

## PENGARUH JENIS SUMBER NITROGEN PADA PEMBUATAN POLYHYDROXYBUTYRATE DARI GLUKOSA MENGGUNAKAN BAKTERI *Bacillus cereus*

Yustinah<sup>1,2\*</sup>, Misri Gozan<sup>1</sup>, Heri Hermansyah<sup>1</sup>, Rizal Alamsyah<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknik Kimia, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

<sup>2</sup>Jurusan Teknik Kimia, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Balai Besar Industri Agro (BBIA), Kementerian Perindustrian, Bogor, Indonesia

\*E-mail : yustinah@ftumj.ac.id

### ABSTRAK

Polyhydroxybutyrate (PHB) adalah salah satu bahan baku plastik biodegradabel. Bakteri memproduksi PHB di dalam selnya, sebagai cadangan sumber carbon dan energi untuk pertumbuhannya, pada saat pasokan nutrisi tidak seimbang. Sifat PHB mirip dengan sifat polypropylene (PP) yang merupakan bahan baku plastik berbasis petrokimia. Selain itu PHB juga bersifat renewable, ramah lingkungan dan biokompatibel. Salah satu nutrisi untuk pertumbuhan bakteri adalah Nitrogen. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh jenis sumber Nitrogen terhadap pertumbuhan sel bakteri dan kadar PHB yang diperoleh. Pembuatan PHB dilakukan secara proses fermentasi. Mula-mula glukosa sebagai sumber karbon dan larutan Mineral Salt Medium (MSM), ditambah dengan sejumlah sumber nitrogen (Trypton, Pepton, Ammonium Sulfat, Ammonium Chlorida). Larutan selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclave. Setelah medium dingin ditambahkan sejumlah 10% vol bakteri *Bacillus cereus*. Selanjutnya medium dilakukan proses fermentasi selama 96 jam. Setelah fermentasi selesai dilakukan pemanenan untuk pemisahan sel biomass dari filtratnya dengan cara centrifugasi. Filtrat yang diperoleh dianalisa kandungan gula reduksi, sedangkan sel biomass dianalisa kadar PHB. Hasil penelitian menunjukkan fermentasi oleh bakteri *Bacillus cereus* menggunakan sumber nitrogen Trypton, menghasilkan berat sel kering yang banyak, yaitu 5,391 g/L, dan produksi PHB sedikit, yaitu 11,2%. Sedangkan pada fermentasi menggunakan sumber nitrogen Pepton, menghasilkan berat sel kering sedikit (3,031g/L), tetapi produksi PHB banyak (19,6%).

**Kata Kunci:** Polyhidroksibutyrate, *Bacillus cereus*, plastik biodegradabel, sumber nitrogen

### ABSTRACT

*Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable plastic raw materials. The bacteria producing PHB in the cell, as a backup source of carbon and energy for growth, while supply of nutrients is not balanced. PHB nature similar to the nature of polypropylene (PP) which is the raw material of petrochemical-based plastics. In addition PHB also be renewable, environmentally friendly and biocompatible. One nutrient for bacterial growth is nitrogen. This research was conducted to study the effect of nitrogen sources on the growth of bacterial cells and levels diperoleh. Pembuatan PHB PHB fermentation process is done. At first glucose as the carbon source and a solution of Mineral Salt Medium (MSM), coupled with a nitrogen source (Trypton, Peptone, Ammonium Sulfate, Ammonium chloride). The solution was subsequently sterilized using autoclave. After a cold medium is added an amount of 10% vol bacterium *Bacillus cereus*. Subsequently medium performed fermentation for 96 hours. Once fermentation is complete the harvesting for biomass cell separation from the filtrate by means centrifugasi. The filtrate obtained was analyzed sugar content reduction, while the biomass of cells analyzed for levels of PHB. The results showed fermentation by the bacteria *Bacillus cereus* using Trypton nitrogen source, produce dry cell weight of the lot, which is 5.391 g / L, and the production of PHB bit, ie 11.2%. While the use of a nitrogen source peptone fermentation, produces little dry cell weight (3,031g / L), but the production of PHB many (19.6%).*

**Keywords:** Polyhidroksibutyrate, *Bacillus cereus*, biodegradable plastics, a nitrogen source

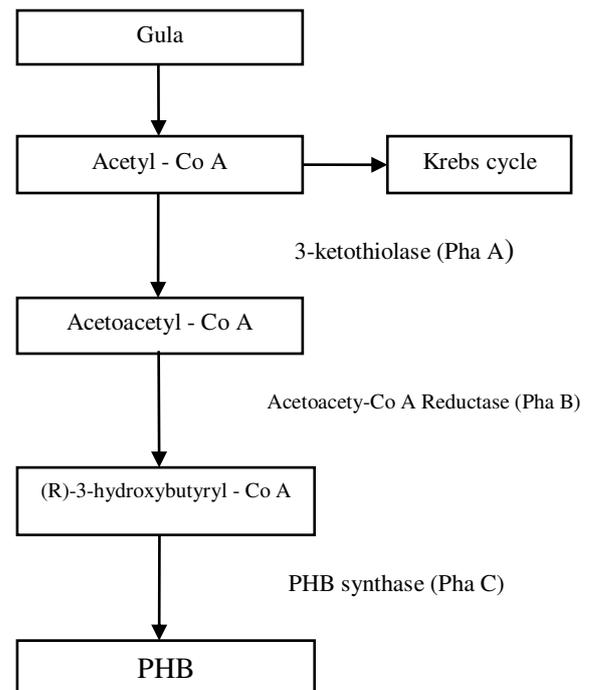
## I. Pendahuluan

Plastik banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Jenis plastik yang banyak digunakan adalah plastik turunan minyak bumi. Salah satu sifat plastik ini adalah mempunyai ketahanan kimia yang tinggi dan sulit dihancurkan oleh alam (non biodegradabel). Karena pemakaian yang banyak menjadikan limbah plastik semakin banyak, dan menjadi salah satu polutan yang sangat besar.

Untuk mengatasi masalah yang ditimbulkan oleh plastik konvensional tersebut adalah dengan membuat material plastik yang mudah diuraikan oleh alam. Plastik semacam ini dinamakan plastik biodegradabel. Jenis plastik ini sangat sesuai dengan siklus karbon alami, karena ketika dibuang ke lingkungan akan didegradasi oleh mikroorganisme sehingga diperoleh hasil CO<sub>2</sub>. Salah satu jenis plastik biodegradabel adalah polyhydroxybutyrate (PHB).

Polyhydroxybutyrate (PHB) merupakan bioplastik microbial, termasuk golongan polyester yang sifatnya mirip dengan plastik konvensional. Selain itu PHB juga bersifat biokompatibel dan terbiodegradasi sempurna. Terbentuknya PHB adalah cara alami bagi bakteri untuk menyimpan karbon dan energi, bilamana pasokan nutrisi tidak seimbang. Poliester ini terbentuk ketika bakteri pertumbuhan dibatasi oleh penipisan jumlah nitrogen, fosfor atau oksigen dan masih adanya kelebihan jumlah sumber karbon [1]. Sementara ini yang paling umum adalah pembatasan nitrogen. Polimer PHB diakumulasi dalam butiran intraseluler (dalam sel). Hal ini menguntungkan bagi bakteri, sehingga dapat menyimpan kelebihan nutrisi dalam selnya.

Dalam metabolismenya, bakteri menghasilkan acetyl-coenzim-A (acetyl-CoA), yang diubah menjadi PHB oleh tiga enzim biosintesis yaitu PhaA, PhaB, dan PhaC. Pada tahap pertama, 3-ketothiolase (PhaA) menggabungkan dua molekul acetyl-CoA untuk membentuk acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA reduktase (PhaB) memungkinkan pengurangan acetoacetyl-CoA oleh NADH menjadi 3-hydroxybutyryl-CoA. Akhirnya, PHB synthase (PhaC) melakukan polimerisasi 3-hydroxybutyryl-CoA menjadi PHB, dan coenzim-A dibebaskan. Hanya (R)-isomer yang diterima sebagai substrat untuk enzim polimerisasi [2]. Mekanisme pembuatan PHB dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme pembentukan PHB [3]

Selama pertumbuhan bakteri normal, 3-ketothiolase akan dihambat oleh Coenzim-A bebas yang keluar dari siklus Krebs. Tapi ketika masuknya acetyl-CoA ke dalam siklus Krebs dibatasi (selama pembatasan nutrisi selain karbon), kelebihan acetyl-CoA disalurkan ke pembentukan PHB [3].

Polyhydroxybutyrate (PHB) diproduksi oleh berbagai bakteri yang berbeda medianya. *Cupriavidus Necator* (sebelumnya dikenal sebagai *Ralstonia eutropha* atau *Alcaligenes eutrophus*) adalah salah satu yang paling sering dipelajari [4]. Imperial Chemical Industries (ICI plc) yang pertama menggunakan strain bakteri ini untuk memproduksi kopolimer PHBV dengan nama dagang Biopol. Beberapa strain penting lainnya yang dipelajari meliputi : *Bacillus spp*, *Alcaligenes spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* dan *Halomonas boliviensis*. Rekayasa genetika adalah alat yang efektif dalam optimasi metabolisme mikroba dalam memproduksi polimer. Strain *Escherichia coli* yang telah dimodifikasi secara genetik menghasilkan PHB dari glukosa dengan Mw sampai 10<sup>7</sup> Da [5].

*Bacillus cereus* merupakan golongan bakteri Gram-positif, yaitu dapat

mempertahankan zat warna kristal violet pada proses pewarnaan Gram. Bakteri bersifat aerob fakultatif, yaitu dapat menggunakan oksigen tetapi dapat juga menghasilkan energi secara anaerobik, dan membentuk spora (endospora). Spora *Bacillus cereus* lebih tahan kondisi panas kering daripada kondisi panas lembab dan dapat bertahan lama dalam produk yang kering. Sel bakteri berbentuk batang besar (bacillus) dan spora bakteri tidak membengkakkan sporangiumnya.

*Bacillus cereus* juga termasuk dalam bakteri penghasil PHB. *Bacillus cereus* mempunyai sifat racun jika dalam kategori makanan dan minuman, akan tetapi jika dimanfaatkan dalam proses pembuatan PHB akan sangat menguntungkan. *Bacillus cereus* dapat menghasilkan PHB dengan syarat mendapat suplai karbon yang cukup sebagai nutrisi dan mengalami kelebihan suplai nitrogen, maka dari itu akan sangat mudah dalam pemberian nutrisi untuk menghasilkan PHB pada jenis bakteri ini.

Bahan yang digunakan untuk produksi PHB dapat diklasifikasikan ke dalam enam kategori, yaitu media berbasis gula, media berbasis pati, media selulosa dan hemi-selulosa, media yang berbasis whey dan media berbasis gliserol serta minyak. Yang paling umum, sebagai sumber karbon murah serta merupakan limbah industri adalah molase. Saat ini telah dilakukan upaya untuk menumbuhkan bakteri pada bahan-bahan terbarukan, seperti minyak nabati dan berbagai limbah industri pertanian [6].

Sel mikroorganisme mengandung Carbon, Nitrogen, Posfor dan Sulfur dengan perbandingan 100:10 : 1 : 1. Untuk pertumbuhan mikroorganisme, unsur-unsur di atas harus ada pada sumber makanannya (substart). Konsentrasi substrat dapat mempengaruhi proses kerja mikroorganisme. Kondisi yang optimum dicapai jika jumlah mikroorganisme sebanding dengan konsentrasi substrat.

Sumber Nitrogen pada proses fermentasi dapat berupa senyawa organik, misalnya pepton, trypton ; maupun senyawa anorganik, misalnya  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Penggunaan sumber nitrogen yang optimal tergantung dari jenis bakteri yang digunakan. Pada proses fermentasi dengan bakteri *Bacillus cereus*, belum diketahui jenis sumber nitrogen yang

dapat menghasilkan pertumbuhan sel dan hasil PHB yang maksimal.

Tujuan penelitian adalah memproduksi PHB dari glukosa. Sedangkan tujuan khusus penelitian adalah mendapatkan jenis sumber nitrogen yang tepat pada proses fermentasi menggunakan bakteri *Bacillus cereus*, supaya menghasilkan produk PHB yang optimal.

## II. Metodologi

### Bahan dan alat

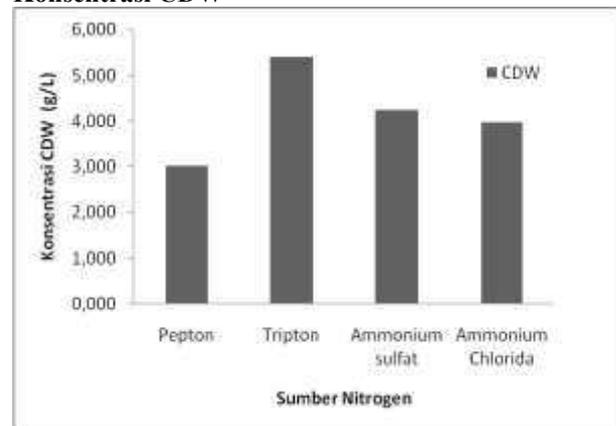
*Bacillus cereus* diperoleh dari Sekolah Tinggi Ilmu Hayati ITB. Sedangkan bahan-bahan kimia untuk fermentasi dan analisa diperoleh dari laboratorium Teknik Kimia UMJ. Peralatan untuk fermentasi bakteri adalah : autoclave, inkubator, shaker, centrifuge dan alat-alat gelas.

### Rancangan Penelitian

Secara singkat tahapan penelitian dibagi menjadi empat tahap. Tahap pertama adalah prekulturi bakteri *Bacillus cereus* menggunakan media Luria Bertani broth, yang bertujuan mendapat bibit yang akan dipakai dalam fermentasi. Selanjutnya tahap kedua adalah pemisahan menggunakan centrifuge bertujuan untuk mendapatkan bibit yang kental. Kemudian tahap ketiga adalah fermentasi glukosa dengan mikroba sehingga menghasilkan PHB. Tahap selanjutnya, setelah selesai fermentasi dilakukan pemanenan untuk sel biomassa. Terhadap sel biomassa kering dilakukan analisa kandungan PHB nya.

## III. Hasil dan Diskusi

### Pengaruh Sumber Nitrogen Terhadap Konsentrasi CDW

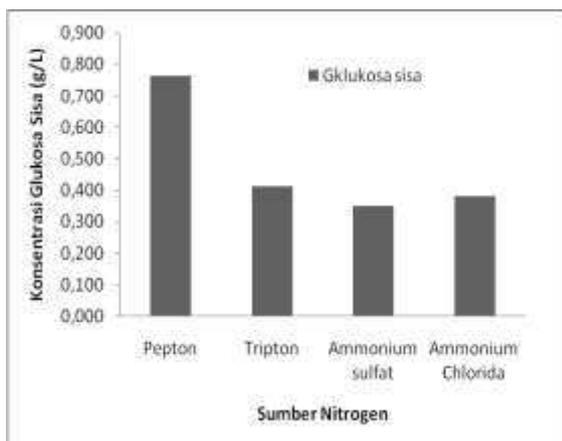


Gambar 2. Grafik Hubungan Variasi Sumber Nitrogen dengan konsentrasi CDW

Pengaruh sumber Nitrogen terhadap konsentrasi CDW yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 2. Konsentrasi CDW paling banyak diperoleh dengan menggunakan sumber Nitrogen dari Trypton, yang merupakan nitrogen organik. Pada penggunaan nitrogen dari bahan anorganik konsentrasi CDW yang didapat tidak terlalu jauh berbeda. Hasil tersebut menunjukkan bakteri *Bacillus cereus* lebih menyukai sumber nitrogen dari Trypton.

#### Pengaruh Sumber Nitrogen Terhadap Konsentrasi Glukosa Sisa

Pengaruh sumber Nitrogen terhadap konsentrasi glukosa sisa dapat dilihat pada Gambar 3. Konsentrasi glukosa sisa terbesar pada pemakaian sumber nitrogen dari Pepton. Konsentrasi Glukosa sisa besar menunjukkan jumlah penggunaan glukosa untuk pertumbuhan kecil, sehingga sel kurang mengalami pertumbuhan. Hal ini mengakibatkan jumlah CDW yang dihasilkan juga sedikit. Hasil tersebut menunjukkan bakteri *Bacillus cereus* kurang menyukai sumber nitrogen dari Pepton untuk pertumbuhannya. Pada penggunaan nitrogen dari bahan anorganik konsentrasi glukosa sisa tidak terlalu jauh berbeda.

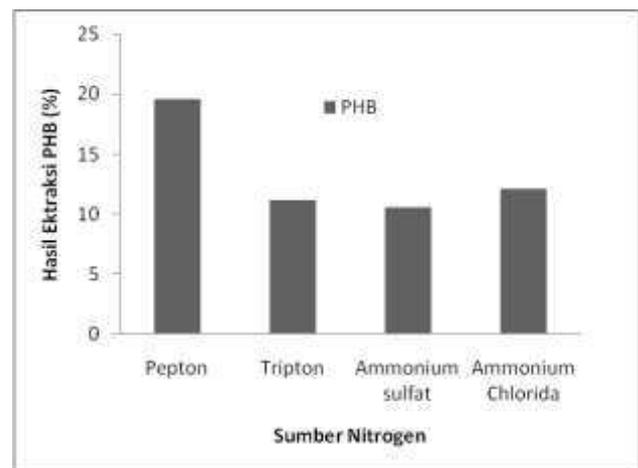


Gambar 3. Grafik Hubungan Variasi Sumber Nitrogen dengan konsentrasi glukosa sisa

#### Pengaruh Sumber Nitrogen Terhadap Konsentrasi PHB Hasil Ekstraksi

Pengaruh sumber Nitrogen terhadap konsentrasi PHB hasil ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 4. Konsentrasi PHB hasil ekstraksi terbesar pada pemakaian sumber nitrogen dari Pepton, walaupun konsentrasi

CDW yang diperoleh paling sedikit. Hasil ini menunjukkan, fermentasi bakteri *Bacillus cereus* dengan menggunakan sumber nitrogen dari Pepton kurang mengalami pertumbuhan sel, tetapi lebih banyak memproduksi PHB di dalam sel nya. Sedangkan pada penggunaan sumber nitrogen dari Trypton, bakteri *Bacillus cereus* lebih banyak melakukan pertumbuhan sel dari pada memproduksi PHB, sehingga hasil ekstraksi PHB yang diperoleh sedikit. Pada penggunaan nitrogen dari bahan anorganik konsentrasi PHB hasil ekstraksi yang lebih besar pada penggunaan sumber nitrogen dari  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .



Gambar 4. Grafik Hubungan Variasi Sumber Nitrogen dengan Hasil ekstraksi PHB

#### IV. Kesimpulan

Penggunaan sumber nitrogen organik lebih disukai oleh bakteri *Bacillus cereus* dibandingkan sumber nitrogen anorganik. Fermentasi oleh bakteri *Bacillus cereus* menggunakan sumber nitrogen Trypton, menghasilkan pertumbuhan sel yang lebih besar sedangkan produksi PHB sedikit. Sebaliknya pada fermentasi menggunakan sumber nitrogen Pepton, menghasilkan pertumbuhan sel sedikit, tetapi produksi PHB banyak.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini, melalui hibah penelitian internal PAKARTI tahun 2016.

**DAFTAR PUTAKA**

- Shang, L., Jiang, M. and Chang, H.N. (2003), Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations, *Biotechnol Lett* 25, 1415–1419.
- Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., Taguchi, K. and Doi, Y. (2005), Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromol Biosci* 5, 112–117.
- Verlinden R.A.J., D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams and I. Radecka, Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Microbiology* 102 (2007), 1437–1449
- Vandamme, P. and Coenye, T. (2004), Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found, *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2285–2289.
- Park, S.J., Choi, J.I. and Lee, S.Y. (2005), Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme Microb Technol* 36, 579–588.
- Lee, K.M. and Gilmore, D.F. (2006), Modeling and optimization of biopolymer (polyhydroxyalkanoates) production from ice cream residue by novel statistical experimental design. *Appl Biochem Biotechnol* 133, 113–148.