

Produksi Polihidroksialkanoat oleh Bakteri *Ralstonia pickettii* dengan Fruktosa sebagai Sumber Karbon

Intan Widya Kustarianingsih dan Refdinal Nawfa

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: refnawfa@chem.its.ac.id

Abstrak— Penelitian ini membahas tentang produksi polihidroksialkanoat (PHA) oleh bakteri *R. pickettii* untuk menghasilkan bahan bioplastik sebagai biopolimer alternatif. Bakteri *R. pickettii* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan bakteri patogen yang mampu bertahan hidup dalam kondisi yang minimal nutrisi. Produksi (PHA) ini dilakukan dengan metode fermentasi batch dengan media minimal nutrisi (Trace Element) dengan fruktosa sebagai sumber karbon. PHA yang dihasilkan menunjukkan gugus fungsi sesuai dengan spektrum FT-IR pada 1022 cm^{-1} (ikatan C-O-C polimer), 1737 cm^{-1} (ikatan C=O ester), 2852 cm^{-1} dan 2924 cm^{-1} (ikatan CH_3 dan CH_2) dan 3448 cm^{-1} (ikatan O-H). Hasil Scanning Electron Microscopy (SEM) biomassa dapat dikatakan bahwa PHA telah berhasil dihasilkan oleh bakteri *R. pickettii* berupa padatan. Pada penelitian ini dihasilkan PHA sebanyak $0,0425\text{ g/g}$ sel kering ($4,25\%$).

Kata Kunci— bioplastik; PHA; *Ralstonia Pickettii*; fermentasi

I. PENDAHULUAN

Plastik merupakan bahan yang paling sering digunakan oleh manusia karena sifat dan fleksibilitasnya yang tinggi mengakibatkan penggunaan yang berlebih hingga mencapai jutaan kilogram per tahun. Penggunaan plastik yang terus meningkat menimbulkan kekhawatiran mengenai dampak yang dihasilkan terhadap lingkungan. Plastik konvensional yang digunakan berasal dari minyak bumi yaitu sumberdaya fosil yang sebagian besar tidak dapat didegradasi sehingga dapat menimbulkan pencemaran terhadap sekitar. Oleh karena itu, perlu adanya alternatif untuk menanggulangi keterbatasan tersebut. Bioplastik merupakan salah satu sumber daya terbarukan yang bersifat ramah lingkungan [1].

Bioplastik dapat dihasilkan dari metabolisme beberapa bakteri disaat terjadi pembatasan nutrisi di lingkungan dengan jumlah sumber karbon yang mencukupi dengan hasil samping berupa senyawa poliester, diantaranya polihidroksialkanoat (PHA). Berbagai mikroorganisme seperti *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, dan *Rhizobium* mengakumulasi PHA sebagai material cadangan energi. Setiap mikroorganisme menghasilkan komposisi polimer PHA yang berbeda. Selain itu, jenis sumber karbon yang digunakan juga akan menentukan jumlah PHA yang dihasilkan [2].

Bakteri *R. pickettii* merupakan bakteri gram negatif dan salah satu jenis bakteri oligotropik yang mampu bertahan di daerah konsentrasi yang sangat rendah nutrisi [3]- [4]. Bakteri *R. pickettii* dapat mengakumulasi PHA sebagai cadangan energi di dalam sitoplasma sel, bentuknya dapat berupa granula dan Kristal. Pada penelitian sebelumnya, Asranudin (2014) [5] telah melakukan penelitian terhadap bakteri *R. pickettii* dengan media *Nutrient Broth* (NB) ditambah glukosa dengan perolehan PHA sebesar 20%, sedangkan, Martha dkk (2010) [6] telah melakukan penelitian tentang produksi PHA dari isolat *R. eutropha* dengan penggunaan media minimal disertai penambahan asam asetat atau asam propionat dengan perolehan PHA sebesar 8,40%.

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini akan digunakan *R. pickettii* sebagai bakteri penghasil PHA menggunakan media minimal cair dengan fruktosa sebagai media kultivasi terhadap PHA yang dihasilkan dimana penggunaan media dan susbstrat ini belum pernah dilakukan sebelumnya.

II. EKSPERIMEN

A. Pembuatan Trace Element

Trace element dibuat dari Larutan garam M9 yang terbuat dari 64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 2,5 NaCl, dan 5,0 NH_4Cl kemudian dilarutkan dalam air aquades hingga volume total sebanyak 1 L. Selanjutnya, diambil 50 mL garam M9 dan ditambahkan dengan 2 mL MgSO_4 1 M, 100 μL CaCl_2 1 M dan dilarutkan dengan aquades hingga volume total sebanyak 250 mL.

B. Persiapan Kultur Cair Bakteri

Trace element diambil 50 mL dan ditambahkan dengan 2 mL MgSO_4 1 M, 100 μL CaCl_2 1 M kemudian dilarutkan dengan aquades hingga volume total sebanyak 250 mL. Selanjutnya, ditambahkan dengan fruktosa digunakan sebagai media tumbuh *R. pickettii*.

C. Produksi Biomassa PHA

R. pickettii dalam trace element (pre-kultur) 25 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Selanjutnya, pre-kultur dimasukkan pada media minimal dengan penambahan fruktosa 3% sebanyak 5 mL sehingga volume total sebesar 250 mL. Kultivasi dilakukan selama 68 jam dengan kecepatan 150 rpm (*shaker incubator*) berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri yang memasuki fase pertumbuhan stasioner.

D. Proses Pemisahan dan Pemurnian PHA

Biomassa sel yang didapat dipisahkan dari cairan kultivasi dengan metode sentrifugasi 3000 rpm. Sel yang diperoleh kemudian dicuci dengan aquades. Setelah proses pencucian, sel yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze drier*. Sel kering ditimbang, kemudian dilakukan proses ekstraksi dengan kloroform:methanol dengan perbandingan 2:1 (Rais dkk, 2007). Selanjutnya, dimasukkan kedalam labu bundar untuk dilakukan refluks pada suhu 50°C selama 12 jam. Setelah proses refluks, hasil disaring dan filtrat diuapkan menggunakan *evaporator* dengan suhu 50°C untuk mendapatkan PHA. Pemurnian PHA dilakukan dengan penambahan n-heksana berkali-kali dan didekantasi.

E. Karakterisasi PHA

Karakterisasi plastik PHA dilakukan menggunakan *Fourier Transform-InfraRed* (FTIR) untuk mengetahui terbentuknya plastik PHA dengan metode pendekatan gugus fungsi. Selain itu, dilakukan karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) untuk mengetahui morfologi dari *R.pickettii* yang mengandung PHA.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kultur Cair Bakteri *Ralstonia pickettii*

R. pickettii mampu untuk tumbuh pada media minimal. Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan kekeruhan yang terjadi dimana sebelum bakteri diinokulasikan media bening tidak berwarna, sedangkan setelah bakteri diinokulasikan terjadi perubahan warna menjadi putih keruh.

B. Produksi Biomassa PHA

Bakteri hasil regenerasi diambil sebanyak satu koloni dan diinokulasikan ke dalam media garam M9, MgSO₄, dan CaCl₂(*trace element*). Kultur dilakukan pre-inkubasi pada *shaker* inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, pre-kultur dipindahkan pada media 250 mL media minimal dengan Proses inkubasi dilakukan selama 64 jam. Lama waktu inkubasi berdasarkan pada fasa akhir eksponensial, karena pada fasa ini bakteri menghasilkan metabolit sekunder paling maksimum untuk mempertahankan diri karena kandungan nutrisi media yang ada sudah mulai berkurang (Junairiah dkk., 2014).

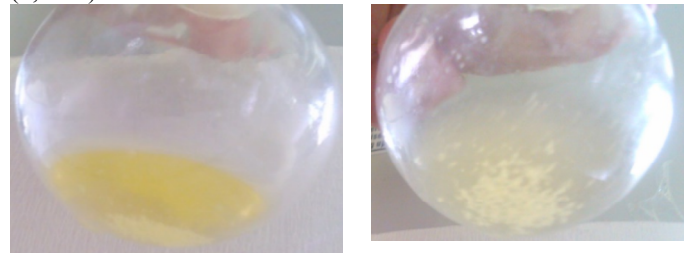
Biomassa hasil inkubasi dalam *shaker* dipisahkan dari media biakannya menggunakan *sentrifuge* selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Sentrifugasi merupakan teknik pemisahan berdasarkan berat molekul dengan kecepatan tertentu sehingga partikel yang memiliki berat moleku lebih besar terkumpul ke dasar tabung. Hasil yang diperoleh berupa endapan berwarna putih dan supernatan bening (tidak berwarna). Kemudian biomassa dimasukkan dalam *freezer* untuk menonaktifkan metabolisme sel. Sel kering yang telah didapat ditimbang massanya dan diperoleh sebesar 0,2817 g/L.

C. Proses Pemisahan dan Pemurnian PHA

Sel kering sebanyak 0,2817 gram dihaluskan terlebih dahulu pada mortar. Hal ini digunakan untuk memperluas permukaan sel kering bakteri. Selanjutnya, sel kering diekstrak menggunakan methanol : kloroform (2:1 v/v).

Campuran pelarut metanol-kloroform ini digunakan sebagai pelarut yang disesuaikan dengan sifat kepolaran PHA. Campuran pelarut tersebut akan meningkatkan indeks polaritas kloroform sehingga sifat polar meningkat dimana sesuai dengan sifat PHA yang merupakan rantai panjang dengan adanya gugus karbonil di dalamnya. Selain itu, poliester merupakan rantai polimer yang cukup panjang sehingga mengubah kepolaran dari senyawa tersebut untuk cenderung berubah pada sifat non polar. Hal ini dijadikan sebab untuk mencampurkan metanol dengan pelarut kloroform yang bersifat non polar sehingga campuran yang terbentuk bersifat semi polar.

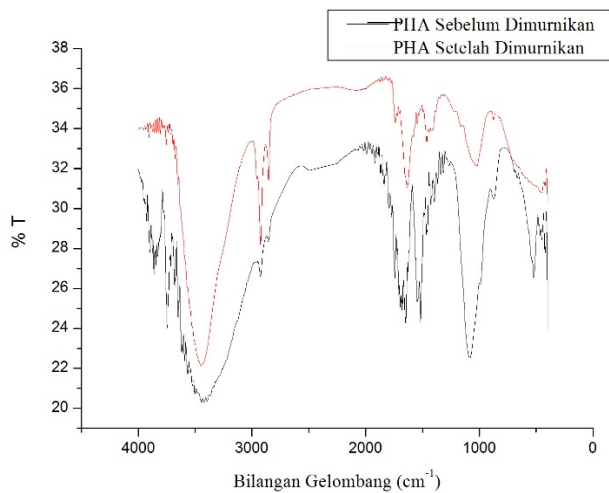
PHA yang didapat berupa padatan berwarna putih. Pada gambar 1(a) merupakan hasil pemisahan PHA sebelum dimurnikan, sehingga tampak cairan berwarna kuning dimana merupakan hasil metabolit lain berupa lemak dan asam lemak. Sedangkan pada gambar 1(b) hanya didapat PHA berupa padatan berwarna putih. Pemurnian menggunakan n-heksan berfungsi untuk memurnikan PHA dari pengotor hasil metabolit lain seperti asam lemak dan lain-lain. PHA yang didapat pada penelitian ini yaitu sebesar 0,0425 g/g sel kering (4,25%).



Gambar 1 (a) sebelum dimurnikan (b) sesudah dimurnikan

D. Karakterisasi PHA

Pada penelitian kali ini, dilakukan analisa PHA melalui FT-IR. Analisa PHA dilakukan sebanyak dua kali yaitu sebelum dan setelah dimurnikan. Hasil spektroskopi FT-IR dari sampel PHA dapat dilihat pada gambar 2. Pada hasil spektra FT-IR sampel ketika sebelum dimurnikan, menunjukkan adanya 5 puncak utama, yaitu pada bilangan gelombang 1084 cm⁻¹, 1741 cm⁻¹, 2856 cm⁻¹, 2926 cm⁻¹, dan 3423 cm⁻¹. Puncak tersebut hampir sama dengan PHB komersil yaitu pada bilangan gelombang 1054 cm⁻¹, 1726 cm⁻¹, 2933 cm⁻¹, 2984 cm⁻¹, dan 3440 cm⁻¹. Pada hasil FT-IR PHA ketika sebelum dimurnikan terdapat banyak puncak yang tumpang tindih, hal ini mungkin dikarenakan masih adanya pengotor yang tertinggal dalam sampel.



Gambar 2. Spektra FT-IR PHA

Setelah dilakukan pemurnian dengan menggunakan n-heksan, spektra FT-IR yang didapat juga hampir sama dengan spektra sebelumnya yaitu terbentuknya 5 puncak utama pada 1022 cm⁻¹, 1737 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 2924 cm⁻¹, 3448 cm⁻¹. Hal yang nampak terlihat jelas pada kedua spektra adalah puncak OH yang sangat berbeda, dimana pada spektra PHA sebelum dimurnikan terdapat puncak yang lebih lebar. Hal ini bisa dimungkinkan adanya kontribusi gugus OH dari lemak ataupun asam lemak.

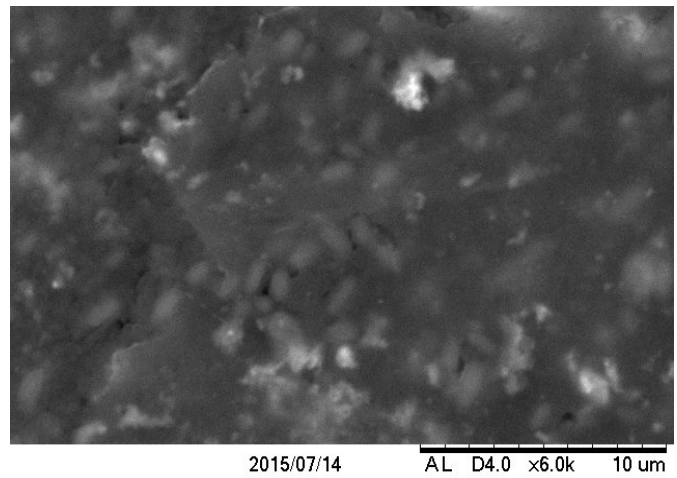
Berdasarkan spektra di atas, maka terlihat beberapa spektra yang menunjukkan gugus fungsi dari PHA sampel baik sebelum maupun sesudah dimurnikan dan dibandingkan dengan PHA komersial dapat ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Tabel Perbandingan Spektra FT-IR

Ikatan (%)	Sebelum dimurnikan (cm ⁻¹)	Sesudah dimurnikan (cm ⁻¹)	Standar PHA komersil (cm ⁻¹)
C-O-C	1084	1022	1054
C=O ester	1741	1737	1726
C-H ₃	2856	2852	2933
C-H ₂	2926	2924	2984
O-H	3423	3448	3440

Pada spektra FT-IR PHA komersil, adanya muncul pada bilangan gelombang tertentu antara lain 1054 cm⁻¹ merupakan vibrasi ikatan C-O, 1726 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi khas ikatan C=O pada ester, 2933 cm⁻¹ dan 2984 cm⁻¹ vibrasi ikatan C-H sp² serta pada 3440 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi ikatan O-H. Puncak-puncak spektra tersebut dapat dilihat bahwa hampir sama dengan spektra yang muncul pada sampel PHA *R. pickettii* setelah dimurnikan.

Hasil analisa PHA menggunakan SEM dapat dilihat pada Gambar 3.



PHA

Gambar 3. Morfologi SEM PHA

Biomassa sel PHA yang didapat memiliki morfologi dengan kerapatan yang rendah. Hal ini dapat dikarenakan karena biopolimer yang terbuat dari mikroorganisme ini merupakan biopolimer yang sangat mudah untuk didegradasi akibat kerapatan antar molekulnya yang sangat rendah.

IV. KESIMPULAN

PHA telah berhasil diproduksi dari *R. pickettii* berupa padatan berwarna putih. PHA yang dihasilkan sebesar 0,0425 g/g sel kering (4,25%). Biopolimer PHA menunjukkan puncak spektrum FT-IR pada 1022 cm⁻¹ (ikatan C-O-C polimer), 1737 cm⁻¹ (ikatan C=O ester), 2852 cm⁻¹ dan 2924 cm⁻¹ (ikatan CH₃ dan CH₂), 3448 cm⁻¹ (ikatan O-H). Berdasarkan hasil SEM yang dilakukan, sel yang didapat mengandung morfologi granula PHA yang hampir sama dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Aarthi, 2011.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada dosen pembimbing Drs. Refdinal Nawfa, M.S dan Prof. Surya Rosa Putra. Serta penulis menyampaikan ucapan terima kasih atas semua doa, dukungan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama proses pengerjaan penelitian dan penyelesaian jurnal ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Pilla, S. (2011). *Handbook of Bioplastic and Biocomposites Engineering Applications*. Wiley, USA.
- [2] Jung, Y. P. (2002). Metabolic Engineering of *Alcaligenes Eutrophus* through the Transformation of Cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26, 201-208.
- [3] Adley, C. P. (2007). *Ralstonia Pickettii* in Environmental Biotechnology Potential and Applications. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 754-764.

- [4] Anatia, D. (2007). Pengaruh suhu, jenis, dan perbandingan pelarut terhadap kelarutan bioplastik dari PHA (poly-hidroxyalkanoates) yang dihasilkan *Ralstonia Eutropha* pada substrat hidrolisat pati sagu, . *skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor*.
- [5] Asranudin; Surya Rosa. (2014). *Efek penambahan PEG 400 pada Plastik PHA yang Diproduksi Dari Ralstonia pickettii*. Prosiding Seminar Nasional Kimia. Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya
- [6] Martha Aznury, Tjandra Setiadi, dan Adi Pancoro. (2010). *Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Produksi Bioplastik Polihidroksialkanoat (PHA) dengan Ralstonia eutropha*. Jurnal Teknik Kimia Indonesia Vol.9, No.1 April 2010, 28-32
- [7] Junairiah, Ni'matuzzahroh, Suwito, H. (2014). *Produksi Elisitor untuk Menstimulasi Metabolit Sekunder pada Kultur Jaringan Tumbuhan*. FMIPA Unair. Surabaya.