

FERMENTASI ASAM ASETAT DENGAN SEL AMOBIL *Acetobacter pasteurianus* INT-7 DENGAN VARIASI pH AWAL DAN KADAR ETANOL

Variation of Initial pH and Ethanol Concentration on Acetic Acid Fermentation by Immobilized Cell of Acetobacter pasteurianus INT-7

Sri Luwihana¹, Kapti Rahayu Kuswanto², Endang Sutriswati Rahayu², Slamet Sudarmadji²

¹Fakultas Agroindustri, Universitas Mercu Buana, Jl. Wates, Yogyakarta. ²Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Yogyakarta 55281.

ABSTRAK

*Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan kondisi optimum fermentasi dengan sel amobil dan hasilnya dibandingkan dengan sel bebas. Penelitian ini diawali dengan pembuatan sel amobil dengan jumlah sel awal 10^7 CFU/mL, larutan alginat 3 %, ratio jumlah sel dan alginat 1:3 (v/v) dan pengkondisian sel amobil pada media pertumbuhan PGY-2 % etanol (pepton glucose yeast extract) pada inkubator goyang 150 rpm, 30 °C selama 1 hari. Sel amobil yang sudah dikondisikan dicuci 2 kali dengan akuades steril dan siap digunakan untuk fermentasi menggunakan media YEPM (yeast extract pepton malt) dengan variasi pH awal (5,5; 6,0 dan 6,5), kadar etanol (5,0; 7,5 dan 10 % b/v) dan waktu fermentasi pada inkubator goyang 150 rpm, 30 °C selama 10 hari. Pengukuran produksi asam asetat dan jumlah sel dilakukan pada hari 1, 3, 5, 7, 8, 9 dan 10 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum fermentasi dengan sel amobil adalah pH awal media 6,0; kadar etanol 7,5 % suhu 30 °C selama 7 hari. Penggunaan sel amobil dalam fermentasi asam asetat dapat meningkatkan resistensi etanol dan waktu optimum fermentasi dicapai lebih lama. Fermentasi dengan sel amobil *Acetobacter pasteurianus* INT-7 pada kondisi optimum menghasilkan asam asetat sebesar 35,81 g/L dan 16,29 g/L pada fermentasi dengan sel bebas. Efisiensi fermentasi dengan sel amobil (36,73 %) lebih besar daripada sel bebas (16,17 %).*

Kata kunci: *Acetobacter pasteurianus* INT-7, sel bebas, sel amobil, alginat

ABSTRACT

*The objective of this study was the optimization condition of acetic acid fermentation by Acetobacter pasteurianus INT-7 immobilized cells. In this study cells immobilized with initiate cell numbers 10^7 CFU/mL and in 3 % alginate solution, ratio of cells number and alginate was 1:3 (v/v) and immobilized cells were conditioned in PGY growth medium supplemented with 2 % ethanol on shaker incubator 150 rpm 30 °C for 1 day and then washed twice with sterile aquadest. Fermentation was done in YEPM (Yeast extract pepton malt) on variation of initial pH (5,5; 6,0 and 6,5) and ethanol concentration (5,0; 7,5 and 10 % w/v) on shaker incubator 150 rpm, 30 °C for 10 days long. The acetic acid production and the cell numbers were monitoring for 1, 3, 5, 7, 8, 9 and 10 days fermentation. The result showed that the optimum condition for acetic acid production by immobilized cells of *A. pasteurianus* INT-7 were initial pH 6,0; ethanol concentration 7,5 % w/v for 7 days fermentation. The immobilization cells could be increase the resistency of ethanol and prolong to achieve of the optimal fermentation time. The acetic acid production of the fermentation by immobilized cell was 35,81 g/L and 16,29 g/L by free cell, the theoretical efficiency of immobilized cell and free cell were (36,73 %) and (16,17 %) respectively.*

Keywords: *Acetobacter pasteurianus* INT-7, immobilized cell, alginate .

PENDAHULUAN

Asam asetat merupakan komponen utama vinegar yang pada umumnya dihasilkan oleh bakteri asam asetat, baik secara tradisional yaitu dengan fermentasi spontan pada bahan dasar yang mengandung gula seperti air kelapa, nira kelapa, nira tebu dan buah-buahan ataupun melalui proses fermentasi terkendali dengan starter bakteri asam asetat (Anonim, 2009). Bakteri asam asetat diketahui memiliki resistensi yang rendah terhadap etanol, sehingga kendala yang sering dihadapi di dalam proses fermentasi asam asetat secara spontan adalah dihasilkannya asam asetat relatif rendah yaitu sekitar 2 % (Kozaki dkk., 1998).

Faktor-faktor yang berpengaruh pada proses fermentasi adalah potensi kultur di dalam memproduksi asam asetat, daya tahan atau resistensinya terhadap etanol sebagai substrat maupun asam asetat sebagai produk, dan kondisi proses yang meliputi konsentrasi substrat, pH awal media, aerasi, suhu serta waktu fermentasi. Salah satu cara yang ditujukan untuk peningkatan produksi asam asetat adalah fermentasi dengan menggunakan sel amobil yaitu sel yang mengalami lokalisasi pada suatu ruang terbatas. Teknik amobilisasi dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan seperti meningkatkan daya tahan atau resistensi terhadap substrat etanol dan resistensi terhadap asam asetat sebagai produk. Bahkan penggunaan sel amobil di dalam proses fermentasi mempunyai keuntungan yaitu kemudahan penggunaan sel kembali (Webb dan Dervakos, 1996).

Amobilisasi sel dapat dilakukan dengan dua cara yaitu adsorpsi pada suatu bahan (*carrier*) atau penjeratan dengan suatu matrik yang berupa gel. Amobilisasi sel dengan cara penjeratan pada matrik alginat paling banyak digunakan sampai saat ini. Adapun alasan penggunaan alginat dalam amobilisasi sel adalah alginat aman sebagai bahan pangan, kekuatan gelnya yang baik dan resiko kerusakan sel karena panas tidak ada, karena proses pembentukan gel kalsium alginat tidak memerlukan panas, sehingga viabilitas dan aktivitas sel dapat tetap dipertahankan (Bucke, 1982; Smidsrod dan Skajk-Braek, 1990 dalam Groboillot dkk., 1994; Tampion dan Tampion, 1988).

Penggunaan matrik alginat untuk amobilisasi sel tersebut masih terbatas pada sel *Acetobacter aceti* NCAIM 001379 (Krisch dan Szajani, 1996) dan sel *Acetobacter* sp (Fumi dkk., 1992) sedangkan strain *Acetobacter pasteurianus* INT-7 belum digunakan pada amobilisasi sel. Dalam proses fermentasi asam asetat menggunakan sel amobil, kondisi fermentasi yang mempengaruhi produksi asam asetat antara lain kadar etanol, suhu dan waktu fermentasi. Krisch dan Szajani (1996) menyatakan bahwa pada fermentasi dengan sel amobil *A. aceti* NCAIM 001379 dengan kadar etanol 5 %, pH awal media tidak mempengaruhi produksi asam asetat. Pada kisaran

pH 5,1 – 6,2 dan suhu optimum 30 °C produksi asam asetat maksimal sebesar 34 g/L.

Ingram (1990) menjelaskan bahwa pada bakteri Gram negatif, etanol dapat meningkatkan permeabilitas membran luar sel yang dikenal dengan Lipopolisakarida (LPS). LPS dengan komponen penyusun *lipid bilayer* berfungsi sebagai *barrier* dari senyawa disekitarnya. Etanol yang masuk melalui LPS akan menyebabkan LPS mengadaptasikan diri untuk sementara waktu dengan meningkatkan aktivitas enzim yang bekerja pada biosintesa asam lemak penyusun membran. Rantai asam lemak bertambah panjang sehingga ketebalan inti hidrofobik meningkat dan menurunkan efektivitas inti hidrofobik membran yang berarti meningkatkan permeabilitas membran.

Di dalam penelitian ini akan dipelajari proses produksi asam asetat menggunakan bakteri lokal *A. pasteurianus* INT-7 yang diisolasi dari nira tebu (Soedarini, 1998). Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa pada kondisi optimum yaitu dengan etanol sebanyak 5 % selama 7 hari pada 30 °C, bakteri ini mampu menghasilkan asam asetat 2,4 %. Selanjutnya parameter yang digunakan untuk mengevaluasi proses fermentasi adalah efisiensi fermentasi teoritis dan laju produksi volumetrik (Qv-g/L jam). Efisiensi teoritis merupakan produksi asam asetat penelitian dibagi produksi asam asetat teori dikalikan 100 %.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Kultur bakteri. Bakteri yang digunakan di dalam penelitian ini adalah *Acetobacter pasteurianus* INT-7 diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Bakteri ini merupakan hasil isolasi dari nira tebu (Soedarini, 1998).

Bahan-bahan kimia. Etanol absolut sebagai substrat dari E-Merck, Natrium alginat sebagai bahan pengamobil diperoleh dari Sigma, CaCl₂, NaOH, bufer fosfat dan bufer sitrat, diperoleh dari Oxoid.

Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah PGY (Pepton Glucose Yeast Extract) dengan komposisi 2 % glukosa, 0,5 % pepton, 0,5 % yeast extract yang ditambah dengan 2 % etanol yang selanjutnya disebut sebagai PGY-2 % etanol untuk media pertumbuhan bakteri asam asetat. Media YEPM (Yeast Extract Pepton Malt Extract) dengan komposisi 0,5 % yeast extract; 0,5 % pepton, 0,5 % malt extract yang ditambah dengan etanol sesuai variasi (5,0; 7,5 dan 10,0 %) yang selanjutnya disebut sebagai YEPM-x % etanol untuk media produksi asam asetat. Berikutnya adalah Pepton

Water untuk pengenceran suspensi sel, Yeast extract, Pepton, Malt extract diperoleh dari Oxoid dan Glucose diperoleh dari Sigma.

Cara Penelitian

Pada penelitian ini dikerjakan beberapa tahapan sebagai berikut: a) penyiapan inokulum, b) pembuatan sel amobil, c) fermentasi asam asetat dengan sel amobil pada berbagai variasi pH awal media dan d) fermentasi asam asetat dengan sel amobil pada berbagai variasi kadar etanol.

Penyiapan Inokulum

Penelitian ini diawali dengan penyiapan inokulum menggunakan 10 mL media PGY-2 % etanol yang diinokulasi dengan 0,1 mL inokulum (umur 2 hari) dengan jumlah sel 10^7 CFU/mL, diinkubasi dengan inkubator goyang 150 rpm, 30 °C selama 2 hari. Selanjutnya dilakukan produksi sel dengan menginokulasikan 10 mL (10^7 CFU/mL) larutan inokulum ke dalam 90 mL media PGY-2 % etanol yang diinkubasikan pada inkubator goyang 150 rpm, 30 °C selama 2 hari dan perhitungan jumlah sel dilakukan dengan cara *dilution and plating*.

Pembuatan Sel Amobil

Pembuatan sel amobil diawali dengan penyiapan larutan alginat 3 % steril dan suspensi sel. Suspensi sel diperoleh dengan melarutkan massa sel hasil sentrifugasi 30 mL kultur bakteri yang jumlah selnya diketahui dengan 1 mL akuades steril. Selanjutnya ke dalam 1 mL suspensi sel ditambahkan larutan alginat 3 % dengan perbandingan suspensi sel dan alginat 1:3 (v/v). Campuran sel dan alginat dihomogenkan dengan vortex, kemudian diteteskan ke dalam 100 mL larutan 0,2 M CaCl_2 dengan alat tetes (modifikasi *syringe* dengan diameter lubang pengeluaran 1 mm) dengan jarak 10 cm dari permukaan larutan 0,2 M CaCl_2 . Hasil penetesan campuran sel dan alginat berupa manik-manik dengan diameter 3-4 mm dan selama penetesan campuran sel dan alginat, pengaduk magnet dijalankan secara pelan. Setelah penetesan selesai manik-manik sel amobil dibiarkan terendam dalam CaCl_2 selama 20 menit, kemudian manik-manik sel amobil dicuci 2 kali dengan akuades steril. Sel amobil yang dihasilkan disimpan dalam larutan pepton 0,1 % pada suhu 4 °C sampai waktu tertentu.

Sebelum sel amobil digunakan untuk fermentasi dilakukan pengkondisian dengan cara sel amobil dimasukkan ke dalam media PGY-2 % etanol steril, kemudian diinkubasikan dengan inkubator goyang 150 rpm 30 °C selama 1 hari. Sedangkan pengkondisian sel bebas dilakukan dengan cara memisahkan sel dari media produksi sel menggunakan sentrifugasi 3500 rpm selama 15 menit, selanjutnya massa sel di

masukkan ke dalam media PGY-2 % etanol dan diinkubasikan dengan cara yang sama untuk sel amobil.

Fermentasi Asam Asetat dengan Sel Amobil pada Variasi pH Awal Media

Pada fermentasi asam asetat dengan sel amobil digunakan media YEPM- 5 % etanol. Pembuatan media pH awal 5,5 dilakukan dengan melarutkan YEPM menggunakan 0,06 M bufer sitrat pH 5,5; media pH awal 6,0 dan 6,5 dilakukan dengan melarutkan YEPM masing-masing dengan 0,06 M bufer fosfat pH 6,0 dan pH 6,5. Sebanyak 30 mL sel bebas (sama dengan jumlah sel yang diamobilkan) yang sudah dikondisikan disentrifugasi dengan 3500 rpm selama 15 menit, massa sel yang diperoleh disuspensikan dengan 10 mL media YEPM-5 % etanol, selanjutnya diinokulasikan ke dalam 90 mL media YEPM-5 % etanol dengan berbagai variasi pH awal media. Demikian juga 10 g sel amobil yang sudah dikondisikan diinokulasikan ke dalam 90 mL media YEPM-5 % etanol dengan berbagai variasi pH awal. Fermentasi dilakukan dalam inkubator goyang suhu 30°C, 150 rpm selama 10 hari. Pada interval waktu (1, 3, 5, 7, 8, 9 dan 10 hari) dilakukan pengamatan jumlah sel dan pengukuran kadar asam asetat. pH awal media (X) yang menghasilkan produksi asam asetat yang maksimal ini digunakan pada fermentasi dengan sel amobil pada berbagai variasi kadar etanol.

Fermentasi Asam Asetat dengan Sel Amobil pada Variasi Kadar Etanol

Fermentasi dengan sel amobil dan sel bebas *A. pasteurianus* INT-7 dilakukan pada kadar etanol yaitu 5 %, 7,5 % dan 10 % (b/v). Sel bebas dan sel amobil yang sudah dikondisikan dan dengan jumlah sel yang sama (10^7 CFU/mL) diinokulasikan ke dalam media YEPM dengan pH awal (X) dan kadar etanol 5 %, 7,5 % dan 10 % (b/v). Fermentasi dilakukan pada kondisi 30 °C, 150 rpm selama 10 hari. Pada interval waktu (1, 3, 5, 7, 8, 9 dan 10 hari) dilakukan pengamatan jumlah sel dan pengukuran produksi asam asetat.

Metode Analisis

Perhitungan jumlah sel. Untuk menghitung jumlah sel yang terjerat dalam manik-manik dilakukan pelepasan sel dari manik-manik dengan cara penambahan 0,2 M buffer fosfat pH 7,2 dengan ratio 1 g manik-manik sel amobil dengan 10 mL 0,2 M bufer fosfat pH 7,2. Setelah alginat larut dilakukan perhitungan jumlah sel terjerat dengan cara *dilution and plating*, begitu juga dengan perhitungan jumlah untuk sel yang lolos dan sel bebas.

Pengukuran pH dan kadar asam asetat. Pengamatan pH dengan pH meter dan pengukuran kadar asam asetat dengan titrasi (Ebner dan Follmann, 1983).

Analisis Hasil Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola sederhana untuk masing-masing perlakuan yaitu pH awal media dan konsentrasi etanol. Data parameter fermel, efisiensi teoritis dan Qv (laju produksi volumetrik- g/L jam).

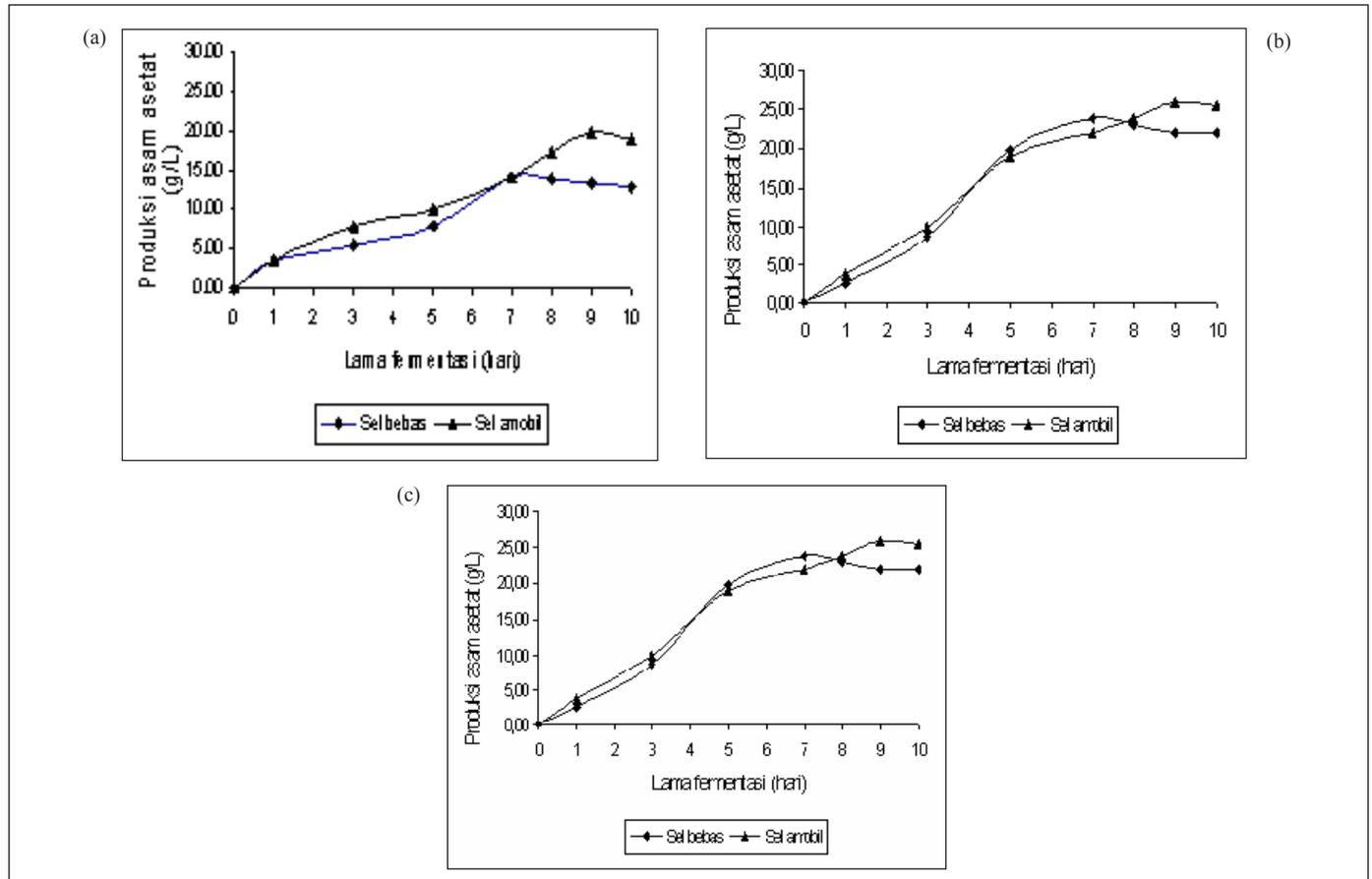
HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi Asam Asetat dengan Sel Amobil pada Berbagai Variasi pH Awal Media

Produksi asam asetat. Produksi asam asetat pada berbagai variasi pH awal menunjukkan bahwa asam asetat terbentuk sejak awal fermentasi dan mencapai maksimal pada hari ke 9 untuk fermentasi menggunakan sel amobil dan hari ke 7 menggunakan sel bebas seperti disajikan pada Gambar 1. Waktu fermentasi optimum dengan sel amobil yang lebih lama ini dikarenakan adanya gel alginat yang melindungi sel dari etanol, sehingga difusi etanol melalui Lipopolisakarida (LPS) berlangsung lebih lambat dari pada sel bebas. Efek alginat yang menghambat difusi etanol ke dalam periplasma seperti yang dijelaskan oleh Webb dan Dervacos (1996).

Fermentasi menggunakan sel bebas dengan pH awal media 5,5 menunjukkan produksi asam asetat lebih rendah daripada fermentasi dengan pH awal media 6,0 dan 6,5 dikarenakan oleh respon katalitik enzim terhadap pH sangat tergantung pada sifat enzim kompleks dari sumber bakteri dan aseptor elektron yang digunakan dalam analisis (Manzo dkk., 2008). Pada penelitian mengenai enzim alkohol dehidrogenase (ADH) dari *Gluconobacter diazotrophicus*, Manzo dkk. (2008) menyatakan bahwa pH 6,0 merupakan pH optimum untuk aktivitas enzim ADH. Beberapa penelitian yang mendukung pernyataan tersebut adalah pH optimum enzim ADH dari *A. aceti* adalah 4,0 (Adachi dkk., 1978), dari *G. polyoxogenes* pH 5,0 – 6,0 (Tayama dkk., 1989) dan dari *G. suboxydans* pada range pH asam sampai netral (Matsushita dkk., 1996).

Penurunan produksi asam asetat yang terjadi pada hari ke 8 untuk sel bebas dan hari ke 10 untuk sel amobil disebabkan oleh oksidasi lebih lanjut asam asetat yang dihasilkan menjadi CO₂ dan H₂O sesuai dengan sifat Genus *Acetobacter* yaitu dapat oksidasi lebih lanjut asam asetat menjadi setelah waktu optimum fermentasi, sehingga konsentrasi asam asetat produk menurun (De Ley dkk., 1994). Penelitian fermentasi



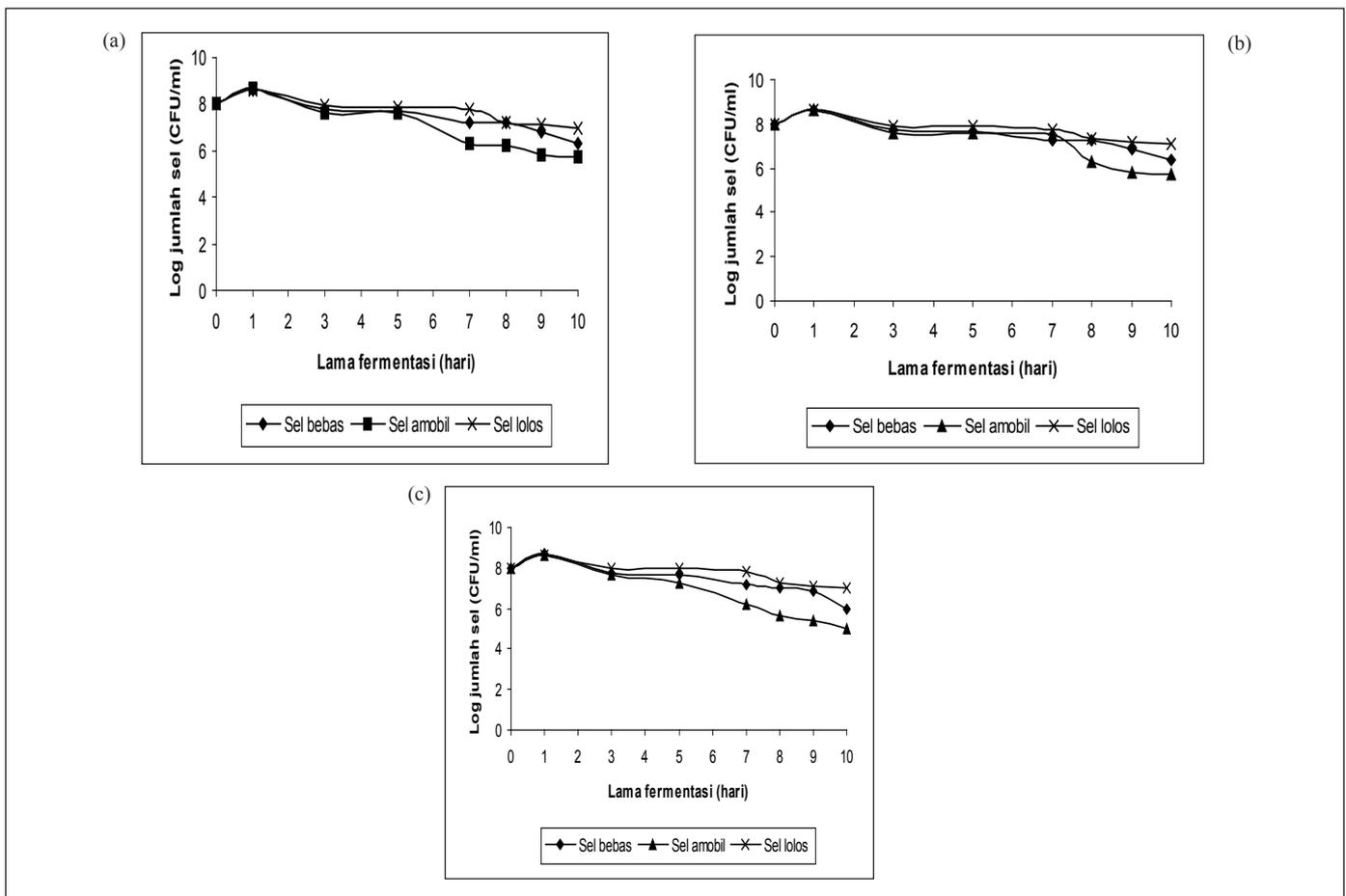
Gambar 1. Produksi asam asetat (g/L) menggunakan sel bebas dan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 dengan variasi pH awal media (a) 5,5; (b) 6,0 dan(c) 6,5, etanol 5 % pada suhu 30 °C

dengan sel amobil *A. aceti* NCAIM 001379 yang telah dilakukan oleh Krisch dan Szajani (1996) juga menjelaskan bahwa pH awal tidak mempengaruhi produksi asam asetat. Gambar 1 memperlihatkan bahwa produksi asam asetat menggunakan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 dengan variasi pH awal media waktu untuk mencapai produksi asam asetat maksimal lebih lama daripada dengan sel bebas ini dikarenakan adanya gel alginat yang melindungi sel dari etanol, sehingga difusi etanol melalui Lipopolisakarida (LPS) berlangsung lebih lambat dari pada sel bebas. Efek alginat yang menghambat difusi etanol ke dalam periplasma tempat berlangsungnya oksidasi etanol menjadi asam asetat ini mengakibatkan produksi asam asetat berjalan lambat tetapi terkendali dan meningkatkan jumlah produksi asam asetat seperti yang dijelaskan oleh Webb dan Dervacos (1996) bahwa amobilisasi sel dapat menyebabkan perubahan fisiologis sel.

Perubahan fisiologis sel dari sel yang diamobilkan antara lain perubahan aktivitas enzim sebagai akibat terkendalinya difusi substrat ke dalam periplasma, kemungkinan adanya perubahan komponen dan karakteristik membran sel karena pengaruh senyawa yang dihasilkan oleh aktivitas en-

zim (Groboillot dkk., 1994). Produksi asam asetat akan menyebabkan penurunan pH fermentasi, seperti yang ditunjukkan pada pengamatan perubahan pH selama fermentasi.

Jumlah Sel Selama Fermentasi. Pada sel yang diamobilkan dengan cara penjeratan ini diduga sel berada di permukaan manik-manik membentuk agregat. Hasil penelitian Mori dkk. (1989), Barbotin dkk. (1990), dan Osuga dkk. (1984) menyatakan bahwa sel yang terjat membentuk agregat dipermukaan manik-manik dengan ketebalan 20-50 μm , masih tumbuh dan memperbanyak diri. Dengan makin banyak jumlah sel di dalam manik-manik dan sifat sel bakteri asam asetat yang motil dan aerob maka sel lolos dari matrik pengamobil ke dalam media fermentasi (Fumi dkk., 1992). Adanya sel yang lolos dari manik-manik dalam fermentasi dengan sel amobil menunjukkan bahwa produksi asam asetat merupakan hasil dari aktivitas enzim sel yang terjat dan kontribusi dari aktivitas enzim sel yang lolos. Jumlah sel bebas, sel yang terjat dan sel yang lolos pada semua variasi pH awal menunjukkan kenaikan 1 log pada hari pertama kemudian terjadi penurunan seperti disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Jumlah sel (CFU/mL) selama fermentasi pada (a) pH awal 5,5; (b) pH awal 6,0 dan (c) pH awal 6,5 menggunakan sel bebas dan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7, etanol 5 % pada suhu 30 °C

Penurunan jumlah sel pada sel bebas, sel yang lolos dan sel yang terjatuh kemungkinan dikarenakan pengaruh asetaldehid hasil oksidasi etanol oleh enzim ADH. Menurut hasil penelitian Meskar dkk. (1996) dan Modig dkk. (2002) senyawa yang bersifat toksis terhadap membran sel adalah asetaldehid bukan etanol.

Asetaldehid merupakan senyawa hasil oksidasi etanol oleh enzim alkohol dehidrogenase (ADH) dapat mempengaruhi komponen asam lemak dalam membran sel seperti kolesterol, fosfolipid dan trigliserida (Meskar dkk., 1996 dan Modig dkk., 2002). Adachi dkk. (1978) menyatakan bahwa produksi asetaldehid dalam proses oksidasi etanol menjadi asam asetat tidak dapat diketahui oleh karena proses oksidasi tersebut berlangsung sangat cepat dan dilanjutkan dengan proses oksidasi asetaldehid menjadi asam asetat oleh enzim aldehid dehidrogenase (ALDH). Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa selama proses oksidasi etanol peningkatan jumlah asetaldehid akan meningkatkan jumlah komponen-komponen membrane sel tersebut sehingga fluiditas membran menurun. Penurunan fluiditas membran menyebabkan gangguan difusi senyawa yang diperlukan untuk pembentukan energi di dalam sitoplasma sehingga proses reproduksi sel mengalami hambatan atau bahkan sel mengalami kematian. Penurunan jumlah sel yang terjatuh lebih besar daripada sel bebas dan sel yang lolos disebabkan karena kemungkinan jumlah asetaldehid hasil oksidasi etanol lebih besar pada sel yang terjatuh sehingga pengaruh asetaldehid terhadap viabilitas sel juga lebih besar. Penurunan jumlah sel yang terjatuh selama fermentasi ini diduga karena sel berhenti tumbuh dan bahkan mungkin mengalami kematian seperti pernyataan Webb dan Dervacos (1996).

Fermentasi Dengan Sel Amobil Pada Variasi Kadar Etanol

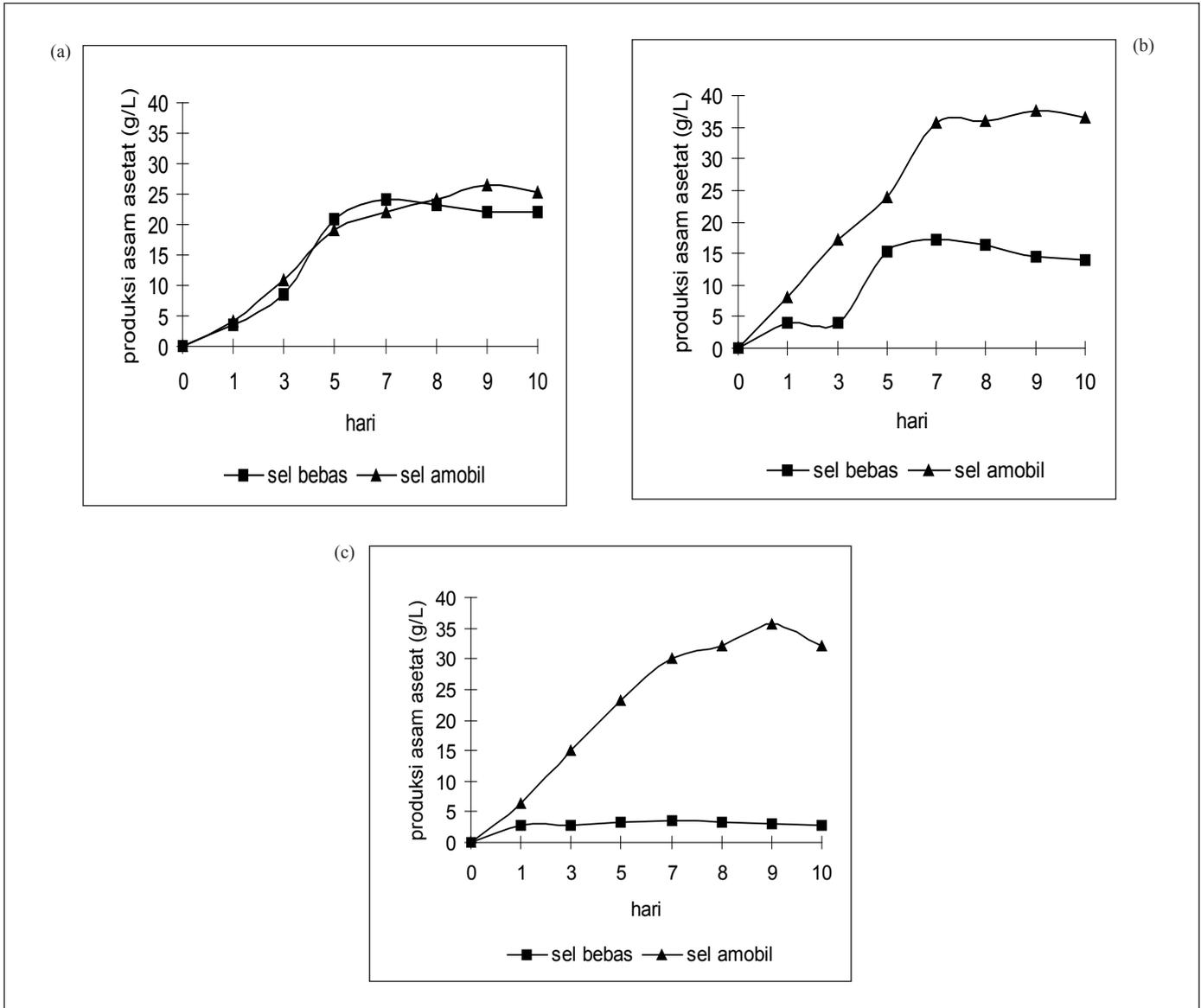
Produksi asam asetat. Tabel 1 menunjukkan bahwa etanol 5 % merupakan konsentrasi optimum sebagai substrat

untuk sel bebas dalam fermentasi asam asetat berdasarkan nilai Qv. Nilai Qv menyatakan produktivitas asam asetat volumetrik (g asam asetat /L jam). Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian Soedarini (1998) yang menyatakan bahwa produksi asam asetat menurun pada penggunaan etanol lebih besar dari 5 %. Selanjutnya Ingram (1990) menyatakan bahwa etanol dapat meningkatkan permeabilitas membran bakteri Gram negatif, sehingga difusi etanol ke dalam sel meningkat. Peningkatan difusi etanol mengakibatkan kenaikan produksi asam asetat. Dari hasil penelitian Soedarini (1998) dan pernyataan Ingram (1990) tersebut diduga pengaruh etanol terhadap peningkatan permeabilitas membran hanya sampai konsentrasi etanol 5 % seperti terlihat pada Gambar 2 (a). Penggunaan sel amobil pada fermentasi dengan konsentrasi etanol 7,5 dan 10 % diduga tidak mempengaruhi permeabilitas LPS dengan akibat difusi etanol ke dalam sel jumlahnya kecil dan produksi asam asetat jumlahnya juga sedikit seperti disajikan pada Gambar 2 (b dan c). Pada sel amobil adanya perlindungan dari alginat difusi etanol terhambat atau lebih tepat terkendali sehingga produksi asam asetat berlangsung lama seperti disajikan pada Gambar 2. Pada sel amobil Qv (laju produksi volumetric) pada etanol 7,5 % merupakan Qv maksimal seperti disajikan pada Tabel 1.

Meskipun pada sel amobil waktu optimum untuk produksi asam asetat adalah 9 hari, akan tetapi dengan pertimbangan Qv yang menurun maka dipilih waktu optimum fermentasi adalah 7 hari. Nilai Qv sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 untuk etanol 7,5 % fermentasi 7 hari sebesar 0,213 g/L jam yang lebih besar dari Qv *A. aceti* NRRL 746 yaitu 0,17 g/L jam (Kocher dkk., 2006). Sebagai pembandingan dipilih penelitian Kocher dkk. (2006) yang menggunakan 4 % alginat untuk amobilisasi sel *A. aceti* NRRL 746 dengan jumlah sel yang terjatuh 10⁶ CFU/mL dan 7 % etanol diinkubasikan selama 28 hari.

Tabel 1. Laju produksi volumetrik (Qv) sel bebas dan sel amobil pada variasi konsentrasi etanol, pH awal media 6,0; 30 °C, 150 rpm

Fermentasi	Laju produksi volumetrik (Qv g/L jam)					
	Etanol 5 %		Etanol 7,5 %		Etanol 10 %	
	Sel bebas	Sel amobil	Sel bebas	Sel amobil	Sel bebas	Sel amobil
Hari 7	0,144	0,074	0,102	0,213	0,021	0,179
Hari 9	0,102	0,122	0,067	0,174	0,014	0,165



Gambar 3. Produksi asam asetat (g/L) menggunakan sel bebas dan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 pada pH awal 6,0 ; 30 °C dengan (a) 5 % etanol; (b) 7,5 % etanol dan (c) 10 % etanol

Penelitian fermentasi asam asetat dengan sel *A. pasteurianus* INT-7 yang telah dilakukan Soedarini (1998) dan Luwihana dkk., (2004) menjelaskan bahwa kadar etanol 5 % selama 7 hari menghasilkan asam asetat yang maksimal. Selanjutnya Gambar 3 (b) menunjukkan bahwa sel *A. pasteurianus* INT-7 dengan resistensi yang rendah terhadap etanol 7,5 % akan mengalami gangguan pertumbuhan sel dan stabilitas enzim yang ada di periplasma sesuai dengan pernyataan Lu dkk. (1999). Adanya gangguan pertumbuhan sel dan stabilitas enzim yang ada di periplasma dapat menurunkan produksi asam asetat. Sel yang terjatuh dalam manik-manik, berada dalam lingkungan tidak normal, sehingga diduga energi untuk pergerakan flagela dialihkan ke produksi enzim, sehingga

produksi asam asetat meningkat. Selanjutnya fermentasi dengan sel amobil adanya pelindung gel alginat, transfer etanol melalui LPS terhambat sehingga proses oksidasi etanol menjadi asam asetat lambat mencapai maksimal pada hari ke-9.

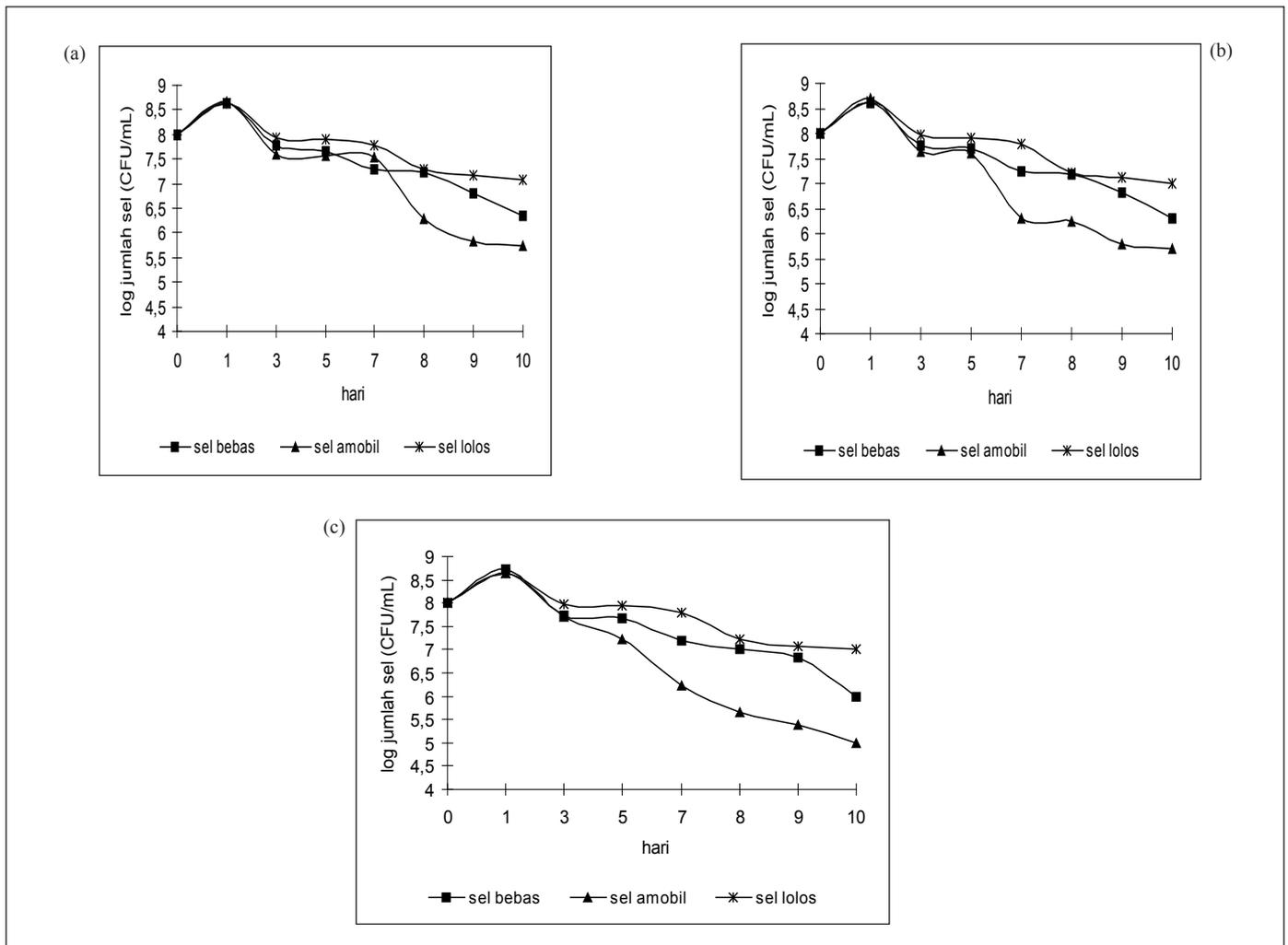
Secara teoritis 1 gram etanol akan dioksidasi menjadi 1,3 gram asam asetat (Adam, 1997), akan tetapi pada kenyataannya tidak mungkin semua etanol dalam media dapat diubah menjadi asam asetat oleh karena etanol juga digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel dan juga menguap selama fermentasi. Pada fermentasi dengan 7,5 % etanol, produksi asam asetat menggunakan sel amobil dan sel bebas masing-masing sebesar 35,81 g/L dan 16,29 g/L. Hasil perhitungan menyatakan bahwa efisiensi

teoritis fermentasi menggunakan sel amobil 36,73 % lebih besar daripada sel bebas (16,17 %).

Jumlah sel selama fermentasi. Pada Gambar 4 (a) fermentasi dengan 5 % etanol, hasil uji statistik menunjukkan bahwa fermentasi optimum pada hari ke 7 jumlah sel bebas, sel yang terjerat dan sel yang lolos tidak berbeda nyata. Fenomena ini menunjukkan bahwa pengaruh asetaldehid terhadap viabilitas sel seperti penjelasan pada variasi pH awal media berlaku untuk sel bebas, sel yang terjerat maupun sel yang lolos dari manik-manik.

Gambar 4 (b) dan (c) pada fermentasi optimum hari ke 7 jumlah sel bebas, sel yang terjerat dan sel yang lolos dari manik-manik berbeda nyata, jumlah sel bebas lebih tinggi daripada jumlah sel yang terjerat. Selanjutnya produksi asam asetat dari sel bebas yang lebih rendah daripada sel amobil ditunjukkan pada Gambar 3 (b dan c). Pada fermentasi dengan sel bebas menggunakan 7,5 % dan 10 % etanol menunjukkan produksi asam asetat yang rendah ini diasumsikan bahwa

asetaldehid hasil oksidasi etanol oleh enzim ADH jumlahnya rendah sehingga pengaruh asetaldehid terhadap viabilitas sel juga rendah. Dengan demikian jumlah sel bebas lebih tinggi daripada jumlah sel yang terjerat. Gambar 4 pada ketiga variasi konsentrasi etanol menunjukkan bahwa jumlah sel bebas dan sel yang lolos dari manik-manik relatif konstan kemungkinan disebabkan oleh jumlah asetaldehid hasil oksidasi etanol oleh enzim ADH juga konstan. Asetaldehid merupakan senyawa yang memotivasi aktivitas enzim yang memproduksi kolesterol, trigliserida dan fosfolipid yang merupakan komponen membran sel (Meskar dkk., 1996). Peningkatan jumlah asetaldehid dalam periplasma dapat meningkatkan jumlah ketiga senyawa komponen membran sel sehingga terjadi penurunan fluiditas membran. Sebagai akibat penurunan fluiditas membran terjadi penurunan permeabilitas membran, sehingga difusi senyawa sumber energi ke dalam sitoplasma terhambat, energi yang diperlukan untuk reproduksi sel berkurang dan akhirnya reproduksi sel terhambat.



Gambar 4. Jumlah sel selama fermentasi asam asetat menggunakan sel bebas dan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 dengan pH awal 6,0; suhu 30 °C dengan (a) 5 %, (b) 7,5 % dan (c) 10 % etanol

Hasil fermentasi dengan variasi etanol menunjukkan bahwa fermentasi dengan sel amobil dapat meningkatkan resistensi etanol dan memperpanjang waktu untuk mencapai produksi maksimal fermentasi. Meskipun jumlah sel yang terjerat menurun selama fermentasi tetapi produksi asam asetat meningkat, dikarenakan sel yang lolos juga mempunyai kontribusi dalam produksi asam asetat. Beberapa dugaan yang dapat menjelaskan penurunan jumlah sel yang terjerat adalah pertama, penurunan sel dalam manik-manik setelah batas pertumbuhan dicapai seperti yang telah dijelaskan Woodward (1985). Dugaan lain adalah seperti yang telah dijelaskan oleh Cheetam (1980) yaitu bahwa sel teramobil seolah-olah berada dalam fase stationer karena terjadinya defisiensi nutrisi atau terbatasnya ruang yang tersedia bagi sel baru. Pada keadaan ini pembelahan sel menjadi terbatas atau terhambat. Penurunan jumlah sel yang terjerat setelah hari pertama kemungkinan terjadi karena kecepatan pembentukan sel baru lebih rendah daripada kecepatan kematian sel.

KESIMPULAN

1. Kondisi fermentasi yang optimum untuk produksi asam asetat menggunakan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 adalah pH awal 6,0; kadar etanol 7,5 % dan suhu 30 °C selama 7 hari.
2. Produksi asam asetat pada kondisi optimum fermentasi dengan sel amobil dan sel bebas berturut-turut sebesar 35,81 g/L dan 16,29 g/L. Efisiensi fermentasi dengan sel amobil (36,73 %) lebih besar daripada sel bebas (16,17 %).
3. Penggunaan sel amobil *A. pasteurianus* INT-7 dalam fermentasi asam asetat dapat meningkatkan resistensi sel terhadap etanol dan memperpanjang pencapaian waktu fermentasi optimum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Diknas melalui BPPS yang telah memberikan bantuan dana selama penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Adachi, O., Miyagawa, E., Matsushita, K., Ameyama, M. (1978). Purification and characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**: 2331-2340.

Anonim, 2009. Acetic Acid. en.wikipedia.org. 20 April 2009.

Barbotin, J.N., Saucedo, I.E.N. dan Thomasset, B. (1990). Morphological observations on immobilized cells. *Da-*

lam: de Bont (Ed.) *Physiology of Immobilized Cells*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

- Bucke, C. (1982). Industrial use of immobilized enzymes and cells. *Dalam*: Flegell, T.M.V., Bhumiratana, A. dan Matangkasombut, P. (Eds). *Immobilized Microbial Enzymes dan Cells*. Proceeding of Regional Workshop. Mahidol University. Bangkok. Thailand.
- Cheetam, P.S.J. (1980). Development in the immobilization of microbial cells and their applications. *Dalam*: Wiseman, A. (Ed). *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Vol. 4. Ellis Horwood, Ltd. West Sussex.
- De Ley, J., Gills, M. dan Swings, J. (1980). *Acetobacteraceae*. *Dalam*: Noel R. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Krieg Williams & Wilkins. Baltimore.
- Ebner, H. dan Follman, H. (1983). Vinegar. *Dalam*: Reed, G. (Ed.) *Food And Feed Production With Microorganism*. Verlag Chemie. Germany.
- Fumi, M.D., Silvia, A., Battistotti, G. dan Colagrande, O. (1992). Living immobilized *Acetobacter* in Ca-alginat in vinegar production: Preliminary study on optimum condition for immobilization. *Biotechnology Letters* **7**: 603-608.
- Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelet, D. dan Neufeld, R.J. (1994). Immobilized cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology* **14**: 75-07.
- Ingram, L.O. (1990). Ethanol tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* **9**: 305-319.
- Kocher, G.S., Kalra, K.L. dan Phutela, R.P. (2006). Comparative production of sugarcane vinegar by different immobilization techniques. *Journal of Institute Brewers* **112**: 264-266.
- Kozaki, M., Iino, H., Matsumoto, T., Dizon, E.I., dan Sanchez, P.C. (1998). Study on the acid-producing bacteria of traditional vinegar from Philippines, Vietnam and Indonesia. Proceeding of International Conference on Asia Network on Microbial Research. Gadjah Mada University, Indonesia.
- Krisch, J. dan Szajani, B. (1996). Effect of Immobilization on biomass production and acetic acid fermentation of *Acetobacter aceti* as a function of temperature and pH. *Biotechnologi Letters* **18**: 393-396.
- Kuswanto, K.R., Dizon, E.I., Thuoc, T.L., Iino, H. dan Kozaki, M. (1998). Studies on the acid-producing bacteria of traditional vinegar; selection dan evaluation on the efficiency of isolated acetic acid bacteria. Proceeding of

- International Conference on Asian Network on Microbial Research. Gadjah Mada University, Indonesia.
- Lu, S.F., Lee, F.L. dan Chen, H.K. (1999). A thermotolerant dan high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. *Journal of Applied Microbiology* **86**:55-62.
- Luwihana, S., Kuswanto, K.R., Sudarmadji, S. dan Rahayu, E.S. (2004). Produksi asam asetat oleh sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 amobil pada variasi kadar etanol. *Agritech* **24**: 70-77.
- Manzo, S.G., Zentella, M.C., Valdez, A.G., Torres, M.S., Espinoza, R.A. Marvan, E.E. (2008). The PQQ-Alcohol Dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *International Journal of Food Microbiology* **125**: 71-78.
- Meskar, A., Holownia, A., Bardou, L.G. dan Menez, J.F. 1996. Effect of Acetaldehyde Generated from Ethanol by ADH-Transfected CHO Cells on Their Membrane Fatty Acid Profiles. *Alcohol* **13**: 611-616.
- Modig, T., Linden, G. dan Taherzadeh, M.J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **363**: 769-776.
- Mori, A., Matsumoto N. dan Imai, C. (1989). Growth behavior of immobilized acetic acid bacteria. *Biotechnology Letters* **11**: 183-188.
- Osuga, J., Mori, A. dan Kato, J. (1984). Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in a k-carrageenan gel. *Journal of Fermentation Technology* **63**: 57-60.
- Saparianti, E. (1998). *Amobilisasi Sel Pediococcus acidilactici F II Penghasil Bacteriosin pada Gel Kalsium Alginat*. Tesis. Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan. Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
- Soedarini (1996). *Seleksi dan Identifikasi Bakteri Asam Asetat "Acido-Ethanol Tolerant" untuk Fermentasi Vinegar*. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Tampion, J dan Tampion, M.D. (1988). *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Tari, A.I.N. (1999). *Viabilitas dan Stabilitas Sel Amobil Pediococcus acidilactici F II Penghasil Pediosin PaF11*. Tesis. Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan. Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
- Tayama, K., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. dan Beppu, T., (1989). Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**: 181-185.
- Webb, C. dan Dervakos, G.A. (1996). *Studies in Viable Cell Immobilization*. Academic Press. California.
- Woodward, J. (1985). *Immobilized Cells dan Enzymes. A Practical Approach*. IRL. Press. Washington DC.