

PENGARUH JENIS BIOKATALISATOR *ASCOMYCOTA* PADA PROSES PEMBUATAN ASAM ITAKONAT DARI SUBSTRAT GLISEROL MODIFIKASI

Marlinda¹⁾, Ramli¹⁾, Doni Damara²⁾

¹⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Samarinda

²⁾Mahasiswa Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Samarinda

ABSTRACT

Biodiesel production will produce a side reaction in the form of glycerol. The use of glycerol by using it as a substrate in the fermentation process of itaconic acid production because glycerol still has alcohol sugar. The purpose of the study was to determine the effect of *aspergillus terreus* and *aspergillus niger* biocatalysis from the time of fermentation on the concentration of itaconic acid produced. The variables used were fermentation time 3,6,9,12 and 15 days and the types of microorganisms used were *aspergillus terreus* and *aspergillus niger*. Modified 300 ml glycerol substrate was put into a fermenter containing 500 ml of NPK nutrient and 25 ml of *ascomycota* starter with a liquid flow rate of 0.4 L/min. Fermentation results are filtered and purified by rotary evaporator. The best research results at 9 days fermentation for *aspergillus terreus* with glucose yield of 4,9% and concentration of itaconic acid 73.28 g/L while *Aspergillus niger* was the best condition at 12 days with glucose levels of 6,4% and concentration itaconic acid is about 45,52 g/L.

Keywords: *itaconic acid, aspergillus terreus, aspergillus niger, modified glycerol*

1. PENDAHULUAN

Dewasa ini pemerintah semakin gencar mengembangkan energi terbarukan, salah satunya biodiesel. Menurut data yang di rilis Kementerian ESDM, produksi biodiesel semakin meningkat pertahunnya. Data terakhir yaitu per tanggal 11 Agustus 2013 menunjukkan, produksi biodiesel di indonesia mencapai 954 ribu KL (ESDM, 2013). Gliserol hasil samping biodiesel (GHB) umumnya mengandung komposisi yang bervariasi. Tergantung dari jenis katalis yang digunakan untuk memproduksi biodiesel (Farobie,2009). Namun pada umumnya, gliserol hasil samping pembuatan biodiesel mengandung komposisi 30% gliserol, 50% metanol, 13% sabun, 2% air, serta sekitar 2–3% garam (biasanya sodium atau potassium) dan 2–3% lainnya adalah pengotor (Azis, 2008). GHB memiliki kadar gula alkohol (metanol & gliserol) yang terkandung di dalamnya cukup besar, membuat gliserol merupakan bahan baku yang baik dalam proses fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalisator. Umumnya diperlukan proses pemurnian terlebih dahulu agar gliserol hasil samping biodiesel bisa digunakan sebagai bahan baku atau substrat untuk dapat meningkatkan nilai ekonomis dari GHB.

Permasalahan lingkungan dalam pengolahan biodiesel sehingga GHB digunakan sebagai sarana dalam peningkatan nilai ekonomisnya dalam pembentukan produk yang lebih bermanfaat. Akan tetapi GHB mempunyai beberapa kekurangan sebagai hasil samping biodiesel adalah kandungan gula yang ada didalamnya dalam bentuk gula alkohol (metanol dan gliserol) sehingga akan membuat substrat GHB tidak terlalu cukup memadai untuk kebutuhan nutrisi dan media tumbuh mikroorganisme untuk produksi asam itakonat. Perbaikan kualitas GHB atau modifikasi GHB sebagai salah satu cara dalam memperbaiki kinerja GHB sebagai substrat sehingga akan dapat meningkatkan produksi asam itakonat. Proses pembuatan asam itakonat dapat dipengaruhi juga oleh faktor dari mikroorganisme yang digunakan. Perubahan substrat glukosa menjadi asam itakonat dilakukan oleh jamur *ascomycota*, proses biokatalisis yang lebih cepat dari jenis *ascomycota* dalam pembuatan asam itakonat baik dari lama waktu dan dari hasil asam itakonat yang dihasilkan (As.ad, 2008).

Asam Itakonat atau *methylene butanedioic acid, methylene succinic acid, 3-carboxy-3-butanoic acid, propylenedicarboxylite acid* adalah salah satu jenis asam organik yang dapat dengan mudah digabungkan untuk membentuk polimer dan dapat digunakan untuk menggantikan monomer berbasis petroleum dengan yang alami. Asam itakonat memiliki 5 atom karbon, serta memiliki 2 gugus karboksilat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jenis biokatalisator *ascomycota* pada proses pembuatan asam itakonat dari substrat gliserol modifikasi. Jenis *Ascomycota* yang digunakan adalah

¹ Korespondensi penulis: Marlinda, Telp 081350208807, lin_syam@yahoo.co.id

aspergillus tereus dan aspergillus niger. Sedangkan modifikasi gliserol dilakukan untuk penyediaan nutrisi makro bagi mikroorganisme sehingga dapat meningkatkan proses fermentasi.

Urgensi penelitian ini bagi negara adalah membantu menanggulangi limbah organik berupa gliserol hasil samping biodiesel (GHB) dan memberikan alternatif substitusi bahan sintetik dan polimer sehingga akan mengurangi dampak pencemaran lingkungan. Sedangkan manfaat bagi ilmu pengetahuan adalah dapat memberikan kontribusi bagi penerapan teknologi bioproses untuk mendukung kebijakan pengembangan substitusi bahan baku alternatif pengganti polimer yang lebih ramah lingkungan serta menghasilkan pemanfaatan limbah menjadi alternatif produk polimer dan resin yang lebih ramah lingkungan.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Doni, 2016, dalam pembuatan asam itakonat dengan substrat gliserol menjadi asam itakonat dengan substrat GHB tanpa pemurnian dan GHB telah dimurnikan, dan menunjukkan bahwa GHB yang dimurnikan lebih baik untuk pembuatan asam itakonat. Penelitian yang lain tentang asam itakonat telah banyak dilakukan dengan bahan yang lain seperti ampas minyak jarak, laktosa dan glukosa (El Imam, 2017 dan Long Stan, 2007).

Pembuatan asam itakonat dengan metode fermentasi oleh *Aspergillus Terreus* dengan bahan baku gliserol telah dilakukan oleh Jarry (1995) dengan variasi jenis dan konsentrasi substrat serta lama fermentasi. Diperoleh kondisi terbaik dalam pembentukan asam itakonat dengan konsentrasi tertinggi yaitu sebesar 57,15 g/L dengan menggunakan campuran substrat gliserol konsentrasi 50 g/L dicampur dengan substrat sukrosa konsentrasi 50 g/L dan pada lama fermentasi selama 161 jam. M.I Juy dkk (2010) juga pernah melakukan fermentasi asam itakonat dengan variabel variasi jenis substrat, konsentrasi substrat, dan konsentrasi bahan tambahan. Didapatkan kondisi terbaik yang menghasilkan asam itakonat dengan konsentrasi tertinggi adalah dengan menggunakan substrat gliserol konsentrasi 105 g/L dan konsentrasi NH_4NO_3 sebesar 6,5 g/L serta KH_2PO_4 sebesar 0,9 g/L.

Penelitian ini merupakan penelitian awal yang akan mengembangkan beberapa teknik modifikasi bahan baku berupa gliserol dan mencari biokatalisator yang lebih efisien dalam proses fermentasi asam itakonat. Begitu juga dengan teknik pembiakan *ascomycota* dalam bentuk media cair sehingga pengembangbiakan *ascomycota* jenis *aspergillus tereus* dan *aspergillus niger* dapat bekerja dengan baik dalam transfer massa nutrisi dan oksigen sehingga dapat mengkatalisis dengan baik sehingga fungsi sebagai biokatalis dalam menghasilkan metabolit yang lebih banyak dan produktif. Dengan begitu akan didapatkan pengembangan biokatalisis dalam peningkatan kapasitas produksi *Aspergillus tereus* dan *Aspergillus niger* sehingga dapat dikembangkan dalam dimensi proses dan metode pengembangan lebih lanjut.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah fermentor kapasitas 1,5 L yang dilengkapi dengan control pH dan suhu, *rotary evaporator*, oven, gelas kimia, erlenmeyer, buret, *magnetic stirrer*, pipet volume, pipet ukur, labu ukur, spatula dan kaca arloji. Bahan yang digunakan adalah gliserol hasil samping biodiesel 36%, glukosa 150 g/L, *aspergillus tereus*, *aspergillus niger*, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, aquades, MgO dan CuNO_3 .

Prosedur Penelitian

Gliserol sebelum dilakukan fermentasi terlebih dahulu dipretreatment dengan cara mencampurkan gliserol (GHB) 36% dengan Glukosa 15% dengan perbandingan (2:1) hingga volume substrat 300 ml. kemudian membuat nutrisi dengan cara memasukkan 1,2 g NH_4NO_3 , 0,3 g MgSO_4 , 0,3 MgO, 0,315 g CaOH, 0,05 g KH_2PO_4 , 0,380 g CuNO_3 kedalam gelas kimia dan menambahkan aquadest hingga mencapai 1 L kemudian menyesuaikan pH larutan hingga mencapai 2,8 - 3 dengan menambahkan larutan asam nitrat. Proses fermentasi dilakukan dengan memasukkan substrat gliserol modifikasi sebanyak 300 ml, nutrisi sebanyak 500 ml dan mikroorganisme *ascomycota* 25 ml dimasukkan ke dalam fermentor dengan waktu fermentasi (3,6,9,12 dan 15 hari). Hasil fermentasi kemudian disaring dengan corong, filtrate dari hasil saringan dilakukan pemurnian dengan *rotary evaporator* sedangkan residu hasil saringan dikeringkan di dalam oven pada suhu 110°C . Hasil bawah *rotary evaporator* berupa asam itakonat kemudian hasil atas berupa asam organik yang lain.

Prosedur Analisa

Konsentrasi asam itakonat ditentukan dengan menggunakan metode HPLC Varian 450. Dilengkapi dengan pompa, detector UV dan detector fluoresensi. Panjang detector 210 nm. Analisa glukosa menggunakan metode Luff Scroll.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Gliserol yang telah dipreparasi dicampur dengan glukosa 15% dan difermentasi dengan *fermentor* variasi waktu fermentasi (3, 6, 9, 12 dan 15 hari). Asam itakonat yang telah didapat dianalisa kadar asam itakonat dengan menggunakan HPLC, kadar glukosa dan rendemen asam untuk biokatalisator *aspergillus* Tereus dan *aspergillus niger* seperti ditunjukkan pada tabel 3.1 dan 3.2 berikut:

Tabel 1. Data Proses Pembuatan Asam Itakonat Dengan Biokatalisator *Aspergillus Tereus*

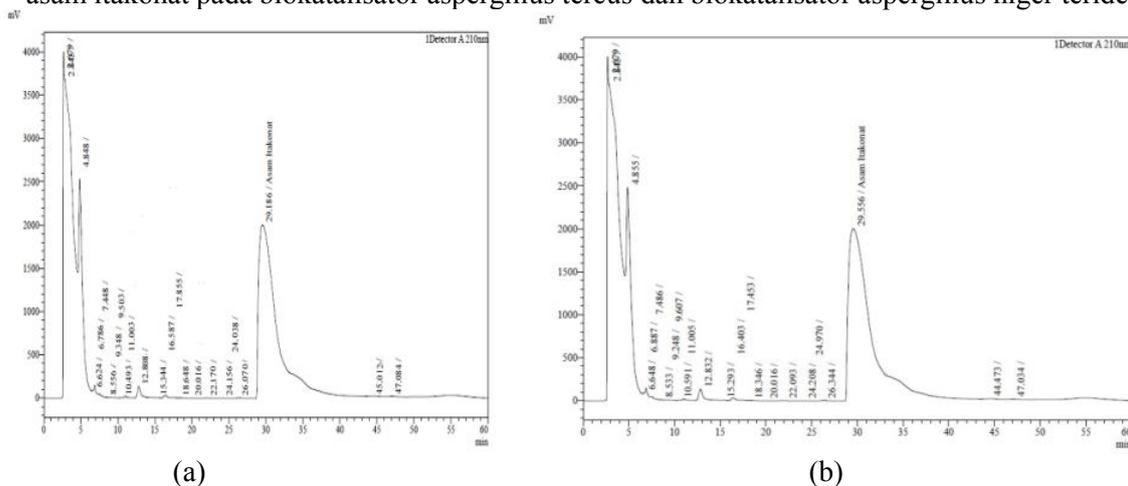
Waktu Fermentasi (hari)	pH	Konsentrasi Glukosa (g/L)	Konsentrasi Asam Itakonat (g/L)	Yield Asam Itakonat (%)
0	4.5	23	0	0
3	3.5	11.5	24.13	31.3
6	3.0	10.3	46.27	39.0
9	2.0	4.9	73.28	68.7
12	2.0	4.2	66.51	44.2
15	2.5	4.5	59.87	30.2

Tabel 2. Data Proses Pembuatan Asam Itakonat Dengan Biokatalisator *Aspergillus Niger*

Waktu Fermentasi (hari)	pH	Kadar Glukosa (%)	Konsentrasi Asam Itakonat (g/L)	Yield Asam Itakonat (%)
0	4.5	23	0	0
3	4.0	14.7	25.36	20.3
6	3.5	11.7	33.42	28.6
9	3.0	8.5	38.35	32.8
12	2.5	6.4	45.52	47.9
15	2.5	6.0	40.89	36.8

Data HPLC Asam Itakonat

Asam itakonat yang dihasilkan dari hasil penelitian kemudian diuji HPLC dengan detector 210 nm, asam itakonat terdapat ada luas area 29.186 sesuai dengan standar asam itakonat. Data HPLC asam itakonat pada biokatalisator *aspergillus* tereus dan biokatalisator *aspergillus niger* teridentifikasi.



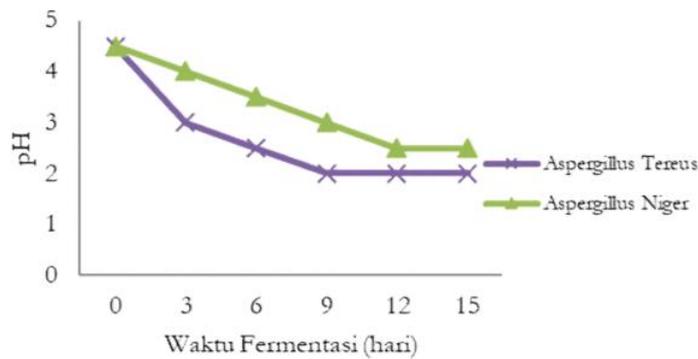
Gambar 1. Gambar Spektrum Asam Itakonat Pada Biokatalisator (a) *Aspergillus Tereus* (b) *Aspergillus Niger*

Pada Gambar 3.1 terlihat terdapatnya asam itakonat pada puncak asam itakonat pada waktu retensi sekita 25-30 menit pada kedua biokatalisator yang digunakan hanya saja luas area masing-masing biokatalisator berbeda. Dengan teridentifikasi adanya asam itakonat berarti proses fermentasi gliserol

modifikasi dapat menghasilkan asam itakonat atau pemanfaatan gliserol sebagai hasil samping dapat digunakan untuk produksi bahan lain.

Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap pH

Faktor lingkungan dalam proses fermentasi mempengaruhi proses pertumbuhan mikroorganismenya. pH merupakan salah satu indikator *ascomycota* menunjukkan proses metabolisme sel. Mikroorganismenya memiliki mekanisme untuk mempertahankan pH intraseluler pada nilai relatif konstan, meskipun pH bervariasi dalam lingkungan eksternal. Ketika pH berbeda dari nilai optimal, akan ada peningkatan kebutuhan energi pemeliharaan. PH optimum medium sering mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk dengan mempengaruhi penyerapan nutrisi, jalur metabolisme dalam biosintesis asam itakonat dan kegiatan fisiologis lainnya. Diketahui bahwa kurangnya kontrol pH selama proses fermentasi dapat mengakibatkan efek pada produksi asam itakonat dan mungkin menghasilkan asam itakonat lebih sedikit (Meena, 2010). Semakin lama proses fermentasi akan menghasilkan substrat yang dapat menaikkan pH dari pH pertumbuhan sehingga proses metabolisme mikroorganismenya semakin menurun.

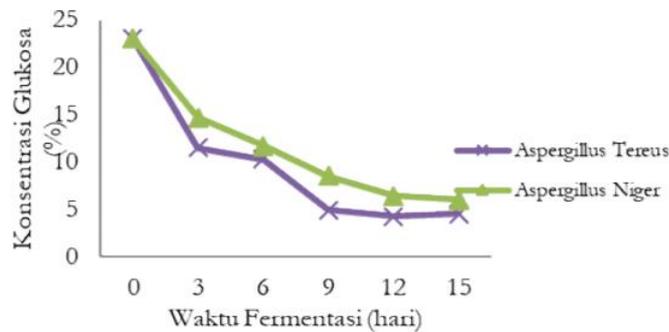


Gambar 2. Grafik Hubungan Waktu Fermentasi Dan pH Pada Ascomycota

Pada *Aspergillus tereus* pH optimum yang dapat dihasilkan lebih cepat tercapai dibandingkan dengan *aspergillus niger* untuk pembuatan asam itakonat.

Pengaruh waktu fermentasi Terhadap Konsentrasi Glukosa

Waktu fermentasi merupakan faktor yang mempengaruhi proses fermentasi. Glukosa merupakan makro nutrisi yang dibutuhkan oleh *aspergillus tereus* dan *aspergillus niger* untuk pertumbuhan sehingga hasil metabolisme berupa enzim dapat dihasilkan dengan baik. Penggunaan glukosa oleh *ascomycota* dalam proses fermentasi akan menghasilkan pengurangan jumlah glukosa. Proses fermentasi yang dilakukan oleh dua biokatalisator mempunyai cara metabolisme yang sama akan tetapi cara kerja *aspergillus niger* lebih lama dibandingkan dengan *aspergillus tereus*. Semakin lama waktu fermentasi untuk kedua biokatalisator dapat menurunkan kadar glukosa pada substrat sehingga dapat dikatakan *aspergillus tereus* dan *aspergillus niger* mengalami perkembangan.



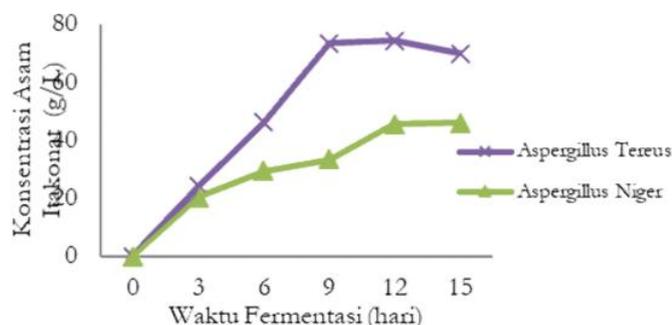
Gambar 3. Grafik Hubungan Waktu Fermentasi Dan Konsentrasi Glukosa Pada Ascomycota

Reaksi pembentukan asam itakonat dimulai dari substrat (bahan baku) dalam hal ini gliserol modifikasi, molekul karbonnya diproses melalui tahap glikolisis menjadi piruvat. Pada saat proses glikolisis yaitu proses pemecahan substrat menjadi asam piruvat, pada saat menggunakan substrat glukosa, satu glukosa bisa dipecah menjadi dua asam piruvat dan kemudian melanjutkan proses hingga menjadi asam itakonat (Bentley and Thiessen, 1957). Tahap glikolisis pada *aspergillus tereus* mampu menghasilkan asam piruvat

yang lebih cepat dan menghasilkan dua molekul asam piruvat sedangkan *aspergillus niger* tahap glikolisisnya lambat.

Pengaruh waktu fermentasi Terhadap Konsentrasi Asam Itakonat

Proses fermentasi *aspergillus tereus* dan *aspergillus niger* dalam biosintesis asam itakonat dapat terjadi di intraseluler dan ekstraseluler. Asam itakonat merupakan asam lanjutan yang dihasilkan oleh mikroorganisme *aspergillus tereus* dan *aspergillus niger*. Aktivitas metabolisme sel dalam pertumbuhan sel akan mempengaruhi hasil produksi asam itakonat.



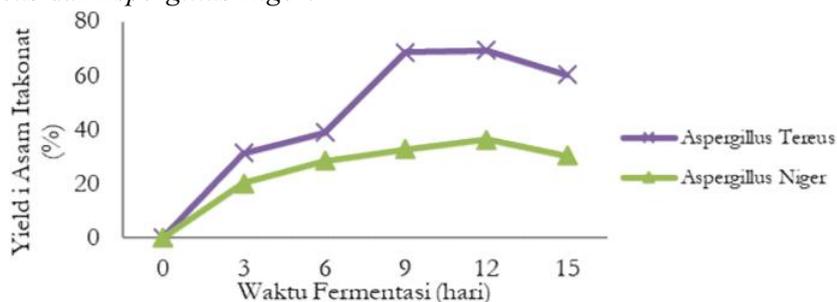
Gambar 4. Grafik Hubungan Waktu Fermentasi Dan Konsentrasi Asam Itakonat

Pengaruh waktu fermentasi dan jenis mikroorganisme berupa *Aspergillus Tereus* dan *Aspergillus Niger* terhadap konsentrasi asam itakonat dapat memberikan pengaruh yang cukup besar. Semakin lama waktu fermentasi akan memberikan efek peningkatan konsentrasi asam itakonat dengan menggunakan biokatalisator *Aspergillus Tereus* dan *Aspergillus Niger*.

Pembentukan asam itakonat untuk substrat gliserol modifikasi pada waktu fermentasi yang semakin lama akan memberikan hasil yang semakin tinggi untuk semua jenis biokatalisator. Untuk mikroorganisme *Aspergillus Tereus* akan menghasilkan asam itakonat yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Aspergillus Niger*. Hal ini dapat disebabkan karena pada *Aspergillus Tereus* metabolisme sel dalam glikolisis asam piruvat cepat dan perubahan enzim *cis aconitate* masuk ke dalam sel dan di urai menjadi enzim *cis aconitate decarboxylase* (CAD) dan di tahap inilah terjadi reaksi karboksilase melepas gugus (-COOH) terlepas menjadi CO₂ hingga terbentuk asam itakonat (Jarry an Seruady, 1995). Terhambatnya pembentukan asam itakonat pada *Aspergillus niger* ini membuat hasil asam itakonat menjadi berkurang dan membutuhkan waktu yang lebih lama karena perubahan enzim *cis aconitate* menjadi enzim *cis aconitate decarboxylase* (CAD) lambat dan sangat kecil yang bisa di transfer keluar sel melalui dinding sel pada *Aspergillus Niger* dibandingkan dengan *Aspergillus Tereus*. Sehingga pembentukan asam itakonat untuk *Aspergillus Niger* lebih kecil yang bisa dihasilkan dan membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan *Aspergillus Tereus* seiring dengan naiknya pH dan penggunaan substrat oleh mikroorganisme yang sedikit sehingga sisa glukosa dalam substrat semakin tinggi. Katalisis *Aspergillus Tereus* lebih cepat dibandingkan dengan *Aspergillus Niger* dalam menghasilkan metabolit lanjutan berupa asam itakonat. *Aspergillus Niger* mempunyai kemampuan katalisis yang lebih baik untuk metabolit primer berupa asam piruvat dan asam sitrat sedangkan untuk metabolit sekunder agak terhambat pada perubahan enzim *cis aconitate decarboxylase* (CAD).

Pengaruh Waktu fermentasi Terhadap Konsentrasi Yield Asam Itakonat

Pengaruh waktu fermentasi terhadap pembentukan asam itakonat untuk biokatalisator ascomycota mengalami peningkatan. akan tetapi pada hari ke 15 telah mengalami penurunan baik biokatalisator *Aspergillus Tereus* dan *Aspergillus Niger*.



Gambar 5 Grafik Hubungan Waktu Fermentasi Dan Yield Asam Itakonat

Penurunan yield pada hari ke 15 untuk biokatalisator *Aspergillus Tereus* dan *Aspergillus Niger* dapat diakibatkan karena persediaan glukosa yang ada di dalam substrat mulai berkurang sehingga hasil metabolisme mikroorganismepun semakin berkurang sehingga hasil asam itakonat semakin menurun. Perhitungan yield asam itakonat dihitung setelah pemurnian asam itakonat melalui proses pemurnian sehingga hasil semakin sedikit karena hasil atasnya yang berupa reaksi samping semakin banyak yang dihasilkan.

4. KESIMPULAN

Kesimpulan ditulis dengan ketentuan sebagai berikut:

- 1) Proses fermentasi asam itakonat dengan menggunakan gliserol modifikasi menunjukkan semakin lama waktu fermentasi akan menghasilkan konsentrasi asam itakonat yang semakin tinggi untuk biokatalisator *Aspergillus Tereus* 73.28 g/L untuk waktu fermentasi optimum 9 hari dan untuk *Aspergillus Niger* konsentrasi asam itakonat yang dihasilkan sebesar 45.52 g/L untuk waktu fermentasi optimum 12 hari .
- 2) Proses Katalisis metabolit *Aspergillus Tereus* lebih cepat sehingga menghasilkan *yield* asam itakonat sebesar 68,7% dibanding *Aspergillus Niger* dengan *yield* asam itakonat sebesar 36,4%.
- 3) Mikroorganisme *Ascomycota* jenis *Aspergillus Tereus* dan *Aspergillus Niger* dapat dijadikan biokatalisator pada pembuatan asam itakonat dengan substrat gliserol modifikasi.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Asad-ur-Rehman, Saman WRG, Nomura N, Sato S, Matsumura M. 2008. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1, 3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. J Chem Technol biotechnol. 83:1072–1080.
- Azis, Isalmi., et al. 2008. *Pemurnian Gliserol Dari Hasil Samping Pembuatan Biodiesel Menggunakan Bahan Baku Minyak Goreng Bekas*. Jakarta : Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah. Februari 28, 2016.
- Bentley, R., and C. P. Thiessen. 1957. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. J. Biol. Chem. 226:703–720.
- Choirunnisa Lely. 2017. Pengaruh Konsentrasi Strarter dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Fruith Ghurt Kulit Buah Naga, Skripsi UIN Maulana malik Ibrahim.
- EL-Imam ama, Kazeem Mo, Odebisi MB, Mushaffa AO, Abidoye AO. 2013. Production Of itaconic acid from *Jatropha Curcas* seed cake by *aspergillus terreus*. Not Sci Biol.5(1):57.
- Farobie O. 2009. Pemanfaatan Gliserol Hasil Samping Produksi Biodiesel Jarak Pagar sebagai Bahan Penolong Penghancur Semen. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana InstitutPertanian Bogor
- Jarry, A., Seraudie, Y. 1995. Production of itaconic acid by fermentation. US Pat. N° 5.457.040.
- Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral, 2013. Program Percepatan Pemanfaatan Bahan Bakar Nabati. <http://www.esdm.go.id/siaran-pers/55-siaran-pers/6424-program-percepatan-pemanfaatan-bahan-bakar-nabati.html>, diakses pada 23 Desember 2014.
- Lai, Long Shan, Chih-Sheng Hung, Chi-chu-Lo. 2007. Effect of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus Terreus* ATCC 20542. Chaoyang University of Technolog.
- M. I. Juy, J.A. Orejas, M.E. Lucca. 2010. Study of itaconic acid production by *Aspergillus terreus* MJL05 strain with Different Variable.
- Patterson, T.F. & Sutton, D.A. 2005. Advances in the diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *infectious Disease Special Edition*. 7: 1-6.
- Wilke, Th., 2001, "Biotechnical Production of Itaconic Acid", Appl Microbiol Biotechnol

6. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih Kepada Kemenristek Dikti yang telah memberikan Pendanaan Penelitian Produk Terapan 2016-2017 dan Penelitian Strategis Nasional 2017-2018 dan kepada P3M Politeknik Negeri Samarinda yang telah banyak membantu terkait Pelayanan Administrasi dan informasi terkait Penelitian dan Pengabdian Masyarakat.