

## Proses Fermentasi *Fed-Batch* untuk Produksi Dekstranase dengan *Streptococcus* sp. B7

### (Fed-Batch Fermentation Processes to Produce Dextranase from of *Streptococcus* sp. B7)

BUDIATMAN SATIAWIHARDJA<sup>1\*</sup>, BENI WIBISONO<sup>2</sup> & UNTUNG MURDIYATMO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Jalan Pahlawan No. 25, Pasuruan 67126

The research aimed to develop fermentation technique on dextranase production from the bacterial isolate of *Streptococcus* sp. B7 using fed-batch fermentation system. The production was done in two litre fermentor with flow rate of medium addition at 19 ml/hr after 24 hours until 72 hours of incubation process. The variable conditions were pH of 7 and 8 and agitation speeds of 300 and 500 rpm. Maximum production was achieved at 500 rpm and pH 8 that produced enzyme activity of 920 U/ml. The best result of some kinetic parameters were as follows : production  $p = 920$  U/ml, productivity  $Q_v = 16.43$  U/ml/hr, dextranase specific activity 17.68 U/mg protein, yield of product over cell  $Y_{p/x} = 696.47$  U/g cell and specific productivity  $q_p = 12.45$  U/g cell/hr.

Key words: dextranase, fed-batch fermentation, *Streptococcus* sp. B7, kinetic parameters

Dekstranase  $\alpha$ -1-6 glukanohidrolase (E.C. 3.2.2.11) yang diproduksi oleh bakteri *Actinomyces*, khamir maupun cendawan adalah sebuah enzim yang mampu menghidrolisis dekstran pada ikatan o-glikosil (Suhartono 1989). Enzim dekstranase memiliki berbagai spesifitas terhadap ikatan alfa glikosidik yang bergantung pada sumber isolat (Thaniyavarn *et al.* 1990). Sebagai produk metabolisme ekstrasel dari mikroba, dekstranase dihasilkan sejalan dengan metabolisme aerob (Fukumoto *et al.* 1971, Tsuru *et al.* 1972, ElMasry 1991). Enzim ini sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme seperti *Penicillium* dan *Streptococcus*. Menurut Fukumoto (1971) galur tertentu yang dimiliki oleh *Penicillium* menghasilkan dekstranase ketika ditumbuhkan pada media yang berisi dekstran sebagai satu-satunya sumber karbon. *Penicillium lilacium* NRRL896 dan *P. funiculosum* NRRL1132 ditemukan sebagai sumber utama penghasil dekstranase.

Dekstranase digunakan dalam industri gula untuk memproduksi maltosa dari pati dan meningkatkan hasil sukrosa pada pemurnian gula (ElMasry 1991). Selain itu dekstranase juga dapat meningkatkan hasil industri gula dan mengatasi masalah akibat adanya dekstran. Dekstran ini dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. dextranicum* yang menyebabkan pengaruh buruk pada viskositas dan menimbulkan pembentukan lendir benang yang merusak sari gula tebu (Thaniyavarn & Yoshida 1987, Thaniyavarn *et al.* 1990). Lebih jauh menurut ElMasry (1991) dekstranase juga digunakan dalam bidang medis untuk menghidrolisis dekstran alami yang terdapat pada

persiapan substitusi plasma darah atau dalam pencegahan dan perawatan karies gigi. Enzim yang ternyata efektif mencegah *plaq* gigi ini digunakan bersamaan dengan senyawa surfaktan seperti natrium lauril sulfat. Dalam bidang biokimia, dekstranase digunakan dalam pembentukan gel dekstran yang dapat larut seperti sefadeks (Suhartono 1989).

Menurut Rachman (1989) sistem *fed-batch* adalah suatu sistem yang menambahkan media baru secara teratur pada kultur tertutup, tanpa mengeluarkan cairan kultur yang ada di dalam fermentor sehingga volume kultur makin lama makin bertambah. Keuntungan sistem *fed-batch* ini ialah konsentrasi sisa substrat terbatas dan dapat dipertahankan pada tingkat yang sangat rendah sehingga dapat mencegah fenomena represi katabolit atau inhibisi substrat. Stanbury dan Whitaker (1984) juga menyebutkan istilah kultur *fed-batch* untuk menggambarkan kultur *batch* yang pemasokan substratnya dilakukan secara kontinu atau bertahap tanpa pengeluaran cairan kultur. Volume kultur bertambah sesuai dengan perubahan waktu. Proses ini juga dapat menghindarkan efek toksik dari komponen media.

Proses *fed-batch* telah diterapkan secara luas dalam berbagai industri fermentasi dan relatif lebih mudah digunakan untuk perbaikan proses *batch* dibandingkan dengan proses kontinu. Apabila pada fermentasi kontinu dihasilkan keluaran secara terus-menerus maka pada *fed-batch* diperoleh keluaran tunggal pada akhir inkubasi sehingga dapat ditangani dengan cara yang sama seperti pada proses *batch* (Sinclair & Kristiansen 1987).

Dengan melihat berbagai keuntungan penggunaan dekstranase maka pengembangan teknik fermentasi enzim mutlak diperlukan. Dengan teknik fermentasi yang baik

\* Penulis untuk korespondensi

dan tepat akan membantu produksi enzim secara optimum. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknik fermentasi pada produksi dekstranase dari isolat bakteri *Streptococcus* sp. B7 dengan menggunakan sistem fermentasi *fed-batch*. Galur ini dipilih sebagai kelanjutan dari proses studi sebelumnya (Winarni 1995) yang melangsungkan proses fermentasi dengan sistem *batch* dan menghasilkan produksi 2343 u/ml pada kondisi optimum (pH 7.30°C dan kecepatan putaran agitator 500 rpm).

## BAHAN DAN METODE

**Mikrob.** Mikroorganisme penghasil dekstranase yang digunakan ialah isolat bakteri *Streptococcus* sp. B7 yang diperoleh dari P3GI Pasuruan. Komposisi media basal penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Bahan substrat untuk analisis aktifitas enzim ialah *Blue Dextran* BM 2 juta.

Tabel 1. Komposisi media produksi: Winarni (1995)

Bahan	Komposisi
Ekstrak Khamir	0.200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.200
NaCl	0.050
CaCl <sub>2</sub>	1.000
MgSO <sub>4</sub>	0.050
Dekstran BM 5-40 Juta	1.000
Amonium Sulfat	0.236

**Fermentor.** Fermentor yang digunakan berkapasitas dua liter, merek EYELA yang dilengkapi dengan pengontrol pH, pengontrol oksigen terlarut, pengontrol buih, botol untuk penambahan asam dan basa, dua buah pompa peristaltik, dan erlenmeyer kapasitas 2000 ml sebagai tempat substrat untuk *feeding*.

**Pemeliharaan Kultur.** Isolat bakteri dari agar-agar cawan digoreskan pada agar-agar miring kemudian diinkubasikan selama dua hari pada suhu 30°C, lalu disimpan dalam refrigerator. Untuk pembuatan inokulum stok, satu ose kalori ditumbuhkan dalam 30 ml media pertumbuhan (sama dengan media produksi), diinkubasi selama dua hari dalam erlenmeyer pada penggoyang dengan kecepatan putaran 180 rpm dan suhu kamar. Sebanyak 20 ml kultur bakteri ditambah 20 ml gliserol steril 80%, lalu dikocok dan disimpan dalam ruang beku (suhu 30°C). Kultur yang disimpan ini dinyatakan sebagai inokulum stok.

**Persiapan Inokulum.** Inokulum stok selanjutnya ditumbuhkan pada agar-agar cawan dan diinkubasikan selama dua hari pada suhu 30°C. Isolat bakteri dari agar-agar cawan ini selanjutnya digoreskan pada agar-agar miring dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama dua hari. Dari isolat agar-agar miring diambil satu ose dan ditumbuhkan dalam lima mililiter media pertumbuhan, diinkubasi selama dua hari dalam erlenmeyer pada penggoyang dengan kecepatan putaran 180 rpm dan suhu kamar. Untuk fermentasi di dalam fermentor, kultur

sebanyak 5 ml ini selanjutnya ditumbuhkan pada erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml media fermentasi dan diinkubasi pada penggoyang dengan kecepatan 180 rpm dan suhu kamar.

Dari agar-agar miring dapat dilakukan peremajaan sampai sebanyak lima kali yang dapat digunakan langsung untuk inokulum cair pertama. Setelah lima kali peremajaan, persiapan inokulum harus diawali lagi dari inokulum stok.

**Proses Fermentasi.** Kultur inokulum yang digunakan untuk proses utama sejumlah 100 ml. Kultur inokulum tersebut diinkubasikan ke dalam 700 ml media fermentasi dalam fermentor. Fermentasi berlangsung selama tiga kali 24 jam, dengan tiga kali pengambilan contoh setiap hari. Pada 24 jam pertama fermentasi berlangsung secara *batch* sedangkan 2 kali 24 jam berikutnya berlangsung secara *fed-batch*. Awal penambahan substrat dilakukan pada jam ke-24. Volume substrat yang ditambahkan selama proses *fed-batch* sekitar 900 ml dengan laju penambahan 19 ml/jam.

Pada penelitian ini fermentasi berlangsung dalam fermentor kapasitas dua liter dengan pengaturan pH pada pH 7 dan 8 serta kecepatan putaran 300 dan 500 rpm.

**Pemisahan Enzim Ekstrasel.** Sebelum dianalisis, 2.5 ml kultur hasil fermentasi disentrifugasi pada 3000 g selama 15 menit. Supernatan disebut sebagai enzim kasar (EK) dianalisis kadar protein dan aktivitas dekstranasenya dan padatan dicuci dan dikeringkan untuk analisis biomassa sel.

**Analisis Aktivitas Enzim Dekstranase.** Aktivitas dekstranase dengan metode *Blue Dextran* (BD) diuji menggunakan metode Koh dan Khaw yang dimodifikasi (Johnson 1991). Larutan enzim sebanyak 0.3 ml ditambah dengan bufer fosfat sitrat 100 mM pH 5.4 sebanyak 0.3 ml. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama lebih kurang lima menit. Reaksi diawali dengan penambahan 0.6 ml substrat yaitu larutan BD 1% dalam bufer yang sama. Campuran ini kemudian diinkubasi selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan etanol 70% sebanyak 2.4 ml.

Tabung selanjutnya direndam dalam bak es selama lebih kurang 15 menit selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Sebagai blanko digunakan EK yang tidak aktifkan. Satu unit enzim dekstranase didefinisikan sebagai peningkatan tiap 0.01 satuan rapat optis (OD) setelah diinkubasi selama satu jam pada kondisi pengujian (unit/ml/jam).

**Analisis Kadar Protein.** Kadar protein EK ditentukan berdasarkan metode Sedmark dan Grossberg (1977). Sampel sebanyak 0.1 ml ditambahkan dengan 2.4 ml larutan NaCl 0.9%. Reaksi dimulai dengan menambahkan 2.5 ml PCA 0.3% yang mengandung 0.06% *Coomassie Brilliant Blue* G250 ke dalam campuran tersebut. Campuran kemudian dikocok dengan vorteks dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm setelah lima menit pencampuran.

Untuk mendapatkan kurva standar digunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai sampel pada konsentrasi 0.01-0.08 mg/ml. Sedangkan pada blanko digunakan akuades sebagai pengganti sampel.

**Analisis Berat Kering Biomassa.** Untuk mendapatkan biomassa mikroba pada awal inkubasi digunakan analisis kekeruhan suspensi sel. Analisis ini dilakukan dengan mengukur absorbansi cairan hasil fermentasi pada panjang gelombang 630 nm. Blanko yang digunakan ialah media basal (MB) yang telah disterilkan. Namun, karena terjadi perubahan warna selama fermentasi maka blanko yang digunakan adalah supernatan dari masing-masing contoh. Setelah pertumbuhan makin banyak, biomassa dianalisis dengan metode gravimetri, yaitu penimbangan sel yang diperoleh setelah proses sentrifugasi dan pencucian. Dalam hal ini, 2,5 ml cairan hasil fermentasi disentrifugasi selama 15 menit pada 3000 g di dalam tabung yang telah diketahui bobot kosongnya. Endapan sel yang diperoleh dicuci dan dikeringkan pada 105°C sampai bobot tetap.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pengaruh Penambahan Substrat.** Fermentasi *fed-batch* ini dilakukan mengingat pada fermentasi sistem *batch* terjadi penurunan produktivitas produksi enzim akibat terjadinya penurunan jumlah substrat yang tersedia dalam media fermentasi, sehingga perlu dilakukan penambahan substrat untuk mempertahankan umur kultur yang lebih lama dengan produktivitas yang relatif tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa potensi induksi substrat pada sel terjamin karena enzim induksi hanya diproduksi bila substrat (dalam hal ini dekstran) tersedia. Bila beberapa substrat tersedia, terjadi kaidah represi katabolit berakibat enzim yang berperan pada substrat yang paling disukai saja yang dihasilkan (Said 1987).

Dari hasil pengujian didapatkan bahwa produksi dekstranase meningkat seiring dengan penambahan substrat. Penambahan substrat dilakukan mulai jam ke-24 dengan kecepatan 19 ml/jam. Laju penambahan ini dikerjakan dengan memperhitungkan laju konsumsi substrat dan volume akhir yang masih sesuai dengan kapasitas volume fermentor. Penambahan substrat dimulai pada jam ke-24 sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa fermentasi dekstranase sistem *batch* memiliki produksi optimum pada hari ke-1. Pemilihan perlakuan pH 7 dan 8 berdasarkan kisaran pH dari galur yang digunakan masih dapat tumbuh dengan baik.

Penambahan substrat telah mempertahankan peningkatan produksi dekstranase sampai jam ke-56, kecuali fermentasi pada pH 8, 500 rpm yang mencapai produksi maksimum pada jam ke-64 (Gambar 1 - 4).

**Pengaruh Perlakuan pH.** Pada perlakuan pH, aktivitas (produksi) dekstranase tertinggi diperoleh pada perlakuan pH 8 (920 U/ml) pada kedua kecepatan putaran. Aktivitas dekstranase pada pH 7 memiliki nilai yang jauh lebih

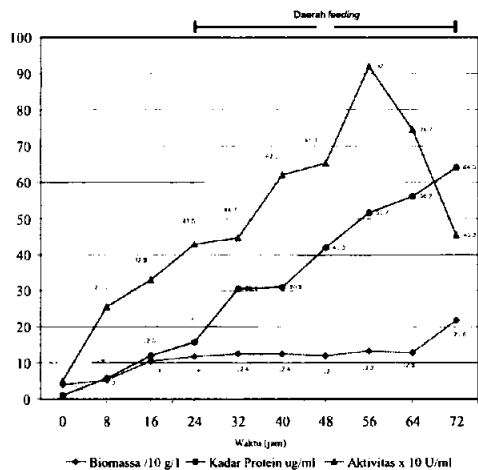
rendah dibanding pada pH 8, yaitu hanya sekitar 300 U/ml saja (Gambar 1 - 4).

Pada perlakuan pH 7 walaupun memiliki aktivitas relatif rendah, tetapi memiliki jumlah protein yang lebih banyak. Hal ini diduga karena enzim yang dihasilkan banyak, bukan merupakan enzim dekstranase, tetapi enzim lain yang kemungkinan terbesar ialah protease. Pendapat ini ditunjang oleh kenyataan bahwa dengan protein terlarut yang tinggi, dekstranase menurun, yang berarti didegradasi oleh protease. Pada pH 7 juga dijumpai hasil biomassa yang kurang dibandingkan dengan pada pH 8 dan dijumpai penurunan jumlah biomassa setelah 44 jam. Ini berarti terjadi lisis sel yang tidak terjadi pada pH 8.

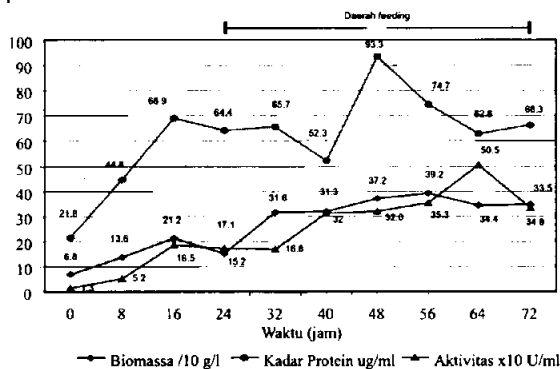
**Pengaruh Kecepatan Putaran.** Fermentasi menggunakan fermentor yang beragitasi ditujukan untuk tetap mempertahankan homogenitas campuran media dan kultur mikroba, serta untuk mempercepat pencampuran dan pelarutan bahan-bahan yang diperlukan dan juga meningkatkan kelarutan oksigen dalam cairan. Selain itu proses pindah panas dan massa dapat dikontrol dengan baik (Said 1987). Kecepatan putaran agitator memberikan pengaruh yang sangat berbeda terhadap aktivitas dekstranase yang dihasilkan. Aktivitas dekstranase yang lebih tinggi dihasilkan pada kecepatan yang lebih tinggi yaitu 500 rpm, baik pada pH 8 maupun pH 7 (Gambar 1 & 3, Gambar 2 & 4). Tetapi dari jumlah protein yang dihasilkan, perlakuan kecepatan putaran 500 rpm menghasilkan jumlah protein yang relatif lebih rendah dibandingkan pada perlakuan 300 rpm. Hal ini diduga pada perlakuan 500 rpm walaupun enzim yang dihasilkan relatif lebih sedikit, tetapi memiliki aktivitas yang lebih tinggi. Kemungkinan lain ialah pada 300 rpm dihasilkan enzim dengan jumlah relatif banyak, tetapi bukan enzim dekstranase dan kemungkinan besar adalah protease.

Secara keseluruhan hasil penelitian produksi enzim dengan fermentasi sistem *fed-batch* pada perlakuan kecepatan putaran 500 rpm mempunyai kecenderungan yang sama dengan fermentasi sistem *batch*, yang terlihat hubungan dari tingginya protein sesuai dengan aktivitas dekstranase yang rendah dan sebaliknya. Sementara itu pada fermentasi sistem *batch* (Winarni 1995), profil produksi dekstranase sebanding dengan biomassa, tetapi pada proses *batch* produksi dekstranase yang dicapai lebih tinggi. Pada penelitian sistem *fed-batch* ini produksi dekstranase yang tinggi sebanding dengan nilai biomassa yang rendah dan sebaliknya (Gambar 1 & 2). Dengan hasil produksi yang lebih rendah dari sistem *batch*. Sistem operasi *fed-batch* secara teori dapat mencegah efek hambatan substrat terhadap sintesis biomassa dan/atau produk. Hasil produksi pada sistem *fed-batch* ternyata tidak sesuai dengan harapan teori. Ini menunjukkan tidak terjadinya fenomena represi katabolit maupun inhibisi substrat pada proses *batch*. Penyebab lebih rendahnya hasil *fed-batch* pada penelitian ini kelihatannya lebih disebabkan oleh perbedaan dalam persiapan inokulum yang dikerjakan oleh Winarni (1995) ketika melakukan proses *batch*.

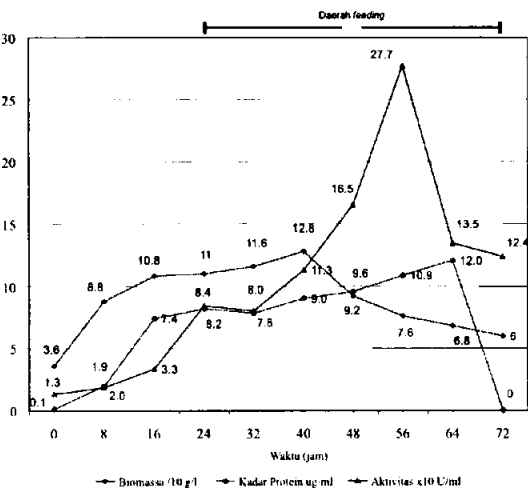
Parameter produk yang terbentuk dapat dipantau melalui kurva aktivitas enzim dan jumlah protein yang dihasilkan. Kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk memperlihatkan kemampuan sel dalam memberi respons terhadap pH dan kecepatan putaran. Dari hasil pengujian aktivitas enzim dekstranase terlihat bahwa kurva aktivitas mengalami penurunan setelah mencapai aktivitas maksimum, sedangkan alam waktu yang bersamaan substrat



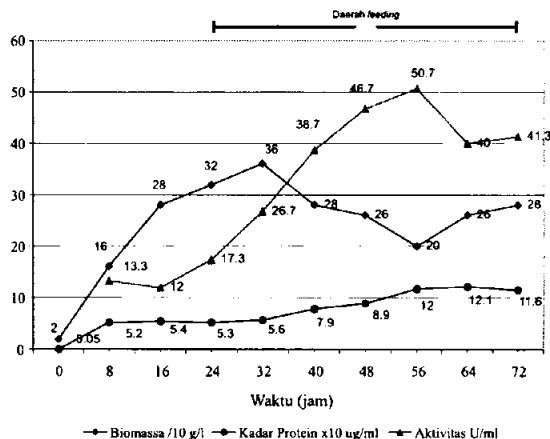
Gambar 1. Profil fermentasi *fed-batch* produksi dekstranase pH 8, 500 rpm.



Gambar 2. Profil fermentasi *fed-batch* produksi dekstranase pH 7, 500 rpm.



Gambar 3. Profil fermentasi *fed-batch* produksi dekstranase pH 8, 300 rpm



Gambar 4. Profil fermentasi *fed-batch* produksi dekstranase pH 7, 300 rpm.

ditambahkan secara konstan. Hal ini diduga karena adanya degradasi enzim oleh protease yang dihasilkan baik secara ekstrasel dan intrasel maupun ekstrasel saja. Kemungkinan lain ialah dihasilkannya metabolit sekunder sebagai inhibitor pada fase akhir produksi dan metabolit sekunder ini akan menghambat aktivitas enzim sehingga aktivitas enzim akan menurun.

Pada sistem *fed-batch* sulit untuk melihat fase eksponensial dan fase stasioner, kecuali fase eksponensial pertama. Untuk menghindari efek represi katabolit dan inhibisi substrat pada fermentasi sistem *batch*, proses fermentasi harus dilakukan pada keadaan konsentrasi substrat yang rendah. Hal ini berarti proses fermentasi akan cepat berakhir sementara produk masih rendah. Kendala seperti ini dapat dikurangi dengan menerapkan sistem *fed-batch* yang pemasokan substratnya dapat diatur sehingga substrat dalam bioreaktor tersedia dalam jumlah yang tepat selama proses fermentasi. Apabila dilihat secara keseluruhan dari semua perlakuan, fermentasi *fed-batch* produksi dekstranase pada fermentor skala dua liter dengan penambahan substrat sebanyak 19 ml/jam ini memiliki kondisi optimum pada pH 8 dengan kecepatan putaran 500 rpm. Produksi dekstranase maksimum sebesar 920 U/ml. Parameter kinetika fermentasi hasil produksi maksimum tersebut dapat dilihat pada Tabel 2, yaitu: produktifitas 16.43 U/ml/jam, aktifitas spesifik 17.78 U/ml protein, y/p/x 696.97 U/g sel dan produktivitas spesifik 12.45 U/g sel/jam.

Tabel 2. Hasil terbaik ditinjau dari beberapa parameter kinetika fermentasi pada pH 8, kecepatan putaran 500 rpm

Parameter	NILAI
Produksi, aktivitas enzim (U/ml)	920
Produktivitas (U/ml/jam)	16.43
Y p/x (U/g sel)	696.97
Aktivitas Spesifik (U/mg protein)	17.78
Produktivitas Spesifik (U/g sel/jam)	12.45

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dewan Riset Nasional yang memberikan dana penelitian melalui program RUT II.

## DAFTAR PUSTAKA

- EIMasry, H.G.** 1991. Optimalization of dextranase synthesis by a local isolated *Fusarium moniliforme*. *J. Zentrabl Mikrobiol.* **146**:132-192.
- Fukumoto, J., H. Tsuji & D. Tsuru.** 1971. Studies on mold dextranase: *P. luteum dextranase*, it's production and some enzymatic properties. *J. Biochem.* **69**:113-121.
- Hiraoka, N., J. Fukumoto & D. Tsuru.** 1971. Studies on mold dextranase. *J. Biochem.* **71**:57-63.
- Johnson, I. H.** 1991. Dextranase activity of *Streptococcus* isolates from human dental plaques. *J. Microbiol.* **65**:155-167.
- Rachman, A.** 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB.
- Said, E.G.** 1987. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: PT. Mediyatama Sarana Perkasa.
- Sedmark, J. J. & J. E. Grossberg.** 1977. A rapid sensitive and versatile assay for protein using comassie brilliant blue G 250. *J. Biochem.* **79**:544552.
- Sinclair, C.G. & B. Kristiansen.** 1987. Fermentation Kinetics and Modelling. Di dalam: J.D. Bu'lock (ed.), *The Biotechnology Series*. Milton Keynes: Open University Press.
- Stanbury, P.F & A. Whitaker.** 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press, Ltd.
- Suhartono, M. T.** 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. IPB, Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi.
- Thaniyavarn, S. & T. Yoshida.** 1987. Production of dextranase by *Penicillium* strains. *Report Biotechnol.* **10**:336338.
- Thaniyavarn, S., S. Yoshiaki, M. Akira & Y. Tashiomi.** 1990. *Characterization of Dextranase from Penicillium sp. and Micrococcus sp.* Manual report of IC Biotechnology, vol. 13.
- Tsuru, D., N. Hiraoka & J. Fukumoto.** 1972. Studies in mold dextranase. Substrate specificity of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Biochem.* **71**:635-660.
- Winarni, I.** 1995. Optimasi Produksi Dekstranase dari *Streptococcus* sp. B7. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.