Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 2, 2002, 49 – 55
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Teknik Fermentasi Suapan Sekelompok (Fed-Batch) pada Biosintesis Poli(3-Hidroksibutirat) dari Bahan Dasar Minyak Kelapa Sawit

Akmal Djamaan [1*], Mohammed Isa Abdul Majid [2] dan Azizan Mohamad Noor [3]
[1] *Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang, Indonesia*
[2] *Pusat Racun Negara, Universiti Sains Malaysia, Penang*
[3] *Pusat Pengajian Sains Kaji Hayat, Universiti Sains Malaysia, Penang*

Diterima : 1 Juli 2002, Disetujui : 2 September 2002

Abstract

A fed-batch fermentation technique on biosynthesis of a biodegradable plastic poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB) using a mineral-media with palm oil as a single carbon source by *Erwinia* sp. USMI-20 has been carried out. Fermentation was conducted on a rotary shaker incubator under aerobic condition at pH 7.0, incubation temperature of 30 °C, and agitation rate of 200 rpm for 66 hours. A single feeding of 4.6 g/l palm oil was used at 30 hour cultivation. The characterization of the polymer production was based on cell growth, polymer content and polymer concentration. From this study, the maximum level of producing P(3HB) was at 66 hour cultivation with polymer content of 63 % b/b, polymer concentration of 3.53 g/l, and the dried cell weight of 5.6 g/l.

Keywords: Fed-batch, poly(3-hydroxybutyrate), biodegradable plastic, palm oil and *Erwinia* sp. USMI-20

Pendahuluan

Diperkirakan sebanyak 25 Juta ton limbah plastik sintetis di buang ke lingkungan setiap tahun (Lee, 1996). Di Amerika Serikat dan Jepang dilaporkan bahwa lebih dari 30 % dari total sampah yang dihasilkan setiap hari adalah berupa limbah plastik sehingga banyak menimbulkan kerusakan lingkungan.

Dewasa ini berbagai penelitian telah dilakukan untuk menghasilkan plastik yang ramah lingkungan atau mudah terurai. Salah satu cara yang banyak diteliti adalah teknik fermentasi menggunakan bakteri penghasil biopolimer poli(3-hidroksialkanoat), P(3HA) (Page, 1995). Diketahui bahwa bakteri tertentu menghasilkan P(3HA) di dalam selnya yang berfungsi sebagai cadangan makanan dan energi pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, misalnya: kekurangan nitrogen dan fosfat (Anderson and Dawes, 1990).

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

Biopolimer yang dihasilkan oleh bakteri tersebut, dapat diekstrak keluar dari selnya dan diproses lebih lanjut sesuai dengan keperluan yang diinginkan. Poli(3-hidroksibutirat), P(3HB) adalah satu dari kelompok P(3HA) yang paling banyak diteliti dan dihasilkan oleh berbagai mikroorganisma. Hal ini disebabkan oleh karena P(3HB) mempunyai sifat mudah terurai dan memiki sifat fisika dan kimia yang hampir sama dengan polimer sintetis (Akmal *et. al.*, 1998a; 1998b).

Pada tulisan ini dilaporkan penggunaan teknik suapan sekelompok (*fed batch*), untuk menghasilkan polimer P(3HB) dari bahan dasar minyak kelapa sawit menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20. Penggunaan minyak kelapa sawit lebih menguntungkan dibandingkan sumber lainnya, karena harganya yang relatif murah dan kandungan asam lemaknya yang besar sangat potensial digunakan sebagai sumber karbon pada fermentasi P(3HB) (Akmal *et al.*, 1998c). Sedangkan teknik pemberian suapan (*feeding*) pada fermentasi bertujuan untuk memberikan sumber nutrien tambahan ke dalam kultur fermentasi yang sedang berjalan, agar nutrien

tersedia dalam jumlah yang cukup untuk pertumbuhan sel dan pembentukan metabolitnya.

Metode Penelitian

Bahan dan alat :

Bahan yang digunakan di dalam penelitian ini antara lain; minyak kelapa sawit bertapis, KH_2PO_4, K_2HPO_4; $(NH_4)_2HPO_4$, larutan $MgSO_4.7H2O$ 0,1 M. $FeSO_4.7H_2O$, $MnCl_2.7H_2O$, $CoSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $CuCl_2.2H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, asam klorida, biotin, asam pantotenat, tiamin, nikotinamid dan piridoksin.

Alat yang digunakan antara lain: *rotary shaker incubator* (B. Braun Certomat R&H), *freeze drier* (B. Braun FD-5505P), spetrofotometri uv/vis (Shimadzu), alat kromatografi gas (Perkin Elmer Autosystem XL), *alat ultra centrifuge* (Sorvall RC-5B), *rotary vacum evaporator* (Eyela), mikroskop elektron trasmisi (Philip CM-12/STEAM) dan alat NMR (Bruker).

Mikroorganisma :

Isolat bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 diperoleh dari Laboratorium Penelitian Bioteknologi, Universiti Sains Malaysia, Penang. Karakteristik dan potensinya dalam menghasilkan P(3HB) ditunjukkan pada Tabel 1 (Majid *et al.*, 1999)

Kondisi Fermentasi :

Erwinia sp. USMI-20 ditumbuhkan dalam medium mineral menggunakan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon tunggal mengguhakan alat *Rotary Shaker Incubator* seperti ditunjukkan pada Gambar 1. Komposisi medium mineral yang digunakan untuk satu liter air suling sebagai berikut: 3,7 g KH_2PO_4; 5,8 K_2HPO_4; 1,1 g $(NH_4)_2HPO_4$; 10 ml larutan $MgSO_4.7H2O$ 0,1 M, 1 ml larutan unsur mikro dan 2,5 ml larutan vitamin. Larutan unsur mikro untuk satu liter air suling, terdiri atas: 2,78 g $FeSO_4.7H_2O$; 1,98 g $MnCl_2.7H_2O$; 2,81 g $CoSO_4.7H_2O$; 1,67 g $CaCl_2.2H_2O$; 0,17 g $CuCl_2.2H_2O$; 0,29 g $ZnSO_4.7H_2O$ dalam 1 liter asam klorida 0,1 M. Sedangkan komposisi larutan vitamin dalam satu liter air suling adalah sebagai berikut: biotin 0,012 g, asam pantotenat 2,4 g, tiamin HCl 2 g, nikotinamid 4,8 g dan piridoksin 20 g (Akmal, *et al.*, 1998b).

Pada awal pengkulturan, minyak kelapa sawit diberikan 4,6 g/l, kemudian setelah 30 jam diberikan suapan tunggal minyak kelapa sawit 4,6 g/l secara aseptik. Fermentasi dijalankan pada pH 7, suhu inkubasi 30°C dan goncangan 200 rpm selama 66 jam. Setiap periode waktu 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 54, 60 dan 66 jam setelah pengkulturan, diambil cuplikan dari cairan fermentasi sebanyak 100 ml, dipusingkan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, kemudian selnya disejuk keringkan (*freeze drying*) selama 24 jam. Analisis yang dilakukan terhadap cuplikan, meliputi: berat kering sel, jumlah minyak kelapa sawit tertinggal, jumlah nitrogen tertinggal, kandungan P(3HB) yang terbentuk dan berat sel residu. Kemudian plastik yang terkandung didalam selnya diekstrak keluar menggunakan kloroform dan diendapkan dengan penambahan metanol.

Prosedur analisis :

Kandungan bioplastik P(3HB) di dalam sel bakteri ditentukan dengan teknik kromatografi gas menggunakan kolom supelcowax (panjang 30 m dengan diameter 0,32 mm), detetor FID (flame ionisation detector), dan gas pembawa nitrogen. Karakteristik biopolimer yang dihasilkan dikonfirmasi menggunakan 270 MHz ^1H dan ^{13}C NMR dalam tetrametilsilan. Berat kering sel dari *Erwinia* sp. USMI-20 ditentukan secara gravimetri dengan cara penimbangan berat kering selnya. Jumlah nitrogen yang tertinggal di dalam medium ditentukan dengan spektrofotometri sinar tampak berdasarkan kaedah reaksi Berthelot (Lee and Yoo, 1994). Jumlah minyak kelapa sawit tertinggal di dalam medium ditentukan dengan kromatografi gas yang dihitung sebagai ester asam palmitat (Majid *et al.*, 1999).

Hasil dan Pembahasan

Pada percobaan terdahulu telah dilakukan fermentasi minyak kelapa sawit secara sekelompok (*batch*) menggunakan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon tunggal dengan konsentrasi 4.6 g/l di dalam medium (Akmal *et al.*, 1998d). Pada percobaan tersebut didapati minyak kelapa sawit di

dalam medium pengkulturan telah habis pada jam ke-40, sehingga medium berada dalam keadaan kekurangan sumber karbon. Ini menyebabkan pembentukan polimer setelah jam ke-40 tersebut terhenti yang diikuti dengan menurunnya sel yang terbentuk. Untuk mengatasi masalah tersebut, pada kajian ini telah dilakukan pemberian suapan (*feeding*) minyak kelapa sawit secara sekelompok (tunggal) sebanyak 4.6 g/l lagi pada jam ke-30, dengan tujuan agar pertumbuhan sel tetap meningkat dan penghasilan polimer di dalam sel tetap berlangsung hingga akhir fermentasi.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa, setelah pemberian suapan minyak kelapa sawit, produksi P(3HB) meningkat dari kandungan polimer nya yang pada awalnya 30% b/b pada jam ke-30 telah meningkat menjadi 63 % b/b pada jam ke-60 dengan berat kering selnya 5,6 g/l. Ini menunjukkan adanya kenaikan pembentukan P(3HB) hampir dua kali lipat dalam masa 30 jam. Kondisi ini seiring dengan kecepatan konsumsi sumber karbon (minyak kelapa sawit) yang sangat tinggi pada selang waktu 36 hingga 60 jam pengkulturan tersebut. Purata penggunaan minyak kelapa sawit pada selang waktu tersebut adalah 0,17 g/l/jam.

Penggunaan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon dalam biosintesis P(3HB) sangat menguntungkan dibandingkan sumber karbon tradisional yang banyak digunakan, seperti glukosa. Menurut kajian yang dilakukan oleh Yamane (1993), dilaporkan bahwa bila menggunakan glukosa sebagai sumber karbon, koefisien penghasilannya ($Y_{P(3HB)/C}$) sebesar 0,48. Ini berarti bahwa dari 1 gram glukosa akan dihasilkan 0,48 gram P(3HB). Sementara itu, bila menggunakan minyak kelapa sawit, diperoleh $Y_{P(3HB)/C}$ sebesar 1,40 (Majid *et al.* 1994), yang berarti dari 1 gram minyak kelapa sawit dapat dihasilkan P(3HB) sebanyak 1,40 gram. Dalam kajian penggunaan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon tunggal yang telah dilakukan sebelumnya (Akmal et al., 1998d, diperoleh koefisien penghasilan yang lebih rendah dari teroritis, yaitu 0,53, yang berarti yang dari 1 gram minyak kelapa sawit yang digunakan, hanya dapat dikonversikan oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 menjadi P(3HB) sebanyak 0,53 gram. Dengan demikian masih memungkinkan untuk dilakukan pengoptimuman produksinya.

Kajian penggunaan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon pada biosintesis P(3HB) juga telah dilaporkan oleh Majid *et al.* (1994), tetapi menggunakan bakteri yang berbeda yaitu *Alcaligenes* sp. AK-201. Dalam kajian tersebut diperoleh koefisien penghasilan P(3HB) sebesar 0,62 yaitu sedikit lebih tinggi dibandingkan hasil yang diperoleh pada kajian menggunakan *Erwinia* sp. USMI-20. Sementara itu Fukui dan Doi (1998) juga telah melaporkan penggunaan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon pada penghasilan P(3HB) oleh *R. eutropha H16* dan hasil rekombinannya. Hasilnya menunjukkan bahwa dengan menggunakan *R. eutropha H16*, kandungan P(3HB) dapat mencapai 79 % b/b dengan berat kering sel 4.1 g/l. Sementara itu bila digunakan rekombinannya yaitu *R. eutropha* PHB 4/pJRDEE32d13, diperoleh kandungan polimer yang sangat tinggi iaitu 81 % b/b dengan berat kering selnya 3.6 g/l.

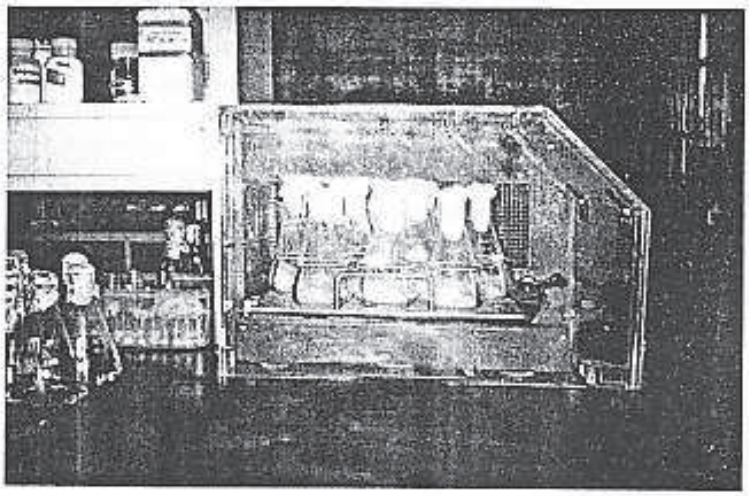
Pada penelitian ini, senyawa bioplastik yang ada di dalam sel bakteri tersebut, telah diekstrak keluar menggunakan kloroform. Senyawa bioplastik yang diperoleh dikarakterisasi spektrum 270 MHz ^{1}H dan ^{13}C NMR-nya (Gambar 3). Puncak puncak spektrum yang diperoleh dibandingkan dengan dengan spektrum baku P(3HB) (Doi, 1990), ternyata mempunyai puncak dan anjakan kimia yang sama dengan P(3HB) standar (Doi, 1990).

Percobaan ini sangat menarik, karena ternyata bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 mampu menggunakan glukosa sebagai sumber karbon untuk menghasilkan P(3HB) sampai 63 % b/b dari berat selnya. Untuk menjelaskan mekanisme biokimia yang terjadi di dalam sel *Erwinia* sp. USMI-20 dapat merujuk kepada mekanisme yang terjadi pada bakteri *Ralstonia eutropha* sebagai mikroba penghasil P(3HB) yaitu dengan pembentukan senyawa asetil-koA terlebih dahulu (Anderson and Dawes, 1990; Page, 1995). Penelitian ini mempunyai prospek cerah untuk dilanjutkan terutama mengenai mekanisme biokimia yang terjadi di dalam sel bakteri dengan menggunakan senyawa bertanda dan radio aktif. Di samping itu dapat dilakukan optimasi dan produksi P(3HB) skala pilot dalam upaya menghasilkan senyawa bioplastik yang ramah lingkungan.

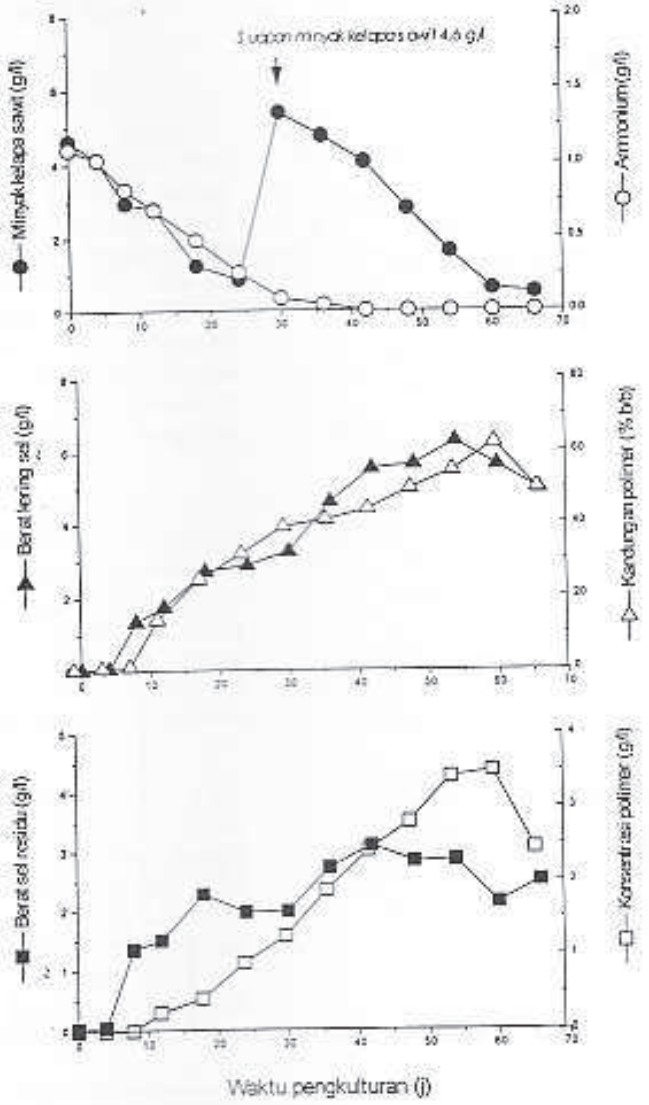
Tabel 1 Karakteristik Bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 yang Digunakan dalam Percobaan ini dengan Sistem API-20E (Majid *et al.*, 1999).

No.	Reaksi/enzim	Substrat	Pengamatan
1.	β-galaktosidase	Ortonitrofenil-galaktosa	+
2.	Arginin-dehidrolase	Arginin	-
3.	Lisin-dekarboksilase	Lisin	+
4.	Ortonitin-dekarboksilase	Ornitin	-
5.	Penggunaan sitrat	Natrium sitrat	+
6.	Pelepasan H_2S	Kalium tiosulfat	-
7.	Urease	Urea	-
8.	Triptofan-desaminase	Triptofan	+
9.	Struktur indol	Triptofan	-
10.	Struktur aseton	Natrium piruvat	-
11.	Gelatinase	Gelatin Kohn	-
12.	Pengkulturan/oksidasi	Glukosa	+
13.	Pengkulturan/oksidasi	Manitol	+
14.	Pengkulturan/oksidasi	Inositol	+
15.	Pengkulturan/oksidasi	Sorbitol	+
16.	Pengkulturan/oksidasi	Ramnosa	+
17.	Pengkulturan/oksidasi	Sukrosa	+
18.	Pengkulturan/oksidasi	Melibiosa	+
19.	Pengkulturan/oksidasi	Amigdalina	-
20.	Pengkulturan/oksidasi	Arabinosa	+
21.	Sitokrom-oksidase	-	-

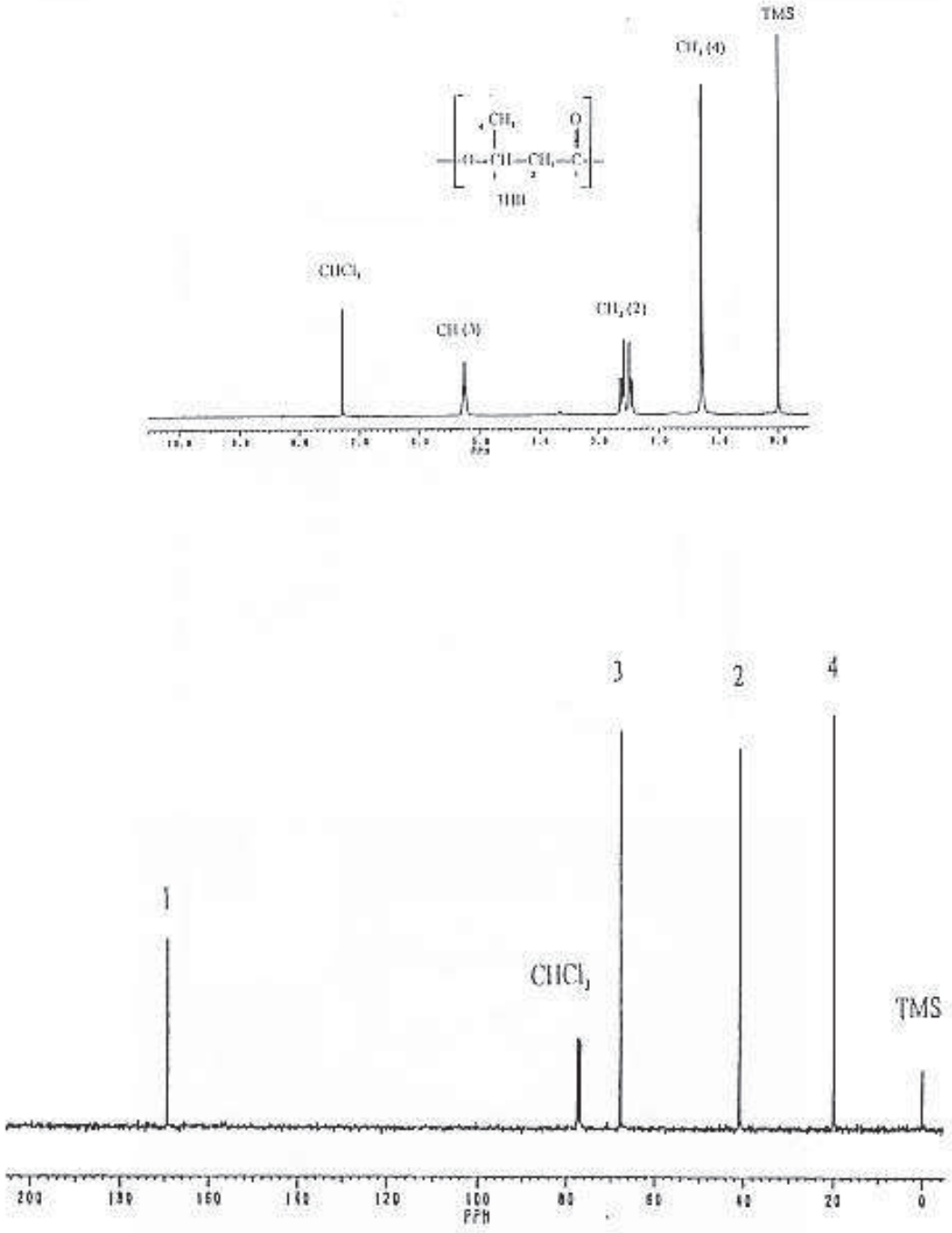
Keterangan : + = reaksi positif/bekteri mengandung enzim yang diuji
- = reaksi negatif/bekteri tidak mengandung enzim yang diuji



Gambar 1. Alat *rotary shaker incubator* yang digunakan dalam penelitian ini



Gambar 2. Profil fermentasi suapan sekelompok P(3HB) dari bahan dasar minyak kelapa sawit oleh bakteri *Erwinia* sp. USM1-20



Gambar 3. Spektrum 270 MHz ^{1}H dan ^{13}C NMR P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari sumber karbon minyak kelapa sawit.

Kesimpulan

Dari percobaan yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan teknik suapan sekelompok, biosintesis P(3HB) oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 dapat ditingkatkan dari 30% b/b menjadi 63 % b/b dengan konsentrasi polimer 3,53 g/ dan berat kering sel sebanyak 5,6 g/l.

Daftar Pustaka

Akmal, D., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan, and M.N. Azizan, 1998a. Production of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from palm oil and valeric acid by *Erwinia* sp. USMI-20, *Proceeding The Second IMT-GT Uninet Conference, Towards The Sustainable Use of Chalenges and Opportunities for the IMT-GT*, August, 29-30, 1998, Prince of Songkhla University, Hatyai, Songkhla, Thailand, 104-106.

Akmal, D., M.I.A. Majid, M.S. Razip, M.N. Nazalan, and M.N. Azizan, 1998b, 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 presented at The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, September, 9-11, 1998, Tokyo, Jepang.

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, *Paper presented at The Regional Conference on Polymeric Moterials 1998*, School of Industrial Technology, Universiti Sains Malaysia, November, 10-11, 1998, Penang, Malaysia.

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, *J. Sains Tek. Far* 3(2), 59-65.

Anderson, A. J. and E. A. Dawes, 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.

Doi, Y., 1990. Microbial Polyester, VCH Publ. Inc., New York, 1-30.

Majid, M. I. A., Hori, K., Akiyama, M. and Doi, Y. (1994). Production of poly(hydroxybutyrate) from plant oil by *Alcaligenes* sp., in: Biodegradable Plastics and Polymers (Eds. Doi, Y. and Fukuda, K.), Elsevier Science B.V, Amsterdam, 417-424.

Majid, M. I. A., Akmal, D. H., Few, L. L., Agustien, A., Toh, M. S., Samian, M. R., Najimudin, N. and Azizan, M. N. (1999). Production of poly(3-hydroxy-butyrate) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20. *Int. J. Biol. Macromol.* 25: 95-104.

Page, J., 1995, Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future, *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl.1), 1-3.

Lee, Y. W. and Y.J. Yoo, 1994, High cell density culture of *Alcaligenes eutrophus* and PHB production by optimation of medium compositions, *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Lett.* 14:811-816.

Lee, S. Y., 1996, Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol Bioeng.* 49:1-14.

Yamane, T., Chen, X. and Ueda, S. (1996). Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 207-211.