

KAJIAN AWAL PRODUKSI ETANOL DARI GLISEROL SEBAGAI HASIL SAMPING INDUSTRI BODIESEL

Fahad Bajammal, Eduardus Ivan Subianto, dan Tjandra Setiadi*

*KKPP Produk Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Bandung,

Email: tjandra@che.itb.ac.id

ABSTRAK

Gliserol, sebagai produk samping industri biodiesel yang sedang berkembang pesat, perlu diolah menjadi produk lain yang lebih bernilai. Tujuan penelitian ini adalah melakukan fermentasi gliserol menjadi etanol menggunakan biokatalis Paenibacillus macerans NCCB 24003. Fermentasi dilakukan secara anaerobik dan aerobik tanpa pengendalian pH. Temperatur fermentasi divariasikan pada 37, 40, dan 43°C, pH awal medium pada 4,8, 5,5, 6, dan 6,5, konsentrasi substrat pada 3,6, 5, 10, 15 dan 20% massa. Etanol dianalisa dengan unit kromatografi gas. Dilakukan pula analisa pH, konsentrasi sel, dan kandungan gliserol sisa.

Penelitian dilakukan menggunakan 4 fermentor anaerobik, 1 fermentor aerobik, dan substrat gliserol murni. Disimpulkan bahwa temperatur optimum produksi etanol adalah 40°C, dan pH awal optimum 6,5. Pada konsentrasi gliserol lebih dari 5%-massa tidak dihasilkan etanol, melainkan produk asam yang diduga adalah asam laktat. Perolehan etanol untuk konsentrasi gliserol 5% adalah 0,26 g etanol/g gliserol pada hari ke-9 fermentasi. Konstanta laju pertumbuhan spesifik pada konsentrasi gliserol 2% adalah 0,49 h⁻¹.

Kata kunci: biodiesel, etanol, fermentasi, gliserol, P.macerans.

PENDAHULUAN

Energi merupakan suatu kebutuhan dasar manusia sehingga ketersediaannya sangat diperlukan. Saat ini 80,9% kebutuhan energi Indonesia dipenuhi oleh sumber energi tak terbarukan yang cadangannya sudah sangat terbatas. Pada tahun 2015, diperkirakan Indonesia akan menjadi net-importer minyak bumi [22, 23].

Dalam Cetak Biru Pengelolaan Energi Nasional disebutkan bahwa biodiesel adalah salah satu alternatif sumber energi yang potensial, dan ditargetkan pada 2009 konsumsi biodiesel adalah 2% dari total kebutuhan solar nasional, yaitu sebesar 720.000.000 liter per tahun [4, 5, 8, 13]. Dari produksi biodiesel sebanyak ini, akan dihasilkan gliserol, yaitu propana dengan gugus hidroksil pada masing-masing atom karbonnya, sebanyak 10 % produksi biodiesel [6, 7, 25].

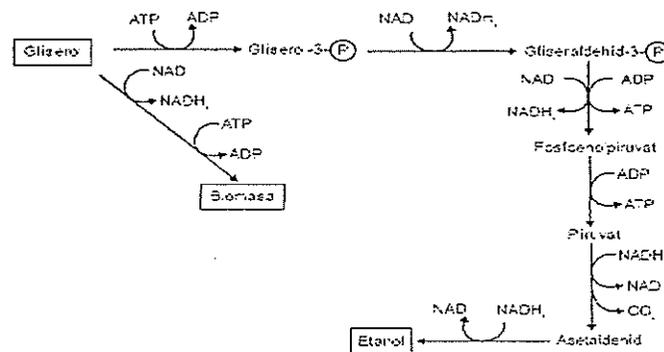
Meskipun gliserol bukan merupakan zat yang beracun, buangan limbah gliserol dengan volume yang besar tetap akan menimbulkan dampak yang serius bagi lingkungan dan kesehatan, dan akan menjadi tidak ekonomis dan efisien bila gliserol hanya dibuang begitu saja [11, 12, 16]. Alternatif yang memungkinkan adalah mengubah gliserol menjadi produk lain yang bernilai ekonomis lebih tinggi, dan lebih aman lingkungan. Teknologi untuk menghasilkan produk lain ini haruslah memungkinkan untuk dilakukan terutama pada industri biodiesel yang berskala lebih kecil. Pertimbangan lainnya adalah untuk mendukung program pemerintah dalam konservasi energi dan penggunaan sumber energi terbarukan. Maka pilihan yang paling memungkinkan dari pertimbangan-pertimbangan di atas adalah mengkonversi gliserol menjadi etanol [14].

Etanol merupakan senyawa yang bernilai jual cukup tinggi, mempunyai pasar yang luas, dan dapat digunakan sebagai energi. Di dalam industri biodiesel, etanol ini dapat dijadikan sumber utama untuk pemenuhan kebutuhan energi pabrik, atau sebagai bahan reaktan cadangan. Konversi gliserol menjadi etanol dapat dilakukan secara mikrobiologis. Salah satu mikroba yang cukup berpotensi untuk menghasilkan etanol dari fermentasi gliserol dengan perolehan yang cukup tinggi adalah *Paenibacillus macerans* (nama lama *Bacillus acetoethylicum*). Bila sumber karbon yang digunakan hanya gliserol, *B.acetoethylicum* dapat menghasilkan produk etanol dengan yield mencapai 40% [20, 21].

Pada Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [3], tidak disebutkan adanya spesies *B.acetoethylicum* dari Genus *Bacillus*, namun terdapat spesies *B.macerans*. Kemungkinan besar *B.acetoethylicum* yang diisolasi oleh Northrop telah digolongkan menjadi salah satu strain dari *B.macerans*. Sedangkan pada tahun 1994, keduanya kembali digolongkan oleh Ash et al. menjadi *Paenibacillus macerans* Strain VKM B-51 / NCCB 24003 untuk isolat Northrop dan *P.macerans* Strain VKM B-506 untuk isolat Schardinger [1, 9, 15, 19]

Percobaan lebih lanjut dengan *P.macerans* menunjukkan adanya asam piruvat dan asetaldehid sebagai produk antara dari proses fermentasi, yang berarti bahwa pembentukan etanol dan (sedikit) aseton terjadi melalui konversi gliserol menjadi piruvat [24]. Sedangkan pembentukan piruvat pasti melalui pembentukan gliseraldehid-3-P dan fosfoenolpiruvat. Pada Bergey's manual [3] disebutkan bahwa 90% strain (atau lebih) dari spesies *B.macerans* tidak

membentuk dihidroksiaseton sebagai produk antara. Ini berarti bahwa pembentukan gliseraldehid-3-P dari gliserol tidak melalui oksidasi gliserol menjadi dihidroksiaseton dan fosforilasi menjadi dihidroksiaseton-P, tetapi melalui produk antara lain. Jika *P.macerans* termasuk strain yang tidak membentuk dihidroksiaseton, bisa jadi gliserol oleh strain ini mula-mula difosforilasi menjadi gliserol-3-P untuk kemudian dioksidasi menjadi gliseraldehid-3-P. Namun hal ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut atau diverifikasi dengan literatur yang lebih terkini. Karena itu kemungkinan jalur metabolik sementara *B.acetoethylicum* untuk pembentukan etanol dari gliserol ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kemungkinan Jalur metabolik *P.macerans*

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan kajian awal proses fermentasi gliserol menjadi etanol secara mikrobiologis dengan bantuan *P.macerans*, parameter-parameter yang mempengaruhinya, kondisi optimal fermentasi, dan perolehan maksimal.

METODOLOGI

Mikroorganisme dan Metode Kultivasi

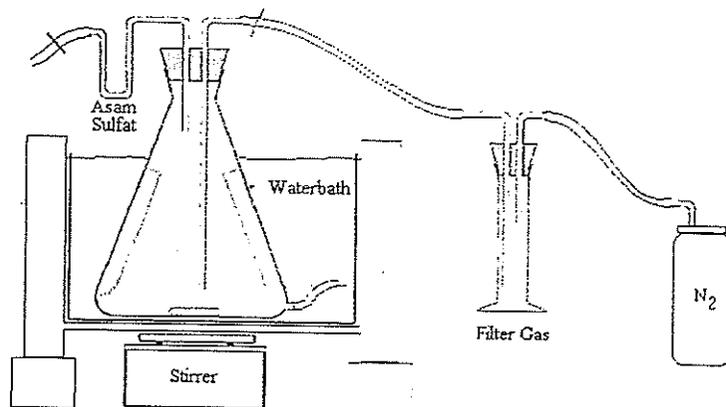
Bakteri *P.macerans* strain NCCB 24003 yang digunakan diperoleh dari pusat kultur *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS), Belanda [9], yang diisolasi oleh Northrop [17] pada tahun 1919. Untuk setiap tempuhan anaerobik, digunakan inokulum berupa 15 ml medium yang diinkubasi selama 24 jam, lalu dipindahkan ke 185 ml medium segar dan diinkubasi selama 6 jam, sebelum dipindahkan ke fermentor utama. Sedangkan pada fermentasi aerobik, 15 ml inokulum langsung dipindahkan ke fermentor utama.

Formulasi Medium

Medium fermentasi yang digunakan terdiri atas komponen gliserol dengan konsentrasi sesuai variasi, ekstrak sapi (*beef extract*) 3 g/l, pepton 5 g/l, NaCl 5 g/l, dan aqua dm, sedangkan pH awal diatur sesuai variasi menggunakan larutan HCl dan NaOH.

Rangkaian Alat dan Variasi Kondisi Percobaan

Fermentasi dilakukan menggunakan erlenmeyer termodifikasi dengan volume kerja 2 L, di dalam *waterbath*, dan diaduk dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 150 rpm. Pada fermentasi aerobik dilakukan aerasi pada laju 1,5 vvm. Sedangkan di awal fermentasi anaerobik dan selama pengambilan sampel, medium digurahkan dengan nitrogen pada laju 1,5 vvm. Skema alat percobaan dapat dilihat pada Gambar 2, sedangkan variasi kondisi fermentasi yang dilakukan ditunjukkan pada Tabel 1.



Gambar 2. Skema Susunan Alat Percobaan

Analisis

Produk fermentasi dianalisis kandungan komponen organik volatilnya menggunakan unit kromatografi gas (GC) SHIMADZU GC 14-B, dengan standar internal propanol 0,9 g/l. Kolom yang digunakan adalah Porapak Q 180/200 mesh dengan temperatur 150 °C. Sedangkan temperatur injektor dan detektor FID yang digunakan masing-masing 200 °C. Konsentrasi sel dianalisa dengan spektrometri pada panjang gelombang 322 nm, sedangkan kandungan gliserol sisa dianalisa dengan metode titrasi iodida-tiosulfat [10] yang telah disesuaikan.

Tabel 1. Variasi Percobaan

Tempuhan	Temperatur (°C)	pH awal	Konsentrasi gliserol (%-massa)
Aerobik 1	40	6,5	2
Aerobik 2	40	6,5	2
Anaerobik 1	40	4,8	3,6
Anaerobik 2	40	6,0	3,6
Anaerobik 3	40	6,5	3,6
Anaerobik 4	37	6,0	3,6
Anaerobik 5	40	5,5	3,6
Anaerobik 6	40	6,0	3,6
Anaerobik 7	37	6,0	3,6
Anaerobik 8	43	6,0	3,6
Anaerobik 9	40	6,5	5
Anaerobik 10	40	6,5	10
Anaerobik 11	40	6,5	15
Anaerobik 12	40	6,5	20

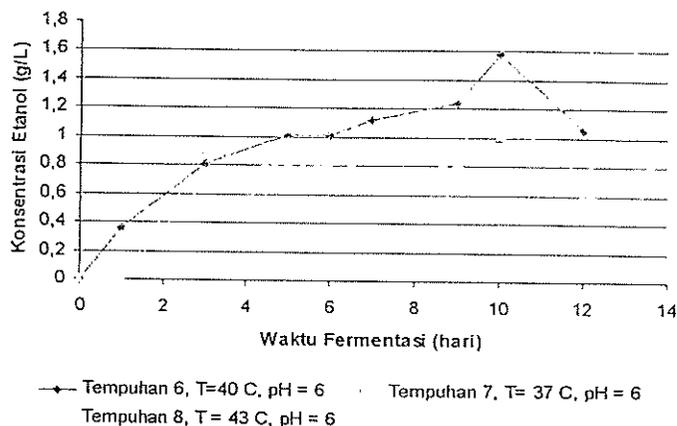
HASIL DAN PEMBAHASAN.

Temperatur Fermentasi Optimum

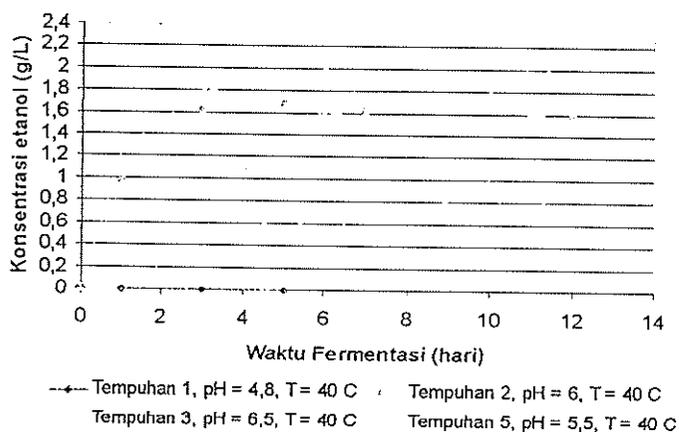
Temperatur fermentasi optimum ditentukan dengan membandingkan konsentrasi etanol maksimum pada tempuhan anaerobik 6, 7, dan 8, seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Terlihat bahwa konsentrasi etanol maksimum mencapai 1,59 g/L dijumpai pada tempuhan 6 yang bertemperatur 40 °C, sedangkan temperatur 37 °C dan 43 °C memberikan konsentrasi etanol maksimum yang lebih rendah, masing-masing 0,98 g/L dan 1,17 g/L.

pH Awal Fermentasi Optimum

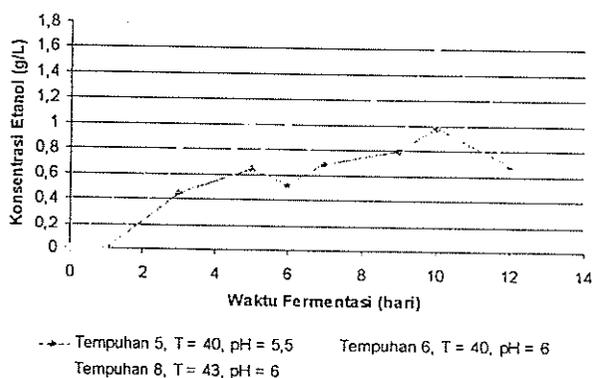
pH awal fermentasi optimum ditentukan dengan membandingkan konsentrasi etanol maksimum pada tempuhan anaerobik 1, 2, 3, dan 5, seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Terlihat bahwa pada tempuhan 1 tidak terjadi pertumbuhan sel dan produksi etanol karena pH terlalu rendah, sedangkan tempuhan 5 memproduksi etanol tapi dengan jumlah paling sedikit. Konsentrasi etanol maksimum dijumpai pada tempuhan 3 yang memiliki pH awal 6,5.



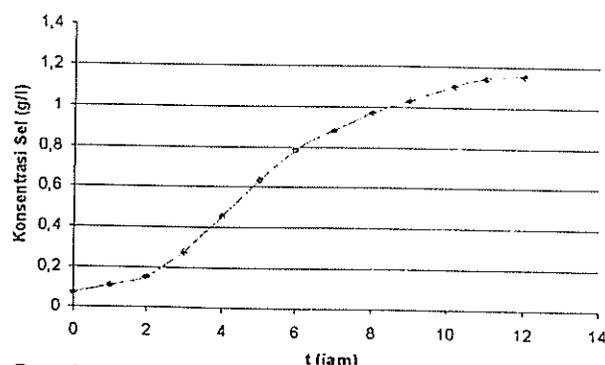
Gambar 3. Penentuan Temperatur Optimum



Gambar 4. Penentuan pH Awal Optimum



Gambar 5. Penentuan Waktu Fermentasi Optimum



Gambar 6. Kurva Pertumbuhan *P. macerans*

Waktu Fermentasi Optimum

Waktu fermentasi optimum ditentukan dengan membandingkan konsentrasi etanol pada tempuhan anaerobik 5 sampai 8, seperti ditunjukkan pada Gambar 5. Terlihat bahwa konsentrasi etanol meningkat sejak hari ke-1 fermentasi, dan mencapai maksimum pada hari ke-10. Pada hari ke-12 konsentrasi etanol menurun kembali, diduga etanol yang terbentuk mulai terkonsumsi oleh mikroba.

Kurva Pertumbuhan Mikroba

Dari dua tempuhan fermentasi aerobik yang dilakukan, diperoleh kurva pertumbuhan bakteri *P.macerans* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6. Dari kurva ini didapatkan konstanta laju pertumbuhan maksimum adalah sebesar $0,49 \text{ h}^{-1}$. Diamati juga bahwa bila inokulum yang digunakan diinkubasi selama 48 jam, atau telah berada pada fasa stasioner, akan terjadi fasa *lag* selama 16-18 jam, diikuti dengan fasa pertumbuhan logaritmik selama 6-8 jam. Sedangkan bila inokulum hanya diinkubasi selama 24 jam, fasa *lag* yang terjadi hanya berlangsung selama 2 jam, diikuti dengan fasa pertumbuhan logaritmik yang juga berlangsung selama 6-8 jam.

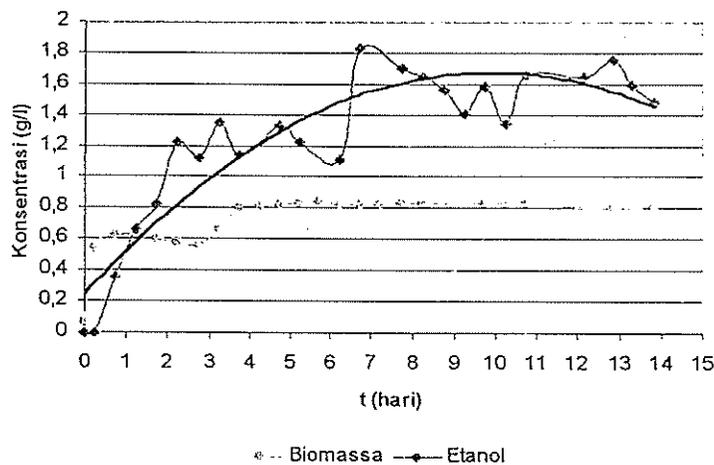
Perubahan pH Selama Fermentasi

Tidak adanya pengendalian pH atau penambahan buffer pada medium menyebabkan terjadinya penurunan pH medium, terutama pada awal fermentasi saat pertumbuhan biomassa masih terjadi. Dari hasil percobaannya menggunakan *P.macerans* (nama lama *Bacillus acetoethylicum*) dengan substrat glukosa atau pati, Northrop [17] menyimpulkan bahwa produk asam yang terbentuk selain etanol dan aseton, adalah asam format dan asam asetat. Namun hasil analisis pada penelitian ini tidak memperlihatkan adanya asam format, asam asetat, maupun aseton. Diduga bila substrat yang digunakan adalah gliserol, asam yang dihasilkan adalah terutama asam laktat.

Penurunan pH sebesar 1-2 skala yang terjadi pada akhirnya akan menyebabkan inhibisi pada aktifitas mikroorganisme sehingga perolehan etanol tidak maksimal, dan gliserol yang terkonsumsi hanya 5-20 % dari konsentrasi gliserol mula-mula. Untuk meningkatkan perolehan etanol harus digunakan buffer atau pengendalian pH pada penelitian yang akan datang.

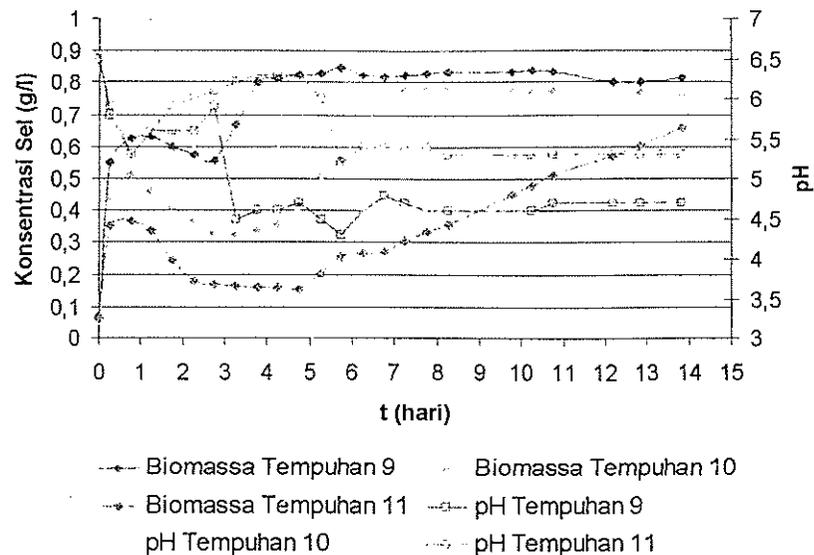
Pengaruh Konsentrasi Gliserol

Dari variasi konsentrasi yang dilakukan pada tempuhan anaerobik 9 sampai 12, produk etanol hanya dijumpai pada tempuhan 9 dengan konsentrasi gliserol 5 %, seperti ditunjukkan pada Gambar 7. Tidak diproduksinya etanol pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi bisa jadi disebabkan sel akan bermetabolisme dengan cara yang berbeda pada konsentrasi substrat yang berbeda, sehingga akan dihasilkan produk fermentasi yang berbeda. Kemungkinan ini juga diperkuat dengan terdeteksinya bau yang khas pada cairan medium dengan konsentrasi gliserol 10 %. Namun kemungkinan lain, seperti waktu inkubasi inokulum yang tidak tepat karena percobaan fermentasi aerobik yang menggunakan konsentrasi substrat yang lebih rendah (2 %). juga perlu untuk diperhatikan.



Gambar 7. Kurva konsentrasi sel dan etanol terhadap waktu untuk tempuhan 9

Kurva pertumbuhan sel dan perubahan pH untuk tempuhan anaerobik 9 sampai 11 ditunjukkan pada Gambar 8. Terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi gliserol dalam medium, sel akan semakin sulit tumbuh, atau terjadi inhibisi substrat pada konsentrasi lebih tinggi. Kemungkinan lain adalah kurangnya waktu inkubasi dan aerasi inokulum pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi.



Gambar 8. Kurva konsentrasi sel dan pH terhadap waktu untuk tempuhan 9, 10 dan 11

Perolehan Etanol

Produksi etanol yang rendah pada tempuhan anaerobik 1 sampai 8, yaitu maksimal hanya mencapai 2,1 g/l, pada awalnya diduga disebabkan oleh pengadukan yang kurang baik atau kondisi fermentasi yang tidak anaerobik sempurna. Namun setelah dilakukan perbaikan rangkaian alat pada tempuhan anaerobik 9 sampai 12, tetap dijumpai produksi etanol yang lebih rendah dari yang diharapkan. Maka kemungkinan penyebab yang harus dikaji lebih lanjut adalah turunnya pH fermentasi sampai dibawah nilai optimum akibat produksi asam selama pertumbuhan sel. Kemungkinan lain seperti mikroorganisme yang diperoleh telah berubah aktifitas dan produktifitasnya karena perbedaan generasi, sehingga berbeda dengan yang diisolasi Northrop [9, 17] pertama kali juga bisa terjadi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hal-hal yang dapat disimpulkan dari penelitian yang telah dilakukan antara lain :

- Fermentasi gliserol menggunakan *P.macerans* dapat menghasilkan etanol, dan tidak menghasilkan produk aseton, asam format, maupun asam asetat.
- Temperatur optimum fermentasi menggunakan *P.macerans* adalah 40 °C.
- Konsentrasi etanol tertinggi pada pH awal 6,5.

- Waktu fermentasi optimum untuk konsentrasi substrat 3,6% adalah 10 hari.
- Fasa pertumbuhan logaritmik sel pada kondisi aerobik untuk konsentrasi substrat 2 % berlangsung selama 6-8 jam, dengan konstanta pertumbuhan maksimum mencapai $0,49 \text{ h}^{-1}$.
- Gliserol yang dikonsumsi oleh mikroba sampai hari ke-12 atau ke-13 fermentasi hanya kurang dari 10 g/L pada konsentrasi gliserol awal 3,6 %, 5 %, dan 10 %.
- Produk asam yang dihasilkan pada awal fermentasi anaerobik diduga adalah asam laktat.
- Perolehan etanol bila menggunakan substrat gliserol 5 % mencapai 0,26 pada hari ke-9, dan turun menjadi 0,15 pada hari ke-13.
- Sampai hari ke-13 tidak terbentuk produk etanol pada konsentrasi substrat 10, 15, dan 20 %, diduga hanya terbentuk produk asam.
- Konsentrasi sel selama fermentasi berlangsung untuk tempuhan anaerobik 9 sampai 12 berbanding terbalik dengan konsentrasi substrat gliserol awal.

Saran

Saran-saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya, antara lain :

- Perlu menjaga pH selama fermentasi berlangsung, agar pH selalu berada pada rentang fermentasi optimum. Arzberger [2] membandingkan penambahan buffer CaCO_3 2% dengan penambahan 1 N larutan NaOH pada rentang waktu tertentu, dan menyimpulkan bahwa penambahan CaCO_3 akan menghasilkan etanol yang lebih banyak, produk asam yang lebih sedikit dan sisa substrat tak terfermentasi yang lebih sedikit, dibandingkan bila menggunakan larutan NaOH. Kemungkinan menggunakan salah satu atau kedua zat di atas dapat dikaji lebih lanjut.
- Gunakan HPLC untuk menganalisa produk fermentasi, karena HPLC dapat menganalisa etanol, gliserol, dan asam laktat sekaligus.
- Lakukan identifikasi ulang bakteri yang digunakan untuk membuktikan ada atau tidaknya perubahan aktifitas atau produktifitas mikroba akibat perbedaan generasi.
- Lakukan variasi konsentrasi gliserol yang lebih rendah, misal 1-3 %. Bisa jadi produksi etanol lebih baik pada konsentrasi gliserol yang lebih rendah.
- Bila terbukti fermentasi lebih efektif pada konsentrasi gliserol yang lebih rendah, dapat dikaji kemungkinan untuk melakukan proses fermentasi secara

fed-batch atau kontinu. Kaji juga kemungkinan untuk menggunakan fermentor dengan *packing* seperti yang dilakukan Northrop [18].

- Dicoba menggunakan sumber Nitrogen dan Fosfor anorganik untuk komponen medium karena harganya yang lebih murah. Penggunaan sumber N dan P organik dari bahan baku yang murah dan berprotein tinggi, misalnya ekstrak bungkil jarak pagar, juga dapat dikaji lebih lanjut. Coba juga menggunakan substrat gliserol kotor hasil industri biodiesel dengan pengolahan awal minimum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ungkapan terima kasih penyusun sampaikan kepada LPKM ITB sebagai salah satu penyokong dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] *All-Russian Collection of Microorganisms*. <http://www.vkm.ru/> . 2005
- [2] Arzberger, C. F., W. H. Peterson, and E. B. Fred : Certain Factors that Influence Acetone Production by *Bacillus Acetoethylcum*.
- [3] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.* The Williams & Wilkins Company, Baltimore. hal. 1104 – 1138. 1974
- [4] *Biodiesel, a solution to pollution*. British Association for Biofuels and Oils. <http://www.biodiesel.co.uk/> . 2005
- [5] *Biodiesel Kelapa Sawit, Alternatif BBM Ramah Lingkungan*. Koran Sinar Harapan, Senin, 18 Maret 2002.
- [6] *Biodiesel*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biodiesel> . September 2005
- [7] *Biodiesel*. <http://sccd.org/biodiesel/> . 2005
- [8] Brodjonegoro, Tirta Prakoso : Saatnya Beralih ke Biodiesel. <http://www.pasarinfo.com> . 12 Oktober 2005
- [9] *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS), Netherlands. <http://www.cbs.knaw.nl/> . 2006
- [10] FBI-A02-A03 Metode Analisis Standar untuk Kadar Gliserol Total, Bebas, dan Terikat di Dalam Biodiesel Ester Alkil : Metode Iodometri – Asam Periodat.
- [11] Felter, Harvey W., and John U. Lloyd : *Glycerinum*. *King's American Dispensatory*. 1898. <http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/> . 2004
- [12] *Glycerol*. <http://www.boulderbiodiesel.com/> . 2005
- [13] *Kebijakan Pengembangan Energi Terbarukan dan Konservasi Energi*. Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral, Jakarta. <http://www.djlpe.go.id/> . 2003

- [14] Koh, Harold : Etanol dan Kelangkaan BBM. *Koran Kompas*, Jum'at, 26 Agustus 2005
- [15] *Names validly published in a Validation List*. <http://www.bacterio.cict.fr/> . 2005
- [16] *New uses of Glycerine*. <http://www.aocs.org/> . 2005
- [17] Northrop, J. H., L. H. Ashe, and J. K. Senior : Biochemistry of *Bacillus Acetoethylicum* with Reference to the Formation of Acetone. *Jour. Biol. Chem.*, 39. hal. 1 – 21. 1919
- [18] Northrop, J. H., L. H. Ashe, and R. R. Morgan : A Fermentation Process for the Production of Acetone and Ethyl Alcohol. *Jour. Ind. Eng. Chem.*, Vol. XI, No. 8., hal. 723– 727. 1919
- [19] *Paenibacillus macerans*. <http://www.dsmz.de/> . 2004
- [20] Piolenc, F. Mar de. *Glycerine to Ethanol Research Proposal*. <http://www.phyco.org/> . November 2005
- [21] Prescott, Samuel C., and Cecii G. Dunn. *Industrial Microbiology, 1st ed.* McGraw-Hill Book Company, New York. hal. 216 – 222. 1940
- [22] *Saatnya Energi Alternatif*. Cakrawala, *Koran Pikiran Rakyat*, Kamis, 13 Oktober 2005
- [23] Soerawidjaja, Tatang H. : Sumber Energi di Indonesia Begitu Melimpah. *Koran Pikiran Rakyat*, Kamis, 13 Oktober 2005. hal. 25 kol. 1
- [24] Speakman, Horace B. : The Biochemistry of Acetone Formation from Sugars by *Bacillus Acetoethylicum*. *Jour. Biol. Chem.*, 64. hal. 41 – 52. 1925
- [25] *What Is Biodiesel*. <http://www.esru.strath.ac.uk/> . 2005