media*). Isolasi secara *direct plating* dilakukan dengan melakukan pengenceran berseri sampel kompos dalam air steril dan disebar pada cawan petri berisi medium untuk isolasi. Sedangkan teknik *enrichment* dilakukan dengan menambahkan sampel kompos dalam *thermophilic Minimum Medium* (TMM) yang diperkaya dengan Xylosa sebagai satu-satunya sumber karbon dan penambahan 4% etanol sebagai medium seleksi. Isolasi dan seleksi koloni dilakukan dalam medium padat dengan komposisi sama. Koloni yang tumbuh dimurnikan dengan cara mengambil tiap koloni tunggal untuk diseleksi lebih lanjut.

Seleksi bakteri penghasil etanol

Kemampuan tiap isolat untuk memproduksi etanol dilakukan dengan cara menumbuhkan tiap isolat dalam erlenmeyer berisi medium cair dengan menggunakan xylosa sebagai sumber karbon tunggal pada suhu 60°C. Sampel diambil pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, dan 48. Tiap sampel diukur jumlah biomassa dan supernatannya digunakan untuk pengukuran jumlah etanol menggunakan kromatografi gas dengan kolom Porapak Q (ukuran fase diam 100-200 μ m), gas pembawa nitrogen, suhu oven 160°C (isothermal), suhu injektor dan detektor 200°C dan detektor *Flame Ionization Detector* (FID).

Suhu optimum pertumbuhan dan produksi etanol

Isolat yang menunjukkan kemampuan menghasilkan etanol digunakan untuk karakterisasi lebih lanjut. Suhu optimum pertumbuhan dan produksi etanol diukur pada suhu 50, 60 dan 70°C.

Identifikasi isolat penghasil etanol

Identifikasi isolat terpilih penghasil etanol dilakukan dengan melakukan teknik pewarnaan Gram dan identifikasi secara molekuler menggunakan teknik sekuensing 16S rRNA (Blanc, *et.al.*, 1997..

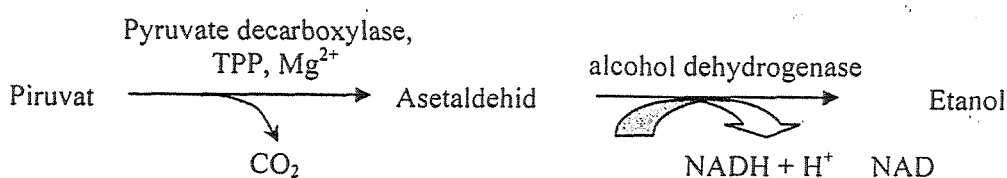
Karakterisasi sifat fisiologis dan biokimia isolat terpilih

Penetapan karakter sifat fisiologi dan biokimia isolat terpilih dilakukan dengan cara melakukan uji penggunaan substrat sebagai sumber karbon, uji Voges-Proskauer, dan motilitas bakteri.

Uji keberadaan dan stabilitas panas enzim Pyruvate decarboxylase (PDC)

Enzim kunci yang menentukan kemampuan suatu mikroorganisme dalam memproduksi etanol adalah enzim *pyruvate decarboxylase*. Keberadaan enzim ini pada isolat terpilih dilakukan dengan cara menguji aktivitasnya. Enzim dilepas dari sel dengan cara memecah sel menggunakan teknik ultrasonik. Aktivitas enzim diukur dengan melakukan asay enzim berdasarkan reaksi berantai dekarboksilasi dan dehidrogenasi pada suhu 25°C. Keberlangsungan reaksi diketahui dengan melihat penurunan absorbansi pada panjang gelombang 340 nm.

Konversi piruvat menjadi etanol digambarkan pada diagram berikut ini:



Gambar 1. Reaksi pembentukan etanol dari piruvat dengan kerja enzim PDC dan ADH

Untuk menentukan stabilitas terhadap panas dari enzim PDC dilakukan perlakuan pemanasan ekstrak enzim pada suhu 25, 40, 50, dan 60°C. Sebelum diukur aktivitasnya. Sebagai control digunakan ekstrak sel dari *Zymomonas mobilis* sebagai kontrol positif dan ekstrak sel *E.coli* DH5 α sebagai kontrol negatif.

Profil pertumbuhan isolate terpilih pada TMM.

Pertumbuhan isolate terpilih dalam medium TMM diamati dengan menggunakan glukosa sebagai substrat. Medium yang digunakan divariasikan dengan cara menambahkan larutan mineral perunut (*trace elements*) dan vitamin. Empat variasi medium digunakan dalam percobaan, yaitu TMM + glukosa (TG), TG + *trace elements* (TGT), TG + vitamin (TGV), dan TG + *trace element* + vitamin (TGTV). Konsentrasi awal glukosa yang digunakan dalam medium adalah 30 g/l dan pH diatur pada pH 7,0. Pertumbuhan isolat diukur dengan membaca OD pada 660 nm pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, dan 48. Sampel yang diambil pada waktu-waktu tersebut digunakan untuk analisis sisa gula, etanol, laktat, dan asetat. Analisis dilakukan menggunakan HPLC dengan fasa gerak larutan H₂SO₄ 0,5 mM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri terpilih

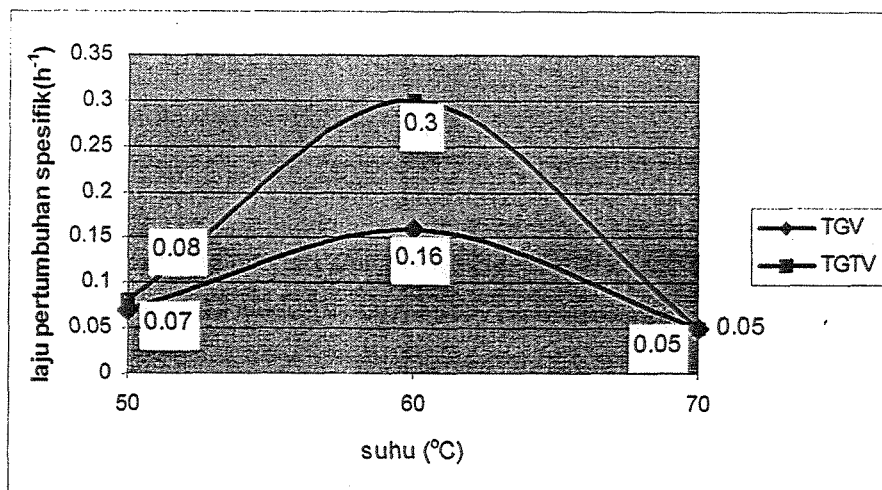
Tahap awal isolasi bakteri dari kompos menghasilkan lebih dari 150 isolat yang mampu tumbuh pada suhu 50-60°C. Seluruh isolat tumbuh dengan baik pada waktu 24 jam inkubasi. Beberapa isolat menunjukkan kemiripan morfologis dilihat dari warna dan bentuk koloninya. Pemurnian isolat dilakukan dengan memisahkan satu demi satu isolat tunggal yang dihasilkan dan disebarkan pada medium padat untuk menghasilkan koloni tunggal yang berbeda satu sama lain.

Setelah mendapatkan isolat murni dilakukan uji kemampuan produksi etanol dari tiap isolat. Hasil tahap ini diperoleh 3 isolat yang menunjukkan karakteristik sebagai bakteri penghasil etanol. Ketiga isolat tersebut diberi nama C-2112, D-2124, dan F-2121. Pada kondisi fermentasi aerobik, jumlah etanol yang diperoleh sangat kecil dengan konsentrasi 0,2-1,9 g/l. Pengujian secara anaerob menunjukkan bahwa ketiga isolat mampu tumbuh pada kondisi tanpa oksigen dan jumlah etanol yang dihasilkan lebih tinggi dengan konsentrasi berkisar antara 2,5-3,7 g/l. Hasil tertinggi ditunjukkan oleh isolat D-2124.

Teknik pewarnaan Gram menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut adalah bakteri Gram positif berbentuk batang dengan kemampuan membentuk spora. Untuk mengklasifikasikan secara lebih akurat, dilakukan analisis sekuens 16S rRNA sebagai acuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat C-2112 dan F-2121 diidentifikasi sebagai *Bacillus caldoolyticus* dan isolat D-2124 adalah *Geobacillus thermoleovorans*.

Suhu optimum pertumbuhan dan produksi etanol.

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan dan produksi etanol pada suhu 50, 60, dan 70°C menunjukkan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan dan produksi etanol adalah 60°C. Pada suhu 50°C pertumbuhan dan etanol yang dihasilkan sedikit lebih rendah, sedangkan pada suhu 70°C pertumbuhan bakteri sangat rendah dengan fase lag yang panjang etanol yang diproduksi sangat rendah, kurang dari 0.2 g/l.



Gambar 2. Suhu optimum pertumbuhan bakteri D-2124

Karakterisasi sifat fisiologis dan biokimia isolat D-2124.

Sifat fisiologis dan biokimia diamati dengan melihat kemampuan memanfaatkan substrat yang bervariasi dan uji lain yaitu uji Voges-Proskauer, uji metil red dan motilitas. Hasil pengujian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Penggunaan substrat, produksi asam, gas, dan uji VP, metil red, serta motilitas isolat D-2124

Substrat	Pertumbuhan	Produksi asam	Produksi gas
Glukosa fosfat	+	N/A	-
Glucose PW	++	+	+
Sukrosa PW	+	-	-
Laktosa	-	-	-
Maltosa	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Xylosa	+	+	-
Arabinosa	-	-	-
Salicin	-	-	-
Sorbitol	+	-	-
Agar urea	+	N/A	N/A
Agar sitrate	-	-	-
Test	Result		
Motility test	+		
VP- test	+		
Methyl red test	-		

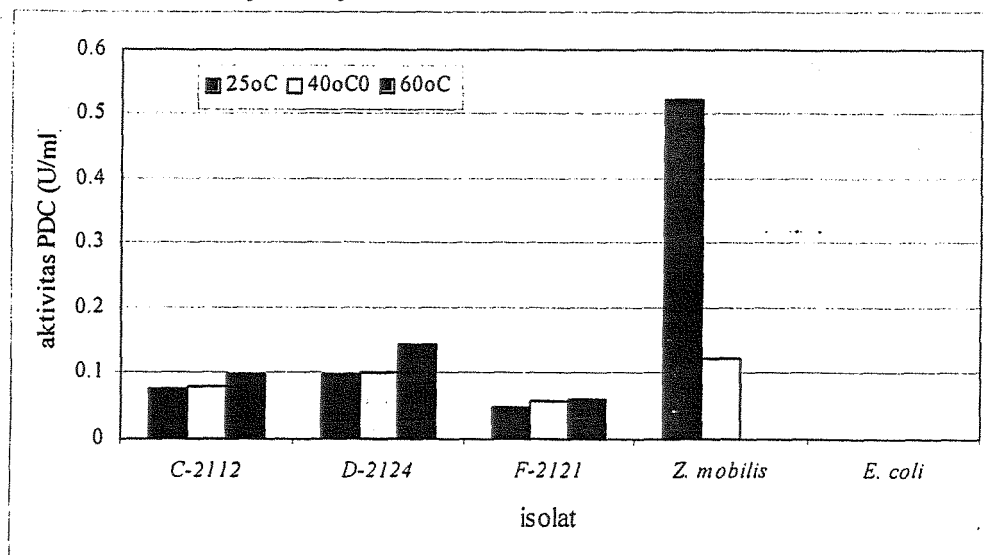
+ = hasil positif

- = hasil negatif

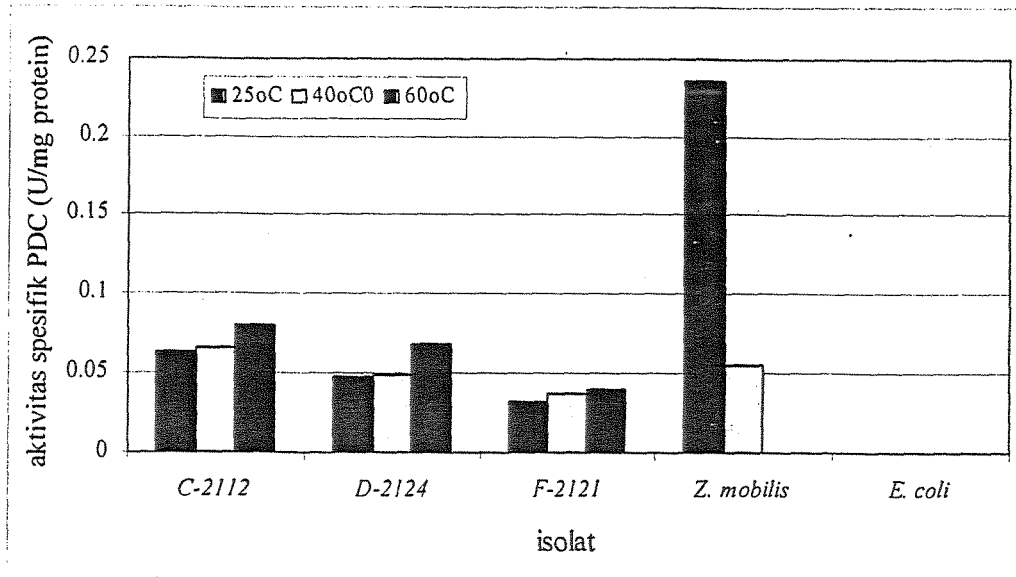
N/A = tidak dilakukan

Aktivitas PDC dan uji stabilitas terhadap pemanasan

Aktivitas enzim PDC dari ekstrak sel hasil sonikasi dilakukan pada suhu 25°C yang merupakan suhu optimum PDC yang dihasilkan oleh bakteri mesofil. Hasil pengujian stabilitas enzim terhadap pemanasan pada suhu 40 dan 60°C menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang ditunjukkan oleh ketiga isolat menunjukkan peningkatan, sedangkan ekstrak sel *Z.mobilis* kehilangan aktivitas secara total pada suhu 60°C. Sebagai kontrol negatif digunakan ekstrak sel *E.coli* DH5α yang sama sekali tidak menunjukkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim dan aktivitas spesifik PDC dari ketiga isolat dan kontrol ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



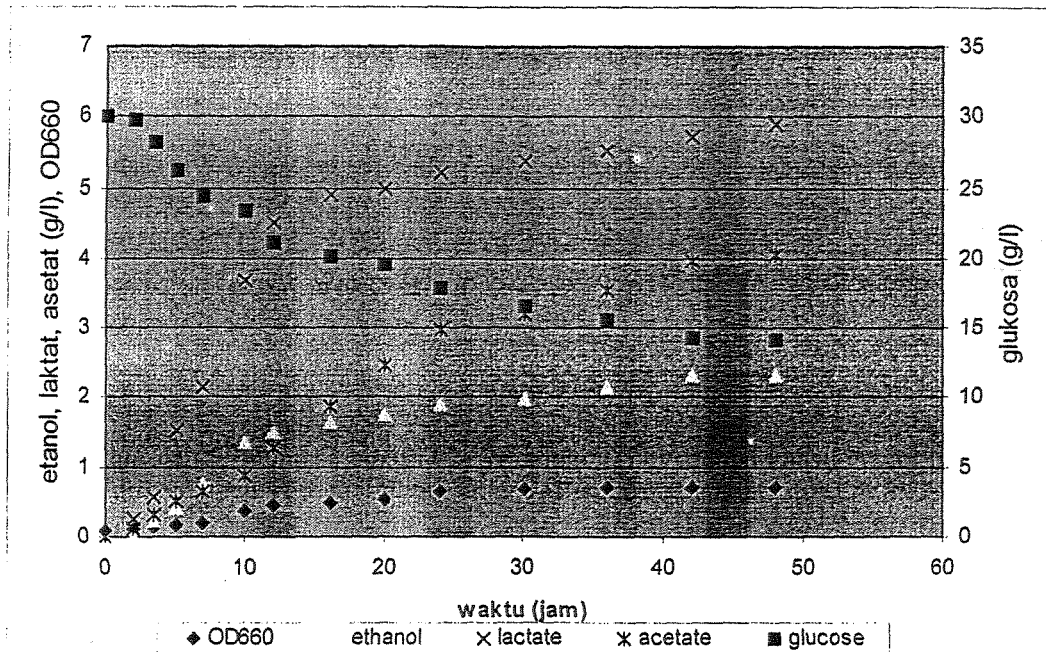
Gambar 3. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas enzim PDC dari isolat terpilih dan kontrol



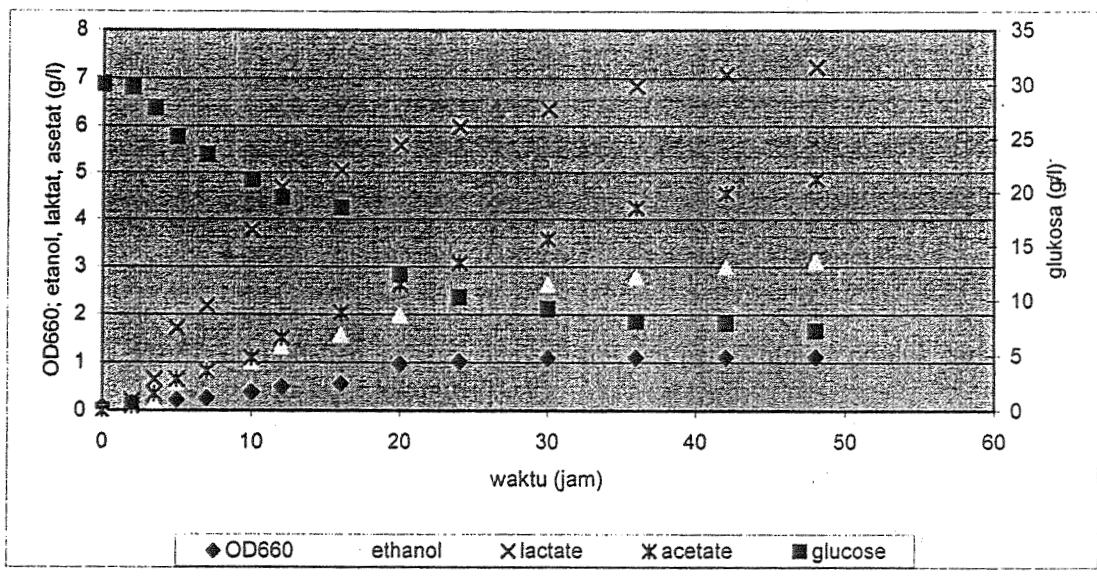
Gambar 4. Pengaruh pemanasan terhadap aktivitas spesifik enzim PDC dari isolat terpilih dan kontrol

Profil pertumbuhan isolat terpilih pada TMM.

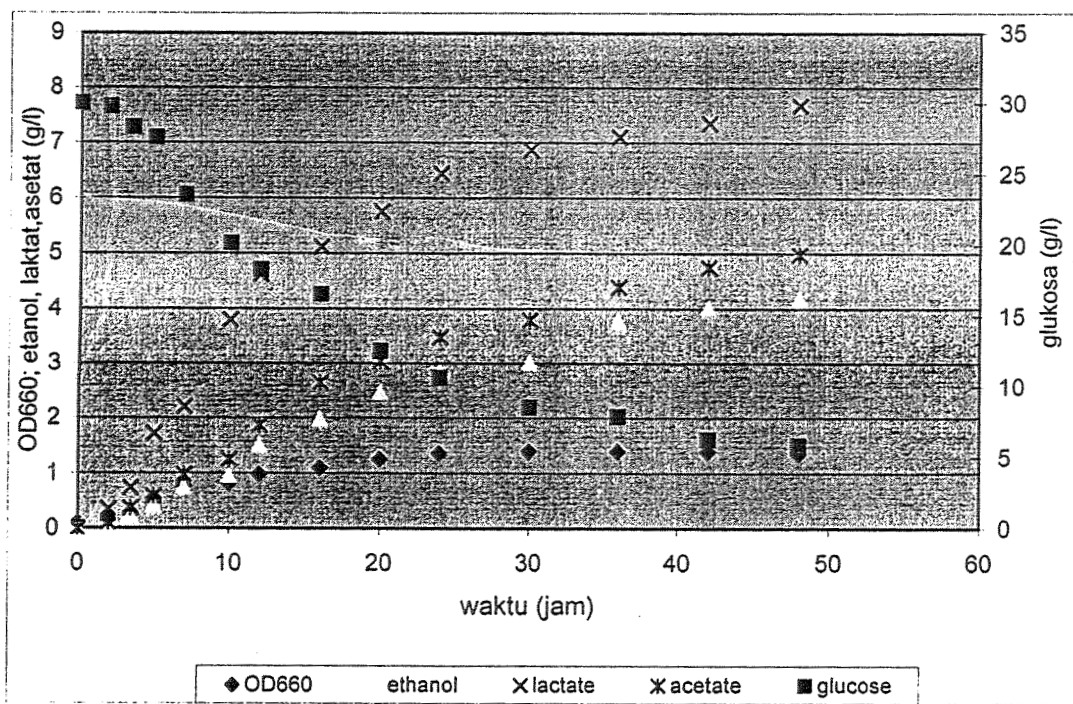
Profil pertumbuhan, sisa gula, produksi etanol, asam laktat, dan asam asetat ditampilkan pada gambar 5-8. Pertumbuhan isolat dan pembentukan produk terbaik ditunjukkan oleh fermentasi isolat D-2124 dalam TGTV dengan hasil etanol mencapai 8 g/l. Sedangkan etanol terendah ditunjukkan oleh fermentasi dalam TG dengan produksi etanol hanya 2,2 g/l.



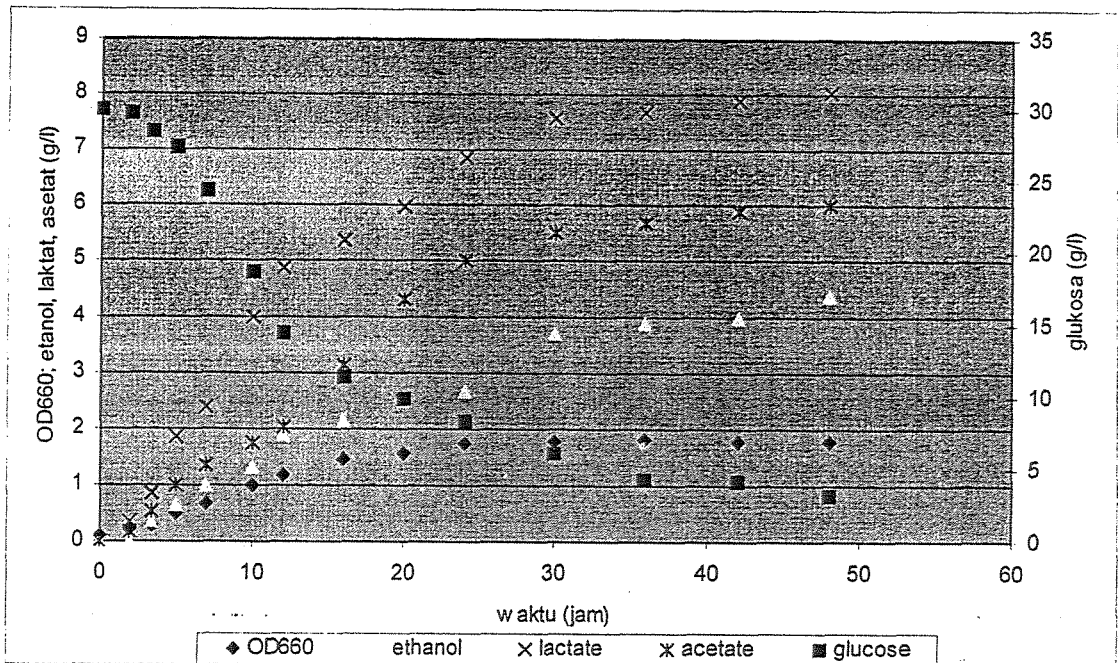
Gambar 5. Profil pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk dari isolat D2124 dalam TMM + Glukosa (TG)



Gambar 6. Profil pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk dari isolat D2124 dalam TG + trace elements (TGT)



Gambar 7. Profil pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk dari isolat D2124 dalam TG + vitamin (TGV)



Gambar 7. Profil pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk dari isolat D2124 dalam TG + Trace element + vitamin (TGTV)

Pembahasan

Tahap isolasi memerlukan strategi untuk mendapatkan isolat dengan karakteristik yang yang kita inginkan. Penambahan etanol pada medium seleksi dimaksudkan untuk memperoleh isolat yang memiliki ketahanan terhadap etanol (*ethanol tolerant*) dengan pemikiran bahwa isolat dengan kemampuan memproduksi etanol harus tahan terhadap keberadaan etanol dalam medium. Seberapa besar toleransi terhadap etanol yang diketahui mengganggu sistem membran bakteri belum dilakukan pengujian terhadap isolat yang dihasilkan.

Isolat yang diperoleh dari penelitian ini diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif berbentuk batang dengan kemampuan membentuk spora sebagai mekanisme mempertahankan diri terhadap tekanan lingkungan. Bakteri ini mampu tumbuh pada suhu kamar sampai 70°C dengan suhu optimum pertumbuhan 60°C. Setelah dilakukan sekuensing terhadap 16S rRNA diketahui bahwa isolat ini 99% memiliki persamaan urutan basa dengan *Geobacillus thermoleovorans*.

Kemampuan untuk tumbuh pada berbagai macam substrat seperti glukosa, sukrosa dan xylosa menjadikan isolat ini potensial untuk dikembangkan lebih lanjut. Xylosa merupakan gula pentosa yang keberadaannya sangat melimpah sebagai produk hidrolisis bahan lignoselulosa. Kayu-kayuan dan limbah pertanian seperti jerami padi dan batang gandum bisa dimanfaatkan sebagai bahan baku yang murah untuk produksi etanol. Dengan demikian diharapkan biaya produksi etanol yang 60% ditentukan oleh harga substrat bisa ditekan dan mampu bersaing dengan harga minyak (Hahn-Hagerdal *et.al.*, 1994).

Produk fermentasi dari isolat *G. Thermoleovorans* D-2124 masih didominasi oleh asam laktat dan asetat, sedangkan produksi etanolnya masih jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan *S. cerevisiae* ataupun *Z. mobilis*. Diduga metabolisme karbohidrat yang dipakai oleh isolat ini mengikuti jalur heterolaktik atau fosfoketolase. Kendala ini bisa diatasi dengan melakukan modifikasi secara genetik, baik dengan teknik kloning gen ataupun mutasi. Dalam jalur metabolismenya piruvat sebagai produk antara katabolisme karbohidrat akan membentuk berbagai macam produk. Jika enzim Lactate dehydrogenase

(LDH) yang bertanggung jawab terhadap pembentukan asam laktat bisa dimatikan, maka bisa diharapkan piruvat akan diubah menjadi etanol secara lebih efisien. Keberadaan enzim Pyruvate decarboxylase (PDC) pada isolat *G. Thermoleovorans* D-2124 dengan karakter stabil terhadap pemanasan memberikan nilai tambah lagi pada isolat ini. Kestabilan terhadap pemanasan kemungkinan disebabkan oleh komposisi asam amino yang lebih didominasi oleh asam-asam amino yang bersifat hidrofobik sehingga memiliki ketahanan struktur yang lebih baik jika dibandingkan dengan enzim PDC yang dihasilkan oleh bakteri mesofil (Tolner, *et.al.*, 1997; Zeikus, *et.al.*, 1998). Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengoptimalkan pembentukan etanol.

KESIMPULAN

Isolat yang diperoleh dari penelitian ini memiliki karakter yang cukup bagus untuk dijadikan isolat unggul dalam sistem produksi etanol. Dengan kemampuan tumbuh pada suhu tinggi, penggunaan substrat yang luas, dan tingkat produksi etanol yang cukup tinggi menjadikan isolat ini ideal untuk dikembangkan lebih lanjut. Kemampuannya untuk memanfaatkan xyloza sebagai substrat memungkinkan biaya produksi etanol dimasa depan akan lebih murah mengingat gula ini sangat berlimpah di alam dengan nilai ekonomi yang rendah.

Produk fermentasi glukosa masih menunjukkan asam laktat sebagai produk utama, diikuti oleh asetat dan etanol. Masing-masing produksinya adalah 8,05 g/l asam laktat, 6,0 g/l asetat dan 4,2 g/l etanol selama 48 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Aristidou, A., and M. Penttilä. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current opinion in biotechnology*. Vol. 11 (2): 187-198.
- Blanc, M., L. Marrilley., T. Beffa., and M. Aragno. 1997. Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot compost. *Int. J. of Sys. Bacteriol*. Vol. 47(4): 1246-1248.
- Brock, T. D. 1985. Life at high temperatures. *Science*. Vol. 230: 132-137.
- Hahn-Hagerdal, B., H. Jeppsson., K. Skoog., B. A. Prior . 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 16 (11): 933-943
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnology*. Vol. 56 (1): 1-24.
- Lynd, L. R. 1989. Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. *Adv. In Biochem. Eng./Biotechnol*. Springer-Verlag. 38: 1-52.
- Tolner, B., B. Poolman., and W. N. Konings. 1997. Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems to High Temperatures. *Comparative Biochem. And Physiol*. Vol. 118 (3): 423-428.

Zeikus, J.G., C. Vieille., and A. Savchenko. 1998. Thermozyms: Biotechnology and structure-function relationship. *Extremophiles*. 21: 179-183.

DISKUSI

Pertanyaan :

1. Bagaimana cara pengambilan isolate yang tradisional dan modern?
2. Berapa derajat suhu yang direkomendasikan ?
3. Apakah karakteristik bakteri yang disolasi sudah dipelajari?misalnya pada konsentrasi gula berapa dihasilkan etanol yang optimum? Berapa *yield* etanolnya?

Jawaban :

1. Uji coba range suhu pertumbuhan mikroba adalah 40 - 90°C dengan selang 10%. Adapun suhu optimum isolate adalah 60°C (termasuk *product recovery* ethanol)
2. Konversi dari polisakarida menjadi etanol masih menjadi impian, namun saat ini tengah diupayakan apakah dengan system simultan/menggunakan bakteri termofilik.
3. Belum dipelajari karakteristik bakterinya, juga belum dihitung *yield* etanolnya.