Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 8, No. 1, 2003, 18 – 25
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 60/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Pengaruh Perbedaan Rasio Karbon-Nitrogen pada Produksi P(3HB) oleh Bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011

Akmal Djamaan, Rustini dan Imam Taufik
Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang

Diterima: 4 Januari 2003, Disetujui: 25 Maret 2003

Abstract

The effect of the difference of mol ratio carbon-nitrogen (C/N) on production of a biodegradable plastic poly (3-hydroxybutyrate), P(3HB) by *Bacillus brevis* FAAC-202011 has been studied. The C/N ratio were used of 5, 10, 15 and 20 by using glucose as carbon source and NH_4Cl as nitrogen source. The fermentation process was conducted through the optimum condition of *Bacillus brevis* FAAC-202011 growth at pH 7, incubation temperature 30°C, and agitation rate of 200 rpm for 60 hours. The characterization of the polymer production was based on cell growth, polymer content, and polymer concentration. Results showed that optimum C/N ratio to produce P(3HB) was 15, with cultivation time was 56 hours, amount of dried cells was 104.4 mg, with polymer content, polymer concentration, and polymer percentage were 0.45 mg, 2.36 mg/100ml, and 2.26 weight % respectively.

Keywords: C/N ratio, biodegradable plastic, poly (3-hydroxybutyrate), glucose, and *Bacillus brevis* FAAC-202011

Pendahuluan

Penggunaan plastik sintetis secara luas di bidang industri dan rumah tangga telah meningkat dengan sangat cepat semenjak 25 tahun terakhir. Keuntungan penggunaan plastik sintetis ini antara lain karena sifatnya yang tahan benturan, kedap air, dan tidak mudah terurai. Kebutuhan akan plastik sintetis yang semakin bertambah, menyebabkan produksinya melebihi 100 juta ton setiap tahunnya (Doi, 1990).

Penggunaan plastik sintetis yang tidak terkontrol ini telah mengakibatkan terjadinya pencemaran lingkungan yang serius. Diperkirakan sebanyak 25 juta ton limbah plastik sintetis telah dibuang ke lingkungan setiap tahunnya (Lee, 1996a). Juga dilaporkan bahwa ribuan ton sampah plastik telah di buang ke laut, sehingga menyebabkan lebih dari satu juta hewan laut mati akibat terjerat oleh komponen plastik yang mengambang (Doi, 1990).

Selain dari masalah pencemaran lingkungan dan kerusakan ekosistem tersebut, bahan mentah pembuatan plastik sintetik yaitu petroleum, merupakan sumber daya alam yang semakin berkurang karena tidak dapat diperbaharui (*non renewable*) sehingga akan cepat habis dan tidak mungkin dipergunakan secara terus menerus dalam jangka waktu yang panjang.

Corresponding author : Telp. 62-751-71682, Fax: 62-751-73118
E-mail : akmal-djamaan@telkom.net

Menyikapi fenomena di atas, berbagai kajian telah dilakukan untuk menghasilkan plastik yang ramah lingkungan, mudah terurai (*biodegradable*) dan dapat dihasilkan dari sumber daya alam yang dapat diperbaharui. Salah satu usaha yang paling banyak mendapat perhatian belakangan ini ialah biosintesis secara fermentasi dengan menggunakan mikro-organisme penghasil biopolimer poli(3-hidroksi butirat), P(3HB) (Lee, 1996b).

Pada tulisan ini dilaporkan pengaruh perbedaan rasio C/N dengan produksi P(3HB) menggunakan glukosa sebagai sumber karbon dan amonium klorida sebagai sumber nitrogen menggunakan bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011. Biopolimer P(3HB) dapat diproduksi oleh *Bacillus brevis* FAAC-202011 pada kondisi yang kurang menguntungkan, seperti kekurangan nitrogen dan sangat berlebihan karbon. Rasio mol C/N menggambarkan tingkat perbandingan mol karbon dan nitrogen dalam produksi P(3HB) dan biopolimer P(3HB) akan dapat diproduksi secara maksimum pada rasio mol C/N yang optimum (Yamane, 1996).

Variasi perbedaan rasio mol C/N dilakukan untuk melihat pengaruhnya terhadap optimasi penghasilan biopolimer P(3HB), dan pada rasio mol C/N berapa *Bacillus brevis* FAAC-202011 dapat menghasilkan P(3HB) dengan kandungan tertinggi di dalam selnya.

Metode Penelitian

Bahan dan Alat:

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Glukosa, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NH_4Cl, $MgSO_4 . 7H_2O$, $FeSO_4 . 7H_2O$, $MnCl_2 . 4H_2O$, $CoSO_4 . 7H_2O$, $CaCl_2 . 2H_2O$, $CuCl_2 . 2H_2O$, $ZnSO_4 . 7H_2O$, asam klorida, reagen *Barthelot*, reagen fenol asam, kloroform, metanol, dan air suling.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *rotary shaker incubator* (Heldolph Unimax 1010), spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu), kromatografi gas (Shimadzu), *sentrifuge*, dan *laminar air flow*.

Mikroorganisma:

Isolat *Bacillus brevis*-202011 diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi-Farmasi, Jurusan Farmasi, Universitas Andalas. Karakteristik dan potensinya dalam menghasilkan P(3HB) ditunjukkan dalam Tabel 1 (Windrasari, 2002).

Kondisi Fermentasi:

Bacillus brevis FAAC-202011 ditumbuhkan dalam medium mineral menggunakan glukosa sebagai sumber karbon dan amonium klorida sebagai sumber nitrogen menggunakan *rotary shaker incubator*. Komposisi medium mineral yang digunakan untuk satu liter air suling sebagai berikut: 3,7 g KH_2PO_4, 5,8 g K_2HPO_4, 0,435 g NH_4Cl, 10 ml $MgSO_4 . 7H_2O$ 1,0 M, dan 1.0 ml larutan mikroelemen. Larutan mikroelemen untuk 1 liter HCl 0,1 N terdiri atas: 2,78 g $FeSO_4 . 7H_2O$, 1,98 g $MnCl_2 . 4H_2O$, 2,81 g $CoSO_4 . 7H_2O$, 1,67 g $CaCl_2 . 2H_2O$, 0,17 g $CuCl_2 . 2H_2O$, dan 0,29 g $ZnSO_4 . 7H_2O$.

Fermentasi dilakukan pada kondisi optimum pertumbuhan bakteri penghasil biopolimer P(3HB), *Bacillus brevis* FAAC-202011 yaitu pada temperatur optimum 30°C, agitasi optimum 200 rpm, selama 60 jam. Setiap periode waktu sampling, yaitu jam ke-12, 18, 20, 22, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 50, 56, dan 60, cuplikan diambil sebanyak 100 ml untuk tiap-tiap rasio mol C/N (Novianti, 2002). Proses pemisahan biomassa dan supernatan dilakukan dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit, biomassa dikeringkan dalam oven suhu 70°C selama 24 jam atau hingga bobot konstan. Analisis yang dilakukan terhadap cuplikan meliputi: kadar nitrogen dan glukosa sisa, berat sel kering, dan kandungan biopolimernya (Akmal, 1999). Bioplastik yang terkandung di dalam sel, diekstrak keluar dengan menggunakan kloroform dan diendapkan dengan penambahan methanol (Akmal, 2002).

Prosedur Analisis

Biopolimer P(3HB) yang terkandung di dalam sel kering ditentukan secara kromatografi gas (Shimadzu) menggunakan kolom *BPX-35* (panjang 30,0 m dan diameter 0,20 mm), detector FID (*Flame Ionization Detector*), gas pembawa nitrogen dan gas pembakar oksigen dan hydrogen (Akmal, 2002). Berat sel kering *Bacillus brevis*-202011 ditentukan secara gravimetri. Kadar nitrogen sisa di dalam medium dilakukan dengan spektrofotometri uv berdasar kaedah reaksi Barthelot (Lee, 1994), sedang kadar glukosa sisa dilakukan juga dengan spektrofotometri uv menggunakan metode kolorimetri fenol asam (Whistler, 1962).

Hasil dan Pembahasan

Pada percobaan terdahulu, telah dilakukan penapisan bakteri penghasil biopolimer P(3HB) dari berbagai sampel air dan tanah di beberapa tempat di Sumatera Barat. Dari hasil yang didapatkan, bakteri yang positif penghasil P(3HB) adalah *Bacillus brevis* FAAC-202011. Karakteristik dari bakteri ini dilakporkan pada Tabel 1. Fermentasi dilakukan pada kondisi optimum pertumbuhannya dan dilakukan variasi rasio mol C/N untuk mendapatkan kandungan P(3HB) yang paling maksimal (Novianti, 2002).

Gambar 1-7 merupakan profil fermentasi P(3HB) oleh bakteri *B. brevis* FAAC-202011. Terlihat bahwa konsentrasi nitrogen sisa pada semua rasio mol C/N habis terkonsumsi (Gambar 1) sedangkan konsentrasi glukosa sisa pada semua rasio mol C/N tidak habis terkonsumsi (Gambar 2). Hal ini terjadi karena nitrogen yang diberikan pada medium dibatasi, sedangkan nitrogen sangat dibutuhkan oleh bakteri untuk sintesis protein yang digunakan untuk pengembanghiakan selnya (Dwidjojo, 1998). Konsentrasi glukosa sisa yang tidak habis pada semua rasio disebabkan karena bakteri mulai memasuki fase kematian pada jam ke-44, sehingga tidak memungkinkan lagi bagi bakteri untuk mengkonsumsi glukosa yang diberikan. Glukosa yang diberikan secara berlebih pada semua rasio, mengakibatkan glukosa ini digunakan untuk memproduksi P(3HB) sebagai cadangan makanan. Pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan lagi, bakteri akan merombak P(3HB) yang ada di dalam sel sebagai sumber makanan untuk mempertahankan kelangsungan hidup bakteri (Schlegel, 1994).

Produksi P(3HB) di dalam sel bakteri sangat dipengaruhi oleh pH. Selama terjadinya fermentasi, pH pada masing-masing rasio terus mengalami perubahan (Gambar 3), seiring dengan berkurangnya glukosa, nitrogen dan semakin meningkatnya metabolit primer dan sekunder dari bakteri. Hal ini disebabkan karena terbentuknya asam karboksilat sebagai hasil sampingan dari fermentasi karena peristiwa

oksidasi. Penurunan pH ini dapat mengakibatkan terjadinya penurunan konsentrasi P(3HB) yang dihasilkan. Untuk menghindari penurunan pH yang cukup berpengaruh, maka digunakan medium dapar fosfat pH 7,0. Bila peristiwa oksidasi ini berjalan terus, maka asam karboksilat yang dihasilkan akan dirombak menjadi gas CO_2, hal inilah yang terlihat sebagai gelembung gas pada peristiwa fermentasi (Judoamidjojo,1992).

Pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan melihat jumlah sel kering bakteri yang terbentuk serta menghubungkannya dengan banyaknya glukosa dan nitrogen yang dikonsumsi dengan melihat profil konsentrasi glukosa dan nitrogen sisa (Gambar 4). Dalam pertumbuhannya, bakteri membutuhkan makro dan mikronutrien yang berasal dari mineral glukosa sebagai sumber karbon dan NH_4Cl sebagai sumber nitrogen yang ditambahkan ke dalam medium fermentasi (Stanbury, 1984).

Sementara itu, jumlah P(3HB) yang tertinggi pada rasio mol C/N 5 yang naik secara signifikan pada jam ke-44 hingga mencapai 0,4675 mg sedangkan jumlah P(3HB) pada rasio mol C/N 15 hampir sebanding dengan rasio mol C/N 5 sebesar 0,4518 mg, tetapi kenaikannya sedikit demi sedikit dimulai dari jam ke-36 hingga 56 (Gambar 5).

Konsentrasi P(3HB) tertinggi pada rasio mol C/N 15 pada waktu sampling jam ke-56 sebesar 2,3586 mg/100ml (Gambar 6). Walaupun jumlah P(3HB) pada rasio ini lebih sedikit bila dibanding pada rasio mol C/N 5, tetapi jumlah biomassa yang dihasilkannya dalam 100 ml sampel jauh lebih tinggi yaitu sebesar 104,4 mg dibanding rasio mol C/N 5 yang hanya 51,1 mg sel kering bakteri. Persentase P(3HB) yang tertinggi pada rasio mol C/N 5 pada waktu sampling jam ke-44 yang meningkat secara nyata hingga 2,3376 % dibanding rasio mol C/N 15 yang hanya 2,2592 % pada waktu sampling jam ke-56 (Gambar 7).

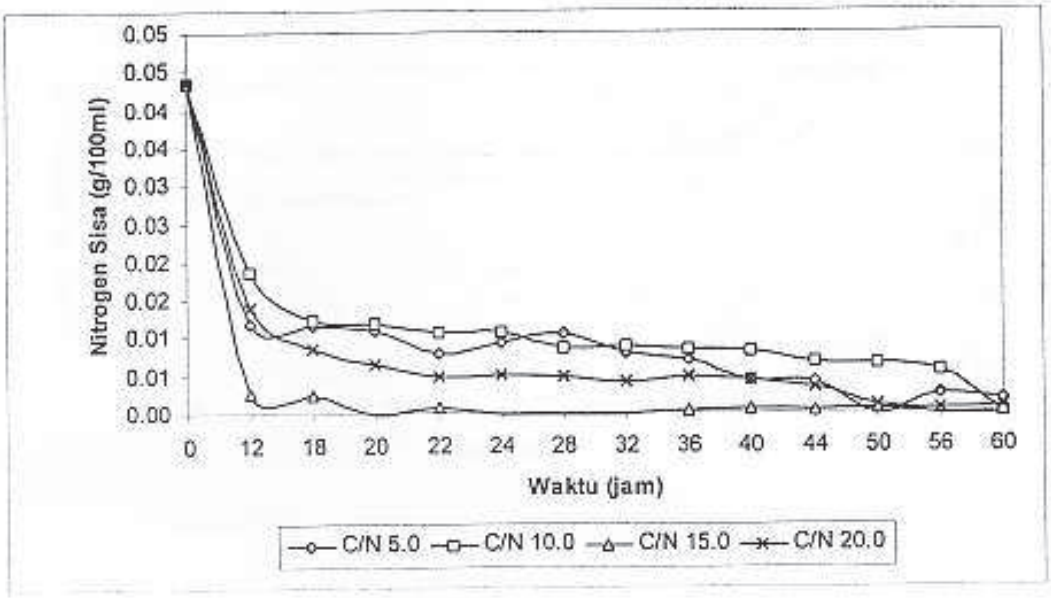
Hal ini berarti bahwa rasio mol C/N 15 merupakan rasio yang paling baik untuk memproduksi P(3HB) dalam skala besar, karena konsentrasi P(3HB) yang dihasilkan paling tinggi. Sedangkan untuk memproduksi P(3HB) yang lebih dipentingkan adalah konsentrasinya di dalam tiap kali sampling daripada kandungan P(3HB) di dalam sel kering bakteri (Akmal, 2002). P(3HB) yang terkandung di dalam sel bakteri, dapat kembali menurun konsentrasinya disebabkan karena kondisi lingkungan yang sudah tidak menguntungkan lagi, sehingga bakteri menggunakan P(3HB) sebagai cadangan makanan untuk dirombak sehingga menghasilkan energi demi mempertahankan kelangsungan hidupnya (Anderson, 1990).

Penelitian ini memiliki prospek yang cerah untuk dilanjutkan ke optimasi penghasilan biopolimer P(3HB) menggunakan limbah tapioka ataupun sumber karbon lain yang lebih murah untuk menghasilkan bioplastik yang lebih murah dan ramah lingkungan.

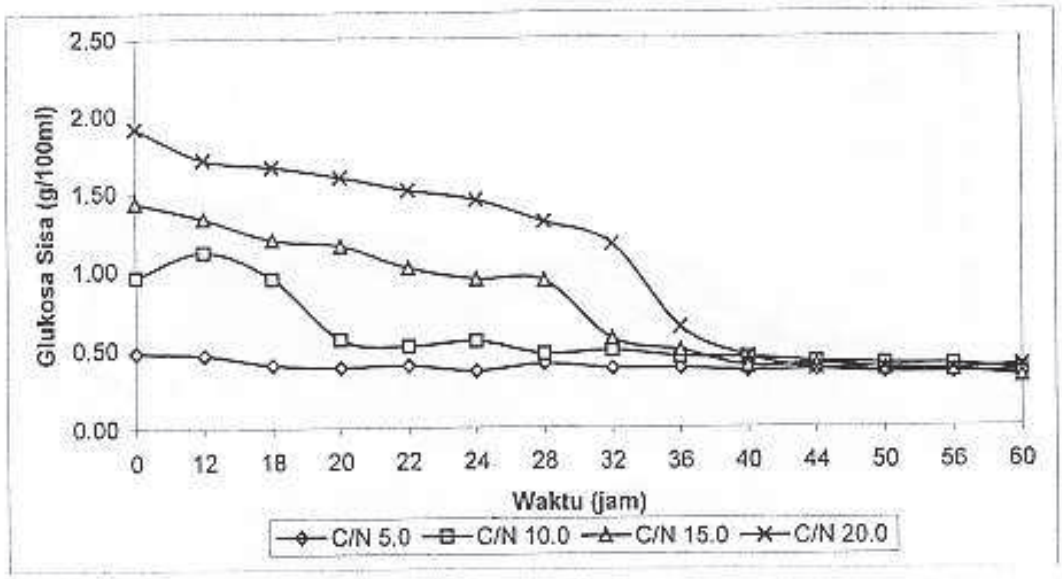
Tabel 1. Karakteristik Bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011 (Windrasari, 2002).

No	Makroskopis	Pengamatan
1	Bentuk	Basil spora
2	Pewarnaan Gram	(+)

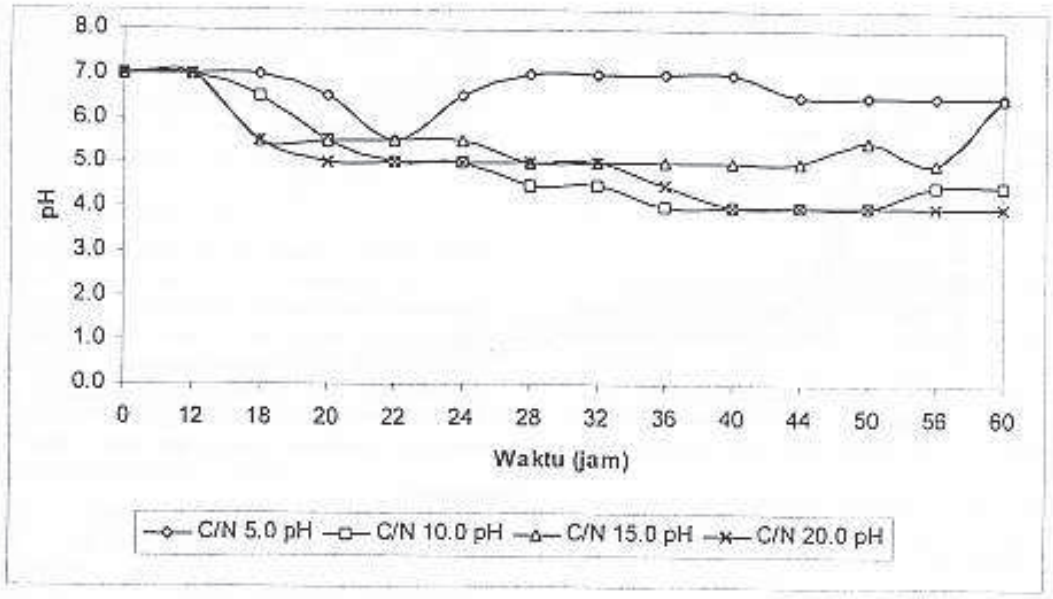
No	Uji Biokimia	Pengamatan
1	H_2S	(-)
2	Gas	(-)
3	Indol	(-)
4	Motility	(+)
5	Laktosa	(-)
6	Glukosa	(+)
7	Sukrosa	(+)
8	Manitol	(-)
9	Methyl red	(-)
10	Voges proskauer	(-)
11	Katalase	(+)
12	Oksidasi fermentasi	(-)
13	Oksidase	(-)
14	Urease	(-)
15	Citrat	(-)
16	Nitrat	(+)
17	KCN	(-)
18	Ornitin	(-)
19	Lysine	(-)



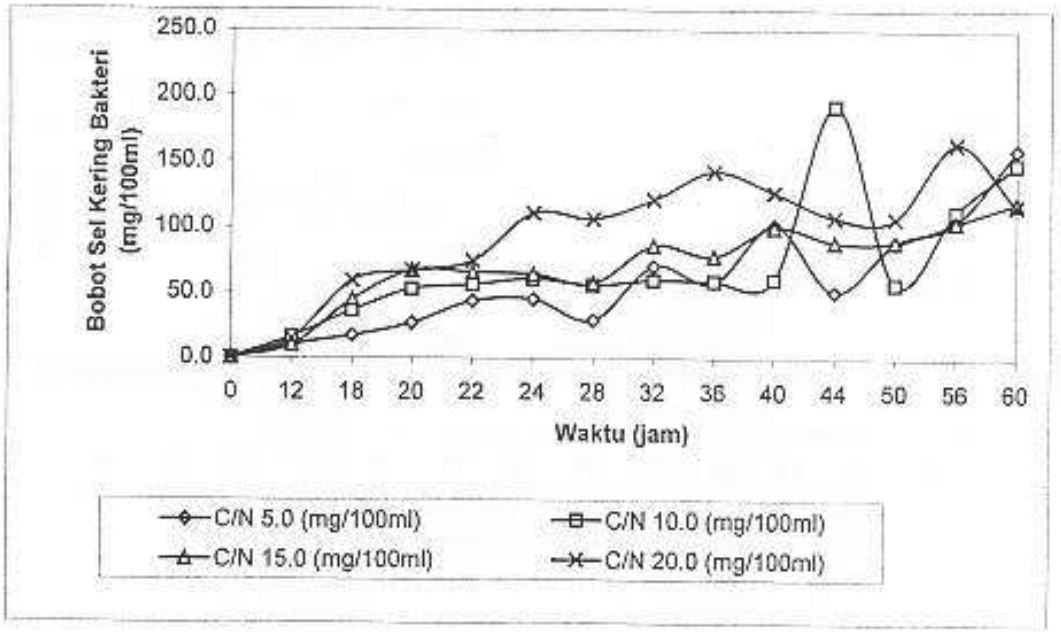
Gambar 1. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi P(3HB) terhadap konsumsi sumber nitrogen oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



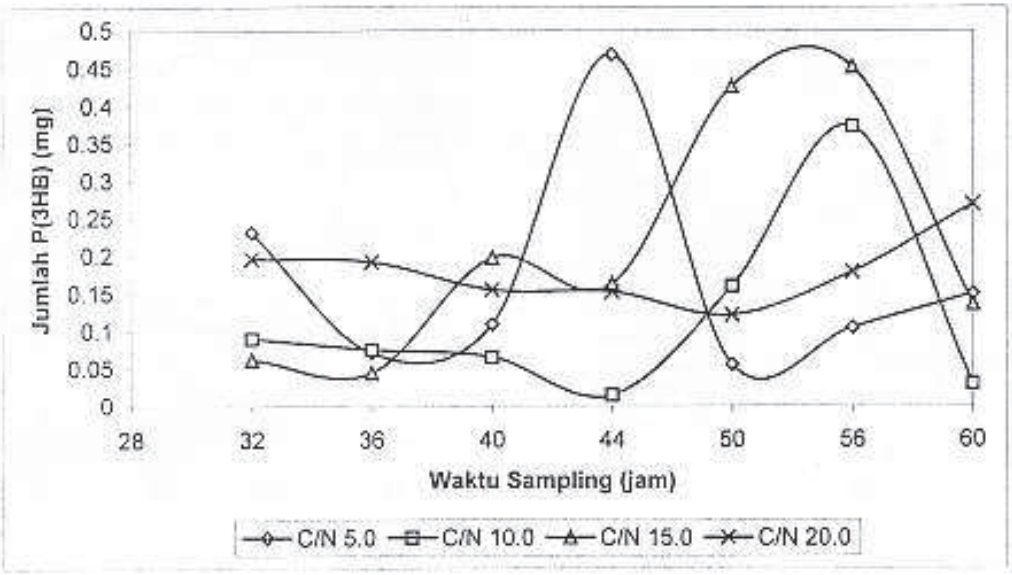
Gambar 2. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi P(3HB) terhadap konsumsi glukosa oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



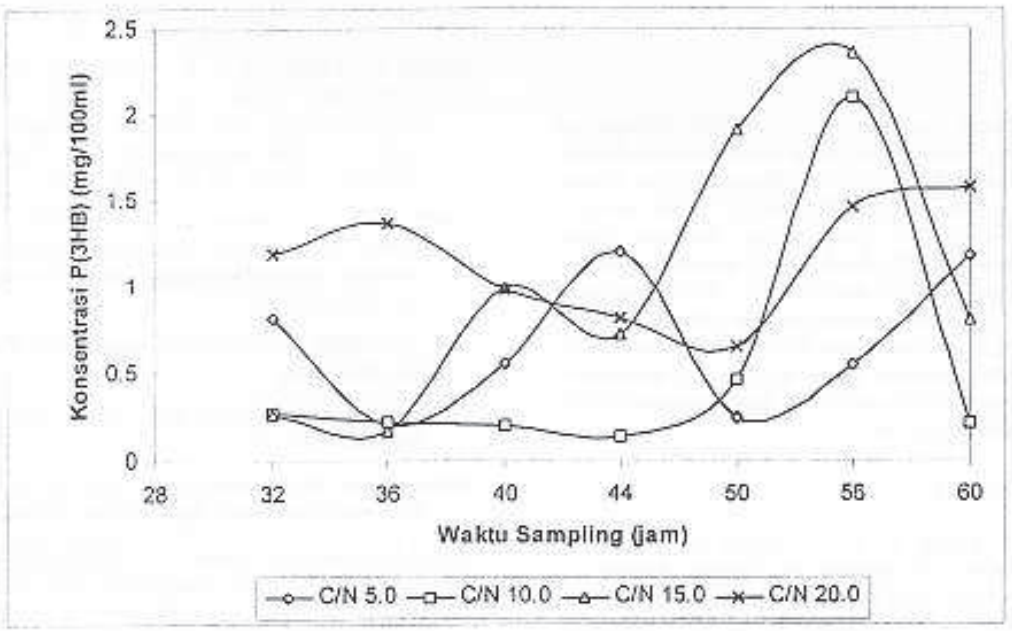
Gambar 3. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi terhadap pH cairan fermentasi P(3HB) oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



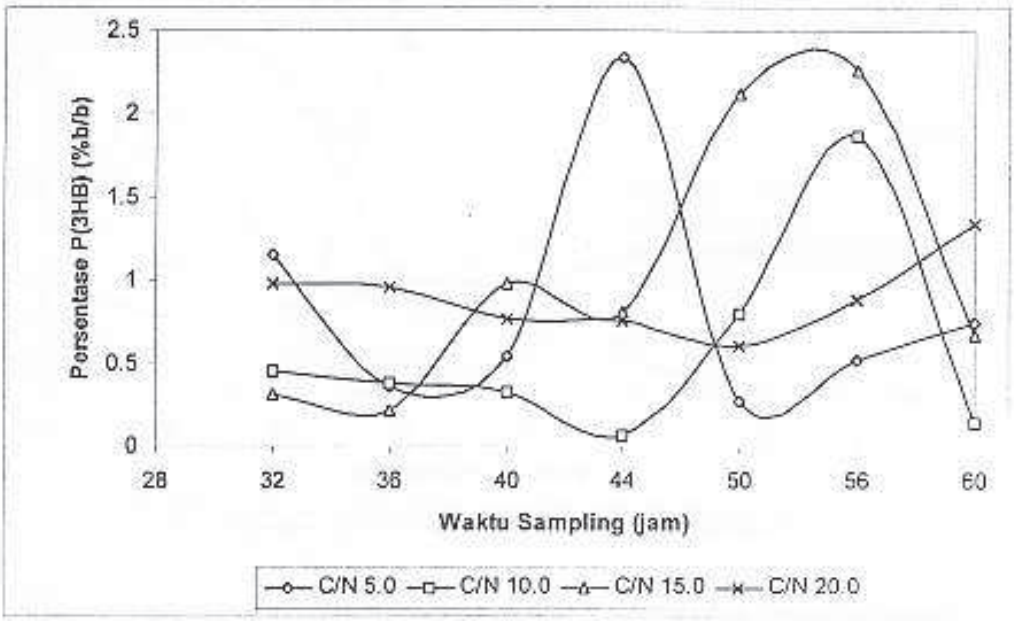
Gambar 4. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi terhadap bobot sel kering bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



Gambar 5. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi terhadap jumlah P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



Gambar 6. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi terhadap konsentrasi P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011



Gambar 7. Pengaruh perbedaan rasio C/N dalam medium fermentasi terhadap persentase P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011

Kesimpulan

Dari percobaan yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa biopolimer P(3HB) dapat diproduksi oleh Bakteri *Bacillus brevis* FAAC-202011 dengan glukosa sebagai sumber karbon dan NH_4Cl sebagai sumber nitrogen. Rasio molekul C/N yang paling optimum dalam menghasilkan P(3HB) adalah C/N 15 dengan konsentrasi P(3HB) adalah 2,36 mg/100 ml. Waktu optimum fermentasi P(3HB) dengan glukosa sebagai sumber karbon oleh *Bacillus brevis* FAAC-202011 adalah 56 jam, dengan biomassa 104,4 mg/100 ml, konsentrasi P(3HB) tertinggi 2,36 mg/100 ml, dan persentase P(3HB) tertinggi sebesar 2,26 %.

Daftar Pustaka

Akmal, D., Majid, M. I. A., Azizan, M. N. (1999), Utilization of Glucose as Carbon Source on Biosynthesis Poly (3-Hydroxybutyrate) by *Erwinia sp* USMI-20, Proceeding: The Second Colloquium on Potensial Utilization of Starch and lignosellulosic Material for Value Added Application, Penang, Malaysia.

Akmal, D., Majid, M. I. A., Azizan, M. N. (2002), Fermentasi Plastic Mudah Lupus Poli (3-Hidroksibutirat) dari Glukosa Sebagai Sumber Karbon Tunggal Menggunakan Bakteri *Erwinia sp* USMI-20, *J. Sains Tek Far*, 3(6), 78-79

Anderson, A. J., Dawes, E. A (1990), Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev*, 54, 450-472

Doi, Y. (1990), *Microbial Polyester*, VCH Publisher. Inc., New York.

Dwidjojoseputro, D. (1998), *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Jakarta.

Judoamidjojo, M., Darwis, A.A., Said, E. G. (1992), *Teknologi Fermentasi*, Rajawali Pers, Jakarta.

Lee, S.Y., Lee, K.M., Chang, H.N. (1994), Steinbuchel, A., Comparison of Escherichia coli Strains for Synthesis and Accumulation of Poly (3-hydroxybutyric Acid) and Morphological Changes, *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 1337-1347.

Lee, S.Y., (1996a), Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol Bioeng*, 49, 1-14.

Lee, S. Y. (1996b), Plastic Bacteria, Progress and Prospect for Polyhydroxyalkanoates Production in Bacteria, *Tibtech*, 14, 1-7.

Novianti, R. (2002), Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri Penghasil Bioplastik P(3HB), *Bacillus brevis*, *Skripsi S1*, Farmasi FMIPA, Universitas Andalas, Padang.

Schlegel, H.G. Schmidt, K.(1994), *Mikrobiologi Umum*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Stanbury, P.F., Whitaker (1984), *Principal Fermentation Technology*, Pergamon Press Oxford.

Windrasari, W. (2002), Penapisan Mikroorganisme Penghasil Senyawa Bioplastik P(3HB) dengan Metode Pewarnaan Menggunakan Nile Blue A, *Skripsi S1*, Farmasi FMIPA, Universitas Andalas, Padang.

Whistler, R.L., Wolfrom, M.L., Miller, J.N., Shafizadech, F. (1962), *Methods in Carbohydrate Chemistry, Analysis and Preparation*, vol I, Academic Press, New York.

Yamane, T., Chen, X. F., Ueda, S. (1996), Growth Associated Production of Poly (3-hydroxyvalerate from n-pentanol by a Methylotrophic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*", *FEMS Microbiol.* Lett, 135: 380-384