

# STUDI PENDAHULUAN BIOSINTESIS BIOPOLIMER POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT) DARI MINYAK NABATI ASAM OLEAT SECARA FERMENTASI

---

## ABSTRAK

Telah dilakukan studi pendahuluan biosintesis biopolimer poli(3-hidroksibutirat) dari minyak nabati asam oleat secara fermentasi menggunakan bakteri *Erwinia* sp USM1-20. Proses fermentasi dijalankan di dalam labu Erlenmeyer volume 500 ml dan goncangan menggunakan *rotary shaker incubator* pada 200 rpm, suhu 30 °C, pH 7, selama 72 jam. Sebagai sumber karbon tunggal digunakan asam oleat dan amonium fosfat sebagai sumber nitrogen. Sampling diambil secara periodik setiap selang waktu 4 dan 6 jam dan dilakukan analisis terhadap berat kering sel, kandungan polimer yang dihasilkan dan kandungan amonium serta asam oleat tertinggal di dalam medium. Hasil percobaan menunjukkan bahwa konsentrasi asam oleat terbaik untuk penghasilan P(3HB) adalah 5 g/l dengan kandungan polimer tertinggi yang diperoleh setelah 54 jam sebanyak 55 % b/b dengan berat kering sel 3,4 g/l.

## I. PENDAHULUAN

Dalam dua dekade terakhir, penggunaan plastik sintetis dalam berbagai industri dan rumah tangga, telah meningkat dengan sangat pesat. Kebutuhan dunia terhadap plastik sintetis saat ini lebih dari 100 juta ton setiap tahunnya (Doi, 1990a). Berbagai keuntungan dari penggunaan plastik sintetis ini antara lain, karena sifatnya yang tahan benturan, tahan air, dan tahan terhadap penguraian (Scott, 1994; Akmal, *et al.*, 1998a).

Akibat dari penggunaan plastik yang tidak terkontrol ini telah menyebabkan masalah pencemaran lingkungan yang serius yang sulit untuk ditanggulangi karena plastik sintetis ini tak dapat terurai secara alamiah di dalam tanah/air (Page, 1995). Di Amerika dan Jepang dilaporkan bahwa lebih dari 30% total sampah yang dihasilkan setiap harinya adalah berupa limbah plastik. Juga diketahui bahwa, ribuan ton sampah plastik telah dibuang ke laut dan menyebabkan lebih dari 1 juta hewan laut mati setiap tahunnya akibat terjerat atau terperangkap oleh puing-puing plastik yang mengambang di dasar lautan (Doi, 1990a). Di samping itu ketersediaan bahan baku penghasil plastik ini yaitu petrolium, lama-kelamaan akan berkurang di alam, sehingga tak mungkin untuk digunakan dalam waktu yang panjang. Untuk itu perlu difikirkan cara lain untuk menghasilkan plastik dari sumber lain yang keterdiannya dapat diperbarui (*renewable*) misalnya: minyak nabati.

Bertitik tolak dari permasalahan tersebut di atas, peneliti bersama kawan-kawan semenjak dua tahun terakhir telah melakukan kajian intensif tentang penggunaan minyak kelapa sawit sebagai bahan dasar penghasilan senyawa biopolimer secara fermentasi menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20. Kajian ini telah membuktikan bahwa bakteri ini dapat menggunakan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbonnya dalam menghasilkan poli(3-hidroksibutirat), P(3HB) dan kopolimernya poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksi-valerat), P(3HB-ko-3HV) (Akmal, *et al.*, 1997a; 1997b; 1998a; 1998b; 1998c; 1998d). Sebahagian hasil penelitian ini telah dipresentasikan pada simposium internasional mengenai biopolimer, *The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, September, 1998, di Tokyo, Jepang (Akmal, *et al.*, 1998a) dan *Regional Conference for Polymeric Materials*, November 1998, di Penang, Malaysia (Akmal, *et al.*, 1998c) serta pada beberapa jurnal ilmiah lainnya. Dari kajian yang telah dilakukan, bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 mampu menggunakan berbagai asam lemak jenuh/tak jenuh dari minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon dalam pertumbuhannya yang diubah menjadi asetil-coA dan dengan bantuan enzim tertentu akan diubah menjadi P(3HB). Senyawa P(3HB) akan diakumulasikan di dalam selnya mencapai lebih dari 50 % dari berat sel keringnya (Akmal, *et al.*, 1997a). Selanjutnya senyawa biopolimer ini diekstrak keluar dari sel bakteri tersebut untuk dilakukan karakterisasi dan aplikasinya. Keuntungan utama dari senyawa biopolimer ini adalah karena dapat diuraikan secara alamiah di dalam tanah/air oleh mikroba pengurai, sehingga tidak akan merusak lingkungan (Page, 1995). Dari segi penghasilannya menggunakan teknologi fermentasi dapat dilakukan dalam waktu yang singkat dan menggunakan bahan mentah yang dapat diperbaharui.

Dalam kerangka penelitian ini, pada proposal penelitian ini akan dilakukan penelitian lanjutan, yaitu: upaya penggunaan minyak nabati lainnya yaitu asam oleat. Asam oleat merupakan salah satu komponen utama yang terkandung di dalam minyak kelapa sawit (40-44% b/b) dengan struktur kimia  $C_{18}H_{34}O_2$  merupakan karbon rantai panjang asam lemak tak jenuh. Secara teoritis penggunaan penggunaan asam oleat sebagai sumber karbon lebih baik dibandingkan dengan glukosa ataupun minyak kelapa sawit.

## II METODE PENELITIAN

### a. Pemeliharaan Bakteri *Erwinia* sp. USMI-20

Bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 ditumbuhkan di atas medium NA dalam cawan Petri dan agar miring. Inkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 24-48 jam kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

### b. Pembuatan Inokulum *Erwinia* sp. USMI-20 dalam medium mineral spesifik

Fermentasi dilakukan dalam labu Erlenmeyer 500 ml dalam medium mineral spesifik dengan komposisi sebagai berikut :

Kaliumdihidrogen fosfat	3,7 g/l
Dikalium hidrogen fosfat	5,8 g/l
Amonium hidrogen fosfat	1,1 g/l

Magnesium sulfat 0,1M	10 ml
Larutan Unsur mikro	1,0 ml
Larutan Vitamin	2,5 ml
Minyak Kelapa Sawit	4,6 g/l
Air suling	hingga 1000 ml

Komposisi larutan unsur mikro adalah sebagai berikut :

Besi (II) sulfat	2,78 g/l
Mangan (II) klorida	1,98 g/l
Kobal sulfat	2,81 g/l
Kalsium klorida	1,67 g/l
Tembaga (II) klorida	0,17 g/l
Tembaga (II) sulfat	0,29 g/l

Komposisi larutan vitamin adalah sebagai berikut :

Biotin	0,01 g/l
Pantotenat	2,40 g/l
Tiamin HCl	2,00 g/l
Nikotinamida	4,80 g/l
Piridoksin HCl	20,00 g/l

Medium mineral spesifik dibuat dengan melarutkan bahan-bahan yang telah dipaparkan di atas ke dalam air suling steril. Larutan unsur mikro disediakan secara terpisah dengan melarutkan bahan-bahan di atas ke dalam HCl 0,1 N sebelum dicampurkan ke dalam medium. pH medium kemudian disesuaikan menjadi 7,0 dan medium yang tersedia disterilkan dengan otoklaf. Asam oleat dan MgSO<sub>4</sub> disterilkan secara terpisah dan ditambahkan secara aseptik. Larutan vitamin disediakan secara penyaringan (filter bakteri) dan sebanyak 2,5 ml ditambahkan secara aseptik ke dalam medium.

c. *Penentuan pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap penghasilan P(3HB) dan kandungan polimernya.*

Dibuat medium mineral spesifik dengan komposisi sebagaimana telah dipaparkan di atas, dengan sumber karbon asam oleat dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 g/l. Inokulasi dengan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20, kemudian dikulturkan pada suhu 30 °C, PH 7 dan agitasi 200 rpm. Pengkulturan dilakukan selama 48 jam. Setelah masa inkubasi, cairan fermentasi disentrifuskan dengan kelajuan 10.000 rpm selama 10 menit. Filtratnya diambil dan disimpan untuk penentuan nitrogen dan asam oleat tertinggal di dalam medium. Biomasnya diambil dan dibekukeringkan (freeze drying) selama 24 jam. Kandungan P(3HB) di dalam sel kering dihasilkannya dengan kromatografi gas.

#### d. Penentuan profil fermentasi penghasiian P(3HB) dari asam oleat

Penghasiian P(3HB) dilakukan dengan menggunakan medium dengan sumber karbon asam oleat yang dapat menghasiian kandungan P(3HB) yang tertinggi, yang diperoleh pada percobaan sebelumnya (c). Fermentasi dilakukan pada suhu 7.0, selama 66 jam, dan agitasi 200 rpm. Setiap selang waktu 4 jam sampai, sampai 18 jam dan selang waktu 6 jam setelah 18 jam sampai 66 jam. Untuk setiap sampel yang diambil dilakukan analisis berupa: berat sel kering (biomas), kandungan polimer, asam oleat teringgal dan nitrogen teringgal di dalam medium.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengkulturan *Erwinia* sp. USMI-20 di dalam medium mineral yang mengandung sumber karbon asid oleik dengan kepekatan berlainan dipaparkan dalam Tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat bahwa empat jenis konsentrasi asam oleat di dalam medium yaitu: 5.0, 10.0, 15.0 dan 20.0 g/l telah digunakan. Hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi asam oleat yang dapat menghasiian kandungan P(3HB) tertinggi ialah 5.0 g/l. Dari 5.0 g/asam oleat di dalam medium dapat dihasiian kandungan P(3HB) 49.5 % b/b dengan konsentrasi P(3HB) 2.0 g/l dan biomasa residu 2.1 g/l. Sedangkan untuk 3 konsentrasi asam oleat yang lebih tinggi lainnya, didapatkan kandungan polimer yang lebih rendah, yaitu lebih kurang 46.0 % b/b.

Profil fermentasi penghasiian P(3HB) oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari sumber karbon asam oleat dengan konsentrasi 5.0 g/l ditunjukkan pada Gambar 1. Corak pertumbuhannya memperlihatkan bahwa penggunaan sumber nitrogen berlaku dengan kadar yang tinggi mulai jam ke 4 hingga jam ke 36. Purata penggunaan sumber nitrogen dalam selang waktu tersebut ialah 0.03 g/l/j. Sedangkan sumber nitrogen di dalam medium didapati telah habis digunakan pada jam ke 42 hingga berakhirnya masa pengkulturan berlaku dalam keadaan kekurangan sumber nitrogen.

Secara keseluruhan ketika fasa pertumbuhan yaitu hingga jam ke 36 pengkulturan, purata kadar penggunaan asam oleat ialah 0.09 g/l/j. Sedangkan pada fasa pertumbuhan cepat, asam oleat digunakan dengan kadar 0.18 g/l/j. Selanjutnya dari jam ke 36 hingga fermentasi tamat pada jam ke 66, purata kadar asam oleat adalah 0.03 g/l/j. Pada akhir fermentasi asam oleat masih terdeteksi di dalam medium dengan jumlah yang secara relatif kecil yaitu 0.7 g/l. Pada eksperimen ini, kadar pertumbuhan spesifik yang maksimum adalah 0.3/j yang terjadi pada jam ke 8 pengkulturan.

Penghasiian P(3HB) mulai terlihat dengan jelas pada jam ke 12 pengkulturan, yaitu sebesar 7.2 % b/b dan terus menaik hingga jam ke 54 dan kemudian didapati menurun hingga jam ke 66 pengkulturan. Kandungan polimer tertinggi yang dapat dicapai ialah 55.0 % b/b dengan berat kering sel 3.4 g/l dan konsentrasi polimer dan biomasa residu secara berturut-turut 1.9 g/l dan 1.5 g/l.

Penelitian ini mempunyai prospek cerah untuk dilanjutkan karena menyangkut bidang bioteknologi penghasiian biopolimer yang bahan dasarnya minyak tumbuhan yang sumbernya berlimpah di Indonesia. Selama ini penelitian ke arah ini belum

mendapat perhatian di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan kondisi percobaan biosintesis plastik biopolimer P(3HB) dari bahan dasar asam oleat secara fermentasi.

Data yang diperoleh pada penelitian ini merupakan faktor penting yang harus diketahui untuk melanjutkan kajian produksi biopolimer P(3HB) dari asam oleat oleh *Erwinia* sp. USMI-20, ke tahap produksi skala pilot dan skala produksi. Secara teoritis dengan menggunakan persamaan yang dikemukakan oleh Yamane (1993), nilai  $Y_{P(3HB)/S}$  untuk glukosa sebesar 0,48 g/g, sedangkan untuk asam oleat 1,47 g/g dan minyak kelapa sawit 1,40 g/g. Hal ini berarti dari 1 gram asam oleat dapat dihasilkan 1,4 gram P(3HB). Harga pasaran P(3HB) yang dihasilkan oleh Zeneca Bioproduct, pada saat ini yaitu US \$ 16/kg (Akmal, 1999a). Dari data yang di dapat masih memungkinkan untuk mengoptimalkan penghasilannya menjadi lebih tinggi dari yang diperoleh saat ini. Hal ini mungkin dapat dilakukan bila produksi dilakukan di dalam fermentor sehingga beberapa parameter fermentasinya dapat dikontrol.

#### IV. KESIMPULAN

Dari percobaan biosintesis poli(3-hidroksibutirat) menunjukkan bahwa konsentrasi asam oleat terbaik untuk penghasilan P(3HB) adalah 5 g/l dengan kandungan polimer tertinggi yang diperoleh setelah 54 jam pengkulturan. Kandungan P(3HB) tertinggi adalah sebanyak 55 % b/b dengan berat kering sel 3,4 g/l dan konsentrasi polimer dan biomasa residu secara berturut-turut 1,9 g/l dan 1,5 g/l.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, D., M.I.A. Majid, and M.N. Azizan (1998a). Biosynthesis of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and n-propanol or propionic acid as a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Paper Program and Abstracts of The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, 9-11 September 1998, Tokyo, JAPAN
- Akmal, D., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan (1998b), Production of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and valeric acid by *Erwinia* sp.USMI-20, *Proceeding of The IMT-GT Uninet Conference*, 29-30 August, 1998, Hat Yai, THAILAND, 104-106.
- Akmal, D., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan (1998c). Biosynthesis of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and n-pentanol by *Erwinia* sp.USMI-20, *Proceeding of The Regional Conference on Polymeric Materials '98*, 10-11 November, 1998, Penang, MALAYSIA, 134-140.
- Akmal, D., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan (1998d). Biosintesis plastik mudah terurai poli(3-hidroksibutirat) dari minyak kelapa sawit menggunakan bakteri *Erwinia* sp.USMI-20, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 3(2), 1998, 59-65.
- Akmal, D. H M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan (1999b), Utilization of valeric acid as a second carbon source on production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 4(1), 1999.
- Akmal, D., M.I.A. Majid and M.N. Azizan (1997a). Preliminary Investigation on the production of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Paper Presented at The 1<sup>st</sup> National Biodegradable Plastic Research Colloquium, Regional Conference on Polymeric Material*, 27 November 1997, Penang, MALAYSIA.
- Akmal, D., M.I.A. Majid and M.N. Azizan (1997b). Preliminary Investigation on the production of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Proceeding of The 1<sup>st</sup> Colloquium on potential of starch and lignocellulosic materials for value added applications*, 29 November 1997, Penang, MALAYSIA.
- Doi, Y (1990a). Poly (3-hydroxyalkanoates). Metabolism. In: *Microbial Polyester*, Chapter 4, UCH Publ. Inc., New York, 63-86.

- Page, W.J. (1995), Bacterial Poly-hydroxyalkanoates, Natural Biodegradable Plastics with A Great Future, *Can. J. Microbiol.* 41 (Supp.1), 4-13.
- Scott, G. (1994). Environmental Biodegradation of Hydrocarbon Polymers, Initiation and Control, In: *Biodegradable Plastics and Polymers* (Doi, Y and Fukuda, (Eds.), Elsevier Science BV, 487-491.
- Yamane, T (1993). Yield of Poli-D-B-hydroxybutyrate from Various Carbon Sources, A Theoretical Study, *Biotechnol. Bioeng.* 165-170.