

- Hume, I. D. 1982 Digestion and Protein Metabolism Pada *Manual in Nutrition and Growth*. Published by AUIDP and AAUCS, 39.
- Maria-Astuti. 1981. Rancangan Percobaan dan Analisa Statistik. Bagian II (Randomized Complete Block Designs, Repeated Measurement and Split-plot Designs). Bagian Pemuliaan Ternak Fakultas Peternakan UGM.
- Martoatmodjo, R. S., I. Hamid dan Soemartono. 1983. *Gamal Pohon Serba Guna*. Balai Pustaka. Jakarta.
- Nourusis, M. J. 1984. SPSS/PC. for the IBM PC/XT Original SPSS, Inc. Illinois
- NRC 1978. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. *Nutrient Requirements of domestic Animals*. 5th Revised ed. NAS. Washington DC.
- Utomo, R. 1987. Pendugaan Total Nutrien Tercerna dan Energi Tercerna Bahan Pakan Berdasarkan Bahan Organik yang Tercerna. Laporan Penelitian. 05187. Fak. Peternakan Univ. Gadjah Mada.
- Van Soest. P. J. 1982 *Nutritional Ecology of the Rument*. Published and Distributed by : O and Books Inc. Corvallis Oregon, USA.

KINETIKA FERMENTASI D-GLUKOSA OLEH *BACILLUS MACERANS* :
1. ANALISIS ENSIM DALAM PROSES PEMBENTUKAN
ASETAT, ASETON DAN ETANOL

Zaenal Bachrudin *)

INTISARI

Penelitian ini merupakan bagian dari proses perubahan selulose menjadi beberapa senyawa yang mempunyai nilai tambah atas jasa mikroorganisme. Proses ini sering disebut sebagai proses gabungan antara proses sakarifikasi dan proses fermentasi.

Bacillus macerans termasuk fakultatif anaerob bakteri, mampu tumbuh pada beberapa macam substrat, termasuk amilum, hemiselulose, glukose, dan xylose.

Pada pH medium 6.0, fermentasi glukose oleh *B. macerans* ditandai dengan dua fase; fase *acidogenic* dan fase *solventogenic*. Perubahan fase tersebut diikuti dengan perubahan pada skala ensimatik. Enzim pembentuk asam asetat mempunyai aktivitas tinggi pada fase pertama, sedangkan enzim pembentuk aseton dan etanol aktif pada fase kedua. Pada pH medium 7.0, proses fermentasi d-glukose oleh *B.macerans* ditandai dengan produksi sel yang mempunyai aktivitas enzim pembentuk asam asetat pada level yang tinggi.

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat diambil kesimpulan bahwa, enzim *thiolase* merupakan enzim yang penting dalam pengaturan proses pembentukan aseton oleh bakteri *B.macerans*.

*) Staf pengajar pada Lab. Biokimia dan Nutrisi Fakultas Peternakan UGM

(Kata kunci : Kinetika fermentasi, D-Glukose, *Bacillus macerans*. Ensim, Asetat, Aseton, Etanol).

**THE KINETIC FERMENTATION OF
D-GLUCOSE BY *BACILLUS MACERANS*:
1. LEVEL OF ENZYMES INVOLVED IN
ACETATE, ACETONE AND ETHANOL
FORMATION**

ABSTRACT

This study was a part of the direct bioconversion of cellulose to microbial products is often called a simultaneous saccharification and fermentation.

Bacillus macerans is a facultative anaerob. it grows on a wide variety of carbohydrates, including starch, hemicellulose, glucose, and xylose.

The fermentation of d-glucose by *B.macerans* at pH 6.0, was characterized by two distinct metabolic phase: acidogenic phase and solventogenic phase. The shift in metabolic activity when cells switch from acidogenic to solventogenic has been shown to be accompanied by a corresponding shift in the activity of the enzymes associated with acid and solvent

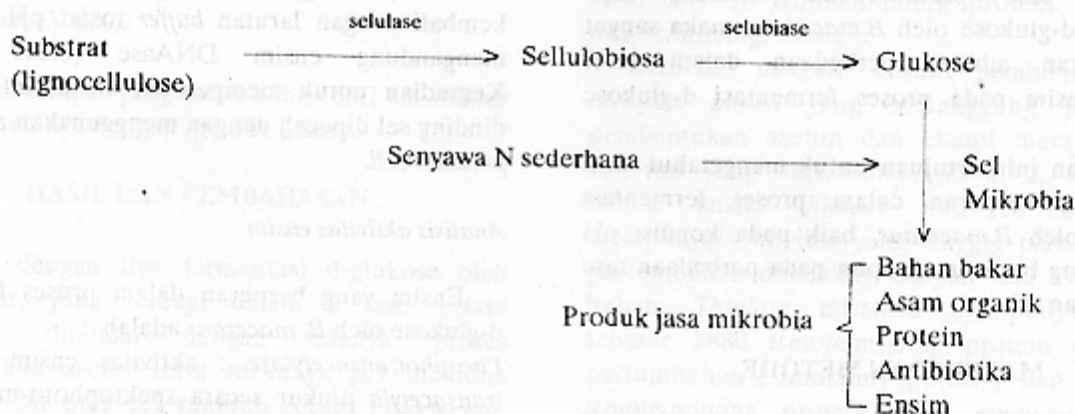
producing pathways. However, the fermentation of d-glucose by *B.macerans* at pH 7.0 was characterized that the level enzymes involved in acetate formation have been shown at high activity.

The finding together with the data obtained from fermentation indicate that *thiolase* may be the key enzyme in the regulation of solventogenesis in this organism.

(Key Words : Cellulose, Biocon version, Fermentation, *B.macerans*, Asetate, Asetone, and Ethanol).

PENDAHULUAN

Banyak usaha telah dilakukan untuk memanfaatkan bahan limbah yang kaya akan selulose sebagai bahan pakan ternak atau sebagai sumber gizi (substrat) dalam proses fermentasi yang mampu menghasilkan produk yang mempunyai nilai tambah, misalnya, asam amino, vitamin, asam organik, dan larutan solven (aseton, dan etanol) (Asenjo *et al.*, 1991). Salah satunya adalah proses secara simultan antara proses ensimatik dan proses biologik, seperti terlihat pada gambar 1.



Gambar 1: Proses perubahan lignocellulosic menjadi beberapa produk secara simultan antara reaksi ensimatik dan reaksi biologik (Asenjo *et al.*, 1991.)

Dalam proses hidrolisis selulose dan hemiselulose, yang merupakan komponen utama limbah pertanian, akan menghasilkan beberapa campuran gula, misalnya d-glukose dan xylose sebagai produk utama (Lynch, 1987).

B.macerans, salah satu fakultatif bakteri anaerob yang mampu mengubah d-glukose menjadi senyawa asetat, aseton dan etanol melalui proses glikolisis dan heterofermentasi. Adapun tipe fermentasi d-glukose oleh *B.macerans* ditandai adanya dua fase: fase pertama merupakan fase pembentukan asam, dengan diikuti oleh turunnya pH serta sel tumbuh secara exponential. Fase kedua disebut fase pembentukan solven, terjadi kenaikan pH, karena sebagian asetat diubah menjadi aseton. Karena ketersediaan bahan dalam medium terbatas serta adanya produk yang bersifat toksik, maka sel akan mengalami pertumbuhan yang tetap, yang akhirnya akan berhenti (Weimer, 1985; Schepers *et al.*, 1986).

Disamping fase pertumbuhan mempengaruhi produk yang dihasilkan, ternyata pH medium juga mempengaruhi tipe produk yang dihasilkan dari proses fermentasi d-glukose oleh *B.macerans*. Pada pH 6,0, akhir dari proses fermentasinya ditandai dengan pertumbuhan sel yang mampu menghasilkan solven, sedangkan pada pH 7,0, asam asetat merupakan produk utama dari proses fermentasi d-glukose.

Sebagai konsekuensi dari pengaruh pH serta perbedaan fase pertumbuhan terhadap tipe fermentasi d-glukose oleh *B.macerans*, maka sangat dimungkinkan adanya perbedaan dalam level aktivitas enzim pada proses fermentasi d-glukose tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui level enzim yang berperan dalam proses fermentasi d-glukose oleh *B.macerans*, baik pada kondisi pH medium yang berbeda maupun pada perbedaan fase pertumbuhan sel.

MATERI DAN METODE

Mikroorganisme dan kondisi kultur

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus macerans* NCTC. 1068,

fakultatif bakteri. Medium yang digunakan mempunyai komposisi sebagai berikut : dalam satu liter, K_2HPO_4 , 30 g; NH_4CL , 2,50 g; $MgSO_4$, 0,20 g; Glukose, 50,0 g; *yeast extract* 2,0 g; dan larutan mineral 10 ml (Lovitt *et al.*, 1987).

Penyediaan sel

Sel yang digunakan untuk analisis aktifitas enzim diperoleh dari *batch* fermentasi oleh *B.macerans* yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung 5,0% (w/v) glukose dan 0,2% (w/v) *yeast extract*. Sampel sel yang diambil selain dari *batch* kultur dengan perbedaan fase pertumbuhan (fase *exponential* dan fase *stationary*) juga dari *batch* kultur dengan perbedaan pH medium, pada pH 6,0 dan pH 7,0.

Persiapan larutan enzim

Kira-kira sebanyak satu liter sel sebagai hasil fermentasi d-glukose oleh *B.macerans*, dipusingkan dengan sentrifuge pada suhu rendah, dengan kecepatan 15.000 g selama 15 menit. Endapan yang berbentuk kemudian dicuci dengan 0,1 M fosfat *buffer* pH 7,40. Sebelum sel dalam bentuk pelet disimpan pada suhu rendah (-4°C), larutan sel dipusingkan kembali dengan kecepatan serta lama pemusingan yang sama.

Sebanyak 10 gram sel yang telah beku diencerkan kembali dengan larutan *buffer* fosfat pH 7,4, yang mengandung enzim DNAase (0,245 mg/ml). Kemudian untuk memperoleh enzim intrasellular, dinding sel dipecah dengan menggunakan alat *french pressure cell*.

Analisis aktivitas enzim

Enzim yang berperan dalam proses fermentasi d-glukose oleh *B. macerans* adalah :

Phosphotransacetylase : aktivitas enzim *phosphotransacetylase* diukur secara spektrofotometer pada suhu 25°C, dengan mengukur kadar *Coensim-A* yang dibebaskan karena adanya penambahan *Acetyl co-A* sebagai substrat (Andersch *et al.*, 1983).

Coensim-A transferase : pengukuran enzim *coensim A transferase* ditentukan dengan pengukuran tidak

langsung. *Acetyl co-A* yang terbentuk akan mengalami proses pembebasan *Co-A* dengan adanya enzim *phosphotrasacetylase* dan arsenat. *Co-A* yang dibebaskan akan ditentukan dengan DTNB (5.5'-*dithiobis (2-nitro-benzoic acid)* (Andersch *et al.*, 1983). *Acetatekinase* : aktivitas enzim *acetatekinase* ditentukan dengan mengukur kecepatan terbentuknya senyawa ADP karena adanya *pyruvatekinase* dan *lactatdehidrogenase* (Andersch *et al.*, 1983).

Thiolase : enzim *thiolase* ditentukan berdasarkan reaksi thiolitik dimana *acetoacetyl co-A* sebagai substrat. Aktivitas enzim tersebut diukur dengan memonitor penurunan *Co-A* pada panjang gelombang 303 nm (Showkowski dan Hatrmanis., 1984).

Glyceral dehyde-3-phosphodehidrogenase : metode yang dilakukan untuk analisis enzim tersebut didasarkan metode yang dilakukan oleh Lovitt *et al.*, 1988).

Hidrogenase : pengukuran enzim *hidrogenase* dilakukan pada kondisi anaerob. Aktivitas enzim tersebut dilakukan dengan memonitor reaksi reduksi dari *methyl viologen*.

Pyruvat dehidrogenase : penentuan enzim *pyruvate dehidrogenase* pada dasarnya sama dengan pengukuran enzim *hidrogenase*.

Acetaldehyde reductase dan *ethanol dehidrogenase* : metode pengukuran kedua enzim tersebut menggunakan metode yang dilakukan oleh Lovitt *et al.*, 1988).

Analisis kadar protein

Protein sampel yang telah bebas dari sel diukur kadar proteinnnya dengan metode Lowry.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sesuai dengan tipe fermentasi d-glukose oleh *B.macerans*, yang terbagi dalam 2 fase : fase *acidogenic* ditandai dengan adanya proses pembentukan asetat serta turunnya pH medium. Pada fase ini pula sel tumbuh secara *exponential*. Fase yang kedua adalah fase *solventogenic*. Pada fase ini sel memanfaatkan sisa glukose yang tersedia, serta senyawa asetat yang terbentuk untuk disintesis menjadi aseton dan etanol.

Hasil dari proses fermentasi secara *batch* kultur, menunjukkan bahwa pH medium sangat berhubungan dengan produk yang dihasilkan. *Batch* fermentasi pada pH 6,0 akan menunjukkan bahwa sel mampu memproduksi aseton pada kadar yang lebih tinggi dibandingkan pada pH 7,0. Pada pH 7,0 tipe proses fermentasi d-glukose ditandai dengan produksi asetat pada konsentrasi yang tinggi.

Dengan dasar hal tersebut diatas, maka secara garis besar enzim yang berperan dalam proses fermentasi d-glukose oleh *B.macerans* dibagi menjadi 3 kelompok : i) enzim yang berperan dalam proses glikolisis, ii) enzim yang memproduksi asam asetat, iii) enzim yang mampu menghasilkan aseton dan etanol.

A. Aktivitas enzim karena perbedaan fase pertumbuhan sel

Dari hasil analisis aktivitas enzim karena perbedaan fase pertumbuhan (fase *exponential* dan fase *stationary*) menunjukkan bahwa enzim *acetatekinase* dan *phosphotransacetylase* pada fase pertumbuhan awal mempunyai aktivitas yang tinggi daripada fase akhir pertumbuhan. Aktivitas enzim *phosphotransacetylase* terjadi penurunan kira-kira sebesar 50% dari 540 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein pada awal pertumbuhan menjadi 250 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein pada akhir pertumbuhan, sedangkan *asetatekinase* aktivitasnya menurun hanya sebesar 20% dari 52 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein menjadi 43 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$, Tabel 1.

Berbeda dengan enzim pembentuk asetat, ternyata enzim yang bertanggung jawab pada pembentukan aseton dan etanol mempunyai tipe aktivitas yang berlawanan. Tabel 2, menunjukkan bahwa enzim *thiolase* dan *co-A transferase* mempunyai aktivitas yang tinggi pada fase akhir pertumbuhan dibanding dengan fase awal pertumbuhan. *Thiolase* misalnya mempunyai aktivitas sebesar 2880 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein pada akhir pertumbuhan (*stationary growth*), dan hanya 1120 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein pada *exponential growth*. Begitu juga terjadi pada enzim *aceto acetyl co-A transferase* secara berturut-turut mempunyai aktivitas sebesar 180 dan 50 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein pada akhir dan awal pertumbuhan.

KESIMPULAN

Seperti yang diharapkan dari penelitian ini, bahwa bila terjadi perubahan aktivitas metabolisme dari proses fermentasi d-glukose oleh *B.macerans* dari fase *acidogenic* menjadi *solventogenic* dengan ditunjukkan dari produk yang dihasilkan, ternyata dari data yang diperoleh, perubahan tersebut diikuti dengan perubahan aktivitas enzim yang berhubungan dengan proses pembentukan asam dan pembentukan solven.

Dari penelitian ini pula dapat disimpulkan bahwa besarnya aktivitas enzim yang mengkatalisis proses pembentukan asam dan solven merupakan fungsi baik dari fase pertumbuhan sel maupun pH medium.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderesch, W., H. Bahl, and G. Gatschalk. 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:327-332.
- Asenjo, L. A., W.H.Sun, and J. L. Spencer. 1991. Optimization of batch processes involving simultaneous enzymatic and microbial reactions. *Biotechnol. Bioeng* 37:1087-1094
- Hartmanis, M. G. N., and S. Gatenbeck. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum* : levels of enzymes involve in the formation of acetate and butyrate. *Appl. Environ Microbiol* 47:1277-1283
- Lovitt, R. W., D. B. Kell, and J. G. Morris. 1987. The physiology of *Clostridium sporogenes* NCTB 8053 growing in defined media. *J. Appl. Bacteriol* 62:81-92.
- Lovitt, R. W., G. J. Shen, and J. G. Zeikus. 1988. Ethanol production by thermophilic bacteria : Biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydro-sulfuricum*. *J. Bacteriol* 170(6):2809-2815.
- Lynch, J. M. 1987. Utilization of lignocellulosic waste *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 715-835.
- Schepers, H. J., S. B. Meyer, and H. Sahn. 1986. Fermentation of D-xylose to ethanol by *Bacillus macerans*. *Z. Naturforsch.* 42C: 401-407.
- Shiokowski, M. X., and M. G. M. Hartmanis, 1984. Simultaneous single-step purification of thiolase and NADP-dependent 3-hydroxybutyryl-co A dehydrogenase from *Clostridiumkhuyveri*. *Anal Biochem.* 141 : 344-347.
- Weimer, P. J. 1984. Control of product formation during glucose fermentation by *Bacillus macerans*. *J. Gen. Microbiol.* 130 : 103-111