

KINETIKA PERTUMBUHAN BAKTERI *BACILLUS* sp. DALAM MEDIUM GLUKOSA SEBAGAI SUMBER KARBON DAN AMONIUM SULFAT SEBAGAI SUMBER NITROGEN

Margono*

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sebelas Maret
Jl. Ir. Sutami no. 36 A, Surakarta 57126 Telp/fax: 0271-632112

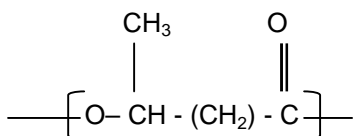
*Email: mrgono04@yahoo.com

Abstract: Carbon and nitrogen compounds are macro nutrients for bacterial growth. Nevertheless, its high concentration is potential to inhibit bacterial growth. The objective of this research is to study the effects of glucose and ammonium concentrations to the growth of *Bacillus* sp. producing polyhydroxybutyrate. The experiments was conducted in shaken flask of 250 mL with working volume of 70 mL. Fermentation was incubated in incubator shaker at environmental temperature, initial pH of 7.0, and shaking speed of 130 rpm. The best growth was happened at glucose concentration of 10 g/L and ammonium concentration of 1.4 g/L. The kinetics constants are μ of 0.148 hour⁻¹, Ks (glucose) of 0.413 g/L, and Ks (ammonium) of 0.038 g/L. At high concentration, glucose and ammonium tended to inhibit growth of the bacteria by different pattern. The inhibition constants of glucose and ammonium are 291.022 g/L and 32.913 g/L respectively.

Keywords: *Bacillus* sp., polyhydroxybutyrate, inhibition constants, maximum concentration

PENDAHULUAN

Polyhydroxybutyrate (PHB) adalah poliester alifatik yang memiliki sifat-sifat termoplastik (Nawrath et al., 1999). PHB memiliki potensi sebagai pengganti polimer berbasis minyak bumi karena beberapa sifatnya, antara lain termoplastik, dapat terdegradasi oleh mikroorganisme (biodegradabel), bahan baku terbarukan, tak beracun (*nontoxic*), *biocompatible*, tak larut dalam air, berbentuk kristalin, bersifat optik aktif, *isotactic*, dan *piezoelectric*.



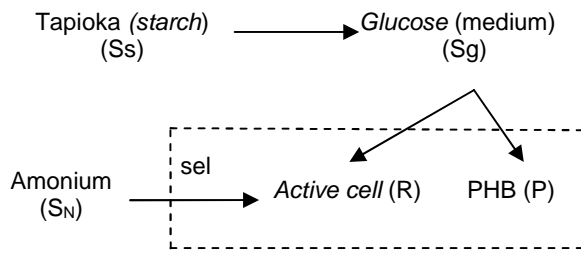
Gambar 1. Rumus Bangun Polyhydroxybutyrate

PHB adalah anggota dari *polyhydroxyalkanoate* (PHA). Bahan ini disintesis oleh bakteri dari berbagai substrat sebagai sumber karbon, yaitu bahan baku terbarukan (sukrosa, pati, selulosa, *triacylglycerol*, dll), bahan baku fosil (metana, *mineral oil*, *lignite*, *hard coal*, dll), produk samping (*molasses*, gliserol, *whey*, dll), dan bahan kimia (asam propionat, asam 4-hidroksi butirat, dll) (Reddy et al., 2003). Beberapa strain

bakteri dinilai sebagai bakteri yang potensial dalam mensintesis PHB, yaitu *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus* (Wang and Lee, 1997; Grothe and Chisti, 2000), dan *Escherichia coli* rekombinan (Ahn et al., 2000; Ahn et al., 2001; Park et al., 2002).

Bahan lokal yang potensial sebagai bahan baku produksi PHB adalah tapioka. Namun demikian, bakteri yang telah dikenal potensial dalam mensintesis PHB sebagaimana disebutkan di atas tidak bersifat amilolitik (tidak mampu mendegradasi amilum). Oleh karena itu, dalam hal ini perlu digunakan bakteri lain yang bersifat amilolitik dan mampu mensintesis PHB. Salah satu kelompok bakteri tersebut adalah *Bacillus* sp. Hanya saja kelompok bakteri ini belum banyak diketahui akan kemampuannya dalam mensintesis PHB, sehingga masih perlu melakukan optimasi kemampuannya dalam memproduksi PHB.

Salah satu cara optimasi adalah melalui pemodelan matematika. Diantara komponen yang harus disusun dalam bentuk model matematika adalah pengaruh substrat terhadap pertumbuhan bakteri. Penyusunan model matematika didasarkan pada model pemanfaatan tapioka oleh bakteri amilolitik pengakumulasi PHB sebagai berikut.



Gambar 2. Pemanfaatan substrat Tapioka oleh Bakteri Amilolitik

Gambar 2 menunjukkan bahwa sebelum dikonsumsi oleh bakteri, tapioka mengalami proses sakarifikasi (degradasi menjadi glukosa) secara ekstraseluler. Hal ini artinya bahwa glukosa merupakan sumber karbon tersedia (siap konsumsi) bagi bakteri, sedangkan sumber nitrogen tersedia adalah amonium. Dengan demikian, studi pengaruh substrat terhadap pertumbuhan didasarkan pada konsentrasi glukosa sebagai sumber karbon dan konsentrasi amonium sebagai sumber nitrogen. Kecepatan pertumbuhan bakteri dalam kultur *batch* sebanding dengan jumlah bakteri dan dituliskan dalam persamaan sebagai berikut (Shuler and Kargi, 2002).

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

Harga μ dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Bentuk hubungan μ dengan konsentrasi substrat (S) yang banyak dikenal dan umum digunakan adalah model kinetika Monod. Persamaan Monod dituliskan dalam bentuk sebagai berikut (Bailey and Ollis, 1986).

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

Berdasarkan persamaan (2) tersebut, jika S relatif kecil maka S merupakan substrat pembatas pertumbuhan. Jika S dinaikkan maka kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) akan naik pula. Namun demikian pada konsentrasi S yang tinggi, S bukan merupakan pembatas sehingga kecepatan pertumbuhan spesifik mencapai maksimum dan tidak lagi dipengaruhi oleh S. Fenomena tersebut berlaku jika konsentrasi S yang tinggi tidak bersifat menghambat pertumbuhan. Namun demikian, dalam kenyataannya konsentrasi S yang tinggi berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan, sehingga persamaan (2) perlu dikoreksi dengan memasukkan faktor penghambatan oleh S.

Bentuk persamaan penghambatan pertumbuhan oleh substrat umumnya merupakan persamaan empiris. Andrews (1968) mengusulkan bentuk persamaan kecepatan pertumbuhan spesifik yang dipengaruhi penghambatan oleh substrat sebagai berikut.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_{si}}} \quad (3)$$

Khanna dan Srivastava (2005) mempelajari penghambatan pertumbuhan oleh substrat pada bakteri *R. eutropha*. Pengaruh S terhadap μ dinyatakan pada persamaan (4) dan (5).

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left[1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^n \right] \quad (4)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^n \quad (5)$$

Karakteristik pertumbuhan bakteri tidak selalu sama, sehingga pengaruh konsentrasi substrat terhadap pertumbuhan perlu dipelajari tersendiri pada masing-masing bakteri. Penelitian ini dimaksudkan untuk mempelajari pengaruh substrat glukosa dan amonium terhadap kecepatan pertumbuhan spesifik bakteri *Bacillus* sp. pembentuk *polyhydroxybutyrate*. Pengaruh yang dimaksudkan adalah apakah terjadi penghambatan atau tidak, serta manakah bentuk persamaan yang sesuai diantara persamaan (3), (4), atau (5).

METODE PENELITIAN

Medium dan inokulum. Bakteri amilolitik *Bacillus* sp. pembentuk PHB ditumbuhkan dalam medium Ramsay (1990) yang dimodifikasi. Komposisi medium fermentasi (per liter) adalah Na₂HPO₄·7H₂O 6,7 g, KH₂PO₄ 1,5 g, (NH₄)₂SO₄ 1,0 g, MgSO₄·7H₂O 0,2 g, FeSO₄ 28,5 mg, CaCl₂·2H₂O 10 mg, *trace element* 1 mL. Komposisi *trace element* (per liter) adalah H₃BO₃ 0,3 g, CoCl₂·6H₂O 0,2 g, CuSO₄·5H₂O 10 mg, ZnSO₄·7H₂O 0,1 g, NaMoO₄·2H₂O 30 mg, NiCl₂·6H₂O 20 mg, dan MnCl₂·4H₂O 10 mg. Komposisi medium starter terdiri dari (per liter) beef ekstrak 3 g, peptone 5 g, yeast ekstrak 3 g, dan glukosa 10 g. Inkubasi starter dilakukan

dalam incubator shaker pada suhu kamar dan kecepatan 130 rpm selama 24 jam.

Pengaruh konsentrasi glukosa. Kultur percobaan berupa erlenmeyer volume 250 mL dan diisi medium sebanyak 70 mL. Pengaruh konsentrasi glukosa dipelajari pada konsentrasi amonium sulfat 1 g/L. Konsentrasi glukosa divariasi pada konsentrasi 0,1 , 0,5 , 2 , 4 , 10 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90 , 100 , dan 110 g/L. Medium diinokulasi dengan starter sebanyak 10 % v/v, kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu kamar, kecepatan 130 rpm dan pH awal 7,0. Sampel diambil secara periodik (jam ke 0, 2 , 5 , 6 , 7 , 9 , 10 , dan 11,3) dan dilakukan analisis kadar berat kering sel.

Pengaruh konsentrasi amonium. Percobaan pengaruh konsentrasi amonium terhadap pertumbuhan dilakukan dengan konsentrasi glukosa 10 g/L dan konsentrasi amonium sulfat bervariasi. Konsentrasi ammonium dipelajari pada 0,0272 , 0,1362 , 0,2724 , 0,5449 , 0,8173 , 1,6346 , 2,1795 , 2,7244 , 5,4488 , 8,1732 , dan 10,8975 g/L. Medium diinokulasi dengan starter sebanyak 10 v/v, kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu kamar, kecepatan 130 rpm, dan pH awal 7,0. Sampel diambil secara periodik setiap 45 menit dan dilakukan analisis kadar berat kering sel.

Analisis berat kering. Analisis kadar berat kering sel dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-vis Shimadzu UV-16A pada panjang gelombang 600 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data percobaan berupa kadar berat kering sel fungsi waktu fermentasi, sehingga data tersebut dapat digunakan untuk menentukan nilai μ berdasarkan persamaan (1). Kecepatan pertumbuhan spesifik bakteri ditentukan dengan metode pencocokan data (*data fitting*) dengan parameter jumlah kesalahan kuadrat (SSE) terkecil minimum.

Percobaan untuk mempelajari pengaruh konsentrasi glukosa terhadap kecepatan pertumbuhan spesifik bakteri dilakukan pada konsentrasi minimal 0,1 g/L dan konsentrasi tertinggi 110 g/L. Hasil percobaan selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi glukosa di bawah 10 g/L maka semakin tinggi konsentrasi glukosa semakin tinggi kecepatan pertumbuhan spesifik bakteri. Namun demikian, di atas konsentrasi 10 g/L terjadi pola yang berbeda yaitu peningkatan konsentrasi glukosa terjadi penurunan harga μ . Fenomena ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tinggi glukosa bersifat menghambat

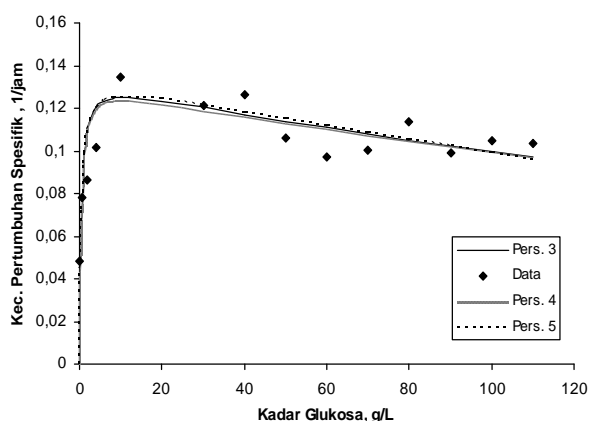
pertumbuhan. Pola penghambatan pertumbuhan oleh glukosa ditunjukkan pada Gambar 3. Pola penghambatan tersebut dipelajari berdasarkan persamaan (3), (4) dan (5).

Tabel 2. Harga μ pada berbagai konsentrasi glukosa

| No. | Konsentrasi glukosa(g/L) | Kec. Pertumbuhan spesifik (μ), 1/jam |
|-----|--------------------------|--|
| 1. | 0,1 | 0,048 |
| 2. | 0,5 | 0,078 |
| 3. | 2 | 0,086 |
| 4. | 4 | 0,102 |
| 5. | 10 | 0,134 |
| 6. | 30 | 0,121 |
| 7. | 40 | 0,126 |
| 8. | 50 | 0,106 |
| 9. | 60 | 0,097 |
| 10. | 70 | 0,101 |
| 11. | 80 | 0,114 |
| 12. | 90 | 0,099 |
| 13. | 100 | 0,105 |
| 14. | 110 | 0,103 |

Parameter kinetika yang terdapat pada ketiga persamaan tersebut ditentukan melalui optimasi parameter persamaan menggunakan metode global optimum, yaitu metode algoritma genetika. Kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum bakteri sebesar 0,134 1/jam. Tetapan masing-masing persamaan adalah $K_s = 0,413$ g/L dan $K_{si} = 291,022$ g/L untuk persamaan (3), $K_s = 0,396$ g/L, $S_m = 598,905$ g/L, dan $n = 0,761$ untuk persamaan (4), serta $K_s = 0,412$ g/L, $S_m = 982,567$ g/L, dan $n = 2,802$ untuk persamaan (5). Ralat relatif rata-rata persamaan (3), (4), dan (5) masing-masing sebesar 9,08 , 8,81 dan 9,34 persen. Berdasarkan data tersebut, secara matematik ketiga persamaan memiliki tingkat kesesuaian dengan data yang relatif sama. Namun demikian, persamaan (4) dan (5) memuat besaran fisis konsentrasi glukosa maksimum yang belum diverifikasi. Bahkan S_m pada persamaan (5) memiliki nilai yang tidak wajar. Dengan demikian, persamaan penghambatan oleh glukosa lebih sesuai jika menggunakan persamaan (3).

Pola penghambatan oleh glukosa tersebut berbeda dengan pola penghambatan oleh fruktosa pada bakteri *R. eutropha*. Khanna dan Srivastava (2005) menunjukkan bahwa penghambatan pertumbuhan pada *R. eutropha* lebih sesuai menggunakan persamaan (5) dengan konsentrasi fruktosa maksimum (S_m) 90,11 g/L serta n sebesar 3,19.



Gambar 3. Pola Penghambatan Pertumbuhan oleh Glukosa

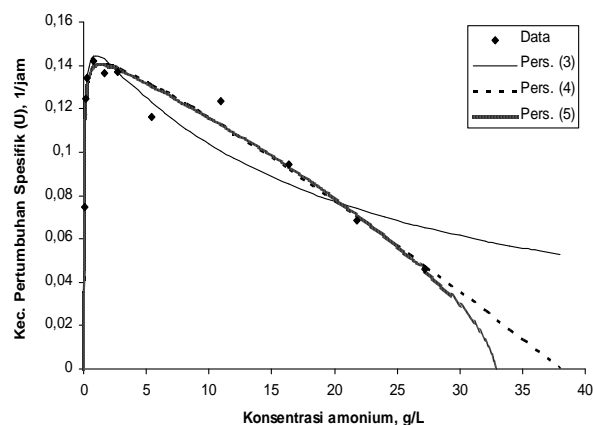
Percobaan pengaruh konsentrasi ammonium terhadap pertumbuhan dilakukan pada kisaran 0,048 g/L sampai 27,24 g/L. Hasil percobaan tersebut ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Harga μ pada berbagai konsentrasi ammonium

| No. | Konsentrasi glukosa, g/L | Kec. Pertumbuhan spesifik (μ), 1/jam |
|-----|--------------------------|--|
| 1. | 0,048 | 0,075 |
| 2. | 0,136 | 0,125 |
| 3. | 0,272 | 0,134 |
| 4. | 0,817 | 0,142 |
| 5. | 1,635 | 0,136 |
| 6. | 2,724 | 0,137 |
| 7. | 5,449 | 0,116 |
| 8. | 10,898 | 0,124 |
| 9. | 16,346 | 0,094 |
| 10. | 21,795 | 0,069 |
| 11. | 27,244 | 0,046 |

Pengolahan data dilakukan dengan cara yang sama dengan Tabel 2. Hasil perhitungan ditunjukkan pada Gambar 3. Tetapan masing-masing persamaan adalah $\mu_m = 0,159$ 1/jam, $K_s = 0,048$ g/L dan $K_{si} = 18,958$ g/L untuk persamaan (3), $\mu_m = 0,147$ 1/jam, $K_s = 0,037$ g/L, $S_m = 37,983$ g/L, dan $n = 1,168$ untuk persamaan (4), serta $\mu_m = 0,148$ 1/jam, $K_s = 0,038$ g/L, $S_m = 32,913$ g/L, dan $n = 0,672$ untuk persamaan (5). Ralat relatif rata-rata masing-masing persamaan secara berurutan sebesar 8,95, 5,23, dan 4,66 persen. Kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum dicapai pada konsentrasi ammonium 1,4 g/L. Berdasarkan pola pengaruh konsentrasi ammonium yang ditunjukkan Gambar 4 dan tingkat kesalahan relatif rata-rata dapat

disimpulkan bahwa persamaan (5) lebih mewakili pola pengaruh konsentrasi ammonium terhadap pertumbuhan bakteri. Khanna dan Srivastava (2005) menunjukkan pola yang sama pada penghambatan pertumbuhan oleh ammonium pada bakteri *R. eutropha*.



Gambar 4. Pola Penghambatan Pertumbuhan oleh Amonium

KESIMPULAN

Pengaruh konsentrasi glukosa dan ammonium terhadap pertumbuhan memiliki pola yang berbeda. Pengaruh konsentrasi glukosa lebih sesuai dengan persamaan (3) dengan tetapan μ_m 0,134 1/jam, K_s 0,413 g/L, dan K_{si} 291,022 g/L. Pengaruh konsentrasi ammonium mengikuti persamaan (5) dengan tetapan μ_m 0,148 1/jam, K_s 0,038 g/L, S_m 32,913 g/L, dan n sebesar 0,672. Kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum bakteri sebesar 0,148 1/jam pada konsentrasi glukosa 10 g/L dan ammonium 1,4 g/L.

DAFTAR DAN ARTI LAMBANG

- K_s : tetapan kejenuhan substrat glukosa atau ammonium, g/L.
- K_{si} : tetapan penghambatan oleh substrat glukosa atau ammonium, g/L.
- n : tetapan.
- S : konsentrasi substrat glukosa atau ammonium, g/L.
- S_m : konsentrasi substrat glukosa atau ammonium maksimum saat bakteri tidak dapat tumbuh lagi, g/L.
- t : waktu fermentasi, jam.
- X : kadar berat kering sel, g/L.
- μ : kecepatan pertumbuhan spesifik bakteri, 1/jam.
- μ_m : kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum bakteri, 1/jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, W.S., Park, S.J., and Lee, S.Y., 2000, Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(8), 3624-3627.
- Ahn, W.S., Park, S.J., and Lee, S.Y., 2001, Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Whey by Cell Recycle Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 23, 235-240.
- Andrews, J.F., 1968, A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates, dalam Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p.392, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., New York.
- Grothe, E. and Chisti, Y., 2000, Poly(3-hydroxybutyric acid) Thermoplastic Production by *Alcaligenes latus*: Behaviour of Fed-batch Cultures, *Bioprocess Engineering*, 22, 441-449.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K., 2005, A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production, *Biotechnol. Prog.*, 21(3), 830-838.
- Nawrath, C., Poirier, Y., and Somerville, C., 1994, Targetting of The Polyhydroxybutyrate Biosynthetic Pathway to The Plastids of *Aerobidopsis Thaliana* Results in High Levels of Polymer Accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12760.
- Park, S.J., Park, J.P., and Lee, S.Y., 2002, Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from Whey by Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* in A Pilot-Scale Fermenter, *Biotechnology Letters*, 24, 185-189.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C., 2003, Polyhydroxyalkanoates: an Overview, *Bioresource Technology*, 87, 137-146.
- Shuler, M.L. and Kargi, F., 2002, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, 2nd ed., Prentice Hall PTR, Upper Saddle River.
- Wang, F. and Lee, S.Y., 1997, Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9) 3703-3706.