

Pemanfaatan Gliserol Lemak Hewani untuk Produksi Bioetanol pada *Escherichia coli* Rekombinan

by Rumah Publikasi Ilmiah

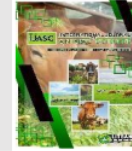
Submission date: 18-Apr-2023 11:38AM (UTC+0700)

Submission ID: 2068035018

File name: pak_acol_turnit.docx (368.58K)

Word count: 1840

Character count: 11772



Utilization of Animal Fat Glycerol for Bioethanol Production in Recombinant *Escherichia coli*

Pemanfaatan Gliserol Lemak Hewani untuk Produksi Bioetanol pada *Escherichia coli* Rekombinan

Wahyu Suradi Pranata ^{a*}

^{a*} Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Persatuan Islam Bandung, Bandung

email: wahyusuradi@unipi.ac.id

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Diterima 24 Februari 2023
Direvisi 30 Maret 2023
Diterima 1 April 2023
Tersedia online 18 April 2023

Kata kunci:

Aerobik
Escherichia coli
Glukosa
Gliserol

Keywords:

Aerobic
Escherichia coli
Glukosa
Gliserol

APA style in citing this article:

Wahyu, S.P. (2023). "Utilization of Animal Fat Glycerol for Bioethanol Production in Recombinant *Escherichia coli*," International Journal of Animal Science Universitas Islam Lamongan, vol. 5, no. 3, pp. 243-248, 2023.

ABSTRAK

Mengoptimalkan pemanfaatan gliserol dari transesterifikasi lemak hewani sebagai substrat untuk produksi etanol dalam etanogenik rekombinan *E. coli* (PDC dan ADH) dalam kondisi aerobik telah diselidiki. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *E. coli* BW25113 yang membandingkan karakteristik pertumbuhan pada substrat gliserol dan glukosa. *E. coli* dapat tumbuh dengan baik pada kedua substrat tersebut dan gliserolnya lebih cepat dikonsumsi daripada glukosa. Pada glukosa, *E. coli* terjadi overflow metabolisme yang menandakan tingginya jumlah asetat, sedangkan pada gliserol akumulasi asetat dapat dikurangi. Sehingga karakteristik pertumbuhan gliserol lebih efektif. Pada *E. coli* Δ ptpHfdh/pTadhB-pdc produksi etanol dengan substrat gliserol adalah 2,18 gL⁻¹. Angka tersebut dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan substrat glukosa dan gliserol sebagai substrat memiliki kondisi optimal dalam menyediakan NADH untuk menghasilkan etanol.

ABSTRACT

Optimizing the utilization of glycerol from animal fat transesterification as a substrate for ethanol production in *E. coli* recombinant ethanologenic (PDC and ADH) under an aerobic condition was investigated. This research was conducted by using *E. coli* BW25113 which compares the growth characteristics on glycerol and glucose as substrates. *E. coli* can grow well on both substrates and it glycerol consumed faster than glucose. On glucose, *E. coli* occurs overflow metabolism that indicated high amount of acetate, meanwhile on glycerol the acetate accumulation could be reduced. So that, the growth characteristics of glycerol was more effective. In *E. coli* Δ ptpHfdh/pTadhB-pdc ethanol production with glycerol substrates was 2.18 gL⁻¹. The number twice higher than with glucose substrate and glycerol as substrate had optimal condition in providing NADH in order to produce ethanol.

1. Pendahuluan

Energi merupakan bagian penting dalam kehidupan karena sebagian besar aktivitas manusia membutuhkan energi. Mayoritas energi yang dimanfaatkan berasal dari fosil khususnya minyak bumi yang tidak dapat diperbaharui dan akan habis. Produksi etanol sebagai bahan bakar terbarukan yang ramah lingkungan merupakan salah satu solusi yang terus dikembangkan. Generasi awal produksi etanol melalui fermentasi khamir (*yeast*) dengan substrat yang berasal dari pati produk pangan, mulai ditinggalkan karena bersaing dengan pangan dan berpengaruh terhadap ekonomi, selanjutnya menuju generasi kedua yang memanfaatkan substrat dari biomassa melalui fermentasi *yeast* atau bakteri yang lebih maju secara teknologi (IEA 2008). Fermentasi *yeast* seperti *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kelemahan waktu pertumbuhan yang lambat sehingga berpengaruh pada hasil produk yang diharapkan selain itu fermentasi bakteri seperti *Zymomonas mobilis* memiliki spektrum pemanfaatan substrat yang terbatas pada gula, sedangkan *Escherichia coli* sudah banyak digunakan dalam rekayasa mikroba untuk produksi etanol karena metabolisme *E. coli* sudah banyak diketahui, memiliki kemampuan pertumbuhan yang cepat, dan memiliki spektrum pemanfaatan substrat yang luas seperti glukosa dan gliserol. Studi sebelumnya menyatakan bahwa peran gula sebagai substrat dalam fermentasi etanol pada *E. coli* dapat digantikan oleh gliserol (Ito et al. 2005).

Gliserol lemak hewani merupakan hasil samping transesterifikasi lemak hewani seperti lemak sapi sebagai limbah dari rumah pemotongan hewan. Transesterifikasi merupakan proses mereaksikan trigliserida yang terdapat pada minyak hewani atau nabati dengan metanol dan tambahan katalis basa, menghasilkan biodiesel dan gliserol sebagai produk samping (Joelianingsing et al. 2006). Peningkatan produksi biodiesel dunia berbanding lurus dengan produksi gliserol sebagai hasil sampingnya. Gliserol disebut juga gliserin merupakan senyawa alkohol trihidrat dengan rumus bangun $C_3H_8O_3$. Gliserol merupakan sumber karbon yang murah dan berlimpah, selain itu gliserol lebih mudah direduksi dalam metabolisme dibandingkan dengan gula sehingga menghasilkan senyawa hasil reduksi seperti etanol, suksinat, xylitol, propionat, hidrogen, dan seterusnya dengan rendemen yang lebih tinggi dari penggunaan gula (Dharmadi et al. 2006). Setiap 3 mol biodiesel yang dihasilkan, menghasilkan 1 mol gliserol (sekitar 5-10% setara berat biodiesel), untuk mengoptimalkan potensi ini perlu usaha untuk mengkonversi gliserol menjadi bahan kimia yang bermanfaat seperti etanol (Yazdani dan Gonzales 2007).

Penelitian-penelitian yang lain melakukan fermentasi pada kondisi anaerob, sehingga pertumbuhan sel berlangsung lambat dan meningkatkan aktivitas laktat dehidrogenase (LDH) yang mengakumulasi laktat dengan substrat piruvat. Suryadarma et al. (2012) menyatakan bahwa kultivasi *E. coli* pada kondisi anaerob menyebabkan pertumbuhan sel rendah sehingga berakibat pada turunnya hasil produk yang diharapkan. Kondisi anaerobik menghasilkan produk samping yang tinggi mengakibatkan produksi etanol pada *E. coli* belum efektif, sehingga perlu dilakukan rekayasa genetik (Ingram et al. 1987) dan mengubah kondisi kultivasi produksi etanol menjadi aerobik. Penginsersian gen etanologenik yaitu gen piruvat dekarboksilase (*pdh*) dan asetaldehid dehidrogenase (*adhB*) dari *Z. Mobilis* ke *E. coli* melalui rekayasa genetik dapat meningkatkan produksi etanol (Ingram et al. 1987). Pada studi lain menyebutkan proses kultivasi pada kondisi aerobik menghasilkan biomassa dalam jumlah besar sekitar 66% dan sisanya berupa air, gas, asam organik (Sutapa 1999). Disamping itu, dalam kondisi aerobik enzim pembentuk laktat (Laktat dehidrogenase; LDH) akan mengalami penurunan aktivitas (Ojima et al. 2012) sehingga akumulasi laktat dapat ditekan.

Tersedianya oksigen sebagai penerima elektron terakhir akan mengkonsumsi NADH (Causey et al. 2004) sehingga menyebabkan berkurangnya NADH untuk produksi etanol. Dilihat dari jalur metabolismenya pemanfaatan gliserol sebagai substrat mampu meningkatkan dua kali NADH dibandingkan glukosa seperti yang dilaporkan oleh Yazdani dan Gonzales (2007). Sehingga gliserol secara substrat dapat menyediakan NADH sebagai kosubstrat untuk pembentukan etanol.

Konversi gliserol menjadi asam suksinat merupakan contoh keseimbangan redoks. Meskipun jalur untuk etanol dan suksinat setara mengenai keseluruhan keseimbangan redoks, kontribusi energi dari jalur etanologenik jauh lebih tinggi, setiap 1 ATP diproduksi per molekul gliserol yang diubah menjadi etanol, sementara produksi energi di jalur suksinat terbatas untuk memenuhi generasi *proton motive force* oleh *fumarate reduktase (frd)* (Dharmadi et al. 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini

membandingkan gliserol dengan glukosa sebagai substrat, sehingga diharapkan dapat mengetahui potensi gliserol sebagai substrat untuk selanjutnya diarahkan menuju produksi etanol pada kondisi aerobik.

2. Materi dan Metode

Bahan yang digunakan yaitu strain *E. coli* BW25113 dan strain rekombinan *E. coli* yang telah dihilangkan fungsi dari gen *pta* (penghasil asetat), yang berasal dari *National BioResources Project* (*National Institute of Genetics* (NIG), Jepang). Strain tersebut ditambahkan gen etanogenik *adhB-pdc* dan gen *fdh* untuk menghasilkan NADH yang berasal dari *Departement Chemical Science and Engineering, Osaka University*, Jepang, dengan nama isolat BW25113 Δ *pta/pHfdh/pTadhB-pdc*.

Prakultivasi dan Kultivasi

Prakultivasi bertujuan menyegarkan kembali sel *E. coli* dalam stok gliserol untuk mencapai pertumbuhan optimum pada saat kultivasi. Sejumlah 50 mL media LB ditambahkan dengan 1% (v/v) isolat BW25113 tanpa antibiotik dan 50 mgL⁻¹ ampisilin, 34 mgL⁻¹ kloramfenikol, 15 mgL⁻¹ kanamisin untuk 1% (v/v) isolat BW25113 Δ *pta/pHfdh/pTadhB-pdc*. Media berisi sampel diinkubasi dalam penggoyang berputar (*Optic Ivymen System*) dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 12 jam pada suhu 37°C. Kemudian dihitung nilai OD₆₆₀ dengan rentang nilai 1 – 1.5, lalu sampel dikultivasi.

Kultivasi bertujuan untuk memproduksi metabolit sel dalam kondisi aerobik. Strain *E. coli* dikultivasi berdasarkan prosedur Ojima *et al.* (2012). Media LB kultivasi terdiri atas Inokulum 5% (v/v), 222 mM glukosa atau 220 mM gliserol, 20 gL⁻¹ CaCO₃ per liter air dan antibiotik (30 mgL⁻¹ ampisilin, 34 mgL⁻¹ kloramfenikol, 15 mgL⁻¹ kanamisin) serta penambahan 0.5 mM isopropil tiogalaktosida (IPTG) untuk strain etanogenik sebagai penginduksi protein rekombinan. Kemudian media kultivasi diatur pH pada pH 7.0. Penambahan CaCO₃ untuk mempertahankan pH agar tidak mengalami penurunan selama kultivasi. Setelah itu, sampel diinkubasi dalam penggoyang berputar (*Optic Ivymen System*) dengan kecepatan agitasi 250 rpm selama 72 jam pada suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0, ke-12, ke-24, ke-48, dan ke-72. Pengulangan dilakukan sebanyak 2-3 kali. Sampel selanjutnya dianalisis.

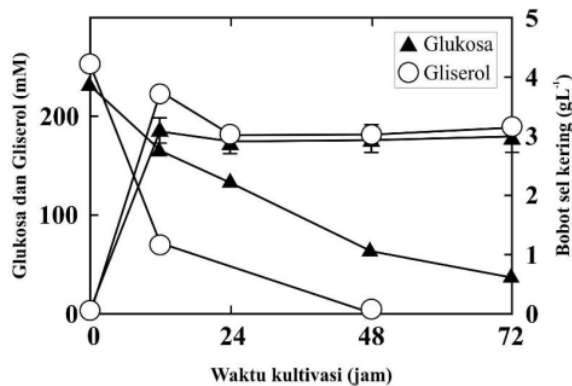
Pengukuran Bobot Sel Kering, Konsumsi Substrat dan Akumulasi Etanol

Pengukuran bobot sel kering untuk mengetahui pertumbuhan sel. Dilakukan berdasarkan Ojima *et al.* (2012), sampel diukur nilai *Optical density* (OD) pada spektrofotometri panjang gelombang 660 nm. Nilai OD₆₆₀ dikalikan dengan 0.36 untuk pengkonversian menjadi nilai bobot sel kering. Sebelum diukur sampel dicampurkan dengan 1 M HCL untuk pendilusian CaCO₃.

Pengukuran konsumsi glukosa, konsumsi gliserol dan akumulasi etanol dilakukan dengan kit (*Roche Glucose kit*, *Roche Glycerol kit* dan *Roche Ethanol kit*). Sampel hasil kultivasi 72 jam diinaktivasi dengan pemanasan dan penghilangan gas. Setelah itu disentrifugasi (*Hettich Zentrifugen*) selama 2 menit 9727 g suhu 4°C. Supernatan difilter dengan filter 0.2 µm, dilakukan pengenceran sesuai dengan estimasi glukosa sisa dan akumulasi etanol. Kemudian dilakukan pengukuran berdasarkan prosedur metode enzimatis dari produsen. Data yang didapatkan adalah nilai rata-rata dan standar deviasi dari pengukuran tiga kali pengulangan dengan signifikansi berdasarkan uji-t. Data yang diperoleh adalah nilai rata-rata dan standar deviasi dari dua hingga tiga pengulangan dengan pengukuran signifikansi berdasarkan uji-t.

3. Hasil dan Diskusi

Karakteristik Pertumbuhan pada Glukosa dan Gliserol sebagai Sumber Karbon dalam Kondisi Aerobik

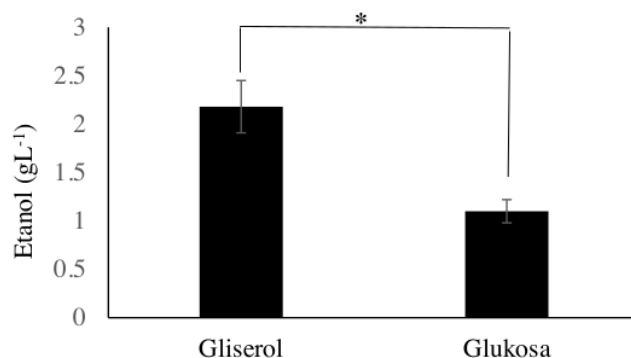


Gambar 1. Profil waktu konsumsi substrat dan bobot sel kering *E. coli* BW25113 pada glukosa dan gliserol dikultivasi selama 72 jam

Pada jam ke-0 hingga jam ke-12 *E. coli* berada pada fase lag hingga akhir fase logaritmik, pada jam ke-12 hingga jam ke-72 pertumbuhan sel berada pada fase stasioner, secara umum kondisi pertumbuhan sel pada kedua substrat mirip (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa *E. coli* mampu tumbuh dengan baik pada glukosa maupun gliserol dalam kondisi aerobik. Kondisi tersebut sesuai dengan penelitian Durnin et al. (2008), bahwa biomassa yang dihasilkan pada glukosa maupun gliserol tidak berbeda pada kondisi tersedianya oksigen sebagai akseptor elektron terakhir.

Gliserol cepat terkonsumsi pada jam ke-48 sedangkan glukosa lambat terkonsumsi hingga jam ke-72 belum habis (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan gliserol lebih cepat terkonsumsi daripada glukosa pada kondisi aerobik. Hal ini memungkinkan karena rataan tingkat pengurangan per karbon, gliserol ($C_3H_5O_3$; $k=4.67$) signifikan lebih tinggi dibandingkan glukosa ($C_6H_{12}O_6$; $k=4$). Kondisi ini mengindikasikan bahwa gliserol lebih efektif digunakan sebagai substrat.

Produksi Etanol pada *E. coli* Etanologenic



Gambar 3. Produksi etanol pada *E. coli* BW25113 $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$ dikultivasi selama 72 jam. Garis vertikal menggambarkan standar deviasi. (*) menunjukkan signifikansi pada taraf uji 5% (uji t).

Berdasarkan karakteristik pertumbuhan gliserol mampu tumbuh dengan baik, lebih cepat dikonsumsi dan tidak ada akumulasi asam asetat maka hal ini menguntungkan untuk selanjutnya diarahkan pada produksi etanol melalui *E. coli* etanologenic. Pada BW25113 $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$ dengan substrat gliserol *E. coli* menghasilkan akumulasi etanol sebesar 2.18 gL⁻¹ lebih besar dua kali lipat dari glukosa 1,1 gL⁻¹ (Gambar 3). Yield etanol mol/mol pada gliserol sebesar 0.16 dimana hasil ini tiga kali lebih tinggi dari hasil pencapaian tertinggi Shah *et al.* (2014) pada kondisi aerobik dan rekayasa genetik. Hasil ini menunjukkan gliserol efektif menyediakan NADH sebagai kosubstrat untuk produksi etanol dan menyeimbangkan rasio NADH/NAD⁺ yang diperlukan sel.

4. Kesimpulan

Karakteristik pertumbuhan pada strain *E. coli* BW25113 menunjukkan hasil gliserol lebih baik sebagai substrat dibandingkan glukosa. *E. coli* etanologenic dengan substrat gliserol yang mampu menyediakan NADH sebagai kosubstrat dalam menghasilkan etanol 2.18 gL⁻¹ dan menyeimbangkan rasio NADH/NAD⁺ yang dibutuhkan sel dalam kondisi aerobik. Sehingga gliserol efektif digunakan sebagai substrat untuk produksi etanol.

5. References

Pemanfaatan Gliserol Lemak Hewani untuk Produksi Bioetanol pada *Escherichia coli* Rekombinan

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	animalsciencejournal.unisla.ac.id Internet Source	6%
2	www.scilit.net Internet Source	3%
3	123dok.com Internet Source	1%
4	M. Yusuf, H. Kurniawan, A. B. R. Pahlevi, Anton Anton, C. Budiman, I. I. Arief. "Peranan Pompa Proton pada Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> di Lingkungan pH Alkali", <i>Jurnal Sain Peternakan Indonesia</i> , 2020 Publication	<1%
5	Guyton Durnin. "Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in <i>Escherichia coli</i> ", <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , 05/01/2009 Publication	<1%
6	Kirana Dira Anjani, Miftahul Ilmi. "Penapisan Isolat Khamir Oleaginous dari Nektar Bunga	<1%

dan Madu Hutan", Jurnal Mikologi Indonesia, 2018

Publication

7	repository.unand.ac.id Internet Source	<1 %
8	e-journal.uajy.ac.id Internet Source	<1 %
9	id.scribd.com Internet Source	<1 %
10	www.neliti.com Internet Source	<1 %
11	idoc.pub Internet Source	<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off