

KAJIAN FERMENTASI BIOPLASTIK POLI-(3-HIDROKSIALKANOAT) (PHA) OLEH *Ralstonia eutropha* MENGGUNAKAN SUMBER KARBON HIDROLISAT PATI SAGU

The Fermentation Study on Polyhydroxyalkanoates Produced by Ralstonia eutropha from Hydrolized Sago Starch as The Carbon Source

Nur Atifah*¹⁾ Khaswar Syamsu²⁾, dan Ani Suryani²⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Industri Pertanian FTP Universitas Brawijaya

²⁾ Teknologi Industri Pertanian Fateta Institut Pertanian Bogor

*Penulis Korespondensi: E-mail: atifah_nashruna@yahoo.co.id

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), microbial bioplastics, not only were similar in properties with those made of petrochemical products, they were also completely biodegradable. At the moment, the price of PHAs was still high. This research was conducted to investigate the ability of Ralstonia eutropha to produce PHAs on a sago starch-based substrate, one of the cheap and abundantly renewable resources in Indonesia, and to characterize the PHAs produced. The microorganism was grown on the hydrolyzed sago starch with an initial sugar concentration of 30 g/l

It was found that the best value of the maximum specific growth rate (μ_{max}) was 0,188 h⁻¹. Kinetic parameters at 96 hour-batch fermentation showed the respective final cell and PHA concentrations of 4,41 g/L and 1,44 g/L. The yields of cell biomass ($Y_{x/s}$), PHAs per gram of cells ($Y_{p/x}$), PHAs per gram of substrate ($Y_{p/s}$) and the percentage of substrate consumption ($\Delta S/S_0$) were, 0.15 g cell/g sugar; 0.35 g PHA/g cells; 0.06 g PHA/g sugar and 99%, respectively. The PHAs produced were predominantly composed of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) as the functional groups with a melting point of 163,96 °C.

Keywords : hydrolyzed sago starch, PHA, *Ralstonia eutropha*

PENDAHULUAN

Semakin meningkatnya penggunaan plastik menimbulkan permasalahan lingkungan yang serius karena sifat limbah plastik yang sulit didegradasi secara biologis oleh mikroba tanah dan keterbatasan cadangan minyak bumi sebagai bahan baku plastik. Penggunaan bahan plastik ramah lingkungan yang dapat didegradasi oleh mikroba (bioplastik) merupakan salah satu alternatif pemecahannya.

Poli-(3-hidroksi alkanoat) atau PHA merupakan salah satu bioplastik mikrobial yang menjanjikan karena sifatnya mirip dengan plastik petrokimia, dapat dimodifikasi sesuai dengan tujuan penggunaan, biokompatibel dan terbiodegradasi sempurna. PHA

merupakan cadangan karbon dan energi intraseluler yang diproduksi oleh sejumlah besar bakteri sebagai respon terhadap kondisi pertumbuhan yang tidak seimbang, misalnya pada kondisi karbon berlebih dan nutrisi pertumbuhan esensial lainnya terbatas (seperti nitrogen, fosfor, oksigen, sulfur atau potasium) (Lee *et al.*, 1999). Terdapat lebih dari 300 jenis mikroba yang dapat mensintesis PHA namun hanya sejumlah bakteri, salah satunya adalah *Ralstonia eutropha*, yang prospektif digunakan dalam komersialisasi produksi PHA (Lee 1996, Lee dan Choi 2001).

Dibandingkan bahan bioplastik lain seperti pati dan protein, PHA memiliki keunggulan karena sifatnya yang hidrofobik, resistensinya yang besar terhadap uap air dan permeabilitas oksigennya yang rendah. PHA dapat

diaplikasikan sebagai *coating* (pelapis), kemasan, bahan-bahan sekali pakai, pembawa (*carrier*) bahan aktif pada bahan-bahan kimia dan obat-obatan, keperluan operasi bedah seperti benang jahit, pembalut luka, pemasangan tulang dan pembuluh darah (Lee *et al.*, 1999 dan Brandl *et al.*, 2001).

Meskipun demikian, pemanfaatan PHA masih sangat terbatas karena harganya jauh lebih mahal (sekitar 17 kali) dibandingkan plastik berbasis minyak bumi (Ayorinde *et al.*, 1998). Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk menurunkan biaya produksi PHA adalah dengan menggunakan substrat/bahan baku yang murah (Godbole *et al.* 2003).

Salah satu alternatif bahan baku murah dan terbaharukan yang melimpah di Indonesia adalah sagu. Indonesia merupakan pemilik areal sagu terbesar di dunia dengan luas areal sekitar 1,128 juta ha atau 51,3% dari 2,201 juta ha areal sagu dunia. Namun dari segi pemanfaatannya Indonesia masih jauh tertinggal dibandingkan Malaysia dan Thailand yang masing-masing hanya memiliki areal sagu seluas 1,5% dan 0,2% dari areal sagu dunia (Abner dan Miftahorrahman 2002). Pati sagu sebagai hasil ekstraksi batang empulur sagu dapat dihidrolisis menjadi komponen lebih sederhana seperti glukosa, maltosa dan oligosakarida sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon yang relatif murah dalam proses fermentasi PHA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan *R. eutropha* tumbuh dan memproduksi PHA pada media hidrolisat pati sagu sebagai sumber karbon tunggal dan mengetahui karakteristik PHA yang dihasilkan. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi positif dalam pengembangan bahan baku terbaharukan (*renewable resources*) pada produksi bioplastik mikroba sebagai salah satu bahan plastik ramah lingkungan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Strain bakteri yang digunakan adalah *Ralstonia eutropha* IAM 12368 yang diperoleh dari IAM Culture Collection, *Institute of Molecular and Celular Bioscience, The University of Tokyo*. Bahan-bahan untuk pembuatan dan analisis hidrolisat pati sagu adalah pati sagu, α -amilase, amiloglukosidase, CaCO_3 , iod, HCl 3%, arang aktif, kertas saring, fenol 5%, dan asam sulfat pekat 96%. Bahan-bahan untuk fermentasi bakteri dan isolasi PHA adalah nutrisi broth, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 0,1 M, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaOH, dan H_3PO_4 .

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, penyaring vakum, oven, *shaking waterbath*, termometer, neraca analitik, *rotary shaking incubator*, spektrofotometer, fermentor kapasitas 2 liter, sentrifuse kecepatan tinggi, *microfuge*.

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian terdiri dari 4 tahap, yaitu (1) persiapan substrat, (2) penentuan konsentrasi gula (fermentasi pada Erlenmeyer 250 ml), (3) evaluasi kinetika fermentasi pada konsentrasi gula terpilih (fermentor skala 2 liter dan (4) karakterisasi PHA. Diagram alir pelaksanaan penelitian selengkapnya disajikan pada Gambar 1.

1. Persiapan Substrat

Hidrolisis pati sagu secara enzimatis

Suspensi pati sagu 30% (pH 6-6,5) digelatinisasi sempurna kemudian ditambahkan enzim α -amilase (1,75 U/g pati) lalu dilikuifikasi pada suhu 90-95°C selama 210 menit. Hasil likuifikasi selanjutnya ditambah dengan enzim amiloglukosidase (AMG) sebanyak 0,3 U/g pati dan disakarifikasi pada suhu 60°C, pH 4-4,5 selama 48-60 jam pada inkubator goyang 150 rpm.

Hidrolisat hasil sakarifikasi dipanaskan pada suhu 105°C selama 5 menit untuk menginaktifkan enzim. Untuk menjernihkan warna, hidrolisat ditambah

arang aktif (1–2 % bobot pati), dipanaskan 80°C selama satu jam dan disaring secara vakum. Hidrolisat pati sagu tersebut siap digunakan sebagai sumber karbon fermentasi dan dianalisis kadar gula pereduksi (metode DNS), total gula (metode fenol sulfat), total nitrogen (Kjeldahl), kadar mineral (AAS) (Apriantono, *et al.* 1989) dan profil gula (*High Performance Liquid Chromatography* atau HPLC).

Penyiapan media dan kultur

Formulasi media fermentasi per liter adalah X ml hidrolisat pati sagu dan Y gram $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sedemikian sehingga rasio C/N awal 10:1 (dengan asumsi bahwa karbon pada hidrolisat sagu = 40% dari total gula), 5,8 gram K_2HPO_4 , 3,7 gram KH_2PO_4 , 10 ml MgSO_4 0,1 M, dan 1 ml larutan mikroelemen (terdiri dari 2,78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,98 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2,81 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,67 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,17 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,29 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan 1 liter HCl 1 N). Penetapan rasio C/N media 10:1 dipilih berdasarkan hasil penelitian Suryani *et al.* (2003) dan Chakraborty *et al.* (2004) yang melaporkan bahwa pada rasio C/N 10:1 *R. eutropha* menunjukkan laju pertumbuhan spesifik, pertumbuhan sel dan pembentukan PHA yang tertinggi.

Sebelum digunakan, media disterilisasi (121°C, 15 menit) kemudian didiamkan sehingga suhunya mencapai 25–30 °C dan siap diinokulasi.

Propagasi kultur dilakukan dengan menumbuhkan kultur segar *R. eutropha* ke dalam media steril pada inkubator goyang 150 rpm, suhu 34°C selama 24 jam. Komposisi media propagasi sama dengan komposisi media fermentasi, volume kultur propagasi 10% dari volume media fermentasi. Kultur hasil propagasi diinokulasikan ke dalam media fermentasi.

2. Penentuan Konsentrasi Gula

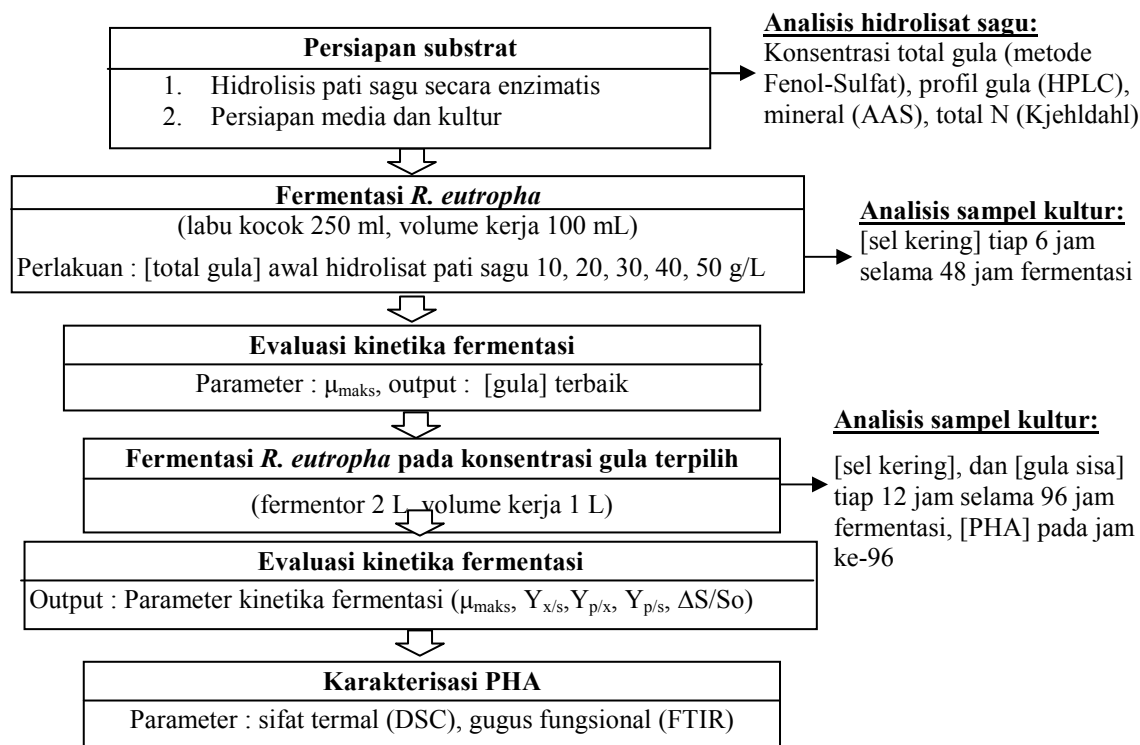
Kultur *R. eutropha* hasil propagasi ditumbuhkan pada media fermentasi (labu Erlenmeyer 250 mL, volume kerja 100 mL) dengan konsentrasi awal total gula hidrolisat pati sagu 10, 20, 30, 40 dan 50 g/L, rasio C/N awal = 10:1, pH awal 6,9, suhu 34 °C dan agitasi 150 rpm selama 48 jam. Parameter yang diamati setiap selang waktu 6 jam adalah konsentrasi sel kering dan gula sisa. Konsentrasi total gula yang memberikan nilai μ (laju pertumbuhan spesifik) dan rendemen molekuler ($Y_{x/s}$) tertinggi dipilih untuk tahap berikutnya.

3. Evaluasi Kinetika Fermentasi

R. eutropha selanjutnya ditumbuhkan secara *batch* pada konsentrasi hidrolisat sagu yang terpilih (tahap 2) dalam fermentor berkapasitas 2 liter, volume kerja 1 liter, pH 6,9, suhu 34 °C, agitasi 150 rpm, aerasi 0,2 vvm selama 96 jam. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam dengan parameter konsentrasi sel kering (metode gravimetri), gula sisa dan PHA (metode Lee *et al.* 1999). Selanjutnya, dilakukan penghitungan parameter kinetika fermentasi.

4. Karakterisasi PHA

PHA dianalisis sifat termal dan gugus fungsionalnya. Analisis sifat termal menggunakan DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) PerkinElmerTM DSC-7 dengan pemanasan 50°–200°C dan laju pemanasan 10°C per menit, sebagai *purge gas* digunakan gas N₂ dengan kecepatan aliran 50 mL/menit. Analisis gugus fungsional menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra Red Spectroscopy*) Shimadzu FTIR-8300 dengan standar uji ASTM E 1252-98 dimana sampel serbuk dibentuk pelet bersama kristal KBr.



Gambar 1. Diagram alir pelaksanaan penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Hidrolisat Pati Sagu

Karakteristik hidrolisat pati sagu yang dihasilkan pada tahap persiapan substrat disajikan pada Tabel 1. Konsentrasi total gula hidrolisat sagu 465 g/L menunjukkan bahwa terdapat 465 g/L glukosa dalam hidrolisat sagu baik dalam bentuk glukosa bebas (monosakarida) maupun unit glukosa yang masih terikat pada molekul disakarida, oligosakarida dan polisakarida. Berdasarkan hasil analisis HPLC didapatkan bahwa selain mengandung glukosa sebagai komponen gula utama (43,29%), hidrolisat pati sagu masih mengandung disakarida (maltosa) dan oligosakarida (maltotriosa-maltoheptosa) lebih dari 50%. Hal ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis enzimatis yang terjadi belum sempurna. Namun, dengan terurainya komponen polisakarida pati sagu yang kompleks menjadi turunan gula yang lebih

sederhana akan memudahkan bakteri memanfaatkannya sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan dan pembentukan produk yang diharapkan. Babel *et al.* (2001) menyatakan bahwa PHB dapat disintesa dari substrat multikarbon seperti karbohidrat dan hidrokarbon baik dari substrat murni maupun limbah.

Ralstonia eutropha tipe liar dilaporkan dapat tumbuh pada fruktosa sedangkan tipe mutan dapat tumbuh pada glukosa (John *et al.*, 1994). Karbohidrat lain yang telah diteliti dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan dan produksi PHA oleh *R. eutropha* adalah xylosa (Tanaka *et al.* 1993; Linko *et al.* 1993), hidrolisat laktosa, gula *invert* (Marangoni *et al.* 2001), selulosa (Chakraborty *et al.* 2004) dan hidrolisat tapioka yang mengandung 90% glukosa (Kim dan Chang 1995 di dalam Madison dan Huisman 1999).

Tabel 1. Karakteristik hidrolisat pati sagu

Komponen	Jumlah	Satuan
Konsentrasi total gula	465	g/l
Komposisi gula:		
Glukosa	43,29	%
Maltosa	9,04	%
Maltotriosa	14,71	%
Maltotetrosa	9,71	%
Maltopentosa	7,46	%
Maltoheksosa	4,82	%
Maltoheptosa	9,46	%
Lainnya	1,51	%
Nitrogen	141,75	mg/l
Kandungan logam:		
Pb	0,057	ppm
Zn	0,276	ppm
Cu	0,024	ppm
Fe	0,411	ppm
Ca	78,725	ppm
Mn	4,416	ppm
Mg	7,325	ppm
Na	2,111	ppm
K	99,75	ppm

Sejauh ini belum pernah dilaporkan bahwa *R. eutropha* dapat tumbuh pada maltosa dan oligosakarida dari glukosa seperti maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltoheksosa, maupun maltoheptosa. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dikaji kemampuan *R. eutropha* untuk tumbuh dan memproduksi PHA pada hidrolisat sagu yang mengandung gula-gula tersebut.

Kandungan nitrogen dan mineral logam pada hidrolisat sagu seperti Mg, Fe, Na, K, Zn, Cu, Ca, Mn merupakan elemen-elemen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Nitrogen pada hidrolisat pati sagu berasal dari kandungan protein alami pada pati sagu dan komponen protein pada enzim yang digunakan pada proses hidrolisis pati sagu, yaitu α -amilase dan amiloglukosidase. Hughes *et al.* (1984) menyatakan bahwa berbagai nutrisi dalam bentuk garam larut air yang secara umum dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme adalah nitrogen (N), fosfor (P), sulfur (S),

potasium (K), sodium (Na), magnesium (Mg), kalsium (Ca) dan besi (Fe). Selain itu juga dibutuhkan mineral kelumit seperti mangan (Mn), seng (Zn) dan tembaga (Cu). Konsentrasi mineral yang paling dominan adalah K (kalium) sebanyak 99,75 ppm dan Ca (kalsium) sebanyak 78,725 ppm. Tingginya kandungan kalsium disebabkan oleh adanya penambahan CaCO_3 pada pembuatan hidrolisat sagu yang berfungsi sebagai penstabil α -amilase.

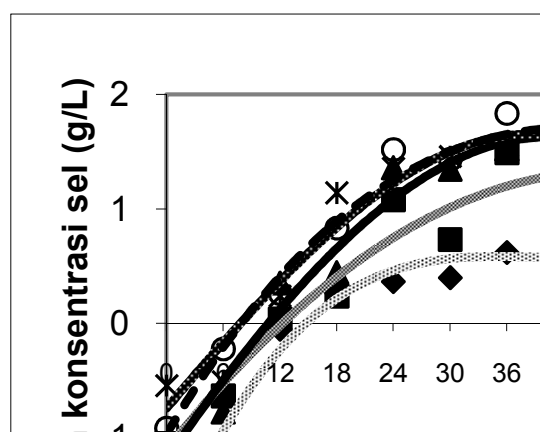
Hasil analisis hidrolisat pati sagu terutama parameter total gula dan total nitrogen digunakan sebagai dasar penghitungan konsentrasi karbon dan nitrogen dalam pembuatan media fermentasi. Berfungsi sebagai sumber karbon adalah hidrolisat pati sagu sedangkan sebagai sumber nitrogen adalah $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ yang merupakan nitrogen inorganik dan kandungan nitrogen organik yang terdapat dalam hidrolisat sagu. Rasio C/N media pada awal fermentasi diatur dengan perbandingan 10:1 dengan asumsi penghitungan bahwa konsentrasi karbon dalam gula (glukosa) adalah 40% (sebanding dengan perbandingan bobot atom C dalam molekul gula) dan konsentrasi N dalam $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ adalah 21,21%. Jumlah $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ yang ditambahkan disesuaikan dengan jumlah N yang terdapat pada hidrolisat sagu sedemikian sehingga konsentrasi total N dalam media mencapai 1/10 konsentrasi karbon.

Kinetika Pertumbuhan Sel *R. eutropha* pada Skala Erlenmeyer 250 ml

Produksi PHA oleh *R. eutropha* dilakukan dalam dua tahap, yaitu fase pertumbuhan tak terbatas yang bertujuan untuk pembentukan biomassa dan fase akumulasi polimer tergantung dari sumber karbon yang diumpankan dengan pembatasan nutrisi (nitrogen, fosfat, oksigen, dll). Dikarenakan PHA merupakan granula intraseluler maka laju pertumbuhan spesifik pada fase pertama haruslah setinggi mungkin agar tercapai produktifitas yang optimal (Marangoni *et al.* 2001). Berdasarkan hal tersebut

maka pada tahap ini dilakukan evaluasi konsentrasi gula yang memberikan laju pertumbuhan spesifik maksimal *R. eutropha* yang tertinggi pada fermentasi *batch*.

Pola pertumbuhan *R. eutropha* secara *batch* pada skala erlenmeyer dengan konsentrasi awal total gula hidrolisat pati sagu 10, 20, 30, 40, 50 g/L dengan rasio C/N 10:1 disajikan pada Gambar 2. Sel *R. eutropha* secara umum tumbuh secara logaritmik pada 24 jam pertama dan cenderung stasioner mulai jam ke-42; kecuali pada konsentrasi gula 10 g/L, sel tampak tumbuh secara logaritmik pada 12 jam pertama, melambat pada jam ke-18 hingga 24 dan cenderung stasioner mulai jam ke-24. Pada konsentrasi gula 10 g/L, sel mengalami dan memasuki fase stasioner lebih cepat sebagai akibat ketersediaan nutrisi yang terbatas.



Gambar 2. Pola pertumbuhan *R. eutropha* pada berbagai konsentrasi total gula (TG) hidrolisat pati sagu pada skala erlenmeyer 250 ml

Pada rentang konsentrasi gula 10 sampai 40 g/L, secara umum semakin tinggi konsentrasi gula maka semakin tinggi pula konsentrasi sel *R. eutropha* yang tumbuh selama fermentasi meskipun tidak demikian dengan tingkat laju pertumbuhannya. Pada batas tertentu semakin tinggi konsentrasi karbon dan nitrogen dengan rasio yang sama berarti semakin banyak bahan

yang dapat dikonversi menjadi materi peyusun dan penggandaan sel.

Evaluasi konsentrasi gula yang akan digunakan pada tahap selanjutnya dilakukan berdasarkan nilai laju pertumbuhan spesifik maksimal (μ_{maks}) yang tertinggi. Nilai μ_{maks} yang didapatkan pada penelitian ini berkisar 0,116 – 0,188/jam (Tabel 2) dimana nilai μ_{maks} tertinggi diperoleh pada konsentrasi gula awal 30 g/L, yaitu 0,188/jam.

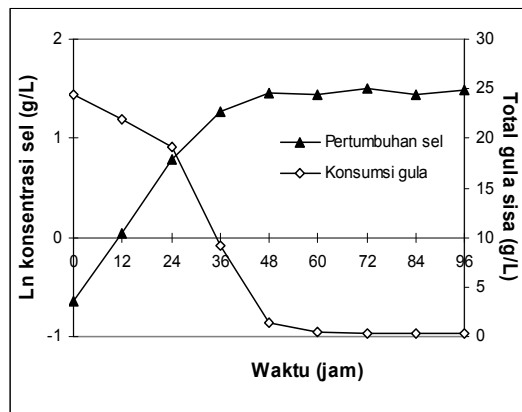
Tabel 2. Nilai μ_{maks} *R. eutropha* yang ditumbuhkan pada berbagai konsentrasi gula hidrolisat pati sagu

Konsentrasi total gula (g/l)	μ_{maks} percobaan (jam ⁻¹)
10	0,1660
20	0,1400
30	0,1880
40	0,1500
50	0,1160

Marangoni *et al.* (2001) mendapatkan nilai μ_{maks} *R. eutropha* mutan DSM 454 yang ditumbuhkan secara *batch* pada skala erlenmeyer (kapasitas 1 L, volume kerja 300 mL) dengan sumber karbon gula *invert*, glukosa, fruktosa dan galaktosa berturut-berturut adalah 0,26, 0,23, 0,21 dan 0,13 jam⁻¹. Dengan demikian, pertumbuhan *R. eutropha* pada hidrolisat sagu dengan total gula awal 30 g/L lebih baik dibandingkan bila ditumbuhkan pada galaktosa, akan tetapi lebih rendah pertumbuhannya dibandingkan bila ditumbuhkan pada gula *invert*, glukosa dan fruktosa.

Kinetika Fermentasi *R. eutropha* pada Skala Fermentor 2 Liter

Untuk mempelajari kinetika fermentasi secara lebih rinci, selanjutnya *R. eutropha* ditumbuhkan secara *batch* pada fermentor berkapasitas 2 L, volume kerja 1 L, pH 6,9, aerasi 0,2 vvm, selama 96 jam. Pola pertumbuhan sel dan konsumsi gulanya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pola pertumbuhan sel dan konsumsi hidrolisat pati sagu *R. eutropha* yang ditumbuhkan secara *batch* (fermentor 2 liter)

Gambar 3 menunjukkan bahwa pertumbuhan *R. eutropha* pada hidrolisat pati sagu mengalami fase pertumbuhan secara logaritmik sampai jam ke-24 kemudian melambat dan memasuki fase stasioner mulai jam ke-48. Pada jam ke-48 ketika konsentrasi sel dan residu gula berturut-turut mencapai 4,32 g/L dan 1,41 g/L, nilai konversi substrat menjadi sel ($Y_{x/s}$) mencapai 0,165 g sel/g gula sedangkan tingkat konsumsi gula ($\Delta S/So$) mencapai 94,2%. Sementara itu pada akhir fermentasi, $\Delta S/So$ mencapai 99%. Pada fase stasioner (terutama jam ke-60 hingga 96) terlihat bahwa konsentrasi residu gula mendekati titik nol (<1 g/L) seiring dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) yang menunjukkan angka nol. Fenomena ini menunjukkan bahwa hidrolisat pati sagu yang mengandung glukosa, maltosa, maltotriosa-maltoheptosa dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan *R. eutropha* hingga 99%, hanya sekitar 1% yang tidak dapat dikonsumsi. *R. eutropha* diduga akan mengonsumsi gula yang lebih sederhana (glukosa, maltosa) terlebih dahulu dibandingkan gula yang lebih kompleks (oligosakarida). Kemungkinan besar

komponen yang tidak dikonsumsi adalah komponen gula yang lebih kompleks daripada maltoheptosa dimana jumlah komponen tersebut pada hidrolisat sagu mencapai 1,51 % (Tabel 1).

Tabel 3 menunjukkan bahwa parameter kinetika fermentasi *batch* terkait dengan rendemen sel yang terbentuk per gram substrat ($Y_{x/s}$), rendemen produk PHA per gram substrat ($Y_{p/s}$), rendemen produk PHA per gram sel yang tumbuh ($Y_{p/x}$) dan tingkat konsumsi gula selama 96 jam fermentasi ($\Delta S/So$). Pada akhir fermentasi (jam ke-96) dihasilkan biomassa dengan konsentrasi 4,41 g/L dan PHA dengan konsentrasi 1,44 g/L atau 32,65 % dari bobot biomassa.

Tabel 3. Parameter kinetika fermentasi *R. eutropha* yang ditumbuhkan pada substrat hidrolisat pati sagu

Parameter	Nilai
$Y_{x/s}$	0,15 g sel/g gula
$Y_{p/s}$	0,06 g PHA/g gula
$Y_{p/x}$	0,35 g PHA/ g sel
$\Delta S/So$	0,99

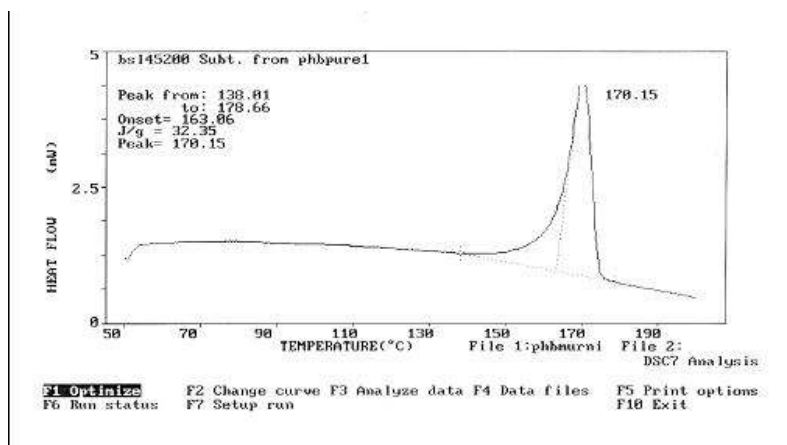
Nilai $Y_{x/s}$ lebih besar daripada $Y_{p/s}$ menunjukkan bahwa gula yang dikonsumsi lebih banyak digunakan untuk pembentukan dan perbanyakan sel dibandingkan untuk pembentukan produk PHA. Pada kondisi pertumbuhan yang seimbang, secara alami *R. eutropha* mengakumulasi PHA dalam selnya meskipun relatif rendah, ditunjukkan dengan nilai $Y_{p/x} = 0,35$ g/g. PHA disintesa sebagai bahan cadangan karbon dan energi intraseluler. Dengan demikian, bakteri yang secara alami menghasilkan PHA memiliki ketahanan hidup yang lebih besar dibandingkan dengan yang tidak (Tal dan Okon 1985 dalam Kim dan Lenz 2001).

Karakterisasi PHA

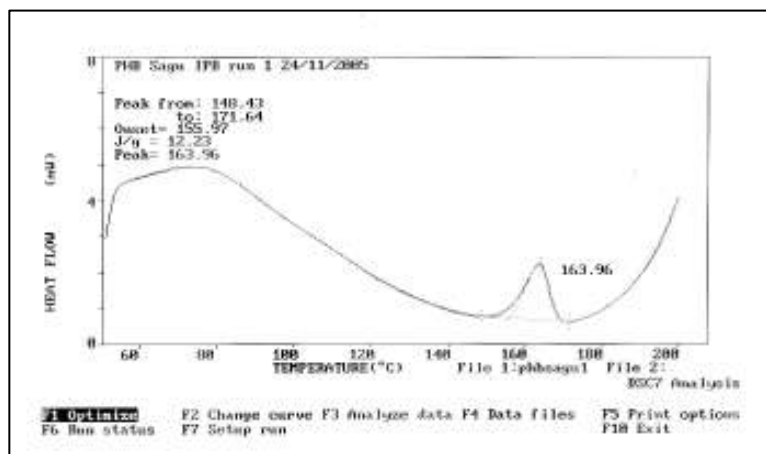
Sifat Termal PHA

Differential Scanning Calorimeter (DSC) mengukur sejumlah energi (panas) yang diserap atau dilepaskan oleh suatu sampel ketika dipanaskan, didinginkan atau didiamkan pada suhu konstan. DSC juga mengukur suhu sampel pada kondisi tersebut. Prinsip kerja menggunakan

metode ini adalah pengukuran aliran panas berdasarkan kompensasi tenaga (Rabek 1983). Pada penelitian ini titik leleh produk PHA diukur dengan DSC dan hasilnya (Gambar 5) dibandingkan dengan PHB standar (Gambar 4). Pada Gambar 4 yang menunjukkan spektra DSC PHB murni, hanya muncul satu *puncak* (puncak) pada suhu 170,15 °C yang merupakan titik leleh PHB.



Gambar 4. Spektra *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) PHB murni



Gambar 5. Spektra *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) PHA dari pati sagu

Gambar 5 menunjukkan bahwa spektra DSC PHA sagu muncul dua puncak, yaitu pada suhu 79,50 °C dan 163,96°C. Puncak pertama yang lebar dan tidak runcing muncul pada suhu 79,50°C, menunjukkan adanya komponen-komponen pengotor yang terikat pada PHA, diduga merupakan

bahan-bahan organik seperti senyawa-senyawa berkarbon maupun protein. Reusch (1992) melaporkan bahwa PHB dapat membentuk interaksi hidrofobik melalui gugus metil dan metilennya. Selain itu, gugus ester karbonil oksigennya dapat berfungsi sebagai akseptor ikatan hidrogen dengan kation-

kation. Dengan karakteristik demikian, PHB dapat melarutkan molekul-molekul lain seperti garam atau makromolekul seperti protein.

Puncak kedua (163,96°C) merupakan titik leleh sampel PHA sagu dimana nilainya sedikit lebih rendah dari titik leleh PHB murni (170,15°C). Oleh karena itu, sampel PHA sagu yang didapat pada penelitian ini diduga merupakan jenis PHB. Lafferty *et al.* (1988) menyatakan bahwa titik leleh (T_m) PHB bervariasi antara 157–188 °C, suhu peralihan kaca (T_g) 5–20 °C dan suhu kristalisasi (T_c) 25–125 °C tergantung dari komposisi dan *thermal history* (riwayat pengolahan dan penanganan) bahan tersebut. Pada penelitian ini, T_g dan T_c PHA sagu maupun PHB murni tidak terdeteksi karena keterbatasan kemampuan alat untuk dioperasikan pada suhu di bawah 40°C.

Analisis Gugus Fungsional

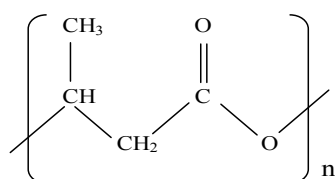
Prinsip dasar analisis gugus fungsional menggunakan metode FTIR (*Fourier Transform Infrared*) adalah ketika cahaya infrared melewati suatu contoh polimer maka sebagian frekuensinya akan diserap dan sebagian lagi akan diteruskan. Transisi yang terjadi pada absorpsi infrared terkait dengan perubahan vibrasi (getaran) di dalam molekul. Ikatan-ikatan yang ada dalam polimer akan menunjukkan frekuensi vibrasi yang berbeda-beda sehingga dapat dideteksi sebagai pita absorpsi dalam spektrum infrared (Rabek 1983). Hasil analisis FTIR produk PHA dibandingkan dengan dengan PHB standar dan identifikasinya disajikan pada Tabel 4 berdasarkan Kansiz *et al* (2000).

Tabel 4. Spektrum FTIR sampel PHA dari hidrolisat pati sagu

PHA sagu ¹			PHB murni ²		
No	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Identifikasi	No	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Identifikasi
1	~3435 *	-OH	1	~<3500*	-OH
2	~2931,6*	C-H	2	~2979,8	Tdd
3	~1726,2*	C=O ester	3	~2933,8*	C-H
4	~1654,8*	C=O amida protein	4	~2875,7	Tdd
5	~1548,7	N-H amida protein	5	~1726,2*	C=O ester
6	~1456,2*	-CH ₃	6	~1689,5	Ttd
7	~1382,9*		7	~1658,7*	C=O amida protein
8	~1284,5*	-C-O-	8	~1454,2*	-CH₃
	~1456,2*	-(CH₂)-	9	~1380,9*	
9	~1228,6		10	~1357,8	Ttd
10	~1184,2*				
11	~1132,1*	(C-O-C) polimer			
12	~1099,3*				
13	~1056,9*	C-C			
14	~979,8*				
15	~896,8*	Ttd	11	~1278,7*	-C-O-
16	~825,5*	Ttd		~1454,2*	-(CH₂)-
				~1278,5	
17	~669,3	ttd	12	~1186,1*	
			13	~1132,1*	(C-O-C) polimer
			14	~1101,3*	
			15	~1058,8*	C-C
			16	~979,8*	
			17	~956,6	
			18	~935,4	
18	~515,0*	ttd	19	~896,8*	ttd
			20	~827,4*	ttd
			21	~597,9	ttd
			22	~515,0*	ttd

Catatan: * menunjukkan bahwa spektrum tersebut juga muncul pada PHB murni
ttd: tidak diketahui; ¹ hasil analisis produk PHA penelitian ini; ² hasil analisis Wicaksono (2005) menggunakan metode dan alat yang sama

Dari 18 spektrum yang muncul pada sampel PHA, terdapat 15 spektrum yang sama dengan spektrum PHB murni. Oleh karena itu, diduga kuat bahwa sampel yang diuji dominan mengandung PHB karena memiliki ciri khas grup PHA, yaitu adanya ikatan karbonil ester (C=O), ikatan -C-O- dan ikatan -C-O-C- polimerik. Selain itu juga muncul gugus metil bebas (-CH₃) dan metilen tunggal (-CH₂-) sehingga sesuai dengan struktur PHB (Gambar 6).



Gambar 6. Struktur kimia PHB

Dugaan di atas relevan dengan temuan Kansiz *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa ikatan utama dalam molekul PHB adalah karbonil ester (C=O) yang terbaca pada bilangan gelombang 1738-1728 cm⁻¹, deformasi metil (CH₃), metilen (CH₂) serta ikatan C-O pada bilangan gelombang 1450-1000 cm⁻¹.

Namun demikian, munculnya gugus-gugus lain seperti C=O dan N-H pada bilangan gelombang 1654,8 dan 1548,7 cm⁻¹ yang merupakan gugus amida protein menunjukkan masih adanya residu protein. Residu protein tersebut diduga berasal dari membran yang melapisi PHA. Jensen dan Sicko (1971) dalam Lafferty (1988) menyatakan bahwa PHB dilapisi oleh satu lapisan membran yang mengandung protein sehingga dikatakan granula PHA terdiri dari 98% PHB dan 2% protein. Selain itu, residu protein diduga juga berasal dari sisa materi pecahan sel (*cell debris*) yang belum terpisahkan dari produk PHA.

Kuatnya intensitas spektrum -OH yang muncul pada bilangan gelombang 3435 cm⁻¹ diduga karena sampel PHA yang berwarna coklat muda mengandung senyawa polifenol. Senyawa tersebut merupakan hasil oksidasi dari D-katekin dan D,L-epikatekin pada pati sagu oleh polifenol oksidase yang menjadi

penyebab warna coklat (Hammer 1993) baik pada pati sagu maupun hidrolisat pati sagu. Selain itu kemungkinan juga pada sampel PHA masih ada senyawa-senyawa intermediet (antara) glukosa menjadi asam-asam organik turunannya ataupun senyawa antara pembentukan PHA yang mengandung gugus -OH.

KESIMPULAN

Hidrolisat pati sagu dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi *R. eutropha* untuk tumbuh dan memproduksi PHA. Pada rentang konsentrasi total gula awal 10-50 g/L, *R. eutropha* tumbuh paling baik pada konsentrasi gula awal 30 g/L dengan laju pertumbuhan spesifik maksimal 0,188/jam.

PHA yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki kemiripan suhu pelelehan dan gugus-gugus fungsional dengan PHB murni sebagai pembanding. Titik leleh produk PHA hasil analisis DSC adalah 163,96°C, sedikit lebih rendah daripada titik leleh PHB murni 170,15°C. Gugus-gugus fungsional penting yang muncul pada analisis FTIR sebagai penciri khas struktur PHB adalah C=O ester, -CH₃, -C-O-, -(CH₂)₂-, (C-O-C) polimer dan -C-C- yang terdeteksi berturut-turut pada bilangan gelombang 1726, 1456-1382, 1284, 1456-1228, 1056-1184 dan 979 cm⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Abner L dan Miftahorrahman. 2002. Keragaan industri sagu Indonesia. Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri 8(1).
- Akyuni D. 2004. Pemanfaatan pati sagu (*Metroxylon* sp) untuk pembuatan sirup glukosa menggunakan α-amilase dan amiloglukosidase [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Fakultas Teknologi Pertanian.
- Anonim. 2002. Menghancurkan plastik dengan air. <http://www.kompas.com>. [26 Oktober 2002].

- Apriyantono A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budiyanto. 1989. *Analisis Pangan*. Bogor: IPB Press.
- Ayorinde, F.O., K.A. Saeed, E. Price, A. Morrow, W.E. Collins, F. McInnis, S.K. Pollack, and B.E. Eribo. 1998. Production of poly-(β -hydroxybutyrate) from saponified *Vernonia galamensis* oil by *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21:46-50.
- Babel, W., U. Ackermann, and Breuer. 2001. Physiology, regulation and limits of synthesis of poly(3HB). Di dalam: Scheper T, managing editor. *Biopolyester: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol 71. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brandl, H., R.A. Gross, R.W. Lenz, and R.C. Fuller. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria : poly (β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 41:77.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 6:29-37.
- Byrom, D. 1990. Industrial production of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. Di dalam : Dawes EA, editor. *Novel Biodegradable Microbial Polymer*. Kluwer, Dordrecht, p 113.
- Godbole, S., S. Gote, M. Latkar, and T. Chakrabarti. 2003. Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films. *Bioresource Technology* 86 : 33-37.
- Hahn, S.K., Y.K. Chang, and S.Y. Lee. 1995. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1):34-39.
- Kansiz, M., H. Billman-Jacobe, and D. McNaughton. 2000. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3415-3420.
- Kim, Y.B. and R.W. Lenz. 2001. Polyesters from microorganisms. Dalam: Scheper T, managing editor. *Biopolyester : Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Vol 71. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lee, S.Y. and J. Choi. 2001. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganism. Dalam: Scheper T, managing editor. *Biopolyester : Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Vol 71. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lee, S.Y., J. Choi, K. Han, and J.Y. Song. 1999. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2762-2764.
- Lefebvre, G., M. Rocher, and G. Braunegg. 1997. Effect of low dissolved-oxygen concentrations on poly-(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(3): 827-833.
- Madison, L.L. and G.W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Review* 63(1):21-53. March 1999.
- Marangoni, C., A. Furigo Jr, and G.M.F. Aragão. 2001. The influence of substrate source on growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. *Braz. J. Chem. Eng.* 18(2).
- Montgomery, D.C. 1991. *Design and Analysis of Experiment*. 3rd edition. New York : John Wiley & Sons.
- Suryani, A., A.M. Fauzi, K. Syamsu, dan B.W.D. Wicaksono. 2001. Kajian penggunaan minyak sawit sebagai substrat fermentasi untuk Menghasilkan *Polyhydroxy-*

- alkanoates (Biodegradable plastic)* oleh *Ralstonia eutropha*. Laporan Penelitian Project Grant QUE.. Bogor : TIP, IPB.
- Suryani, A., A.M. Fauzi, K. Syamsu, B.W.D. Wicaksono, M. Herwina, dan A. Yulianti. 2003. Yield and thermal characteristics of *Ralstonia eutropha*'s polyhydroxyalkanoates cultivated using palm-oil based carbon. Dalam *Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*. Bandung, 29-30 Agustus 2003.
- Syamsu, K., A. Suryani, A.M. Fauzi, dan B.W.D. Wicaksono. 2003. Optimasi produksi, karakterisasi, aplikasi dan pengujian biodegradasi bioplastik yang dihasilkan oleh *Ralstonia eutropha* pada substrat hidrolisat minyak sawit. Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing IX. Bogor :Pusat Penelitian Bioteknologi IPB.
- Wicaksono, B.W.D. 2005. Optimasi produksi dan karakterisasi *poly-β-hydroxyalkanoates* (PHA) hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* menggunakan hidrolisat minyak sawit [Tesis]. Bogor : Sekolah Pascasarjana IPB.