

PRODUKSI BIOPLASTIK POLI (3-HIDROKSIBUTIRAT) DARI BAKTERI REKOMBINAN *Escherichia coli*

Anthoni Agustien¹ dan Akmal D. Hakam²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas

²Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Bioplastik atau poli(3-hidroksi butirat) (P3HB) merupakan plastik yang dapat diuraikan dan dihasilkan oleh mikroba pada keadaan pertumbuhan yang tidak seimbang. Pada penelitian ini sumber bioplastik adalah bakteri *E. coli* rekombinan yang mengandung plasmid pWE-16 yang telah mengandung gen *phbC*. Bakteri rekombinan dipelihara pada medium Luria Bertani (LB) yang mengandung ampisilin. Dalam memproduksi bioplastik digunakan media LB, LB + Glukosa dan media mineral + Glukosa. Dilakukan penentuan waktu panen bioplastik, pengaruh glukosa terhadap bioplastik yang dihasilkan. Konsentrasi glukosa ditentukan dengan metoda enzimatik (kit bio Merieux PAP 1200), penentuan kadar nitrogen dengan metoda spektrofotometri, biomassa sel dengan pengeringan sel pada oven, penentuan polimer dengan metoda Gas kromatografi dan perolehan bioplastik dengan cara ekstraksi menggunakan kloroform. Dari hasil seleksi bakteri rekombinan *E. coli* yang mempunyai kode pWE-16-5 menghasilkan kadar PHB tertinggi (42%). Bakteri rekombinan *E. coli* dapat menghasilkan polimer bioplastik polihidroksi butirat (PHB) dari medium Luria Bertani dan medium mineral yang mengandung glukosa. Waktu fermentasi untuk menghasilkan kandungan polimer PHB tertinggi adalah 24 jam dengan menggunakan medium mineral + glukosa 1,5%. Penggunaan glukosa 1,5% menghasilkan kandungan PHB tertinggi pada rekombinan *E. coli* (74%) dan *Erwinia* sp. (48%).

Kata kunci: Bioplastik, PHB, Rekombinan, phbC

ABSTRACT

Poly-(3-hydroxybutyrate) (P3HB) are biodegradable plastics produced by bacteria producing at unbalance growth. In this research the source of biodegradable plastics from *E. coli* recombinant containing *phbC* gene in pWE-16 plasmid. Maintenance of *E. coli* recombinant on was cultured in Luria-Bertani (LB) contains ampicillin. Biodegradable plastics production used LB; LB and medium mineral containing glucose. Production time of biodegradable plastics with interval sampling, effect of glucose for production by can be glucose concentrated variations, determined of glucose concentration with enzymatic method (kit of bio Merieux PAP 1200), determined of nitrogen concentration with spectrophotometry method, biomass dried by oven. Polymers by GC method and Biodegradable plastics materials by extraction using chloroform. The screening resulted, the *E. coli* recombinant pWE-16-5 have concentration highest of PHB (42%). *E. coli* recombinant can be biodegradable plastics (PHB) producing if used Luria Bertani and mineral medium containing glucose. Fermentation time for production of PHB polymer contain is 24 hours with used of Mineral medium contain glucose 1.5%. Using Glucose 1.5% the produced highest PHB polymer contain at *E. coli* recombinant (74%) and *Erwinia* sp. (48%).

Keywords: Biodegradable plastics, PHB, Recombinant, phbC

PENDAHULUAN

Lebih dari dua puluh lima tahun, derivat petrokimia digunakan untuk pembuatan plastik, akan tetapi plastik tersebut tidak dapat didegradasi sehingga menimbulkan masalah sebagai limbah padat.¹

Bioplastik sangat menarik perhatian, sebab aman digunakan dan merupakan suatu polimer yang dapat didegradasi dan sangat potensial peruntukan dalam berbagai bidang medis, pertanian dan kelautan.² Zaneca Bioproduk (Cleveland, UK), memproduksi 1000 ton bioplastik per tahun dengan menggunakan

bakteri *Alcaligenes eutrophus* dengan merek dagang Biopol senilai USD 16/kg. Dalam tahun 1990 dilaporkan bahwa lebih dari 6.8 juta ton dari termoplastik resin atau 25% pasaran plastik dunia, telah dijual untuk tujuan pembungkusan. Pasaran yang diharapkan untuk plastik mudah terdegradasi ini kira-kira 1.5 juta ton/tahun.³

Bioplastik P3HB, merupakan poliester yang dihasilkan oleh banyak bakteri dan disimpan dalam sel dalam bentuk granula dan dari sudut pandang lingkungan, bioplastik merupakan pilihan utama, karena dapat didegradasi.⁴ Oleh karena sangat potensial digunakan sebagai termoplastik yang dapat didegradasi dan dapat dihasilkan dari berbagai sumber, maka riset mengenai bioplastik sangat intensif dilakukan kalangan akademis maupun industri.⁵

Bakteri *Erwinia* sp USMI-20 adalah salah satu bakteri yang telah diketahui berpotensi sebagai penghasil bioplastik poli (3-hidroksibutirat) atau P(3HB). Biopolimer P(3HB) merupakan salah satu jenis P(3HA) yang paling banyak diteliti. *Erwinia* sp. USMI-20 mampu menghasilkan kandungan P(3HB) sebesar 48 % dengan sumber karbon berupa glukosa 1,5% dalam waktu 48 jam. Pada sel bakteri, bioplastik yang dihasilkan adalah dalam bentuk granul dan biasanya terdapat 1-15 granul per sel bakteri dengan diameter 250-366 nm.⁵

Permintaan pasar terhadap produk bioplastik semakin meningkat, maka teknologi penghasilannya pun perlu ditingkatkan. Penelitian lain yang diupayakan adalah dengan mengekspresikan gen biosintesis P(3HB) ke dalam bakteri lain yang lebih mudah tumbuh misalnya *Escherichia coli* dan produksi P(3HB) dapat ditingkatkan sampai 90%.⁷

Rekayasa genetik, merupakan teknik yang terpopuler untuk meningkatkan hasil bioplastik pada dewasa ini. Telah banyak penelitian di beberapa negara yang menggunakan teknik manipulasi gen. Dari beberapa literatur dilaporkan bahwa hasil rekayasa genetik yaitu berupa bakteri rekombinan *E. coli* yang digunakan untuk meningkatkan hasil produksi, bioplastik dan dapat menekan biaya produksi. Penelitian ini mempunyai prospek cerah untuk dilanjutkan karena menyangkut bidang bioteknologi terutama ilmu bahan untuk menghasilkan senyawa bioplastik baru yang belum banyak diteliti di Indonesia.

Dari penelitian terdahulu telah didapatkan 10 strains rekombinan *Escherichia coli* hasil kloning dan setelah diskriming dengan teknik pewarna Nile Blue A, bakteri rekombinan tersebut menunjukkan indikasi menghasilkan bioplastik.⁸

Penelitian ini bertujuan untuk menggunakan bakteri rekombinan *E. coli* pWE-16, agar menghasilkan bioplastik dengan kadar yang

tinggi dalam waktu lebih cepat dibandingkan bila digunakan bakteri *Erwinia* sp. galur liar.

METODOLOGI

Pemeliharaan Bakteri Rekombinan *E. coli*

Pada penelitian ini digunakan bakteri hasil rekayasa genetik *E. coli* yang mengandung plasmid pWE-16 yang membawa gen PHA Sintase (*phbC*) dari *Erwinia* sp. Bakteri *E. coli* rekombinan diinokulasikan pada petridish dan agar miring yang berisi medium Luria-Bertani dan mengandung antibiotik ampisilin pada kadar 100 µg/ml. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Fermentasi bakteri rekombinan *E. coli* dan galur liar *Erwinia* sp. dalam beberapa medium untuk produksi bioplastik

Pada penelitian ini digunakan berbagai medium untuk memproduksi bioplastik. Adapun medium yang digunakan adalah medium Luria-Bertani, medium Luria-Bertani yang masing-masing mengandung glukosa pada konsentrasi 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0% dan 2,5% (v/v) dan medium mineral yang mengandung glukosa 1,5%. Medium yang mengandung bahan kimia MgSO₄ disterilkan secara tersendiri dengan menggunakan otoklaf pada 121° C, 15 lbs selama 15 menit. Sedangkan glukosa dan campuran larutan vitamin disterilisasi dengan menyaring larutan menggunakan filter whatmann (0,2 µm) steril.

Penentuan waktu fermentasi yang terbaik untuk produksi bioplastik

Pada masing-masing medium Luria-Bertani, Luria-Bertani yang mengandung 1,5% glukosa dan medium mineral, diinokulasikan 1 ml inokulum bakteri rekombinan *E. coli* dan *Erwinia* sp. digunakan sebagai kontrol. Inkubasi pada suhu kamar di atas shaker 180 rpm dan disampling selang waktu 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 dan 72 jam inkubasi. Selanjutnya masing-masing sampel dilakukan assay yang meliputi : biomassa sel, konsentrasi glukosa, konsentrasi nitrogen, dan bioplastik.

Pengaruh glukosa terhadap produksi bioplastik

Pada masing-masing erlenmeyer yang berisikan medium Luria-Bertani dengan variasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5% glukosa, diinokulasikan 1 ml inokulum bakteri rekombinan *E. coli*. Sebagai kontrol digunakan inokulum *Erwinia* sp. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar, di atas shaker 180 rpm dengan waktu inkubasi yang telah ditentukan dari langkah c diatas.

Penentuan Konsentrasi Glukosa, nitrogen, biomass sel, Polimer dan ekstraksi bioplastik

Penentuan konsentrasi glukosa dilakukan dengan metoda enzimatis (bio Merieux PAP 1200, France). Kadar nitrogen ditentukan dengan metoda spektrofotometri. Biomassa sel ditentukan dengan metoda oven. Polimer P(3HB) yang dihasilkan, diubah terlebih dahulu dalam bentuk ester sehingga dapat dideteksi dengan kromatografi gas. Ekstraksi bioplastik dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform pada biomassa sel, kemudian dibiarkan kloroform menguap sehingga terbentuk film bioplastik. Bioplastik kemudian dicuci dengan methanol, ditimbang berat bioplastik yang diperoleh dan dapat ditentukan % bioplastik yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi rekombinan *E. coli* penghasil polimer PHB yang paling tinggi

Penyeleksian dilakukan terhadap enam rekombinan *E. coli* hasil rekayasa genetika yang mempunyai kandungan polimer PHB tertinggi. Rekombinan *E. coli* pWE-16-5, pWE-16-8, pWE-16-10 dan pWE-16-15, dapat menghasilkan PHB dengan prosentase PHB berturut-turut 42, 20, 23 dan 30%. Sedangkan rekombinan *E. coli* pWE-16-2 dan pWE-16-4 tidak dapat menghasilkan polimer PHB (Tabel 1).

Tabel 1. Prosentase polimer PHB yang terkandung pada *E. coli* rekombinan

No.	Rekombinan <i>E. coli</i>	Prosentase PHB (%)
1.	pWE-16-2	0
2.	pWE-16-4	0
3.	pWE-16-5	42
4.	pWE-16-8	20
5.	pWE-16-10	23
6.	pWE-16-15	30

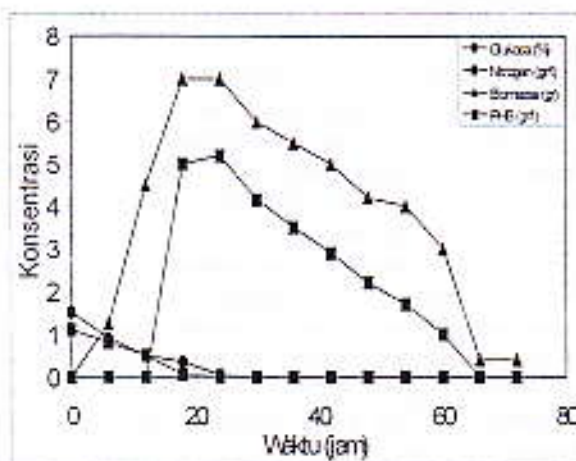
Rekombinan *E. coli* dapat menghasilkan polimer PHB, hal ini disebabkan pada sel bakteri tersebut ada plasmid yang mengandung gen yang mengkode enzim PHB-polimerase yang mengkatalisis terbentuknya polimer PHB. Rekombinan *E. coli* pWE-16-2 dan pWE-16-4 tidak dapat menghasilkan PHB, hal ini mungkin disebabkan gen yang mengkode enzim PHB-polimerase tidak terekspresikan sehingga enzim tersebut tidak tersintesis. Rekombinan *E. coli* pWE-16-5 mempunyai kandungan PHB yang tertinggi, hal ini disebabkan pada rekombinan mempunyai kopi gen *phbC* yang lebih banyak

sehingga dapat menghasilkan enzim PHB-polimerase yang memiliki aktivitas yang tinggi yang tentunya akan menghasilkan kandungan polimer PHB yang lebih tinggi. Untuk penelitian selanjutnya digunakan rekombinan *E. coli* pWE-16-5.

Penentuan waktu fermentasi yang terbaik untuk produksi bioplastik

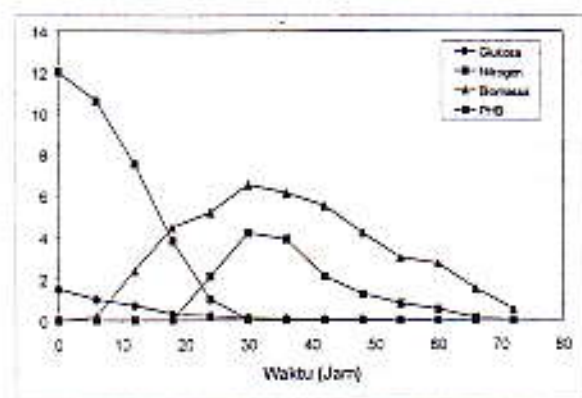
Rekombinan *E. coli* menghasilkan polimer PHB pada medium Luria Bertani yang mengandung glukosa 1,5% mulai 24 jam fermentasi. Polimer PHB dihasilkan paling tinggi pada 30 jam fermentasi, yakni sebesar 4,20 g/l dari biomassa 6,5 g/l sehingga prosentase. Kandungan polimernya adalah 65%, hal ini berarti 65% dari seluruh sel bakteri rekombinan tersebut adalah polimer PHB.

Bakteri *Erwinia* sp. pada medium Luria-Bertani yang mengandung glukosa 1,5% tidak dapat menghasilkan polimer PHB (Gambar 1), hal ini mungkin disebabkan medium ini mengandung protein yang tinggi, sehingga menekan biosintesis enzim PHB polimerase didalam sel bakteri. Pada medium mineral yang mengandung glukosa 1,5%, rekombinan *E. coli* dapat menghasilkan polimer PHB mulai 18 jam fermentasi.



Gambar 1. Produksi PHB oleh rekombinan *E. coli* selama fermentasi menggunakan medium Luria Bertani yang mengandung Glukosa 1,5%

Polimer PHB dihasilkan paling tinggi pada 24 jam fermentasi, yakni didapatkannya bioplastik sebesar 5,20 g/l dari biomassa 7,00 g/l sehingga prosentase kandungan polimernya adalah 74% (Gambar 2), hal ini berarti 74% dari seluruh sel bakteri rekombinan tersebut adalah polimer PHB. Bakteri *Erwinia* sp. pada medium Mineral yang mengandung glukosa 1,5% menghasilkan polimer PHB pada 48 jam fermentasi dengan kandungan polimernya 48% (data tidak ditampilkan).



Gambar 2. Produksi PHB oleh rekombinan *E. coli* selama fermentasi menggunakan medium Mineral yang mengandung glukosa 1,5%

Pada medium Luria Bertani, rekombinan *E. coli* tidak dapat menghasilkan polimer PHB, hal ini disebabkan medium Luria Bertani tidak mengandung glukosa sebagai sumber karbon, begitu juga halnya dengan bakteri *Erwinia* sp. Dari gambar 1 dan 2 dapat juga dilihat bahwa medium yang paling baik untuk memproduksi bioplastik adalah medium mineral dengan kadar glukosa 1,5%. Hal ini disebabkan pada medium tersebut mengandung vitamin-vitamin yang berguna sebagai kofaktor bagi kerja enzim di dalam sel bakteri.

Pengaruh glukosa terhadap produksi bioplastik

Kadar glukosa optimum untuk menghasilkan polimer bioplastik adalah pada kadar glukosa 1,5% (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh kadar glukosa terhadap produksi polimer bioplastik

Glukosa (%)	Prosentase PHB (%)	
	Rekombinan <i>E. coli</i>	<i>Erwinia</i> sp.
0,5	0	0
1,0	50	20
1,5	74	48
2,0	65	40
2,5	50	30

Pada kadar glukosa 0,5%, ternyata rekombinan *E. coli* dan *Erwinia* sp. tidak menghasilkan bioplastik. Hal ini disebabkan glukosa tidak cukup untuk digunakan sebagai makanan cadangan dalam bentuk polihidroksi butirat. Pada kadar glukosa 2 dan 2,5 %, polimer PHB yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan bila digunakan kadar glukosa 1,5%.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Bakteri rekombinan *E. coli* dapat menghasilkan bioplastik polihidroksi butirat (PHB) dari medium Luria Bertani dan medium mineral yang mengandung glukosa
2. Waktu fermentasi untuk menghasilkan kandungan polimer PHB tertinggi adalah 24 jam
3. Penggunaan glukosa 1,5% menghasilkan kandungan PHB tertinggi pada rekombinan *E. coli* dan *Erwinia* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini dengan no. kontrak 005/LIT/BPPK/III/2001 Tanggal 15 Maret 2001.

DAFTAR PUSTAKA

1. S.Y. Lee, *E. coli* moves into the plastic age, *Nature Biotechnology*, 15, Jan ; 17-18 (1997).
2. M. Scandola, Polymer blends based on bacterial P(3HB), *Journal of Microbiol.* ; 310-315 (1995).
3. K.F. Lindsay, Truly degradable resin are now truly commercial, *Mod. Plast.* 69; 62-64. (1992)
4. F. Liu, W. Li, D. Ridgway, T. Gu, Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*, *Biotech Letter*, 20(4); 345-348 (1998).
5. A. Steinbuchel, PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In H.J. Rehm and G.Reed (ed), *Biotechnology*, 6, VCH, Weinheim, 1996, pp. 405-464.
6. D. H. Akmal, M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan, M.N. Azizan, Biosintesis poli(3-hidroksibutirat) dari glukosa oleh bakteri *Erwinia* sp.USMI-20, *Jurnal Matematika dan Pengetahuan Alam*, 8(1) (1999).
7. S.G. Slater, W.H. Voige, D. E. Derris, Cloning and expression in *E. coli* of *Alcaligenes eutrophus* H-16 poly-B-hydroxybutyrate biosynthetic pathway, *J. Bacteriology* 170, 4431-4436 (1988).
8. A. Agustien, M.N. Razip, M.N. Azizan, M.N. Nazalan, M.I.A. Majid, D.H. Akmal, L.L. Few, Cloning of PHA synthase gene of *Erwinia* sp. by PCR, *Proceeding of The IMT-GT Uninet Conference*, 29-30 August, 1998, Hat Yai, Thailand, (1998).