

## Konversi Gliserol menjadi Polihidroksibutirat dengan Menggunakan Bakteri *Eschericia coli*

Endah Fitriani Rahayu<sup>1✉</sup>, Wega Trisunaryanti<sup>2</sup>, dan Karna Wijaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

<sup>2</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada Kampus Sekip Utara BLS 21 Bulaksumur Yogyakarta

### Info Artikel

Diterima : September 2017

Disetujui : Oktober 2017

Dipublikasikan : November 2017

#### Keywords:

*Eschericia coli*  
fermentation  
glycerol  
polyhydroxybutyrate

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang konversi gliserol menjadi polihidroksibutirat (PHB) dengan menggunakan bakteri *Eschericia coli*. Bakteri ini dibiakkan dengan menggunakan kultur media yang terdiri dari 1% laktosa, pepton, dan NaCl, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang dihasilkan kemudian ditambahkan kedalam media gliserol 10, 20, 30, 40, dan 50 g/L kemudian difermentasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam, dilanjutkan sentrifugasi dan fase padatan dikeringkan dan ditimbang sebagai biomassa. Filtrat dianalisis kadar gliserol sisa. PHB diekstraksi dari biomassa dengan menggunakan kloroform, kemudian dianalisis dengan menggunakan FT-IR, H-NMR, C-NMR, dan viscometer. Unit monomer dari polimer diperoleh dengan cara esterifikasi polimer kemudian dianalisis dengan GC. Hasil analisis FT-IR, NMR, dan kromatografi gas menunjukkan bahwa PHB dapat disintesis dengan menggunakan gliserol dan bakteri *Eschericia coli*. PHB yang dihasilkan semakin tinggi dengan bertambahnya waktu fermentasi dan konsentrasi awal gliserol, dengan prosentase PHB tertinggi sebesar 92,73%. Berat molekul PHB optimum pada konsentrasi gliserol 40 g/L selama 96 jam. Pada konsentrasi gliserol 50 g/L, berat molekul PHB mengalami penurunan.

### Abstract

Conversion of glycerol into polyhydroxybutyrate (PHB) using *Eschericia coli* bacteria had been evaluated. The bacteria was cultured in lactose medium, consist of 1% of lactose, peptone, and NaCl, then incubated at 37°C for 24 h. The bacteria culture was then added into the 10, 20, 30, 40, and 50 g/L glycerol media and then fermented for 24, 48, 72, and 96 h, then followed by centrifugated and solid phase was dried and weighed as a biomass. The filtrate was analyzed to determine the remaining glycerol. PHB was extracted from the biomass using chloroform, and then analyzed by FT-IR, H-NMR, C-NMR and viscometer. Monomer unit of the polymer was produced by esterification of the polymer then analyzed by GC. Analysis generates that FT-IR, H-NMR, C-NMR, and GC shows the PHB can be synthesize from glycerol using *Eschericia coli*. PHB production is increasing if the time fermentation and initial glycerol concentration has been risen, with the maximum PHB produced is 92.73%. Molecular weight of PHB has maximum value if produced at initial glycerol concentration 40 g/L for 96 h. in the initial glycerol concentration 50 g/L, the molecular weight of PHB was reduced.

© 2017 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:  
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229  
E-mail: [endahfitrianiarahayu@yahoo.com](mailto:endahfitrianiarahayu@yahoo.com)

## Pendahuluan

Polihidroksibutirat merupakan kelompok senyawa polihidroksialkanoat rantai pendek yang memiliki sifat dan karakter termoplastik (Chee *et al.*, 2010). Poliester ini juga resisten terhadap kelembaban dan memiliki permeabilitas oksigen yang rendah (Atifah *et al.*, 2007). Polimer ini menunjukkan kelompok senyawa dengan karakter fisikokimia yang mirip dengan polipropilen, akan tetapi polimer ini lebih ramah lingkungan dan dapat didegradasi secara menyeluruh di alam.

Polihidroksibutirat dapat disintesis menggunakan berbagai bakteri dan sumber karbon. Beberapa sumber karbon yang dapat digunakan sebagai substrat dalam pembuatan polihidroksibutirat yaitu meliputi glukosa (Amarilla *et al.*, 2001), asam oleat (Djamaan *et al.*, 2003), dan gliserol (Ashby *et al.*, 2011). Meskipun sumber karbon tersebut dapat digunakan untuk mensintesis polihidroksibutirat dalam skala laboratorium, namun biaya yang dibutuhkan untuk memproduksi dalam skala besar masih relatif mahal. Biaya untuk pembelian substrat dalam proses fermentasi dapat mencapai 50% dari total biaya produksi.

Diantara beberapa sumber karbon, gliserol merupakan sumber potensial yang dapat digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi untuk menghasilkan polihidroksibutirat. Gliserol merupakan hasil samping industri biodiesel yang kelimpahannya relatif besar mencapai 10% dari berat total biodiesel yang dihasilkan. Produksi biodiesel dunia antara tahun 1998 hingga 2002 meningkat dari 0,2 juta menjadi 33 juta gallon per tahun (Ashby *et al.*, 2004). Peningkatan produksi biodiesel berpengaruh pada kelimpahan gliserol di dunia.

Penelitian terdahulu telah dilakukan oleh Nakas *et al.* (2009). Penelitian tersebut berhasil memanfaatkan gliserol untuk mensintesis polihidroksibutirat dengan menggunakan bakteri *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. Polihidroksibutirat yang dihasilkan dalam penelitian tersebut mencapai 81,9% dari total biomassa selama 96 jam. Serupa dengan penelitian tersebut, Ashby *et al.* (2004) melakukan penelitian mengenai sintesis polihidroksibutirat dengan menggunakan *Pseudomonas oleovorans* dengan 0,3% dari berat biomassa yang dihasilkan. Alternatif lain yang dilakukan yaitu peruses fermentasi dengan menggunakan *Escherichia coli* dan gliserol sebagai sumber karbonnya.

## Metode

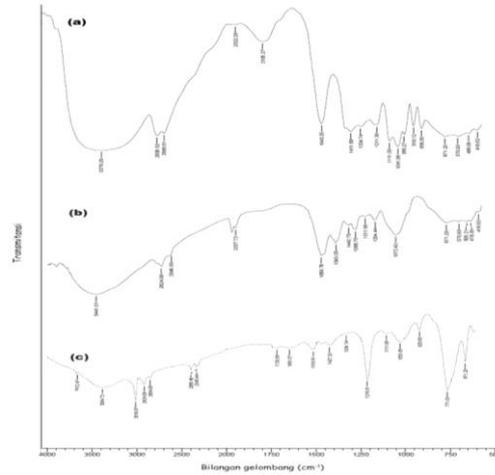
Sebanyak 10 mL medium dengan komposisi 1% laktosa, 1% pepton, 1% NaCl ditempatkan dalam labu erlenmeyer. Tambahkan 0,5 mL bakteri dari kultur stok. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Bakteri yang telah dibiakkan kemudian akan digunakan untuk sintesis PHB. Medium dibuat dengan membuat larutan gliserol 10 g/L kemudian dimasukkan ke dalam empat labu erlenmeyer masing-masing 200 mL. Ke dalam labu erlenmeyer tersebut kemudian ditambahkan 2 mL bakteri *Escherichia coli*, kemudian tutup dengan kapas dan bungkus dengan kertas. Campuran ini diinkubasi pada 37°C. Media bakteri yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi 3000 g selama 10 menit untuk memisahkan padatan seluler bakteri. Cuci padatan yang dihasilkan dengan aquades kemudian di sentrifugasi kembali dengan 3000 g selama 10 menit. Padatan kemudian di pisahkan dan di keringkan. Media sisa setelah proses sentrifugasi dianalisis kadar gliserol dengan metode titrasi iodometri berdasarkan prosedur yang telah dilakukan sebelumnya (Indofood).

Karakterisasi terhadap polihidroksibutirat yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan FT-IR dan NMR. Unit monomer dianalisis dengan menggunakan GC terhadap hasil esterifikasi polimer. Sebanyak 15 mg sel kering dicampurkan dengan 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/methanol (15:85) dan 2 mL kloroform, reaksi dilakukan pada 100°C selama 140 menit untuk menghasilkan monomer metil ester. Campuran ini didinginkan pada temperatur kamar dan tambahkan 2 mL kloroform kemudian kocok dalam corong pisah. Kedalamnya ditambahkan 1 mL aquades dan larutan dikocok selama 1 menit. Fasa organik yang dihasilkan dipisahkan. Analisis terhadap berat molekul dilakukan dengan menggunakan metode viskositas. Sebanyak 1 gram PHA dimasukkan kedalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan kloroform hingga menghasilkan larutan PHA 100 mL. Viskositas dari larutan ini diukur dengan menggunakan viskometer.

## Hasil dan Pembahasan

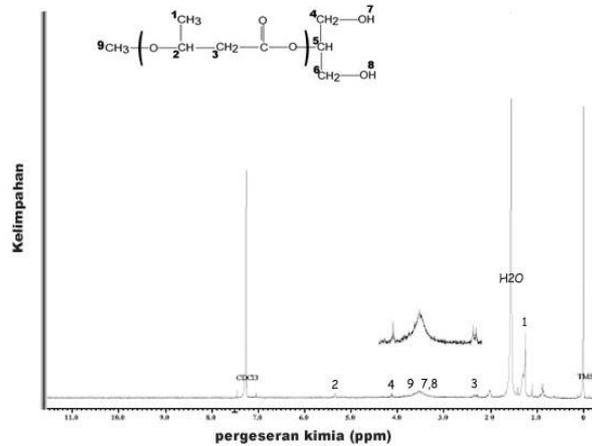
Spektrum gliserol menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 3379,29 cm<sup>-1</sup> yang merupakan vibrasi *stretching* O-H. *Stretching* C-H ditunjukkan oleh bilangan gelombang 2939,52 cm<sup>-1</sup> dan *bending* C-H muncul pada 1200-1300 cm<sup>-1</sup>. Gugus C-O pada gliserol mengalami vibrasi *stretching* pada bilangan gelombang 1000-1100 cm<sup>-1</sup>. Dari spektrum FT-IR polimer yang disintesis, ternyata masih terdapat vibrasi *stretching* O-H di bilangan gelombang 3441,01 cm<sup>-1</sup>. Vibrasi O-H dalam polihidroksibutirat mungkin disebabkan oleh gugus ujung polimer yang mengandung ikatan tersebut. Selain vibrasi OH, terdapat pula vibrasi C-H pada 2924,09 cm<sup>-1</sup>, vibrasi C=O pada bilangan gelombang 1658,78 cm<sup>-1</sup> dan C-O pada panjang gelombang 1072,42 cm<sup>-1</sup> yang merupakan ciri khas dari vibrasi gugus asam karboksilat dan ester. Hasil tersebut menunjukkan bahwa gliserol telah berubah menjadi senyawa lain. Berdasarkan analisis FT-IR yang

dihasilkan oleh Davis *et al* (2009), polimer yang dihasilkan dalam penelitian ini merupakan homopolimer polihidroksibutirat. Spektrum FT-IR yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 1.

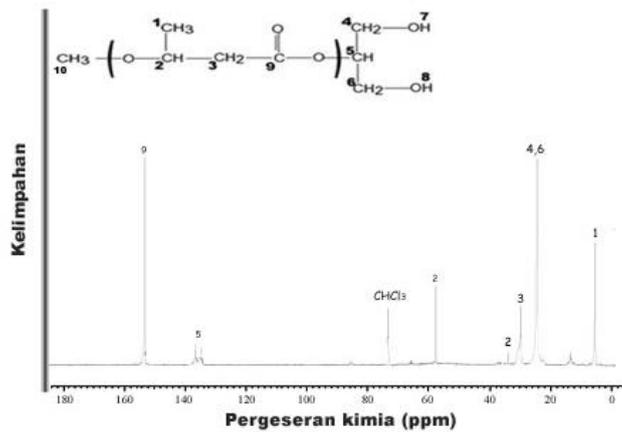


**Gambar 1.** Spektrum FT-IR gliserol (a), polimer yang dihasilkan (b), dan hasil esterifikasi polimer (c)

Analisis NMR terhadap larutan polimer dilakukan dengan menggunakan gelombang radio 500 MHz yang mana spektrum proton NMR (H-NMR) ditunjukkan pada Gambar 2 sedangkan karbon NMR (C-NMR) ditunjukkan pada Gambar 3.

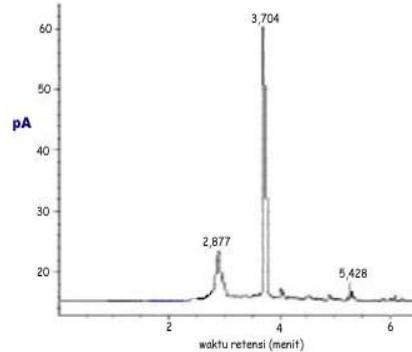


**Gambar 2.** Spektrum H-NMR polimer yang disintesis



**Gambar 3.** Spektrum C-NMR polimer yang disintesis

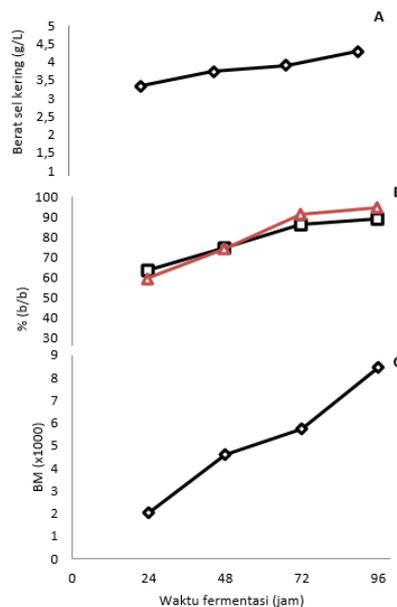
Setelah dilakukan analisis terhadap spektrum H-NMR yang dihasilkan, dapat diramalkan bahwa puncak yang muncul menunjukkan struktur molekul seperti pada gambar. Atom C1 menunjukkan puncak pada geseran 1,2 ppm, C2 pada geseran 5,3 ppm, C3 pada geseran 2,3 ppm. Puncak-puncak tersebut menunjukkan struktur dasar dari polihidroksi butirat (PHB). Puncak yang lain muncul pada geseran 4,1 ppm untuk C4 dan C6, geseran 3,5 ppm untuk C7 dan C8, geseran 3,6 ppm untuk C9. Dari hasil tersebut dapat diramalkan bahwa polimer yang dihasilkan memiliki gugus ujung metoksi dan gliserol. Spektrum C-NMR menunjukkan hasil yang mendukung. Spektrum hasil analisis karbon NMR juga menunjukkan spektrum yang memperlihatkan struktur molekul seperti pada gambar. Geseran puncak muncul pada 6,8 ppm untuk C1; 13,2 ppm untuk C10; 25,1 ppm untuk C4 dan C6; 30,3 ppm dan 57,4 ppm untuk C3 dan C2; 137,8 ppm untuk C5; dan 156,2 ppm untuk C9. Dari hasil analisis dapat diramalkan bahwa polimer yang dihasilkan adalah polihidroksibutirat. Hasil analisis dengan menggunakan kromatografi gas ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Kromatogram polihidroksibutirat (PHB)

Pada konsentrasi awal gliserol 10 g/L dan waktu fermentasi 96 jam produk esterifikasi polihidroksibutirat mempunyai waktu retensi 3,704 menit, sedangkan waktu retensi standar metil 3-hidroksi butirat yang dihasilkan adalah 3,708 menit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa monomer dalam polimer yang disintesis adalah asam 3-hidroksi butirat.

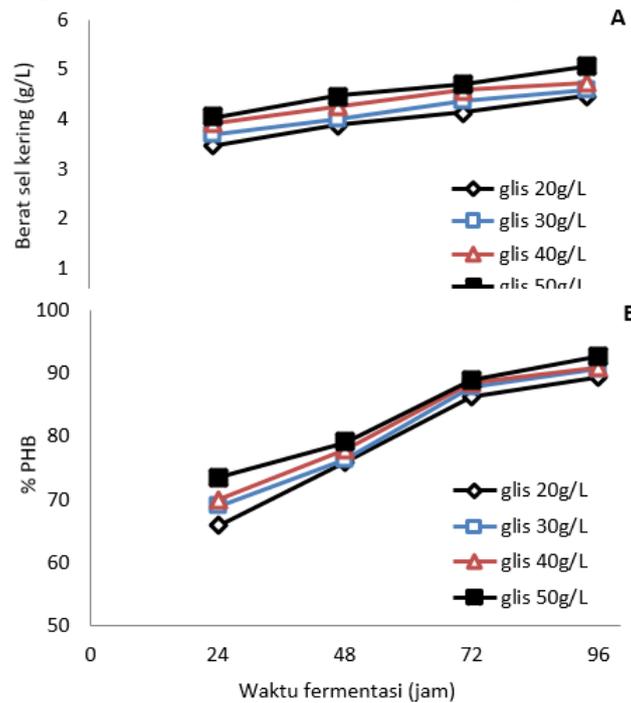
Gambar 5 menunjukkan grafik pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi PHB, dengan konsentrasi awal gliserol dalam media 10 g/L. Grafik 5 A menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka semakin banyak pula sel kering yang dihasilkan begitu pula dengan prosentase PHB yang dihasilkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5 B.



**Gambar 5.** Pengaruh waktu fermentasi terhadap terhadap berat sel kering (A), PHB dan gliserol terkonversi (B), dan berat molekul polimer (C) dengan konsentrasi awal gliserol 10 g/L

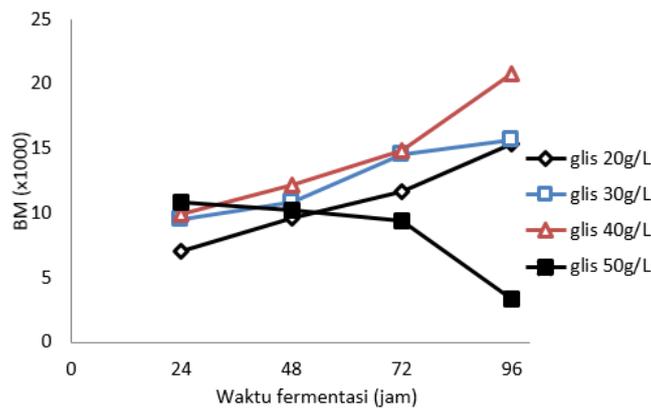
Prosentase gliserol terkonversi semakin besar pula sesuai dengan peningkatan yang terjadi pada prosentase polihidroksibutirat yang dihasilkan. Pada waktu fermentasi 48 jam, sebanyak 74,8% polihidroksibutirat yang dihasilkan. Namun, gliserol yang terkonversi sebesar 74,0% setelah 48 jam fermentasi. Disisi lain, pada waktu fermentasi 72 jam sebesar 86,0% polihidroksibutirat yang dihasilkan dan gliserol terkonversi sebesar 91,2%. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi gliserol bukan merupakan satu-satunya faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan sintesis polihidroksibutirat dalam sel bakteri *Escherichia coli*.

Grafik 5 C memperlihatkan pengaruh waktu fermentasi terhadap berat molekul polihidroksibutirat. Hasil menunjukkan berat molekul polihidroksibutirat mengalami kenaikan yang signifikan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi PHB dengan beberapa konsentrasi awal gliserol ditunjukkan pada Gambar 6. Dari gambar tersebut diketahui bahwa walaupun konsentrasi gliserol diubah dengan sedemikian rupa, namun hasil polihidroksibutirat yang diperoleh menunjukkan pola yang mirip satu dengan yang lain. Berat sel kering dan PHB yang dihasilkan semakin besar dengan bertambahnya waktu. Berat sel kering dan PHB tertinggi diperoleh pada waktu 96 jam dan konsentrasi awal gliserol 50 g/L dimana dihasilkan 5,06 g/L sel kering dan 92,73% PHB.



**Gambar 6.** Pengaruh waktu fermentasi terhadap (A) berat sel kering dan (B) %PHB pada beberapa konsentrasi awal gliserol

Hasil yang menarik dalam penelitian ini yaitu pada pengaruh waktu terhadap berat molekul polimer yang dihasilkan dengan konsentrasi awal gliserol 50 g/L seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.

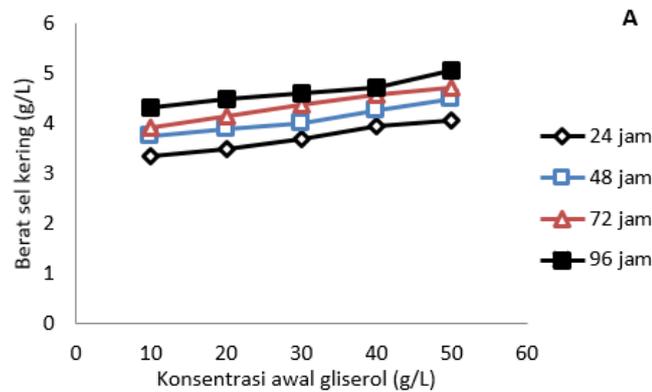


**Gambar 7.** Pengaruh waktu terhadap berat molekul polimer pada beberapa konsentrasi awal gliserol

Grafik 7 yang diperoleh menunjukkan perubahan yang cukup signifikan pada konsentrasi awal gliserol 50 g/L. Seiring dengan bertambahnya waktu, dengan konsentrasi awal gliserol tersebut mengakibatkan berat molekul polihidroksibutirat yang dihasilkan menurun secara drastis, walaupun prosentase polihidroksibutirat yang diperoleh semakin tinggi. Hal ini terjadi karena sel bakteri *Escherichia coli* mengalami stress dan mengalami penurunan aktivitas enzim dalam pembentukan polihidroksibutirat.

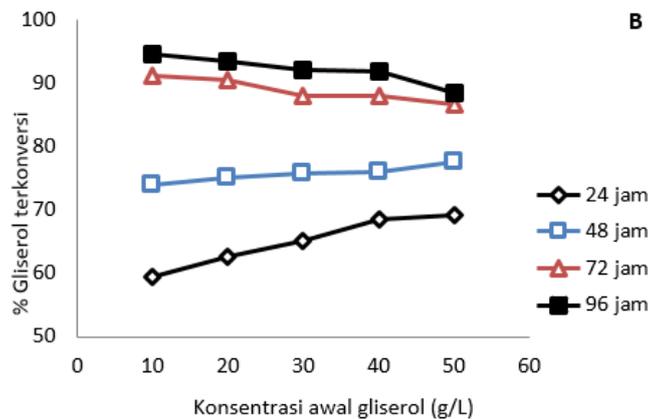
Hasil yang diperoleh untuk mengetahui pengaruh konsentrasi awal gliserol disajikan pada Gambar 8. Dari grafik pada Gambar 8 A diketahui bahwa berat sel kering semakin besar seiring dengan besarnya konsentrasi gliserol yang ditambahkan kedalam media. Hal ini berkaitan dengan semakin besarnya kelimpahan gliserol yang dapat digunakan oleh bakteri *Escherichia coli* untuk tumbuh.

Pada Gambar 8 B data prosentase gliserol terkonversi menunjukkan hasil yang unik. Pada waktu fermentasi 72 jam dan 96 jam, jumlah gliserol terkonversi semakin kecil seiring dengan bertambahnya konsentrasi awal gliserol dalam media. Hal ini terjadi akibat stress yang dialami oleh bakteri *Escherichia coli* dengan bertambahnya konsentrasi gliserol yang memiliki berat jenis yang besar.



**Gambar 8.** Pengaruh konsentrasi awal gliserol terhadap berat sel kering (A), gliserol terkonversi (B), dan %PHB (C)

Semakin besar konsentrasi awal gliserol sebagai sumber karbon dalam media menunjukkan prosentase polihidroksibutirat yang semakin besar pula. Fenomena yang terjadi dalam penelitian ini yaitu pada berat molekul polimer yang dihasilkan dengan variasi konsentrasi awal gliserol seperti ditunjukkan pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Pengaruh konsentrasi awal gliserol terhadap berat molekul PHB

### Simpulan

Gliserol dapat dikonversi menjadi Polihidroksibutirat (PHB). Presentase PHB semakin tinggi dengan semakin tingginya waktu fermentasi dan konsentrasi gliserol dengan presentase PHB tertinggi sebesar 92,73%. Berat molekul PHB optimum pada konsentrasi gliserol 40 g/L selama 96 jam.

### Daftar Pustaka

Amarilla, F., Fernandes, E.G., Mata, D., Quagliano, J.C., Miyazaki, S.S. 2001. Effect of Simple and Complex Carbon Sources, Low Temperature Culture and Complex Carbon Feeding Policies on Poly-

- 3-hydroxybutyric Acid (PHB) Content and Molecular Weight (Mw) from *Azotobacter chroococcum* 6B. *World J. Microbiol. Technol.*, 17: 9-14
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Foglia, T.A. 2004. Bacterial Poly(Hydroxyalkanoate) Polymer Production from Biodiesel Co-product Stream. *J. Polym. Env.*, 12(3): July 2004
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Strahan, G.D. 2011. Efficient Utilization of Crude Glycerol as Fermentation Substrate in the Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) Biopolimer. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, DOI 10.1007/s11746-011-1755-6
- Atifah, N., Fauzi, A.M., Hartoto, L., Suryani, A., Syamsu, K. 2007. Pemanfaatan Hidrolisat Pati Sagu sebagai Sumber Karbon Untuk Memproduksi Bioplastik Polihidroksi Alkanoat (PHA) oleh *Ralstonia eutropha* pada Sistem Kultivasi Fed Batch. *J. Sains dan Teknologi Indonesia*, 9(1): 17-21
- Chee, J.Y., Yoga, S.S., Lau, N.S., Ling, S.C., Abed, R.M.M., Sudesh, K. 2010. *Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoates (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics*. Current Research, Technology, and Education Topics in Applied Microbiology and Microbiol Biotechnology
- Djamaan, A., Majid, M.I.A., Noor, M.A.M. 2003. Fed-Batch Fermentation on Production of Biodegradable Plastic Poly(3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid. *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(1): 256-264
- Nakas, J.P., Zhu, C., Nomura, C.T., Perotta, J.A., Stipanovic, A.J. 2009. Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Biodiesel-Glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *J. Biotechnol. Prog.*, 26(2)