

**PENINGKATAN KAPASITAS PRODUKSI GAS HIDROGEN (H<sub>2</sub>) DENGAN  
SUBSTRAT LIMBAH BIODIESEL OLEH MUTAN GANDA  
*Enterobacter aerogenes* AD-H43 DI BATCH  
STIRRED TANK REACTOR (BSTR)**

Iwan Hidayat<sup>1)</sup>, Mahyudin AR<sup>2)</sup> Srikandi<sup>3)</sup>\*

<sup>1)</sup>Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, UNB Bogor

<sup>2)</sup>BPPT PUSPIPTEK Serpong

<sup>3)</sup>Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, UNB Bogor

Jl. K.H. Sholeh Iskandar Km. 4 Cimanggu, Tanah Sareal, Bogor 16166

Telp. 0251-8340217, 7535605

\*e-mail: srius@yahoo.co.id

**ABSTRACT**

***Enhancement of Hydrogen Gas Production Capacity (H<sub>2</sub>) With Substrate of Biodiesel Waste  
By Double Multiles *Enterobacter aerogenes* Ad-H43 In Batch Stirred Tank Reactor (Bstr)***

*Hydrogen is the simplest element consisting of only one proton and one electron. Almost all components inside the cell contain hydrogen atoms. Hydrogen gas (H<sub>2</sub>) consists of two binding hydrogen atoms. H<sub>2</sub> can be produced by chemical / physics method and biological method. The production of H<sub>2</sub> by chemical / physics method is done thermochemically and electrolyzed water, while biologically done by microorganisms through direct and indirect biofotolysis as well as light and dark fermentation. The results showed that H<sub>2</sub> production using a double *Enterobacter aerogenes* AD-H43 mutant on the BSTR fermentor scale occurred an increase in H<sub>2</sub> capacity followed by decreased production of lactic acid due to mutation with Ethyl Methane Sulfonate (EMS). On the glycerol substrate *E. aerogenes* AD-H43 produces H<sub>2</sub> of 3.14 mol / mol glycerol while *E. aerogenes* AY-2 produces only H<sub>2</sub> of 2.65 mol / mol glycerol, or an increase of 18% compared to *E. aerogenes* AY-2 whereas for production lactic acid decreased 33% while in biodiesel waste *E. aerogenes* AD-H43 yield H<sub>2</sub> 0.98 mol / mol glycerol and *E. aerogenes* AY-2 only 0.85 mol / mol glycerol or about 15% increase and in purified biodiesel waste resulting in a higher yield of H<sub>2</sub> from biodiesel waste of 0.89 mol / mol glycerol at *E. aerogenes* AY-2 and 0.98 mol / mol glycerol in *E. aerogenes* AD-H43.*

*Keywords: Hydrogen, Enterobacter aerogenes, BSTR fermentor*

**ABSTRAK**

Hidrogen adalah unsur paling sederhana yang hanya terdiri dari satu proton dan satu elektron. Hampir semua komponen di dalam sel mengandung atom hidrogen. Gas hidrogen (H<sub>2</sub>) terdiri atas dua atom hidrogen yang berikatan. Pembuatan H<sub>2</sub> dapat dilakukan dengan metode kimia/fisika dan metode biologis. Produksi H<sub>2</sub> dengan metode kimia/fisika dilakukan secara termokimia dan elektrolisis air, sedangkan secara biologis dilakukan oleh mikroorganisme melalui biofotolisis langsung dan tidak langsung serta fermentasi terang dan gelap. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi H<sub>2</sub> menggunakan mutan ganda *Enterobacter aerogenes* AD-H43 pada skala fermentor BSTR terjadi peningkatan kapasitas H<sub>2</sub> dengan diikuti penurunan produksi asam laktat akibat mutasi dengan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS). Pada substrat gliserol *E. aerogenes* AD-H43 memproduksi H<sub>2</sub> sebesar 3.14 mol/mol gliserol sedangkan *E. aerogenes* AY-2 hanya memproduksi H<sub>2</sub> sebesar 2.65 mol/mol gliserol, atau mengalami kenaikan sebesar 18 % dibandingkan *E. aerogenes* AY-2 sedangkan untuk produksi asam laktatnya terjadi penurunan 33% sedangkan pada limbah biodiesel *E. aerogenes* AD- H43 menghasilkan *yield* H<sub>2</sub> 0.98 mol/mol gliserol dan *E. aerogenes* AY-2 hanya 0.85 mol/mol gliserol atau terjadi kenaikan sekitar 15 % dan pada limbah biodiesel yang di purifikasi menghasilkan *yield* H<sub>2</sub> yang lebih tinggi dari limbah biodiesel yaitu 0.89 mol/mol gliserol pada *E. aerogenes* AY-2 dan 0.98 mol/mol gliserol pada *E. aerogenes* AD-H43.

Kata Kunci: Hidrogen, *Enterobacter aerogenes*, fermentor BSTR

## PENDAHULUAN

Menurunnya cadangan minyak bumi mendorong dilakukan usaha penghematan energi dan pencarian sumber energi baru sebagai alternatif. Gas hidrogen ( $H_2$ ) merupakan bahan bakar yang menjanjikan sebagai bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan karena dapat diperbaharui, efisien, dan juga karena tidak memiliki ikatan dengan karbon sehingga tidak menghasilkan emisi gas buang yang dapat mencemari lingkungan. (Sardjoko, 1991, Ngundiwaluyo dan Amos, 1996)

Gas  $H_2$  dapat dihasilkan dengan bantuan mikroorganisme yang dikenal sebagai biohidrogen (Said, 2007). Gas  $H_2$  dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri misalnya *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, dan *Klebsiella sp* (Sang-Eun Oh *et.al*, 2003). Pada penelitian ini yang digunakan adalah *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) Bakteri tersebut dapat menghasilkan  $H_2$  melalui fermentasi gelap, sehingga tidak tergantung pada cahaya matahari. *E. aerogenes* juga dapat menghasilkan  $H_2$  lebih cepat dari mikroorganisme fotosintetik dan dapat bertahan hidup pada konsentrasi  $H_2$  yang tinggi (Rachman, 1997). *E. aerogenes* mampu memanfaatkan berbagai macam substrat, misalnya gliserol, substrat tersebut dapat diperoleh dari limbah biodiesel karena merupakan salah satu komponen utama penyusun limbah tersebut (Ngan *et al.*, 2004).

Limbah biodiesel merupakan limbah organik yang dapat digunakan sebagai substrat karena kaya akan bahan-bahan organik. Limbah biodiesel yang merupakan sisa hasil pengolahan minyak kelapa sawit menjadi bahan bakar biodiesel dapat dimanfaatkan sebagai substrat oleh beberapa mikroorganisme. Substrat organik di dalam limbah tersebut bermacam-macam, di antaranya karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Ngan *et.al*, 2004). Indonesia merupakan salah satu negara penghasil kelapa sawit terbesar, sehingga penggunaan limbah tersebut untuk produksi biohidrogen bersifat ekonomis dan menguntungkan.

Produksi  $H_2$  secara teoritis pada fermentasi asetat menghasilkan 4 mol

$H_2$ /mol glukosa, sedangkan produksi  $H_2$  oleh *E. aerogenes* menggunakan substrat gliserol hanya mencapai 0.669 mol  $H_2$ /mol gliserol (Nishio dan Nakashimada, 2004). Pengembangan galur *E. aerogenes* untuk mendapatkan produktivitas  $H_2$  lebih tinggi juga telah dilakukan dengan melakukan mutasi pada *E. aerogenes* HU-101 dengan senyawa kimia *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NTG), kemudian diseleksi dengan *alil alkohol* dan *proton suicide* menghasilkan suatu mutan *E. aerogenes* AY-2. Produksi  $H_2$  oleh mutan *E. aerogenes* AY-2 menghasilkan 1,17 mol  $H_2$ /mol glukosa atau 1,5 kali lebih tinggi dari *E.aerogenes* HU-101 (Rachman dkk, 1997), sedangkan secara teoritis (stoikiometri) adalah 1 mol  $H_2$ /mol gliserol (Ngan *et.al*, 2004). Produktivitas  $H_2$  oleh mutan *E. aerogenes* AY-2 masih dapat ditingkatkan melalui perubahan metabolisme yaitu dengan menghambat pembentukan metabolit berupa alkohol dan asam organik .

Perubahan metabolisme pada mikroorganisme dapat dilakukan dengan mutagenesis menggunakan suatu mutagen, antara lain mutagen kimia *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS). Dari penelitian sebelumnya diperoleh informasi bahwa EMS memberikan efek mutasi sehingga terjadi perubahan jalur metabolisme pada mutan *E. aerogenes* AY-2 dengan memproduksi asam laktat lebih rendah dari sebelumnya, sehingga mengakibatkan Mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43. Mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 memiliki produktivitas  $H_2$  lebih tinggi yaitu sebesar 20% dari nilai produksi mutan *E. aerogenes* AY-2 pada skala vial botol (50 ml) (Said, 2007).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 dan mutan *E. aerogenes* AY-2, ekstrak khamir (Scharlau 07-079), Tripton (Oxoid),  $KH_2PO_4$  (Univar),  $K_2HPO_4$  (Univar),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), gliserol,  $Na_2CO_3$ , NaOH (Merck), HCl (Merck), akuades, akuabides, limbah biodiesel,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ ,

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , *nicotinic acid*,  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ,  $H_2PO_4$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $H_3PO_4$ ,  $NaCl$ .

Peralatan yang digunakan adalah autoklaf (Iwaki, Jepang), *high performance liquid chromatograph* (Hitachi L 5025, Jepang), *high performance liquid chromatograph* (Waters), respirometer, *batch stirred tank reactor* (LKB bromma), pH meter (Knics), alat sentrifugasi, oven (Mettler), vorteks (Sargen Welch), neraca teknis (Sartorius), mikroskop compound (Nikon), kamar hitung improve Neubauer (Assistant), inkubator statis, spektrofotometer, penangas air, termometer, *cool chamber*, *water bath*, *laminar air flow cabinet*, alat hitung, tabung mikrosentrifugasi, mikrofilter 0,2  $\mu m$ , pengaduk bermagnet, tabung sentrifugasi, pipet mikro, erlenmeyer dan peralatan yang biasa digunakan dalam laboratorium.

## Metode

### 1. Pembuatan medium

#### a. Pembuatan Media Pertumbuhan

##### Kompleks

Sebanyak 0,25 g ekstrak khamir, 0,25 g tripton, 0,5 ml unsur makro  $\{(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O\}$ , dan 0,5 ml unsur mikro  $\{Na_2SeO_3$ ,  $NiCl_2$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  dan *nicotinic acid\}, dimasukkan dalam erlenmeyer 50 ml dan dilarutkan menggunakan akuades hingga volume 40 ml, dihomogenkan dengan pengaduk bermagnet dan pH ditepatkan menjadi pH 6,8 dengan penambahan NaOH 0.1N. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang sudah steril dan dingin ditambahkan gliserol 5 ml dan 5 ml *buffer* fosfat yang juga sudah disterilisasi.*

#### b. Pembuatan Media Pertumbuhan Agar Semi Solid

Sebanyak 0,575 g ekstrak khamir agar, 0,175 g ekstrak khamir 0,375 g tripton, dan 0.25 g NaCl, dimasukkan dalam erlenmeyer 125 ml dan dilarutkan menggunakan akuades hingga volume 50 ml, dihomogenkan dengan pengaduk

bermagnet dan pH ditepatkan menjadi pH 6,8 dengan penambahan NaOH 1N. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

### c. Pembuatan Media Fermentasi Limbah Biodiesel pada BSTR

Medium produksi  $H_2$  dibuat berdasarkan metode Hungate (Miller *et.al*, 1974) yang dimodifikasi. Sebanyak 17.5 g ekstrak khamir, 17.5 g tripton, 35 ml makroelemen dan 35 ml mikroelemen dilarutkan dalam 2555 ml aquades ditambah 175 ml limbah biodiesel yang sudah disaring sehingga volumenya 2800 ml dihomogenkan dengan pengaduk bermagnet dan pH ditepatkan menjadi pH 6,8 dengan penambahan NaOH 1 N. Erlenmeyer yang berisi medium tersebut ditutup dengan kertas aluminium dan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100 °C selama 20 menit. Medium kemudian didinginkan dengan es pada suhu -5 °C. Setelah dingin, medium kemudian dipindahkan ke fermentor dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 100 °C, tekanan 1 bar, selama 15 menit. Medium yang sudah steril dan dingin ditambahkan 350 ml *buffer* fosfat yang sudah disterilisasi

### d. Pembuatan Media Fermentasi Limbah Biodiesel purifikasi pada BSTR

Pembuatan media fermentasi limbah Biodiesel yang dipurifikasi prinsipnya sama dengan pembuatan media fermentasi limbah biodiesel tanpa purifikasi, Purifikasi dilakukan dengan cara memanaskan limbah biodiesel sambil dihomogenkan dengan pengaduk bermagnet hingga mencapai suhu  $\pm 40$  °C kemudian ditambahkan  $H_2SO_4$  pekat dengan menggunakan pipet, dengan konsentrasi 2.5% v/v. Sehingga dari hasil purifikasi ini diperoleh gliserol dan garam pospat reaksinya sebagai berikut:

Limbah Biodiesel +  $H_2SO_4 \rightarrow Na_2SO_4$  + Gliserol

### 2. Pembuatan Kultur Stok *E. aerogenes* AY-2 dan *E. aerogenes* AD-H43

Kultur stok yang disimpan pada -80 °C diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 125 ml yang berisi 50 ml medium pertumbuhan kompleks kemudian diinkubasi dalam

inkubator statis selama 8-12 jam pada suhu 37 °C. Kultur kemudian disimpan dalam *cool chamber* dan diremajakan setiap dua minggu sekali.

### 3. Pembuatan Kultur Kerja

Kultur stok yang disimpan di *cool chamber* diambil sebanyak  $\pm$  1 ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 50 ml media agar *semi solid* dengan cara ditusukan. Kultur tersebut diinkubasi dalam inkubator statis pada suhu 37 °C selama 8 jam. Kultur kemudian disimpan dalam *cool chamber* dan diremajakan setiap dua minggu sekali.

### 4. Pembuatan Kultur Awal (*Pre Culture*)

Sebanyak 35 ml media pertumbuhan kompleks dimasukkan dalam erlenmeyer 50 ml pH ditetapkan 6.8. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang sudah steril dan dingin ditambahkan gliserol 3.5 ml dan 3.5 ml *buffer* fosfat yang juga sudah disterilisasi, kemudian dilakukan inokulasi 1 ose bakteri mutan dari media agar semi solid. Setelah diinokulasi simpan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 8 jam

### 5. Pembuatan kurva pertumbuhan

Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengambil kultur mutan *E. aerogenes* AY-2 dan mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam botol serum 125 ml yang berisi media pertumbuhan. Kultur tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator statis pada suhu 37 °C. Penghitungan *Optical Density* (OD) dilakukan pada jam ke 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, dengan cara diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 680 nm

### 6. Pembuatan Media starter (*Main culture*)

Sebanyak 1.75 g ekstrak khamir, 1.75 g trypton, 3.5 ml unsur mikro, 3.5 ml unsur makro dilarutkan dengan 238 ml aquades sampai volum 280 ml dihomogenkan dengan pengaduk bermagnet dan pH ditepatkan menjadi pH 6,8 dengan

penambahan NaOH 1 N. Erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan sumbat kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah medium dingin ditambahkan larutan *buffer* pospat 35 ml yang sudah disteril terpisah kemudian dilakukan inokulasi *Pre culture* kedalam media starter di *Laminar Air flow*. Kemudian disimpan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 8 jam.

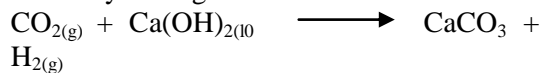
### 7. Produksi $H_2$ oleh *Enterobacter aerogenes* AD-H43 dalam fermentor BSTR

Sebanyak 35 ml media pertumbuhan yang berisi kultur mutan ganda AD-H43 diinokulasi kedalam 350 ml media starter steril, selanjutnya media starter steril dinokulasi kedalam media fermentasi didalam sebuah fermentor 6L. Suhu selama produksi dijaga pada 37 °C, pH 6,8 dan agitasi 40 rpm. Volume gas  $H_2$  yang dihasilkan selama 20 jam dicatat, dan pengukuran jumlah sel dilakukan pada jam ke 0, 4, 8, 12, 16, 20. Selain melakukan pengukuran dan penghitungan sel juga dilakukan. Pengukuran asam laktat diukur pada jam ke 20.

### 8. Pengukuran hasil fermentasi

#### a. Pengukuran $H_2$

Pengukuran jumlah hidrogen dilakukan menggunakan respirometer. Selang respirometer dihubungkan dengan lubang pada bagian atas fermentor. Gas  $CO_2$  dan  $H_2$  yang terbentuk akan mengalir melalui selang tersebut ke erlenmeyer yang berisi larutan  $Ca(OH)_2$ . Gas  $CO_2$  akan bereaksi dengan  $Ca(OH)_2$  membentuk  $CaCO_3$ , sedangkan  $H_2$  akan masuk ke dalam tabung respirometer yang berisi NaCl jenuh. Reaksinya sebagai berikut :



Volume NaCl yang dipindahkan pada respirometer diukur sebagai volume gas  $H_2$  yang dihasilkan. Jumlah  $H_2$  diperoleh melalui perhitungan (Rachman *dkk*, 1997).

$$Yield H_2 = \frac{\text{mol } H_2}{\text{mol substrat}}$$

#### b. Pengukuran konsentrasi asam laktat

Pengukuran jumlah asam laktat dilakukan menggunakan analisis HPLC.

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril dan kemudian disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke tabung mikrosentrifus yang lain dan kemudian disaring menggunakan mikrofilter 0,2  $\mu$ m. Larutan standar asam laktat 100 mM diinjeksi ke HPLC dan setelah injeksi tersebut supernatan hasil sentrifugasi diinjeksikan ke HPLC. Konsentrasi sampel diketahui dengan rumus perhitungan:

$$\text{Kons. sampel} = \frac{\text{area sampel} \times \text{kons std}}{\text{area standar}}$$

$$\text{Produksi asam laktat} = \frac{\text{mol asam laktat}}{\text{mol substrat}}$$

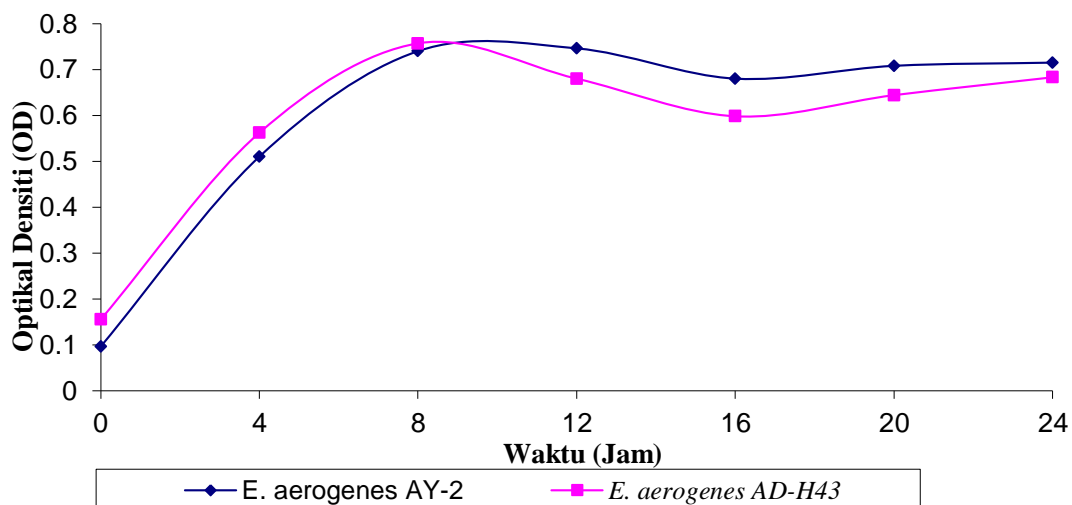
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kurva Pertumbuhan mutan *Enterobacter aerogenes* AY-2 dan mutan ganda *E.aerogenes* AD-H43

Menurut Harley (2005) kurva pertumbuhan dapat memperlihatkan empat tahapan pertumbuhan, yaitu fase lag, fase log (fase logaritmik/eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian (*death phase*). Fase lag dan fase log pada Gambar 1 terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-8. Fase stasioner dimulai setelah jam ke-8 dan pada jam ke-48 dianggap sel telah mengalami

fase kematian Fase kematian tidak dapat diamati, karena pengamatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan metode spektrofotometer. Menurut McKanne dan Kandel (1996), kelemahan metode spektrofotometer adalah tidak dapat mengamati jumlah sel yang hidup dan mati

Pengukuran OD *E. aerogenes* AD-H43 dilakukan pada  $\lambda = 680$  nm. Hal tersebut berdasarkan Rachman (2001) yang telah melakukan pengukuran OD pada *E. aerogenes* AY-2. Nakashimada *et al* (2002) juga menggunakan  $\lambda = 680$  nm untuk mengukur OD *E. aerogenes* HU-101. Gambar 1 menunjukkan bahwa *Enterobacter aerogenes* AD-H43 dan *E. aerogenes* AY-2 membutuhkan waktu 8 dan 12 jam untuk mencapai akhir fase log. Akhir fase log adalah kondisi pada kurva pertumbuhan saat bakteri mencapai jumlah maksimal dan aktif melakukan metabolisme. Penentuan kecepatan tumbuh dan waktu bakteri melakukan proses metabolisme juga dapat diketahui dengan melihat nilai dari *spesifik rods*( $\mu$ ). Rumus dari  $\mu = \tan \alpha =$  nilai OD akhir fase log dibagi dengan waktu pada saat akhir fase log. Sehingga diperoleh nilai  $\mu$  dari *E. aerogenes* AD-H43 =  $0.09 \text{ j}^{-1}$ , Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa fase log *E. aerogenes* AY-2 lebih lama dari *E. aerogenes* AD-H43. Hal tersebut yang menjadi pertimbangan dalam penentuan saat inokulasi.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri Mutan Ganda *E. aerogenes* AD-H43 dan *E. aerogenes* AY-2

Nilai  $\mu$  yang semakin besar dari *E. aerogenes* AD-H43 berarti bahwa mutasi menggunakan EMS pada *E. aerogenes* AY-2 memberikan efek terjadi perubahan pada bentuk koloni maupun fisik bakteri selain itu juga memungkinkan terjadi perubahan DNA yang lebih tinggi dari gen pengkode laktat dehidrogenase akibat alkilasi yang diakibatkan oleh gugus etil pada EMS. Menurut Meuth & Arrand (1982), mutasi menggunakan EMS dapat menyebabkan kesalahan pemasangan basa (*mispairing*), sehingga terjadi transisi basa GT menjadi AT pada replikasi DNA.

*Enterobacter aerogenes* termasuk ke dalam kelompok yang sama dengan *Escherichia coli* (*E. coli*) dalam penggolongan beberapa genus bakteri, sehingga dapat dianggap mewakili beberapa karakter *E. aerogenes*. Beberapa bakteri, seperti *E. coli* memiliki enzim O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA alkiltransferase (AGT atau MGMT) yang dapat memperbaiki kerusakan akibat alkilasi EMS (Margison *et. al*, 2003, Mishina, 2005). Enzim alkiltransferase merupakan *suicide enzyme* dan bersifat *irreversible*. Enzim tersebut, setelah memperbaiki satu basa guanin yang teralkilasi tidak dapat digunakan lagi dan akan dihancurkan oleh sel (Twyman, 1998, Faibanks dan Andersens, 1999). Apabila kerusakan DNA akibat alkilasi oleh EMS terjadi pada banyak basa guanin gen tersebut, maka mekanisme perbaikan hanya dapat memperbaiki sebagian kecil basa yang telah teralkilasi. Hal tersebut dapat menyebabkan kemungkinan bakteri termutasi pada gen pengkode laktat dehidrogenase akan semakin besar.

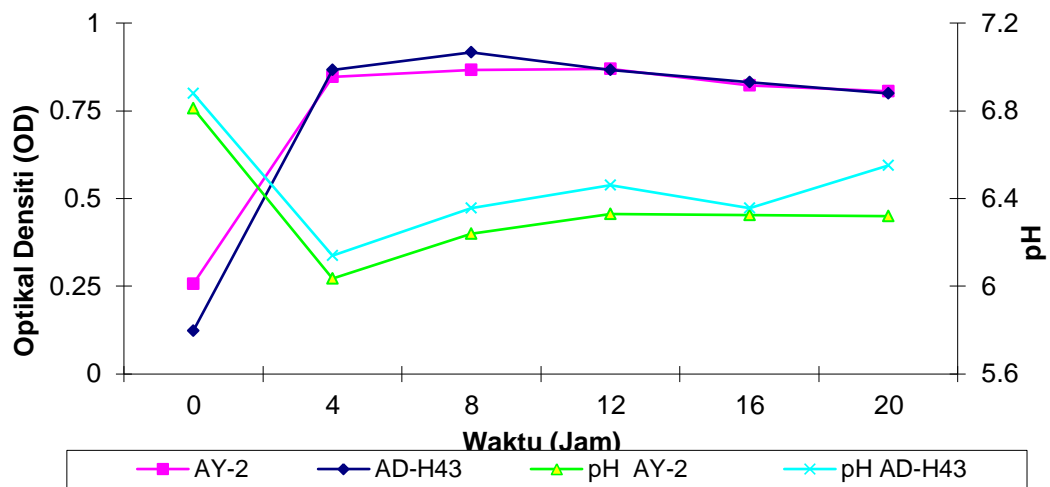
### Fermentasi dengan substrat gliserol murni dalam fermentor BSTR

Fermentasi dengan substrat gliserol murni dilakukan untuk mengetahui kerja *E. aerogenes* AD-H43 dalam substrat gliserol murni dalam memproduksi  $H_2$  serta untuk mengetahui kenaikan produktivitas dari *E. aerogenes* AD-H43 pada skala lebih besar. Kecepatan produksi  $H_2$  pada kedua bakteri dengan substrat gliserol mencapai optimum pada jam ke 8, tetapi kecepatan produksi  $H_2$  mutan ganda AD-H43 lebih tinggi dari *wild*

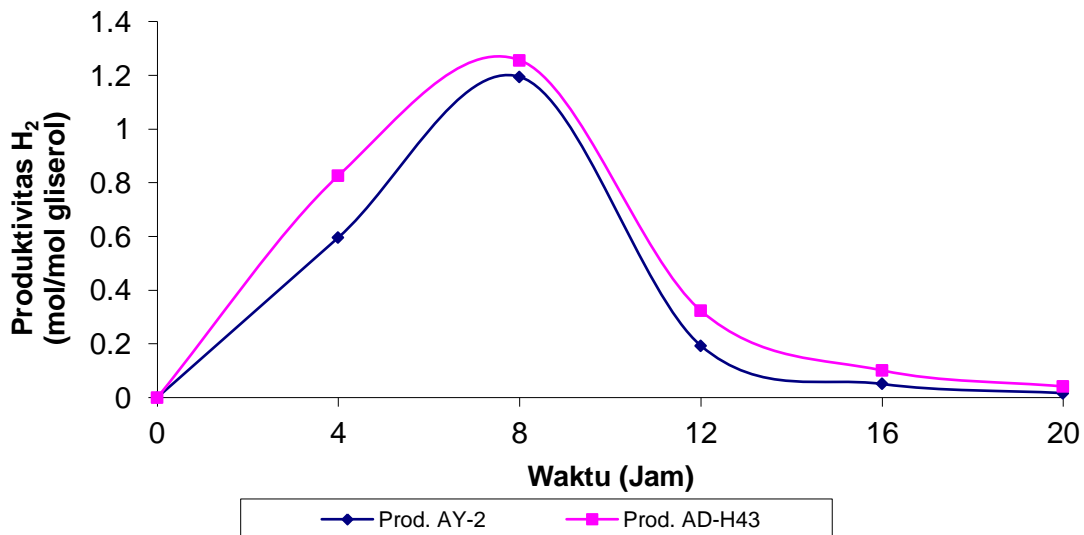
*typenya*. Hal tersebut terjadi karena efek dari mutasi yang berakibat pada kecepatan pertumbuhan bakteri untuk mencapai fase log. Dimana fase tersebut kondisi bakteri mencapai jumlah maksimal dan aktif melakukan metabolisme. Ito *et.al* (2005) menyatakan bahwa sumber karbon gliserol murni dapat digunakan untuk produksi  $H_2$ . Produksi  $H_2$  dan metabolit lain seperti asam laktat oleh mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 berbeda dengan mutan *E. aerogenes* AY-2 dimana mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 memproduksi  $H_2$  lebih tinggi dibandingkan mutan *E. aerogenes* AY-2 tetapi produksi asam laktat rendah.

Perlakuan mutasi diduga berpengaruh pada mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 sehingga menyebabkan bakteri tersebut melakukan perubahan yang berdampak pada perubahan pada produksi  $H_2$  dan asam laktat yang dihasilkan. Salah satu perubahan yang diduga dilakukan mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 adalah cenderung melakukan metabolisme piruvat menjadi  $H_2$  dan asam laktat.

Dari Gambar 2 dapat disimpulkan bahwa OD mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 tertinggi pada jam ke-8 dan pada mutan *E. aerogenes* AY-2 pada jam ke-12 hal tersebut menunjukkan bahwa pada jam ke-8 mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 mencapai pertumbuhan yang maksimal sehingga melakukan proses produksi metabolit seperti  $H_2$  mencapai jumlah terbanyak pada jam tersebut. Pada saat OD tinggi maka diikuti dengan penurunan pH sehingga terjadi produktivitas  $H_2$  yang cukup tinggi juga. Penurunan pH yaitu dari pH 6.8 menjadi 6.14 terjadi karena pada waktu produksi  $H_2$  juga diikuti dengan produksi asam-asam organik sehingga reaksi menjadi asam. Singleton dan Sainsbury (1981) mengatakan bahwa dalam setiap jalur fermentasi, akan terjadi keseimbangan pembentukan produk yaitu apabila suatu produk dibentuk berlebih maka akan disertai dengan penurunan produk lain.



Gambar 2. Kurva Hubungan Optical Density (OD) terhadap pH dan Waktu *E. aerogenes* AD-H43 dan *E. aerogenes* AY-2 dengan Substrat Gliserol



Gambar 3. Kurva Hubungan Produktivitas  $H_2$  dengan Waktu pada Fermentasi dengan Substrat Gliserol dalam Fermentor BSTR

Pada Gambar 3 terlihat bahwa produktivitas  $H_2$  tertinggi terletak pada jam ke-4 sampai ke-8, pada mutan ganda AD-H43 pada jam ke-4 sudah menghasilkan  $H_2$  yang cukup tinggi sehingga diperkirakan mutan ganda AD-H43 menghasilkan  $H_2$  pada jam ke-2 sama seperti pada AY-2 tetapi berbeda dalam kecepatannya. Pada penelitian ini mutan ganda AD-H43 menghasilkan kecepatan pembentukan 8.53

mmol/L.jam sedangkan AY-2 7.16 mmol/L.jam

Pembentukan metabolit seperti asam laktat yang berkurang diduga menyebabkan  $NADH_2$  dalam sel bertambah karena  $NADH_2$  tersebut tidak mengalami oksidasi menjadi  $NAD$ .  $NADH_2$  tersebut diduga digunakan oleh enzim hidrogenase untuk diubah menjadi  $H_2$ . Menurut Nakashimada *et.al* (2002),  $H_2$  dapat diproduksi dari kelebihan  $NADH_2$ . Produksi

$H_2$  oleh hidrogenase melalui oksidasi  $NADH_2$  tersebut diduga menguntungkan bagi *E. aerogenes* karena memperlancar reaksi reduksi-oksidasi dalam sel. Mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 memproduksi  $H_2$  sebesar 3.14 mol/mol gliserol sedangkan mutan *E. aerogenes* AY-2 hanya memproduksi  $H_2$  sebesar 2.65 mol/mol gliserol, atau mengalami kenaikan sebesar 18 % dibandingkan *E. aerogenes* AY-2 sedangkan untuk produksi asam laktatnya terjadi penurunan 33%. Berdasarkan hasil tersebut dapat diasumsikan bahwa mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 mengalami defisiensi laktat dehidrogenase. Menurut Nakashimada *et.al* (2002) pembentukan asam laktat, etanol, dan 2,3 Butandiol melibatkan oksidasi NADH berperan dalam produksi  $H_2$ . Senyawa NADH yang tidak digunakan sebagai koenzim dalam pembentukan asam laktat akan berinteraksi dengan enzim hidrogenase dan ferredoksin yang tereduksi sehingga menghasilkan  $H_2$  ( $2NADH \rightarrow FdH_2 \rightarrow H_2$ )

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa kenaikan  $H_2$  pada skala lebih besar tidak mengalami kenaikan sebesar 20% seperti pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Said (2007) pada skala vial botol, selain kenaikan produksi  $H_2$  juga terjadi penurunan produksi asam laktat. Hal tersebut juga memberikan informasi bahwa perlakuan mutasi menggunakan EMS memberikan efek mutasi sehingga terjadi perubahan jalur metabolisme pada *E. aerogenes* AY-2 dengan memproduksi asam laktat lebih rendah dari sebelumnya. perubahan produksi tersebut diduga karena adanya perubahan basa pada gen pengkode laktat dehidrogenase, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim laktat dehidrogenase. Mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 merupakan bakteri yang potensial dalam pengembangan bioenergi masa depan.

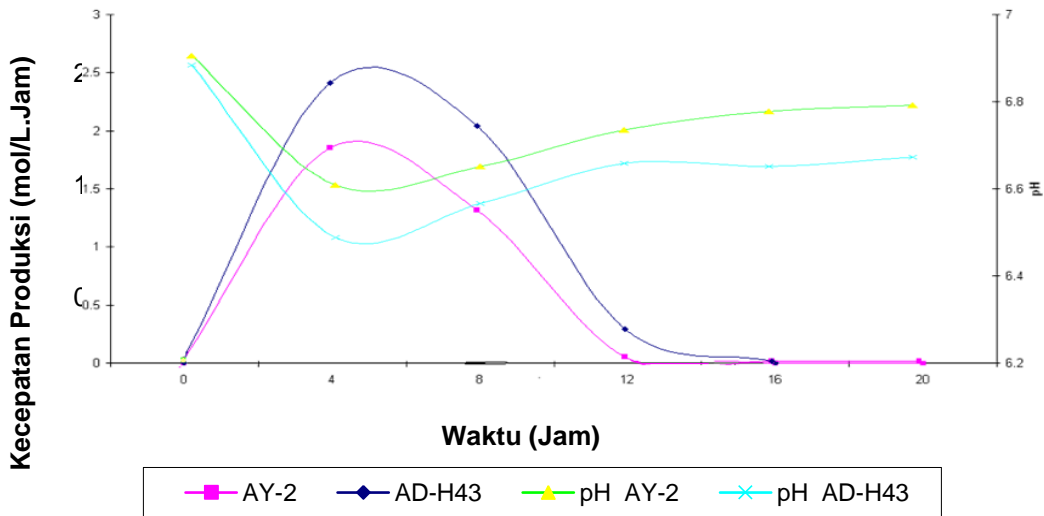
### **Fermentasi dengan substrat Limbah Biodiesel dalam fermentor BSTR**

Produksi  $H_2$  dalam fermentor menggunakan substrat limbah biodiesel

dilakukan untuk mengetahui perbandingan kecepatan produksi  $H_2$  dan produktivitas antara *E. aerogenes* AY-2 dan *E. aerogenes* AD-H43. Selain itu juga sebagai awal peningkatan skala produksi  $H_2$  menggunakan *E. aerogenes* AD-H43 setelah produksi pada skala botol. Produksi tersebut dilakukan untuk mengetahui berapa kenaikan *yield*  $H_2$  yang dihasilkan mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43.

Hasil penelitian (Gambar 4) menunjukkan bahwa kecepatan produksi  $H_2$  terus mengalami kenaikan hingga jam ke-4 kemudian mulai turun pada jam ke-8 sampai jam ke-20 hingga gas yang dihasilkan habis. Pada kedua bakteri kecepatan pembentukan tertinggi pada jam 4 tetapi berbeda mutan ganda AD-H43 lebih tinggi dari AY-2. Kenaikan produksi  $H_2$  diikuti dengan penurunan pH hal ini disebabkan adanya reaksi yang bersuasana asam pada waktu fermentasi mencapai waktu yang optimum untuk bakteri menghasilkan metabolit seperti  $H_2$  dan asam-asam organik.

Hasil fermentasi selama 20 jam (Gambar 4) mengindikasikan bahwa *E. aerogenes* mampu memanfaatkan lebih dari satu sumber karbon untuk memproduksi  $H_2$ . Pemanfaatan tersebut terlihat dari kecepatan produksi yang mencapai maksimal pada jam ke-4 dan kemudian menurun pada jam ke-8 hingga akhir jam ke-16. Penurunan tersebut kemungkinan mutan ganda AD-H43 memproduksi  $H_2$  secara optimum hanya sampai jam ke-8 setelah itu mutan ganda AD-H43 memproduksi metabolit lain selain  $H_2$ . Menurut Nishio dan Nakashimada (2004), *E. aerogenes* mampu memanfaatkan beberapa sumber karbon seperti gliserol, glukosa, fruktosa, sukrosa, manitol, dan sorbitol untuk memproduksi  $H_2$ . *Enterobacter aerogenes* diduga mampu memanfaatkan lebih dari satu sumber karbon dalam limbah biodiesel untuk produksi  $H_2$  karena limbah biodiesel adalah limbah yang kaya akan bahan organik seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat.



Gambar 4. Kurva Hubungan Kecepatan Produksi  $H_2$  dengan pH dan waktu Fermentasi dengan Substrat Limbah Biodiesel dalam Fermentor BSTR

*Enterobacter aerogenes* diduga memanfaatkan gliserol lebih dahulu dan kemudian memanfaatkan sumber karbon lain yang lebih kompleks untuk memproduksi  $H_2$ . Judoamidjojo *et. al.* (1990) menyatakan bahwa dalam substrat yang kompleks, bakteri dapat memanfaatkan lebih dari satu substrat untuk pertumbuhan dengan terlebih dahulu memanfaatkan substrat yang paling sederhana.

Pengukuran terhadap produk lain juga dilakukan tetapi hanya pada pengaruh asam laktat terhadap produksi  $H_2$ . Dari hasil penelitian didapat bahwa dengan bertambahnya atau semakin tinggi produksi  $H_2$  mutan ganda AD-H43 berpengaruh pada produksi asam laktat, hal ini disebabkan pengaruh mutagen EMS pada *E. aerogenes* AY-2 sehingga menyebabkan mutasi acak pada basa-basa DNA, sehingga mempengaruhi aktivitas enzim serta metabolit yang dihasilkan pada setiap mutan guna menjaga reaksi oksidasi dalam metabolisme.

Hasil penelitian memberikan informasi bahwa *yield*  $H_2$  0.98 mol/mol gliserol dan *E. aerogenes* AY-2 hanya 0.85 mol/mol gliserol atau terjadi kenaikan sekitar 15 %.

#### Fermentasi dengan substrat limbah biodiesel yang dipurifikasi

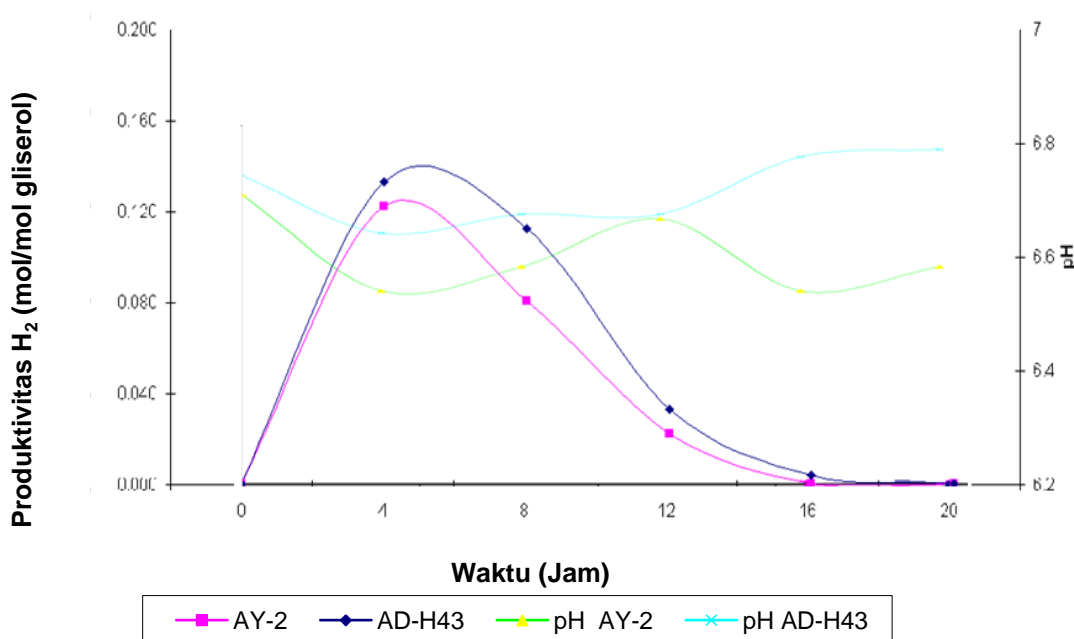
Fermentasi dengan substrat limbah biodiesel yang dipurifikasi dilakukan untuk mengetahui produktivitas  $H_2$  yang dihasilkan oleh mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 dan mutan *E. aerogenes* AY-2, kemudian membandingkan dengan produktivitas  $H_2$  yang dihasilkan oleh kedua bakteri pada substrat limbah biodiesel tanpa purifikasi. Seperti diketahui produksi  $H_2$  dengan substrat limbah biodiesel tanpa purifikasi diduga masih kurang optimum karena kandungan gliserol dalam limbah biodiesel tersebut masih terikat dengan katalis sisa proses pembuatan biodiesel. Salah satu perlakuan terhadap limbah biodiesel yang dapat mengikat katalis yang masih ada dalam limbah biodiesel sehingga didapat gliserol lebih murni yaitu dengan cara purifikasi.

Hasil penelitian menggunakan limbah biodiesel yang dipurifikasi (Gambar 5) terlihat produktivitas  $H_2$  yang dihasilkan mutan ganda AD-H43 lebih tinggi dari mutan AY-2 yaitu 0.89 mol/mol gliserol pada *E. aerogenes* AY-2 dan 0.98 mol/mol gliserol pada *E. aerogenes* AD-H43. Sedangkan kalau dibandingkan dengan substrat limbah biodiesel tanpa purifikasi nilai produktivitasnya lebih tinggi walaupun pola grafiknya sama yaitu mencapai optimum pada jam ke-4 sampai jam ke-8.

Pada fermentasi menggunakan substrat limbah biodiesel yang dipurifikasi (Gambar 5) terlihat bahwa dengan menurunnya produksi  $H_2$  pada kedua bakteri terjadi kenaikan pH dengan dipurifikasi kandungan gliserol dalam limbah biodiesel semakin murni sehingga dihasilkan  $H_2$  dengan *yield* yang tinggi.

Pada fermentasi dengan substrat ini juga dilakukan juga pengukuran asam organik selain asam laktat. Dari hasil

pengukuran dengan menggunakan GCMS didapatkan asam organik yang ada dalam jalur metabolisme dari data tersebut disimpulkan bahwa asam-asam organik yang dihasilkan mutan ganda AD-H43 seperti Etanol, 1,3 propandiol, meningkat hal ini disebabkan oleh efek dari EMS yang memblok jalur pembentukan asam laktat sehingga  $H^+$  hasil oksidasi NADH membentuk alkohol grup yang penting bagi oksidasi *E. aerogenes*.



Gambar 5. Kurva Hubungan Waktu, pH dan Produktivitas  $H_2$  pada Fermentasi Dengan Substrat Limbah Biodiesel Purifikasi

Tabel 1. Perbandingan Produksi  $H_2$  Mutan *E. aerogenes* AY-2 dan Mutan Ganda *E. aerogenes* AD-H43

Substrat	Produksi $H_2$ dengan mikroorganisme	
	<i>E. aerogenes</i> AY-2 (mol/mol gliserol)	<i>E. aerogenes</i> AD-H43 (mol/mol substrat)
Gliserol	2.65	3.14
Limbah Biodiesel	0.85	0.98
Limbah Biodiesel Purifikasi	0.89	0.98

Dari Tabel 1 terlihat produksi  $H_2$  dengan substrat Gliserol murni lebih tinggi dibandingkan limbah biodiesel dan limbah biodiesel purifikasi. Menurut Ito *et.al* (2004) produksi menggunakan limbah biodiesel lebih rendah dari menggunakan gliserol murni pada konsentrasi yang sama. Produksi  $H_2$  yang lebih tinggi pada gliserol disebabkan gliserol merupakan substrat tunggal sehingga *E. aerogenes* dapat memanfaatkan substrat tersebut dengan optimum untuk menghasilkan  $H_2$ , sedangkan pada limbah biodiesel lebih rendah karena dalam limbah tersebut masih terdapat substrat kompleks. Judoamidjojo *et. al* (1990) menyatakan bahwa dalam substrat yang kompleks, bakteri dapat memanfaatkan lebih dari satu substrat untuk pertumbuhan dengan terlebih dahulu memanfaatkan substrat yang paling sederhana.

Oleh sebab limbah biodiesel merupakan substrat kompleks maka pada waktu fermentasi mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 sebelum menggunakan substrat tersebut secara maksimal untuk produksi  $H_2$ , bakteri tersebut telah mencapai fase kematian. Sedangkan pada limbah biodiesel yang dipurifikasi masih lebih rendah dari gliserol murni karena substrat tersebut masih belum murni benar sehingga kemungkinan masih ada kandungan selain gliserol yang dapat menghambat produksi  $H_2$ . Pada tabel tersebut juga terlihat produksi  $H_2$  oleh mutan ganda *E. aerogenes* AD-H43 lebih tinggi karena terjadi perubahan jalur metabolisme akibat mutasi dengan EMS sehingga memproduksi asam laktat lebih rendah. Penurunan produksi tersebut diduga karena adanya perubahan basa pada gen pengkode laktat dehidrogenase, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (Said, 2007).

### KESIMPULAN

*Enterobacter aerogenes* AD-H43 memiliki spesifik rods yang besar dari *wild typenya* hal ini mengakibatkan waktu untuk melakukan proses metabolisme lebih cepat dari *Enterobacter aerogenes* AY-2. Produksi  $H_2$  dalam substrat limbah biodiesel tidak dipurifikasi dan limbah

biodiesel yang dipurifikasi menggunakan mutan ganda *Enterobacter aerogenes* AD-H43 pada skala fermentor BSTR terjadi peningkatan kapasitas  $H_2$  dengan diikuti penurunan produksi asam laktat.

### DAFTAR PUSTAKA

- Fairbank, D.J & W.R Andersen. 1999. *Genetic; the continuity of life*. Wadsworth Publishing Company, London.
- Harley, J. P. 2005. *Laboratory exercise in microbiology*. 6th ed. McGraw Hill Companies, Inc. , New York.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis & E.G. Sa, id. 1990. *Teknologi fermentasi*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Meuth, M & J.E. Arrand. 1982. Alteration of gene structure in Ethyl Methane Sulfonate- induced mutants of mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1459-1462
- Mishina, Y., E.M. Duguid & Chuan He. 2006. *Direct reversal of alkylolation damage*. Januari: 18 hlm  
<http://he-group.uchicago.edu/chem%20Review.pdf>, 25 juli 2006
- McKanne, I. & J. Kandel. 1996. *Microbiology: Essentials & application*. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw Hill Companies, Inc. , New York.
- Miller, T.L. & M.J. Wolin. 1974. *A serum bottle modification of the hungate technique for cultivating obligate anaerobes*. *Applied Microbiology* 27(5): 985--987.
- Nakashimada, Y., M.A. Rachman, T. Kakizono & N. Nishio. 2002. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox state. *Int. J. Energy*. 27 : 1399-1405.

- Ngan, M. A., S. Tanisho, M. Marimoto & S. Yoshino. 2004. *Development of conversion technology of biomass into bioenergy*. Maret 2004. [http://www.nedo.go.jp/english/archives/170117/pdf/H-02Y\\_E.pdf](http://www.nedo.go.jp/english/archives/170117/pdf/H-02Y_E.pdf). 20 Mei 2005.
- Ngundiwaluyo, S. dan Amos . 1996. Hidrogen sebagai alternative energi. *Majalah BPPT*.65 (5): 134-138.
- Nishio, N. & Y. Nakashimada. 2004. High rate production of hydrogen/methane from various substrat and waste. *Advanced Biochemical Engineering Biotechnology*. 90: 63--87.
- Rachman, M.A. 2001. Hubungan antara pH kultur dan aktivitas hidrogenase pada produksi  $H_2$  mutan *Enterobacter aerogenes*. *Jurnal Hayati* 8(1): 15-17.
- Rachman M.A., Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio. 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. of Ferm. And Bioeng.* 83: 358-363.
- Said, A., 2007. *Perlakuan Ethyl Methane Sulfonate(EMS) pada Enterobacter aerogenes untuk Peningkatan Produksi Gas Hidrogen ( $H_2$ )*.Skripsi. Departemen Biologi FMIPA UI, Depok.
- Sang-Eun Oh, S. Van Ginkel &B.E. Logan. 2003. *Relativeness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production* . *Enviromental Science & Tecnology*
- Singleton, P. & D. Sainsbury .1981. *Introduction to bacteria*. John Wiley & sons, Chichester.
- Sardjoko. 1991. *Bioteknologi: latar belakang dan beberapa penerapannya*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Twyman, R.M. 1998. *Advanced molecular biology: A concise reference*. Bioscientific Publisher, New York.