

Produksi Poli-β-Hidroksibutirat (PHB) Menggunakan Bakteri *Burkholderia cepacia*

Sri Wahyu Murni dan Gunarto

Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri UPN "Veteran" Yogyakarta
Jl SWK 104 Lingkar Utara Condongcatur Yogyakarta telp. 0274 486889

Abstract

Plastics have important roles nowadays. However, its non-biodegradable property potentially makes a great problem because of the accumulation of its waste. Therefore, many researches about biodegradable plastics have been developed. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) is an alternative material to produce biodegradable plastics. The objectives of this research are to study the production of PHB by using *Burkholderia cepacia* bacteria and soluble starch substrate and determine the kinetics parameters including maximum specific growth rate (μ_{maks}), saturation constant (K_s), and yield ratio of product-to-bacterial cell ($Y_{P/X}$). Fermentation was conducted at room temperature by using Ramsay medium with soluble starch at certain concentrations. The starter of *Burkholderia cepacia* incubated for 24 hours was inoculated as many as 10% by volume. The PHB product and dry cell weight were analyzed at certain several time intervals. This experiment was repeated at variation of phosphate concentrations. This research showed that the optimum cell growth and PHB production was obtained at soluble starch concentration of 8 g/100 ml and growth period of 72 hours. At this condition, the results were the dry cell weight of 7.5 mg/ml and PHB concentration of 0.0095 mg/ml. The values of kinetics parameters were μ_{maks} of 0.01292 g/ml.h, K_s of 0.2854 g/100ml, $Y_{P/X}$ of 0.00143. The accumulation of PHB was optimum at limited phosphate concentration. It could be also concluded that *Burkholderia cepacia* was a non-effective bacteria to produce PHB.

Keywords: Poly-β-hydroxybutyrate (PHB), biodegradable plastics.

Pendahuluan

Penggunaan plastik mempunyai peranan penting pada masa sekarang ini. Sifatnya yang awet dan fleksibel menjadi suatu kelebihan tersendiri dibanding bahan-bahan lainnya. Namun, penumpukan limbah plastik menjadi suatu masalah yang belum bisa teratasi sampai sekarang, meskipun berbagai usaha daur ulang telah dilakukan. Hal ini dikarenakan plastik yang banyak digunakan saat ini adalah polimer buatan yang mempunyai sifat non biodegradabel. Disamping itu bahan baku plastik pada umumnya yang merupakan produk dari pabrik petrokimia dimana sangat tergantung pada ketersediaan bahan baku fosil sebagai bahan baku. Sedangkan bahan tersebut jumlahnya di alam terbatas yang semakin lama semakin menipis.

Dengan demikian perlu suatu usaha untuk mencari alternatif-alternatif lain sebagai bahan baku pembuatan plastik demi ketersediaannya di masa yang akan datang dan dalam rangka menjaga kelestarian lingkungan. Salah satu alternatif yang dikembangkan adalah pemanfaatan PHB (Poli-β hidroksibutirat) sebagai salah satu bahan dasar pembuatan plastik. PHB adalah suatu polimer yang termasuk dalam kelas poliester dihasilkan di dalam sel mikroba dan digunakan sebagai cadangan energi. PHB mempunyai beberapa kelebihan yaitu dapat didaur ulang dengan cepat oleh bakteri tanah (*biodegradabel*), termostabil dan fleksibel. Karena dihasilkan oleh mikroba, sehingga PHB merupakan suatu bahan yang terbaharui (*renewable resource*).

PHB dapat diproduksi oleh golongan bakteri, ada banyak spesies bakteri penghasil PHB, salah satunya adalah *Burkholderia cepacia*. Salah satu kendala dalam komersialisasi PHB adalah biaya produksinya yang mahal, karena dalam proses pembuatannya menggunakan substrat

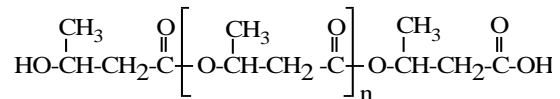
glukosa. Oleh karenanya perlu dicari alternatif sumber karbon yang murah, misalnya pati. Dalam penelitian ini akan dipelajari produksi PHB dari bakteri *Burkholderia cepacia* dengan substrat pati terlarut sebagai sumber karbon.

Tinjauan Pustaka

Poli-β hidroksibutirat (PHB)

Poli-β-hidroksibutirat (PHB) termasuk dalam golongan poliester yang dihasilkan dalam sel tubuh bakteri yang memproduksinya. PHB ini mulai dikembangkan antara tahun 1923 dan 1926 oleh seorang ahli biologi Perancis yang bernama *Mourice Lemoigne*. (www.wikipedia.org/wiki/Polyhidroxybutirate)

Struktur molekul PHB ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Molekul PHB

PHB digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan plastik, merupakan *biodegradable plastic* (dapat didaur ulang dengan cepat oleh bakteri tanah), selain itu PHB juga mempunyai kelebihan yaitu termostabil dan fleksibel.

PHB merupakan cadangan sumber karbon yang berbentuk polimer yang terakumulasi dalam bentuk granula intraseluler dengan ukuran bervariasi 0,2 – 0,5 μm dan diselubungi lapisan tipis dengan tebal sekitar 2 nm. Pada dasarnya PHB yang terakumulasi dalam sel bakteri adalah

cadangan energi bagi bakteri tersebut. Oleh karena itu, pada saat substrat eksternal masih berlebihan untuk keperluan bakteri, maka bakteri akan memproduksi PHB dan menyimpannya sebagai granula di dalam sel. Setelah substrat eksternal ini habis, bakteri mulai mengkonsumsi simpanan karbon dalam bentuk PHB tersebut.

Dalam produksi PHB secara komersial, pemanenan dilakukan pada saat akumulasi PHB maksimum. Untuk menentukan waktu pemanenan yang optimum diperlukan informasi mengenai kecepatan pembentukan PHB dan kaitannya dengan lama waktu fermentasi serta jumlah substrat sebagai sumber karbon dan fosfat yang berpengaruh langsung terhadap populasi sel dalam medium.

Bakteri Penghasil PHB

Beberapa spesies dari golongan bakteri yang mampu menghasilkan PHB adalah: *Alcaligenes eutrophus H-16*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas deovorans*, *Escherichia coli*. (Margino dkk, 2000; Brandl and Co.,1988; Sabra, 1999). Bakteri yang digunakan sebagai penghasil PHB dalam penelitian ini adalah dari species *Burkholderia cepacia* karena mampu memproduksi PHB dengan menggunakan substrat glukosa. Pertumbuhan optimum bakteri ini adalah pada suhu sekitar 27-35°C dan termasuk bakteri aerob (Singleton and Sainsbury, 1981). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Young Kastner (1994) dinyatakan bahwa dalam 10 g glukosa dalam 1 liter medium, bakteri tersebut mampu memproduksi PHB sebanyak 2,8 g (Margino dkk, 2000).

Fermentasi untuk produksi PHB

Fermentasi dalam produksi PHB terjadi dengan adanya perubahan substrat yang mengandung sumber glukosa menjadi produk PHB dengan bantuan bakteri, antara lain *Burkholderia cepacia*. Metabolisme bakteri penghasil PHB dapat diketahui dari jalur biosintesis pembentukan PHB itu sendiri. Menurut Entner-Doudorff pathway, biosintesis PHB dari bakteri dimulai dengan kondensasi dua molekul *acetyl-CoA* untuk membentuk *acetoacetyl-CoA*, yang kemudian direduksi menjadi *hydroxybutyryl-CoA*. Senyawa ini kemudian digunakan sebagai monomer untuk membentuk polimer PHB.

PHB dapat diakumulasi oleh sel bakteri yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung konsentrasi karbon tinggi tetapi nitrogen dan fosfatnya terbatas (Margino dkk, 2000) . Tetapi dalam penelitian yang dilakukan Sabra (1999) dinyatakan bahwa dengan adanya fosfat yang berlebih dapat dihasilkan akumulasi PHB yang besar.

Sumber karbon dapat diperoleh dari karbohidrat misalnya substrat pati yang harganya relatif murah. Pati termasuk karbohidrat dari golongan polisakarida yang mengandung amilum. Amilum dapat dihidrolisis menghasilkan glukosa. Karbon digunakan bakteri sebagai sumber energi bagi metabolisme selnya (Volk & Wheeler, 1988). Pada penelitian ini digunakan substrat pati

Kinetika reaksi produksi PHB

Perbanyakkan sel mikroba berlangsung dengan

penggandaan, setiap satu sel menjadi dua sel dalam periode waktu yang konstan yang disebut waktu penggandaan. Dalam suatu interval waktu yang singkat (dt) akan terjadi kenaikan jumlah berat sel (dX) yang proporsional dengan jumlah berat sel yang ada, sebagaimana ditunjukkan oleh persamaan 1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \dots\dots (1)$$

Menurut Monod, pengaruh kadar substrat terhadap kecepatan pertumbuhan dapat mengikuti konsep kinetika enzim yang dirumuskan oleh Michaelis-Menten. Maka kecepatan pertumbuhan dapat dirumuskan adalah sebagai berikut (Ward, 1989)

$$\mu = \frac{\mu_{maks} S}{K_s + S} \dots\dots (2)$$

PHB merupakan cadangan makanan bagi mikroba, oleh karenanya pembentukannya mengikuti pola *growth associated product formatian*. (Humprey dan Millis, 1973). Hubungan antara kecepatan pertumbuhan sel dan kecepatan pembentukan produk dinyatakan dengan persamaan (3).

$$\frac{dP}{dt} = \left(Y_{p/x} \right) \frac{dX}{dt} \dots\dots(3)$$

Dari persamaan (3) maka harga $Y_{p/x}$ adalah:

$$Y_{p/x} = \frac{dP}{dX} \dots\dots (4)$$

Metodologi

Bahan dan Alat

Pati terlarut (*comercial soluble starch*) diperoleh dari Lab. Mikrobiologi, Fak. Pertanian UGM, bakteri *Burkholderia cepacia* diperoleh dari PAU UGM.

Media agar miring

Komposisi per 100 ml: 0,1 g *beef extract* ('lab.Lemco'powder), 0,2 g *yeast extract*, 0,5 g pepton, 0,5 g NaCl, 1,5 g agar, pH 7,4 ± 0,2.

Media starter

Media yang digunakan untuk membuat starter adalah *Nutrient Glukosa Yeast Broth* (NGYB). NGYB dengan komposisi per 100 ml adalah: 0,5 g pepton, 0,3 g *beef extract*, 1 g glukosa, 0,3 g *yeast extract*.

Media fermentasi

Media fermentasi menggunakan medium Ramsay dengan komposisi per 100 ml: 0,67 g Na₂HPO₄; 0,15 g NH₂PO₄; 0,1 g (NH₄)₂SO₄; 0,02 g MgSO₄; 0,006 g Ferrous Ammonium Citrat; 0,001 g CaCl₂; 0,1 ml *trace element*; pati (dengan variasi 2 g, 4 g, 6 g, 8 g)

Bahan pembantu untuk analisis

kloroform, H₂O₂ 10%, H₂SO₄ pekat

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa fermentor kapasitas 1 liter di dalam *shaker incubator*.

Cara Percobaan

Percobaan meliputi 3 tahap yaitu peremajaan bakteri, pembuatan starter dan fermentasi produksi PHB.

Peremajaan Biakan Bakteri

Biakan bakteri *Burkholderia cepacia* diperbanyak dengan cara memindahkan biakan bakteri pada media agar miring yang baru. Peremajaan dilakukan dengan inkubasi selama 1-3 hari.

Pembuatan Starter

Setelah media starter siap kemudian diinokulasikan 2 ose bakteri dari agar miring dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 32°C selama 24 jam.

Fermentasi Produksi PHB

Produksi PHB dilakukan dalam fermentor (Erlenmeyer) berkapasitas 1 liter di dalam *shaker incubator*. Media fermentasi steril sebanyak 200 ml dimasukkan ke dalam fermentor, kemudian diinokulasikan 20 ml starter. Percobaan dilakukan dengan variasi konsentrasi pati (2 g, 4 g, 6 g, 8 g) per 100 ml. Selama percobaan suhu dijaga pada suhu ruangan. Pengambilan sampel dilakukan setiap 24 jam, sebanyak 10 ml *fermentation broth*. Dilakukan analisis berat kering sel menggunakan metode gravimetri dan konsentrasi PHB. Percobaan diulangi dengan variasi konsentrasi PO_4 (0,05 g; 0,1 g; 0,15 g; 0,2 g) per 100 ml dan difermentasikan selama waktu tertentu (waktu dimana produk

PHB paling maksimum) yang telah diperoleh pada percobaan sebelumnya.

Analisis Hasil

Analisis Kadar PHB

Sel dalam sampel dipisahkan dari medium dengan *centrifuge* pada kecepatan 4000 rpm, selama 15 menit. Supernatan dibuang, sehingga didapatkan pellet. Kemudian pellet ditambahkan aquadest hingga volume suspensi sel 5 ml, setelah itu dianalisis kadar PHBnya. Diambil 1 ml suspensi sel dan ditambahkan 5 ml chloroform, kemudian ditambahkan 5 ml H_2O_2 10%. Setelah itu diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu kamar selama 2 jam, 150 rpm. Selanjutnya *dicentrifuge* pada 4000 rpm selama 20 menit. Akan terbentuk 2 lapisan yang dipisahkan oleh padatan sel, lapisan atas berupa H_2O_2 dan lapisan bawah berupa campuran chloroform dan PHB. Lapisan atas (supernatan) dan padatan sel dibuang. Bagian bawah diambil dan dituang ke cawan petri. Setelah itu dibiarkan chloroform menguap sehingga menjadi kering dan didapat pellet kering. Kemudian ditambahkan 5 ml H_2SO_4 pekat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dididihkan dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 10 menit dan diukur absorbansinya (OD) dengan UV-VIS Spektrofotometer 238 nm.

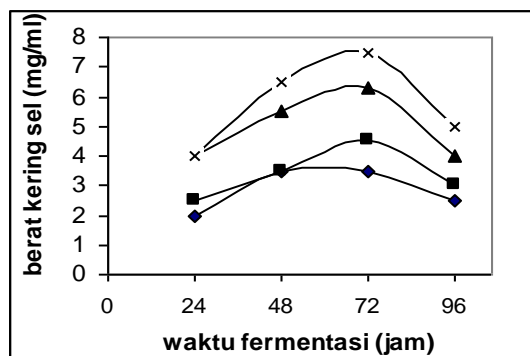
Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian tentang pengaruh kadar pati terhadap massa sel dan konsentrasi PHB disajikan pada Tabel 1 dan 2 serta Gambar 2 dan 3

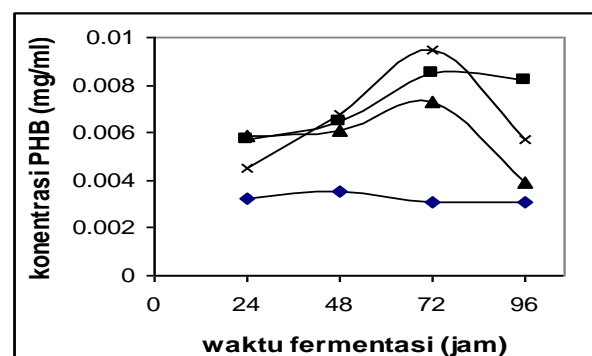
Tabel 1. Hubungan antara Jumlah Massa Sel dan Konsentrasi PHB dengan Waktu pada berbagai Kadar Substrat.

Volume media fermentasi	: 200 ml	pH	: 7.3
Suhu	: suhu ruangan ($\pm 28^\circ C$)	Kadar PO_4	: 0.15 g/100 ml
Volume starter	: 20 ml		

Konsentrasi substrat (g/100 ml)	Massa sel (mg/ml)				Konsentrasi PHB (mg/ml)			
	2	4	6	8	2	4	6	8
Waktu (jam)								
24	2	2.5	4	4	0.0032	0.0057	0.0059	0.0045
48	3.5	3.5	5.5	6.5	0.0035	0.0065	0.0061	0.0068
72	3.5	4.5	6.3	7.5	0.0031	0.0085	0.0073	0.0095
96	2.5	3	4	5	0.0031	0.0082	0.0039	0.0057



Gambar 2. Hubungan berat kering sel dengan waktu fermentasi pada berbagai konsentrasi substrat (g/100 ml): (◆), 2; (■), 4; (▲), 6; (*), 8.



Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi PHB dengan waktu fermentasi pada berbagai konsentrasi substrat (g/100 ml): (◆), 2; (■), 4; (▲), 6; (*), 8.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi pati berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan perolehan PHB. Semakin besar konsentrasi pati maka berat sel yang dihasilkan juga semakin besar. Pada awal masa inkubasi hingga jam ke 72 terjadi pertumbuhan sel yang cepat, selanjutnya terjadi fase stasioner. Peningkatan konsentrasi pati juga menunjukkan peningkatan akumulasi PHB. Berdasarkan hasil tersebut maka pola pembentukan PHB menggunakan bakteri *Bulkhoderia cepacia* mengikuti pola *growth asosiated product formation*. Namun pada konsentrasi substrat 2 g/100 ml, pola pertumbuhan sedikit berbeda, fase stasioner terjadi setelah jam ke 48, demikian juga akumulasi PHBnya. Data menunjukkan akumulasi pada konsentrasi substrat 2 g/100ml sangat rendah, hal ini disebabkan PHB akan disintesa sel pada konsentrasi substrat yang tinggi karena berfungsi sebagai cadangan makanan bagi sel.

Berdasarkan data pada Tabel 1, kemudian dihitung parameter kinetika yaitu kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) juga yield produk PHB terhadap sel ($Y_{P/X}$), hasil-hasil disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hubungan antara parameter kinetika dengan Kadar Substrat

konsentrasi substrat (S) (g/100 ml)	μ rata-rata (g/ml.jam)	$Y_{P/X}$ (mg PHB/mg sel)
2	0.01136	0.00040
4	0.01190	0,00139
6	0.01223	0,00120
8	0.01268	0,00143

Hasil tersebut menunjukkan bahwa harga μ makin meningkat dengan semakin meningkatnya konsentrasi substrat, demikian pula untuk $Y_{P/X}$. Selanjutnya diperoleh kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) optimal 0,1268 g/ml.jam, kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) 0,01292 g/ml.jam, K_s 0,2854 g/100 ml, *gowth yield* produk terhadap sel ($Y_{P/X}$) sebesar 0,00143 (g PHB/g sel) pada kadar substrat 8 g/100 ml. Hasil ini menunjukkan bahwa akumulasi PHB sangat kecil yaitu hanya 0,143% dari berat kering selnya. Cahyono (2006) melaporkan akumulasi PHB mencapai 57% dari berat kering selnya. Maka dapat disimpulkan bahwa bakteri *Bulkhoderia cepacia* tidak produktif sebagai bakteri penghasil PHB.

Pengaruh Kadar Fosfat

Percobaan dilakukan pada konsentrasi pati 4 g/100 ml dan waktu fermentasi 72 jam, hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hubungan antara Konsentrasi Fosfat terhadap konsentrasi PHB

Kadar PO ₄ (g/100 ml)	konsentrasi PHB (mg/ml)
0.05	0.0087
0.10	0.0082
0.15	0.0081
0.20	0.0075

Percobaan ini dilakukan berdasarkan pernyataan Margino dkk (2000) bahwa PHB diproduksi jika konsentrasi fosfat terbatas, tetapi Sabra (1999) menyatakan sebaliknya yaitu pada konsentrasi fosfat makin besar maka produksi PHB makin meningkat. Data pada penelitian ini menunjukkan bahwa produksi PHB semakin

kecil dengan kenaikan konsentrasi fosfat, maka untuk bakteri *Bulkhoderia cepacia* sesuai dengan pernyataan Margino dkk (2000) bahwa pembentukan PHB semakin besar pada konsentrasi fosfat terbatas

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Substrat pati terlarut (*soluble starch*) dapat menghasilkan poli- β -hidroksibutirat (PHB) dengan proses fermentasi dengan bantuan bakteri *Burkholderia cepacia*.
2. Semakin tinggi konsentrasi substrat pada rentang 2 g/100 ml sampai dengan 8 g/100 ml maka kecepatan pertumbuhan sel meningkat.
3. Kecepatan pembentukan PHB dipengaruhi oleh kecepatan pertumbuhan sel. Kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) adalah 0.01292 g/ml.jam dan harga K_s : 0.2854 g/100ml, *Growth Yield* produk terhadap sel ($Y_{p/x}$) optimal adalah 0.00143 pada konsentrasi substrat 8 g/100 ml.
4. Pembentukan produk PHB akan meningkat dengan menurunnya konsentrasi nutrisi fosfat dalam medium fermentasi pada rentang konsentrasi fosfat antara 0.05 g/100 ml sampai dengan 0.2 g/100 ml.
5. Bakteri *Burkholderia cepacia* tidak produktif sebagai penghasil PHB.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Saudara Farida N. Dan Anggun B.N. yang telah membantu dalam pengambilan data.

Daftar Pustaka

Brandl. H., R.A. Gross and C. Chavarie, 1988, "Pseudomonas oleovorans as a Sources of Poly- β Hydroxyalkanoates for Potential Application as Biodegradable Polyester", Applied and Environmental Microbiology, 54 : 1977-1982

Cahyono, dkk., 2006, "Pengaruh Kadar Pati pada Kecepatan Pembentukan Poly- β Hydroxybutirate (PHB) oleh Bakteri Amilolitik Penghasil Biopolimer dengan Limbah Industri Tapioka sebagai Bahan Baku", Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan", Jurusan Teknik Kimia UPN "Veteran" Yogyakarta

Demain A.L., and Solomon N.A., 1986, "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology", American Society for Microbiology, Washington, D.C

Humphrey, A.E dan Nancy F.L., 1973, Biochemical Engineering, Unyversity of Tokyo Press, edisi ke dua, Tokyo

Margino, S., E. Martani, Soesanto, A. Yuswanto, dan L. Sembiring, 2000, "Isolasi dan seleksi bakteri penghasil plastik terdegradasi, poli- β -hidroksibutirat", Biologi, Vol.2, No. 10, 583-597

Sabra, W., 1999, "Microaerophilic Production of Alginat by *Azotobacter vinelandii*", A stoichiometric study, 8th European Congress on Biotechnology, p.p. 1-67, Budapest, Hungary

Singleton, P. and Sainsbury, D., 1981, "Introduction to Bacteria", p.p. 154, Brisbane, Toronto, New York

Volk and Wheeler, 1998, "Mikrobiologi Dasar", ed. 5, hal. 81 – 92, Erlangga, Jakarta

Ward, O. P., 1989, "*Fermentation Biotechnology: principles, processes, product*", Oxford University Press, Manchester

Wibowo, dkk., 1988, "*Prinsip-prinsip Teknologi Fermentasi*", 48-72, PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Winarno, F.G., 1993, "*Pangan Gizi, Teknologi dan Konsumen*", cetakan 1, hal.27, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta

<http://scisoc.org/feature/BurkholderiaCepacia/html>
download: 16-02-2007

<http://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxybutirate>
download: 16-02-2007