

Kinetika Fermentasi Produksi Selulosa Bakteri Oleh *Acetobacter pasteurianum* Pada Kultur Kocok

NOER LAILY, ATARIANSAH, DIANA NURANI, SRI ISTINI, IDA SUSANTI,
LIESBETINI HARTOTO^{*)}

Peneliti pada Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Gd. 2, Lt 15 BPPT, Jl. MH. Thamrin no 8 Jakarta Pusat 10340
^{*)}Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Bogor
noerlaily2003@yahoo.com

Abstract

Fermentation Kinetics of Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter pasteurianum* in the Shaking Culture. Optimization of bacterium cellulose production by shake culture has been done using *Acetobacter pasteurianum*. Optimization covers media cultivation and speed of agitation. Cultivation media consist of coconut water, KH_2PO_4 0, 1 % b / v, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0, 25 % b / v, sucrose 3, 83 % b / and v (NH_4) 2SO_4 0, 73 % b / v. While speed of optimum agitation obtained at a speed of 0 rpm for the cell propagation and cell 140 rpm for the production of cellulose bacterium. The yield of purred dried cellulose bacterium obtained by cultivation media and optimum agitation speed is 5, 5 g / l.

Keywords : fermentation kinetics, *Acetobacter pasteurianus*, shaking culture

I. PENDAHULUAN

Selulosa bakteri adalah selulosa yang diproduksi oleh mikroba terutama bakteri dari galur *Acetobacter*. Selulosa bakteri memiliki karakteristik yang lebih menguntungkan dibanding selulosa dari tanaman. Karakteristik tersebut antara lain kemurniannya tinggi, dapat terurai, seratnya halus (berdiameter 0.1 μm atau 300 kali lebih kecil dibanding serat kayu), kekuatan tarik mekaniknya bagus, kapasitas pengikatan airnya yang tinggi dan derajat kristalinitasnya yang tinggi (Ross *et al.*, 1991). Oleh karena kelebihananya, selulosa bakteri digunakan sebagai bahan baku industri (Johnson *et al.*, 1990; Yamanaka *et al.*, 1989; Tahara *et al.*, 2000).

Sejauh ini, proses produksi selulosa bakteri yang umum digunakan adalah dengan kultur diam (*static culture*). Namun metode ini dari sudut pandang industri tidak efisien, karena waktu fermentasi lama, membutuhkan tempat yang luas untuk menumbuhkan kultur dan tenaga

kerja dibutuhkan banyak (Toyosaki *et al.*, 1995; Son *et al.*, 2001). Oleh karena itu, diperlukan metode produksi massal yang efisien untuk memproduksi selulosa bakteri. Kultur tergoyang dan kultur teraduk berpotensi dijadikan metode produksi massal selulosa bakteri, karena waktu fermentasinya relatif cepat dan tidak membutuhkan tempat yang luas untuk menumbuhkan kultur.

Pada kultur tergoyang dan kultur teraduk, umumnya selulosa bakteri yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan kultur diam. Hal ini berhubungan dengan mutasi sel, sehingga sel tidak dapat memproduksi selulosa bakteri (Dudman, 1960). Namun, beberapa penelitian telah berhasil mengisolasi galur yang dapat memproduksi selulosa dalam jumlah besar pada kultur tergoyang dan kultur teraduk (Toyosaki *et al.*, 1995; Son *et al.*, 2001).

A. pasteurianum merupakan salah satu galur yang mampu memproduksi selulosa bakteri. Namun, sejauh ini belum ada penelitian yang menggunakan galur ini untuk memproduksi

selulosa bakteri menggunakan kultur tergoyang dan kultur teraduk. Berdasarkan hasil penelitian Toyosaki *et al.*, (1995) selulosa bakteri yang diproduksi secara tergoyang menggunakan galur *A. pasteurianum* ATCC 10245 pada media CSL-Fru lebih rendah dibandingkan *A. xylinum* subsp. *sucrofermentan* BPR 2001. Perbedaan perolehan selulosa bakteri antar galur dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain komposisi media kultivasi dan kecepatan agitasi atau pengadukan.

Menurut Toyosaki *et al.*, (1995) selulosa bakteri yang diperoleh menggunakan kultur tergoyang erat hubungannya dengan jenis media kultivasi yang digunakan. Media CSL-Fru merupakan jenis media kultivasi yang telah terbukti mampu menghasilkan selulosa bakteri dalam jumlah besar pada kultur tergoyang dan kultur teraduk. Namun media tersebut relatif mahal, karena banyak menggunakan bahan sintetik, seperti campuran vitamin, campuran garam dan CSL (*Corn Steep Liquor*). Oleh karena itu, diperlukan modifikasi media CSL-Fru menggunakan bahan-bahan yang murah dan mudah didapat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan parameter kinetika kultivasi menggunakan media kultivasi dan kecepatan agitasi optimum.

II. BAHAN DAN METODE

2.1. Mikroba

Mikroba yang digunakan adalah *A. pasteurianus* koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), Pusat Penelitian Pengkajian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong.

2.2. Bahan dan alat

Air kelapa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MERCK), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK), KH_2PO_4 (J. T Baker), K_2HPO_4 (J. T Baker), ekstrak khamir (OXOID), agar bacteriological (OXOID), sukrosa (MERCK), glukosa (MERCK). Bahan-bahan untuk analisis antara lain NaOH 0,1 N, aquades, NaHPO_4 10 %, H_2SO_4 pekat, fenol 5 %, PbO 5 % dan Pb-asetat 7,5 %.

Alat yang digunakan terdiri dari labu erlenmeyer 300 ml, pipet mikro ukuran 5000 μl , termometer, timbangan analitik, ph-meter

(ORION model 720A), autoclave, *Laminar air flow* beserta perlengkapannya (bunsen, jarum ose dan lampu UV), inkubator, *shaker* (T-Verter N2-series), penangas air, oven pengering, spektrofotometer (Hitachi U-2001), *Multispeed Refrigerated Centrifuge* (ALC model PK 121 R), *magnetic stirrer*, desikator, *cool chamber* dan *refrigerator*.

2.3. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, P3Teknologi Bioindustri, BPPT Kawasan Puspiptek Serpong.

2.4. Metode Penelitian

Produksi selulosa bakteri pada kultur kocok. Media kultivasi yang digunakan adalah media kultivasi optimum hasil penelitian terdahulu yaitu terdiri dari air kelapa sebagai pelarut, KH_2PO_4 0,1 % b/v, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 % b/v, sukrosa 3,83 % b/v dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,73 % b/v. Sedangkan kecepatan agitasi optimum diperoleh pada kecepatan 0 rpm (diam) untuk propagasi sel dan kecepatan 140 rpm. Analisa yang dilakukan meliputi rendemen selulosa bakteri murni kering, OD (densitas optik) media kultivasi, bobot biomassa kering dan kadar gula sisa. Pengambilan sampel dilakukan selama 10 hari. Hari pertama sampel diambil setiap 4 jam sekali. Hari ke-2 sampai hari ke-4, sampel diambil setiap 6 jam sekali. Hari ke-5, setiap 8 jam sekali. Kemudian hari ke-6 sampai hari ke-10 setiap 12 jam sekali.

Analisis rendemen selulosa bakteri murni kering. Selulosa yang terbentuk di dalam media kultivasi dikumpulkan dan dicuci dengan air destilata. Setelah dicuci, selulosa direndam dalam larutan NaOH 0,1 N pada suhu 60 °C selama 2 jam. Kemudian selulosa dicuci kembali dengan air destilata untuk menghilangkan sisa-sisa alkali dan sel-sel bakteri. Selulosa murni tersebut dikeringkan didalam oven pada suhu 70 - 80 °C sampai kering dan selulosa memiliki bobot konstan.

Analisis OD (densitas optik) media kultivasi. Densitas optik media kultivasi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (Masaoka *et al.*, 1993).

Analisi Bobot biomassa kering. Setelah inkubasi selesai, labu erlenmeyer digoyang cukup kuat untuk melepaskan sel yang terjatuh pada jaringan atau serat selulosa. Kemudian selulosa yang berada dalam media kultivasi dipisahkan dari cairan media kultivasi dengan saringan. Cairan media kultivasi akhir yang diperoleh disentrifus pada kecepatan 4000 rpm dan suhu 4°C. Setelah sentrifus, endapan yang terbentuk dipisahkan dari cairan media kultivasi dan dibersihkan dari media yang masih melekat dengan air destilata. Kemudian endapan tersebut dikeringkan menggunakan oven pengering pada suhu 50 °C selama 24 jam atau sampai bobotnya tetap.

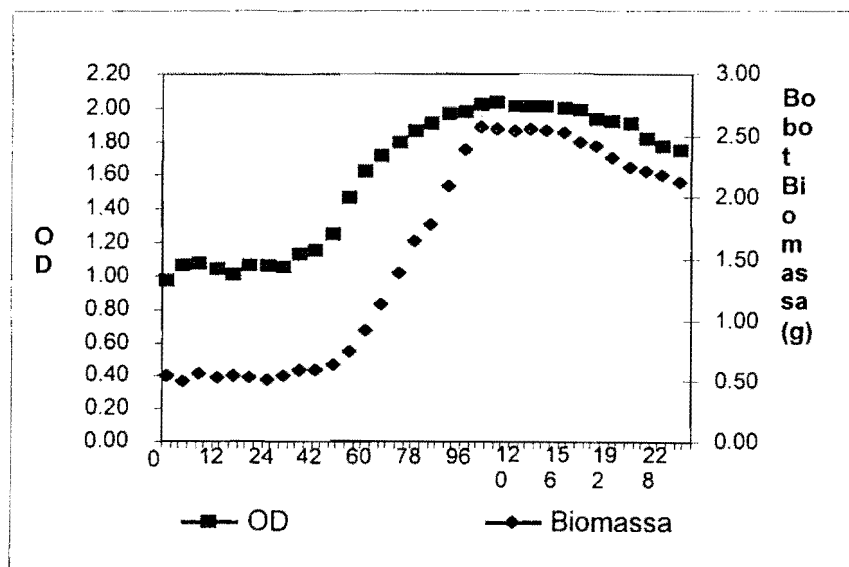
Analisis kadar gula sisa. Kadar gula sisa diukur sebagai kadar gula total menggunakan metode fenol. Pelaksanaan pengujian mengikuti prosedur penentuan gula total metode fenol Apriyantonno et al., (1989).

Analisa Statistik. Data (Rendemen selulosa bakteri murni kering) dianalisa menggunakan analisa ragam (Anova). Kemudian perbedaan rata-rata rendemen antar perlakuan diuji menggunakan uji wilayah berganda Duncan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan parameter kinetika dilakukan menggunakan media optimum hasil penelitian sebelumnya. Komposisi media kultivasi terdiri dari air kelapa, KH_2PO_4 0,1 % b/v, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 % b/v, sukrosa 3,83 % b/v dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,73 % b/v. Media kultivasi tersebut digunakan untuk propagasi sel dan produksi selulosa bakteri. Sedangkan kondisi proses (kecepatan agitasi) yang digunakan adalah kecepatan agitasi optimum yaitu kecepatan agitasi propagasi 0 rpm atau diam dan kecepatan agitasi produksi 140 rpm.

Pertumbuhan sel dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa atau jumlah sel. Umumnya pertumbuhan sel dinyatakan melalui massa sel, karena lebih mudah, cepat dan sederhana. Massa sel dalam penelitian ini dianalisa melalui kerapatan optik/kekeruhan cairan media kultivasi dan bobot biomassa kering. Pengamatan terhadap pertumbuhan sel pada tahap ini terdiri dari kerapatan optik dan bobot biomassa. Hasil pengamatan kerapatan optik cairan media kultivasi (*Optical Density*) dan bobot biomassa kering dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Kerapatan Optik (OD) Cairan Media Kulivasi dan Bobot biomassa kering

Kurva kerapatan optik (OD) pada Gambar 1 menunjukkan bahwa fase adaptasi

terjadi sampai jam ke-30. Hal ini terlihat dari kekeruhan cairan kultivasi yang stabil. Pada fase

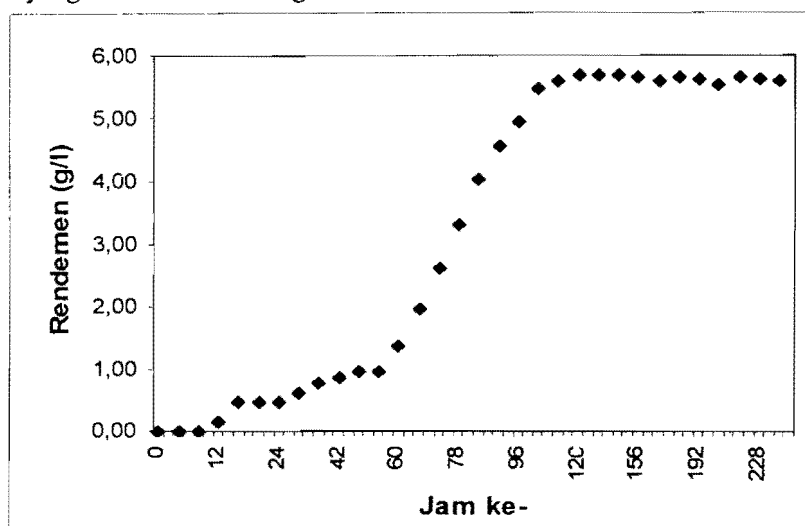
awal terjadi sintesis enzim oleh sel yang diperlukan untuk metabolisme metabolit (Suryani dan Mangunwidjaja, 2000). Setelah fase adaptasi, pertumbuhan sel memasuki fase eksponensial yang terjadi mulai jam ke-36 sampai jam ke-104. Hal ini terlihat dari peningkatan kekeruhan cairan kultivasi yang tinggi. Setelah jam ke-104 kekeruhan cairan berkurang dan akhirnya stabil sampai jam ke-144. Hal ini menandakan bahwa pertumbuhan sel telah memasuki fase stasioner. Kekeruhan cairan kultivasi akan berkurang semakin cepat mulai jam ke-156 sampai jam ke-240.

Pola pertumbuhan sel yang sama ditunjukkan pula oleh kurva bobot biomassa kering. Kurva bobot biomassa diatas menunjukkan bahwa fase adaptasi terjadi sampai jam ke-48. Kemudian pertumbuhan sel memasuki fase eksponensial mulai jam ke-54 sampai jam ke-104 dengan bobot biomassa tertinggi (X_{maks}) sebesar 2,57 g/l. Kemudian setelah jam ke-104 pertumbuhan sel memasuki fase kematian yang terlihat dengan

berkurangnya bobot biomassa kering. Fase kematian disebabkan karena ketahanan hidup sel menurun akibat akumulasi berbagai produk metabolit dan inhibitor, sehingga terjadi lisis sel dan massa sel berkurang.

Penentuan laju pertumbuhan spesifik (μ) berkaitan dengan fase eksponensial. Pada fase ini, laju pertumbuhan spesifik adalah tetap dengan keadaan pertumbuhan yang mantap. Berdasarkan persamaan linier kurva penentuan μ dapat diketahui bahwa nilai μ adalah 0,0251 /jam. Waktu ganda sel untuk memperbanyak diri dua kali dari jumlah atau bobot sel semula, yaitu sebesar 27,62 jam. Sedangkan laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) besarnya sama dengan nilai μ , karena nilai μ pada fase eksponensial adalah konstan.

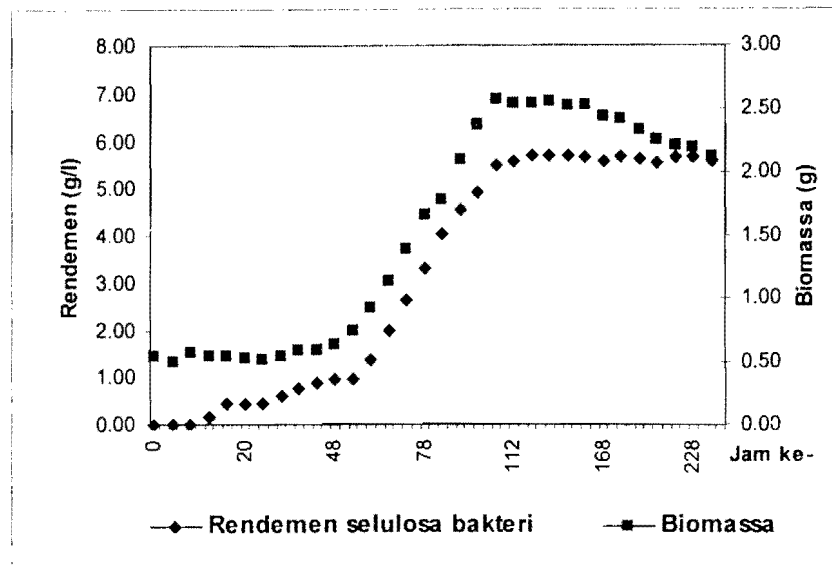
Pembentukan selulosa bakteri pada kultur tergoyang dinyatakan dengan rendemen selulosa bakteri murni kering. Hasil pengamatan rendemen selulosa bakteri murni kering dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Rendemen Selulosa Bakteri Murni Kering

Kurva di atas menunjukkan bahwa selulosa bakteri terbentuk setelah jam ke-8. Hal ini disebabkan karena sel-sel sedang aktif memproduksi enzim-enzim yang diperlukan untuk metabolismenya. Kemudian mulai jam ke-12 sampai jam ke-54, mulai terbentuk selulosa bakteri dengan laju produksi rendah. Mulai jam ke-60 sampai jam ke-112, rendemen meningkat

dengan laju yang tinggi. Kemudian setelah jam ke-112, rendemen yang dihasilkan tidak mengalami peningkatan lagi dan cenderung stabil. Kurva rendemen selulosa bakteri murni kering memiliki kecenderungan pola yang sama dengan kurva bobot biomassa kering, seperti yang tersaji pada Gambar 3.

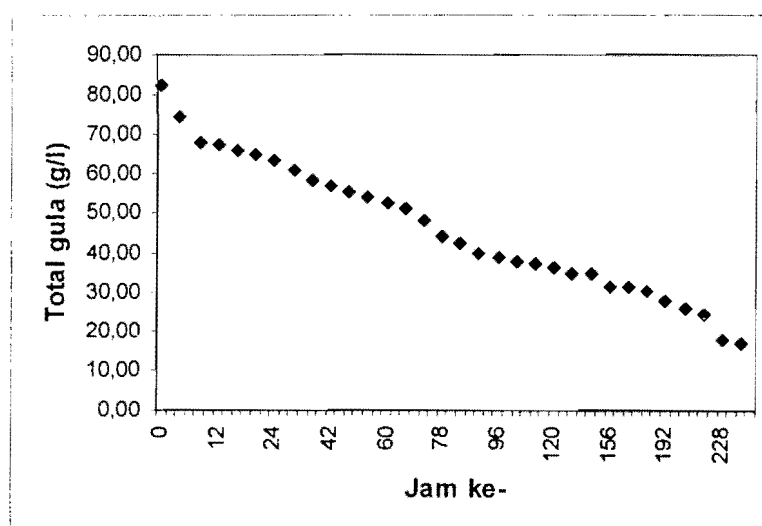


Gambar 3. Hubungan Antara Rendemen Selulosa Bakteri Murni Kering Dengan Bobot Biomassa Kering.

Perbedaan kedua kurva diatas terjadi setelah fase eksponensial. Rendemen selulosa bakteri murni kering menunjukkan fase selanjutnya adalah fase stasioner, sedangkan bobot biomassa kering terjadi fase kematian. Hal ini terjadi karena sel-sel mengalami lisis, sehingga massa sel berkurang dan selulosa bakteri tidak dapat diproduksi lagi. Oleh karena itu, rendemen selulosa bakteri murni kering yang diperoleh adalah konstan. Kedua kurva tersebut juga menunjukkan bahwa pertumbuhan

produksi selulosa bakteri berasosiasi dengan pertumbuhan sel pada kultur tergoyang, karena memiliki kecenderungan pola yang sama. Selain itu, waktu inkubasi atau kultivasi optimum juga dapat diketahui, yaitu selama 112 jam.

Bersamaan dengan produksi selulosa bakteri, substrat akan mengalami penurunan secara cepat. Substrat yang diamati adalah kadar gula total yang dikonsumsi oleh sel. Penurunan kadar gula total dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva Penurunan Kadar Gula Total dalam Media Kultivasi

Kurva penurunan kadar gula total diatas menunjukkan penurunan yang cepat mulai dari jam ke-30 sampai jam ke-104. Penurunan kadar gula total tersebut terjadi sejalan dengan fase eksponensial massa sel dan produksi selulosa (rendemen selulosa bakteri murni kering). Setelah itu, penurunan kadar gula total terjadi dengan laju yang rendah.

Pertumbuhan dan pembentukan produk oleh mikroba merupakan proses-proses biokonversi, yaitu nutrisi kimiawi yang

digunakan dikonversi menjadi massa sel dan metabolit-metabolit. Setiap konversi tersebut dapat dikuantitasikan oleh suatu koefisien hasil yang dinyatakan sebagai massa sel atau produk yang terbentuk per unit massa nutrisi yang dikonsumsi, yakni $Y_{x/s}$ untuk sel dan $Y_{p/s}$ untuk produk. Selain itu, koefisien hasil/efisiensi juga dapat pula dinyatakan sebagai produk yang terbentuk per unit biomassa, yaitu $Y_{p/x}$. Hasil perhitungan parameter-parameter kinetika secara lengkap tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai-Nilai Parameter Kinetika Kultivasi

Parameter	Nilai
μ_{maks}	0,0251 /jam
X_{maks}	2,57 g sel/l
T_d	27,62 jam
$Y_{p/s}$	0,25 g selulosa bakteri/g substrat
$Y_{x/s}$	0,099 g biomassa/g substrat
$Y_{p/x}$	2,48 g selulosa bakteri/g biomassa
α	2,48

IV. KESIMPULAN

Pembentukan selulosa bakteri berasosiasi dengan pertumbuhan sel *A. pasteurianum* pada kultur tergoyang. Laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,0251 /jam dengan bobot biomassa kering tertinggi (X_{maks}) 2,57 g. Waktu ganda sel (t_d) terjadi selama 27,62 jam. Pola pertumbuhan biomassa terdiri dari fase adaptasi (mulai jam ke-0 sampai jam ke-48), fase eksponensial (jam ke-54 sampai jam ke-104) dan fase kematian (jam ke-114 sampai jam ke-240). Parameter kinetika yang lain yaitu $Y_{p/s}$ sebesar 0,25 g selulosa bakteri/g substrat, $Y_{x/s}$ sebesar 0,099 g biomassa/g substrat dan $Y_{p/x}$ sebesar 2,48 g selulosa bakteri/g biomassa. Nilai α atau laju pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan sel adalah 2,48.

DAFTAR PUSTAKA

Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Sedarnawati Dan S. Budiyo. 1989. **Petunjuk Laboratorium Analisa Pangan**. Pusat Antar Universitas, IPB, Bogor.

Dudman, W.F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium. *J. Ben. Microbiol.* **2** : 329-337

Jihson, D.C. dan A.R. Winslow. 1990. Bacterial cellulose has potential application as a new paper coating. *Pulp and Paper*, **May**: 105-107

Masaoka, S., T. Ohe, dan N. Sakaota. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. of Fermentation and Bioengineering.* **75** : 18 – 22.

Ross, P., M. Raphael, B. Moshe. 1991. Cellulose of Biosynthetic and Function in bacteria. *Microbiological Review.* **55**: 35-38.

Son, H.J., M.S. Heo, Y.G. Kim dan S.J. Lee. 2001. Optimation of Fermentation condition for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking culture. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**: 1-5.

Suryani, A Dan D. Mangunwijaya. 2000. **Dasar Rekayasa Proses**. Diktat Kuliah Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

Tahara, N., K. Watanabe, N. Hioki, Y. Morinaga, T. Hajauda, H. Miyashita, S. Hiroshi, A. Shibarta dan H. Ougiya. 2000. Bacterial Cellulose Concentrate and Methode for Treatment of the Concentrate. US Patent No. 6069136

Toyosaki, H., Naritomi, A. Seto, M. Matsuika, T. Tsuchida dan F. Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose producing *Acetobacter* strains suitable for agitation culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** : 1498 – 1502.