

Optimasi Produksi Poli- β -Hidroksibutirat (PHB) oleh *Bacillus* sp. PSA10 The Optimization of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Production by *Bacillus* sp. PSA10

Nur Arfa Yanti^{1*}, Sebastian Margino², dan Langkah Sembiring³

¹Program studi Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Haluoleo Kendari

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: Arfayanti73@yahoo.com *penulis untuk korespondensi

Abstract

A new strain characterized as *Bacillus* sp. PSA10 was found to produce poly- β -hydroxybutyrate (PHB) at concentration of 52.28% (g PHB/g dry cell weight) in shaken flask culture, using sago starch as a carbon source. This research is aimed to determine the optimum culture condition of PHB production *Bacillus* sp. PSA10 at laboratory scale. Optimization of PHB production was conducted in this research, in terms of inoculum concentration, concentration of the major components in minimal medium, environmental condition and incubation time. The result showed that optimum conditions for the production of PHB by *Bacillus* sp. PSA10 were achieved at minimal medium (Ramsay medium) with 5% (v/v) inoculum concentration, 2% (w/v) sago starch, 1.0 g/l (NH₄)₂SO₄, 6.7 g/l Na₂HPO₄·7H₂O, and 0 g/l KCl. The optimum environmental conditions were achieved with initial pH 7, temperature 37°C, agitation speed at 150 rotary per minute (rpm) and the best of incubation time was 48 hour. Under this optimum condition, the maximum PHB production by *Bacillus* sp. PSA10 increased from 52.28% to 71.35% (g PHB/g dry cell weight) at 48 hour cultivation. Therefore, *Bacillus* sp. PSA10 is potential to apply for PHB production from sago starch at industrial scale.

Key words: Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production, *Bacillus*, sago starch, optimization

Abstrak

Strain baru yang dikarakterisasi sebagai *Bacillus* sp. PSA10 ditemukan mampu memproduksi poli- β -hidroksibutirat (PHB) dengan konsentrasi 52,28% (g PHB/g berat kering sel) menggunakan pati sago sebagai sumber karbon pada skala erlenmeyer. Penelitian ini bertujuan mendeterminasi kondisi optimum *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB pada skala laboratorium. Optimasi produksi PHB yang dilakukan pada penelitian ini meliputi konsentrasi inokulum, konsentrasi nutrisi pada medium minimal, kondisi lingkungan dan waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 pada medium minimal (Ramsay medium) adalah konsentrasi inokulum 5% (v/v), konsentrasi pati sago 2% (b/v), (NH₄)₂SO₄ 1,0 g/l, Na₂HPO₄·7H₂O 6,7 g/l, dan KCl 0 g/l. Kondisi lingkungan optimum untuk produksi PHB dicapai pada pH awal media 7, suhu kultivasi 37°C, kecepatan agitasi 150 rpm dan waktu inkubasi terbaik adalah 48 jam. Di bawah kondisi optimum, produksi PHB maksimum *Bacillus* sp. PSA10 meningkat dari 52,28% menjadi 71,35% (g PHB/g berat kering sel) pada 48 jam masa kultivasi. Dengan demikian, *Bacillus* sp. PSA10 berpotensi diaplikasikan untuk produksi PHB menggunakan substrat pati sago pada skala industri.

Kata kunci: Produksi Poli- β -hidroksibutirat (PHB), *Bacillus*, pati sago, optimasi

Diterima: 15 Desember 2009, disetujui: 24 Juni 2010

Pendahuluan

Poli- β -hidroksibutirat (PHB) adalah polimer yang diproduksi oleh beberapa jenis bakteri secara intraselular pada kondisi substrat

pertumbuhan tidak seimbang, yaitu ketika nitrogen, fosfor atau oksigen terbatas tetapi sumber karbon berlebih (Anderson dan Dawes, 1990). PHB merupakan poliester termoplastik yang dapat didegradasi (*biodegradable*) dan

memiliki sifat sama dengan plastik sintetik atau plastik berbahan dasar minyak bumi (seperti polipropilen) (Byrom, 1987). Dengan demikian, PHB dapat digunakan sebagai pengganti plastik sintetik yang sulit didegradasi, sehingga polusi yang disebabkan oleh limbah plastik dapat teratasi.

Pemanfaatan PHB sebagai pengganti plastik sintetik masih menemui kendala karena biaya produksi yang tinggi (Lee, 1996). Dengan demikian, pengembangan produksi PHB diarahkan pada upaya untuk menurunkan biaya produksi tanpa mengurangi kuantitas dan kualitasnya. Upaya tersebut antara lain difokuskan pada pencarian bakteri *indigenous* unggul penghasil PHB, penggunaan sumber karbon murah, seperti pati sagu dan optimasi kondisi fermentasi pada produksi PHB.

Bacillus sp. PSA10 merupakan strain bakteri *indigenous* yang diisolasi dari tepung sagu basah pengolahan sagu di kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara (Yanti *et al.*, 2009). Bakteri ini mampu mengakumulasi PHB menggunakan pati sagu sebagai sumber C hingga 52,28% (g PHB/g berat kering sel). Beberapa bakteri yang telah dilaporkan mampu memproduksi PHB dari glukosa sebagai sumber C adalah *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 dengan produksi PHB kurang lebih 80% (Lee, 1996), *Bacillus megaterium* Y6 sebanyak 48,13% (Aslim *et al.*, 2002), *Bacillus cereus* UW85 sebanyak 25% (Labuzek dan Radecka, 2001), *Bacillus brevis* M6 sebanyak 41,67% (Yilmaz *et al.*, 2005) dan *Bacillus* sp. BA-019 yang mampu memproduksi PHB dari molase sebagai sumber Cnya sebanyak 47,48% (Kulpreecha *et al.*, 1997). Jika dibandingkan dengan beberapa literatur acuan tersebut, maka *Bacillus* sp. PSA10 berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai penghasil PHB untuk skala industri. Kemampuan *Bacillus* sp. PSA10 menggunakan pati sagu sebagai sumber C dalam memproduksi PHB merupakan suatu keuntungan karena pati sagu harganya lebih murah dibandingkan glukosa sehingga biaya produksi dapat diturunkan.

Produksi PHB sangat dipengaruhi oleh kondisi fermentasi terutama konsentrasi nutrisi dan kondisi lingkungan sehingga optimasi kondisi fermentasi produksi PHB untuk setiap strain bakteri sangat penting dilakukan (Lee,

1996; Grothe *et al.*, 1999). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi kondisi fermentasi untuk produksi PHB oleh strain bakteri baru *Bacillus* sp. PSA10 sehingga dapat diperoleh produksi PHB yang maksimal.

Metode Penelitian

Strain Bakteri dan Media Kultivasi

Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah PSA10 yang diisolasi dari tepung sagu basah dan diidentifikasi sebagai strain anggota genus *Bacillus* (Yanti *et al.*, 2009).

Medium kultivasi yang digunakan untuk produksi PHB adalah medium minimal Ramsay (Ramsay *et al.*, 1992), dengan komposisi (l⁻¹ akuades) : 1.0 g (NH₄)₂SO₄, 6.7 g Na₂HPO₄.7H₂O, 1.0 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 60 mg *Ferrous Amonium Citrate*, 10 mg CaCl₂.2H₂O, dan 1 ml *trace element*. Medium Ramsay yang digunakan untuk studi optimasi, komposisinya disesuaikan dengan perlakuan optimasi.

Metode Kultivasi untuk Optimasi Produksi PHB

Produksi PHB dilakukan menggunakan erlenmeyer 250 ml dengan pengaturan kondisi pertumbuhan meliputi beberapa variasi perlakuan. Perlakuan yang dilakukan adalah optimasi konsentrasi inokulum (5, 10, 15, 20% (v/v), konsentrasi nutrisi pada medium kultivasi yang meliputi konsentrasi pati sagu (1, 2, 3, 4% b/v), (NH₄)₂SO₄ (0,5; 1; 1,5; 2 g/l), Na₂HPO₄.7H₂O (0; 2,2; 4,4; 6,7; 8,9 g/l), KCl (0; 0,5; 1; 1,5; 2 g/l) dan kondisi lingkungan, yang meliputi pH (5, 6, 7, 8), suhu (25, 30, 37°C) dan kecepatan agitasi (125, 150, 200 rpm). Setiap perlakuan diinkubasi selama 72 jam, dan pada akhir masa inkubasi dilakukan pengukuran berat kering sel dan kadar PHB. Pada optimasi produksi PHB ini dilakukan perlakuan tunggal secara bertahap dan hasil terbaik dari masing-masing tahap dijadikan acuan untuk perlakuan berikutnya. Monitoring jumlah bakteri dilakukan hanya pada perlakuan konsentrasi inokulum.

Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Produksi PHB

Studi mengenai waktu inkubasi pada produksi PHB dilakukan pada kondisi optimum

yang diperoleh. Penelitian dilakukan menggunakan fermentor kapasitas 2 L dengan kondisi fermentasi meliputi kecepatan agitasi 150 rpm, aerasi 1,6 L/menit, suhu 37°C dan busa (*foam*) yang terbentuk pada medium dikontrol dengan penambahan antifoam (silikon). Sampling dilakukan dengan interval waktu setiap 6 jam selama 78 jam masa inkubasi dan setiap sampling dilakukan pengukuran terhadap berat kering sel dan kadar PHB.

Prosedur Analisis

Berat kering sel ditentukan dengan menempatkan 1 ml suspensi sel pada botol timbang yang telah diketahui beratnya kemudian dioven pada suhu 80°C sampai diperoleh berat konstan. Analisis kadar PHB diawali dengan ekstraksi PHB menggunakan metode *n-hexan-aceton*-dietil eter dan kadar PHB diukur menggunakan spektrofotometer UV (Shimadzu 6A) pada panjang gelombang 235 nm (Senior et al., 1972). Produksi PHB dideterminasi sebagai persentase rasio konsentrasi PHB dengan berat kering sel (g PHB/g berat kering sel). Jumlah bakteri dilakukan dengan menggunakan metode hitungan cawan (*plate count*).

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menjelaskan kondisi fermentasi *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB. Berdasarkan hasil penelitian ini akan diperoleh kondisi optimum *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB.

Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi inokulum yang digunakan pada penelitian ini adalah 2,5, 5, 10, 15 dan 20% (v/v). Gambar 1 menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi inokulum dapat meningkatkan pertumbuhan sel *Bacillus* sp. PSA10 tetapi produksi PHBnya (persentase PHB perberat kering sel) menurun. Produksi PHB tertinggi diperoleh pada konsentrasi inokulum 5% yaitu 50,86% (g PHB/g berat kering sel).

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah inokulum dengan metode hitungan cawan (*plate count*) untuk *Bacillus* sp. PSA10 menunjukkan konsentrasi inokulum 2,5% (b/v) sama dengan 10^5 cfu/ml, 5% (10^7 cfu/ml), 10% (10^9 cfu/ml), 15% (10^{10} cfu/ml), dan 20% (10^{12} cfu/ml).

Penggunaan inokulum yang tepat dapat mempercepat proses fermentasi dengan mengurangi lamanya fase lag (Grothe et al., 1999; El-Sayed et al., 2009), sehingga optimasi konsentrasi inokulum sangat penting dilakukan untuk mempercepat dan meningkatkan produksi PHB. Hasil optimasi konsentrasi inokulum dari *Bacillus* sp. PSA10 menunjukkan konsentrasi inokulum optimum untuk produksi PHB adalah 5% dengan jumlah inokulum adalah 10^7 cfu/ml. Konsentrasi dan jumlah inokulum optimum isolat PSA10 yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian yang melaporkan bahwa konsentrasi inokulum optimum untuk produksi PHB berkisar antara 5–10% (Baei et al., 2010; Mahmoudi et al., 2010) dan jumlah inokulum optimum untuk produksi PHB berkisar dari 10^6 – 10^8 cfu/ml (Patwardhan dan Srivastava, 2004; Vijayendra et al., 2007; El-Sayed et al., 2009).

Konsentrasi Nutrien Medium Kultivasi

Konsentrasi nutrien medium kultivasi yang dioptimasi adalah pati sagu (sumber C), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sumber N), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sumber P), dan KCl (sumber K).

Produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi pati sagu 2% (b/v) yaitu 44,39% (g PHB/g berat kering sel) dan menurun jika konsentrasi pati sagu lebih dari 2%, dengan demikian konsentrasi pati sagu optimum untuk produksi PHB adalah 2% (Gambar 2a).

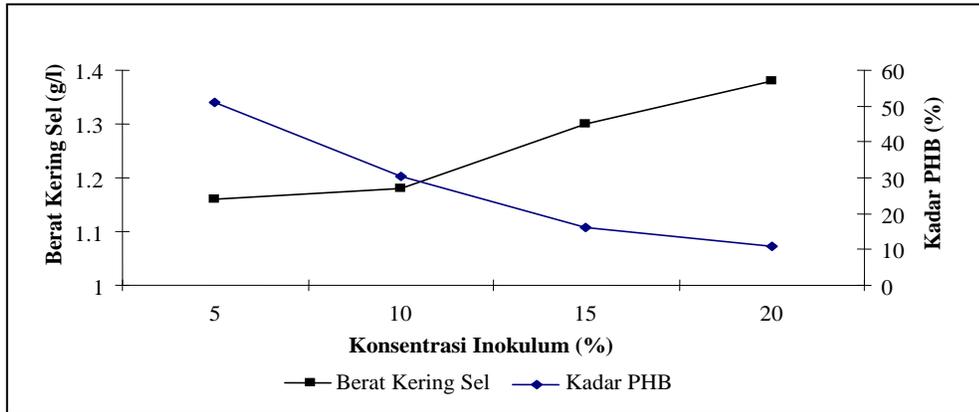
Sumber Nitrogen yang digunakan adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Gambar 2b menunjukkan bahwa konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang semakin tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan sel, tetapi produksi PHB akan menurun jika konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lebih dari 1 g/l. Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l merupakan konsentrasi optimum untuk produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 karena produksi PHB tertinggi diperoleh pada konsentrasi tersebut yaitu 41,76% (g PHB/g berat kering sel).

Sumber fosfat (P) yang digunakan dalam adalah $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Konsentrasi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hingga 6,7 g/l dapat meningkatkan pertumbuhan sel dan produksi PHB (% PHB perberat kering sel) tetapi jika konsentrasi lebih dari 6,7 g/l akan menurunkan produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 (Gambar 2c). Produksi PHB

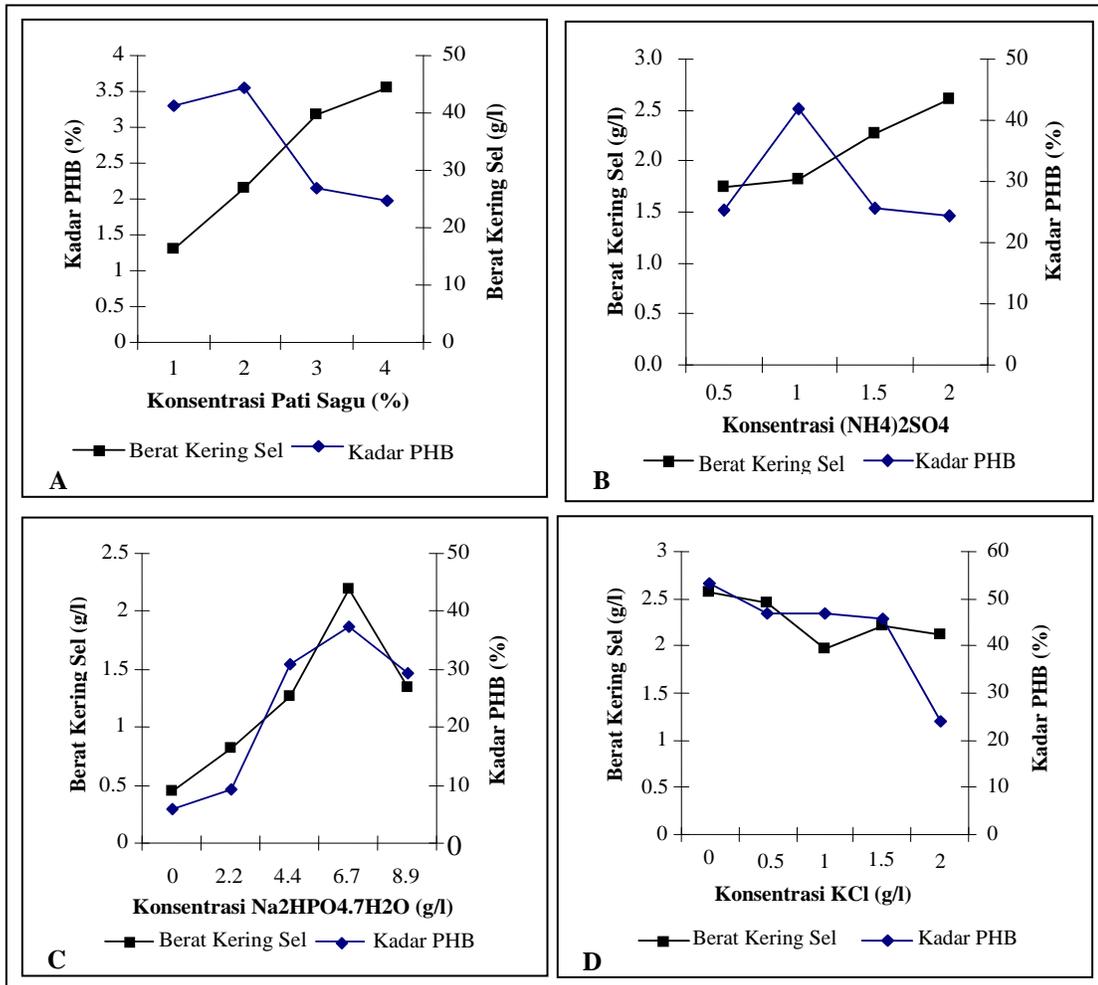
tertinggi pada konsentrasi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.7 g/l yaitu 37,44% (g PHB/g berat kering sel).

Sumber Kalium (K) yang digunakan adalah KCl. Keberadaan KCl dalam media kultivasi *Bacillus* sp. PSA10 untuk memproduksi PHB dapat menurunkan pertumbuhan dan

produksi PHB. Produksi PHB tertinggi diperoleh pada konsentrasi KCl 0 g/l yaitu 53,31% (g PHB/g berat kering sel) (Gambar 2d). Hasil ini menunjukkan bahwa dalam memproduksi PHB, *Bacillus* sp. PSA10 tidak membutuhkan sumber K.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan dan produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi nutrisi medium kultivasi terhadap pertumbuhan dan produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 : konsentrasi pati sagu (a), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (c) dan KCl (d)

Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi nutrisi pada medium kultivasi menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB membutuhkan pati sagu sebanyak 2% sebagai sumber C, sumber P ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sebanyak 6,7 g/l, sumber N $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 1 g/l dan tidak membutuhkan sumber K (KCl). Konsentrasi nutrisi optimal pada medium kultivasi yang diperoleh tidak berbeda dengan konsentrasi medium Ramsay yang digunakan sebagai kontrol. Medium Ramsay merupakan medium yang digunakan untuk memproduksi PHB oleh *Alcaligenes latus* ATCC 29714, *A. eutrophus* DSM 545, *B. Cereus* NRC 9008, *P. pseudoflava* ATCC 33668, *P. cepacia* ATCC 17759 dan *Micrococcus halodenitrificans* NRC 14024 dengan sumber C glukosa (Ramsay et al., 1990). Hasil penelitian ini dan penelitian yang dilakukan oleh Ramsay et al., (1990) menjelaskan bahwa konsentrasi nutrisi pada medium Ramsay dapat digunakan untuk produksi PHB oleh banyak strain anggota spesies bakteri.

Keterbatasan salah satu nutrisi utama seperti N, P atau K pada media kultivasi dapat meningkatkan produksi PHB (Grothe et al., 1999; Sangkharak dan Prasertsan, 2008; Vijayendra et al., 2007). Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengaruh konsentrasi sumber N dan P pada produksi PHB mengindikasikan bahwa nutrisi yang perlu dibatasi untuk produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 adalah sumber nitrogen (N). Indikasi yang menunjukkan bahwa sumber N merupakan faktor pembatas produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 dapat dilihat terjadinya penurunan produksi PHB oleh isolat PSA10 jika konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lebih dari 1 g/l (Gambar 2b). Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa produksi PHB dapat meningkat dengan membatasi sumber N pada media kultivasi (Kulpreecha et al., 1997; Md.Din et al., 2006; Sabra dan Abou-Zeid, 2008). Anderson dan Dawes (1990) juga menyatakan bahwa akumulasi PHB di dalam sel terjadi jika sumber C pada medium kultivasi berlebih tetapi salah satu nutrisi penting lainnya seperti N, P, atau oksigen terbatas.

Kondisi Lingkungan

Kondisi lingkungan yang dioptimasi adalah pH awal media, suhu kultivasi dan

kecepatan agitasi. Produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 tertinggi diperoleh pada pH awal media 7,0 yaitu 49,43% (g PHB/g berat kering sel) (Gambar 3a). pH awal media yang lebih rendah dari 7,0 (5,0 dan 6,0), tidak menghambat pertumbuhan *Bacillus* sp. PSA10 tetapi menghambat produksi PHB. Hasil ini mengindikasikan bahwa pH medium kultivasi yang asam dapat menjadi faktor pembatas bagi sintesis PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10. Hal ini mungkin disebabkan oleh pH media yang asam dapat mempengaruhi ketersediaan beberapa mikro nutrisi dalam media kultivasi untuk digunakan oleh isolat bakteri. Dugaan ini sesuai dengan hasil penelitian Grothe et al., (1999) dan Ali et al., (2006) yang melaporkan bahwa pH media berpengaruh pada ketersediaan beberapa nutrisi untuk digunakan oleh bakteri.

Produksi PHB dan pertumbuhan sel *Bacillus* sp. PSA10 tertinggi diperoleh pada suhu 37°C (Gambar 3b). Suhu optimum untuk produksi PHB adalah 37°C karena pada suhu tersebut diperoleh kadar PHB tertinggi yaitu 46,05% (g PHB/g berat kering sel). Suhu kultivasi mempengaruhi produksi PHB karena dapat menginduksi ekspresi gen *phb* yaitu gen pengkode enzim yang berperan dalam sintesis PHB (Shi et al., 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Shi et al., (2001) melaporkan bahwa suhu 30–40°C dapat menginduksi ekspresi gen *phb* dan meningkatkan produksi PHB oleh *Escherichia coli* rekombinan JM109 namun produksi PHB tertinggi dicapai pada suhu kultivasi 30–37°C.

Kecepatan agitasi yang semakin tinggi akan meningkatkan pertumbuhan sel *Bacillus* sp. PSA10 namun produksi PHB akan menurun jika kecepatan agitasi melebihi 150 rpm (Gambar 3c). Produksi PHB tertinggi diperoleh pada kecepatan agitasi 150 rpm yaitu 51,11% (g PHB/g berat kering sel).

Kecepatan agitasi yang lebih tinggi dari 150 rpm dapat menurunkan produksi PHB dari *Bacillus* sp. PSA10. Kecepatan agitasi berhubungan dengan kadar oksigen yang tersedia dalam media, yaitu ketika kecepatan agitasi tinggi maka transfer oksigen ke media semakin banyak. Penelitian ini mengindikasikan bahwa kecepatan agitasi 150 rpm yang optimal mentransfer O_2 ke media kultivasi untuk memaksimalkan produksi PHB oleh *Bacillus* sp.

PSA10. Jika kecepatan agitasi lebih dari 150 rpm maka transfer O₂ pada media akan berlebih dan ketersediaan O₂ yang tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan sel *Bacillus* sp. PSA10 tetapi produksi PHBnya menurun. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Kim dan Chang (1998) yang melaporkan bahwa kecepatan agitasi yang tinggi dapat meningkatkan ketersediaan O₂ dalam media dan O₂ yang tinggi menjadi faktor pembatas bagi *Azotobacter chroococcum* dalam memproduksi PHB dari substrat pati terlarut.

Hasil optimasi kondisi lingkungan *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB diperoleh pH awal optimum adalah 7, suhu kultivasi 37°C, dan kecepatan agitasi 150 rpm. Hasil penelitian ini mendukung bahwa pH, suhu kultivasi dan kadar O₂ pada media produksi merupakan faktor penting yang mempengaruhi produksi PHB sehingga ketiga faktor tersebut perlu dikontrol secara akurat pada saat fermentasi menggunakan fermentor.

Waktu Inkubasi

Waktu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 78 jam dengan interval waktu sampling setiap 6 jam. Hasil penelitian pada Gambar 4 menunjukkan bahwa pertumbuhan sel meningkat secara signifikan pada jam ke-12 dan memasuki masa stationer pada jam ke-36 hingga jam ke-48 dan mulai menurun pada jam ke-54. Produksi PHB dimulai pada jam ke-12 atau pada fase eksponensial dan optimal pada jam ke-48 atau pada fase stationer akhir. Produksi PHB mulai menurun pada jam ke-54 bersamaan dengan menurunnya berat kering sel.

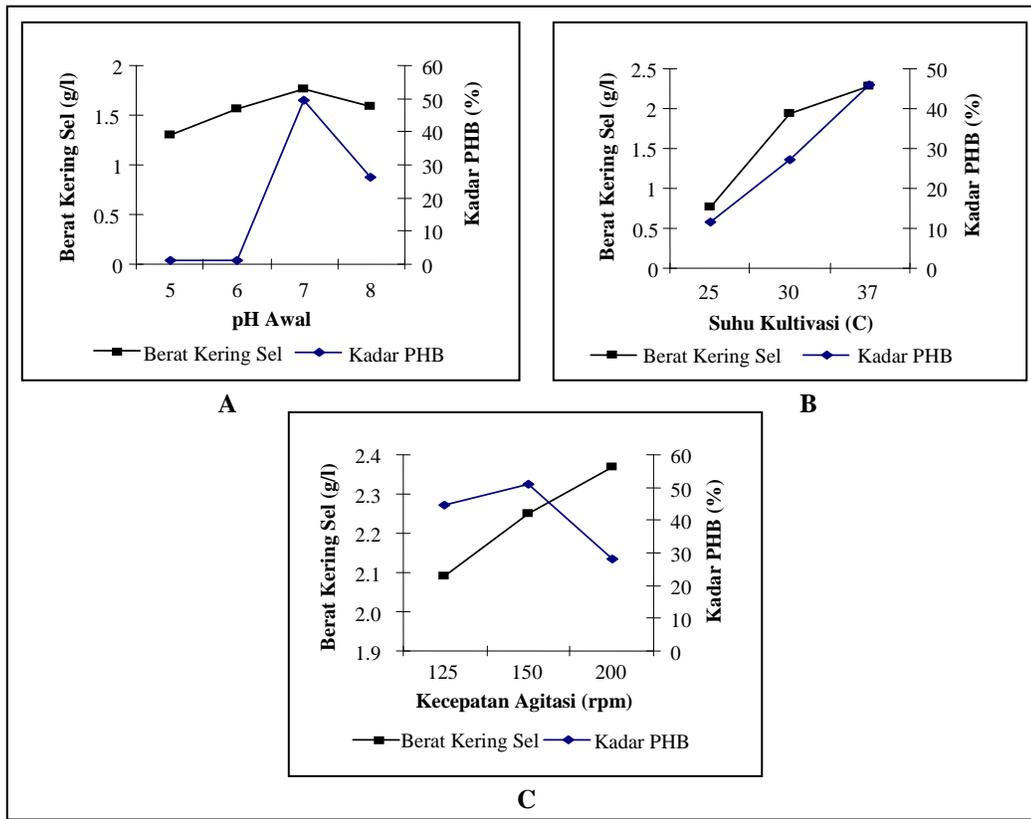
Produksi PHB tertinggi diperoleh pada jam ke-48 yaitu 71,35% (g PHB/g berat kering sel). Hasil ini menunjukkan bahwa produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 membutuhkan waktu 48 jam masa inkubasi dan waktu inkubasi yang terlalu lama akan menurunkan kadar PHB yang diproduksinya.

Produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 dimulai pada fase eksponensial dan mencapai produksi maksimal pada fase stationer setelah fase

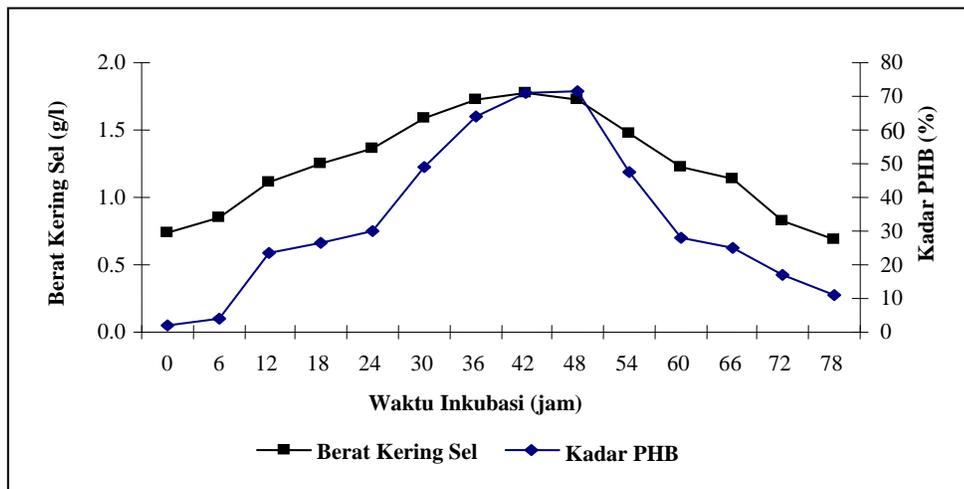
stationer kadar PHB menurun. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 berkaitan dengan pertumbuhan (*growth associated*), yaitu bahwa produksi PHB meningkat bersamaan dengan meningkatnya pertumbuhan sel dan menurun bersamaan dengan menurunnya pertumbuhan. Menurut Lee (1996), bakteri penghasil PHB dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan kondisi substrat untuk produksi PHB yaitu (i) *non growth associated*, umumnya bakteri ini memproduksi PHB pada fase stationer, contohnya *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 dan (ii) *growth associated*, pada umumnya bakteri ini mengakumulasi PHB selama fase pertumbuhan (fase eksponensial), contohnya *Alcaligenes latus* ATCC 29714 (Lee, 1996) dan *Bacillus mycoides* RLJ B-017 (Borah *et al.*, 2002).

Penurunan kadar PHB yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. PSA10 setelah fase stationer disebabkan semakin lama waktu inkubasi maka substrat dalam media semakin berkurang dan jika substrat berkurang maka PHB yang juga berfungsi sebagai cadangan makanan akan digunakan oleh bakteri tersebut untuk pertumbuhannya. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa produksi PHB tertinggi diperoleh pada fase stationer, setelah fase tersebut kadar PHB akan menurun (Yuksekdag *et al.*, 2004; Sangkharak dan Prasertsan, 2008). Yuksekdag *et al.*, (2004) melaporkan bahwa *B. subtilis* 25 dan *B. megaterium* 12 mencapai produksi PHB tertinggi pada fase stationer yaitu jam ke-45 setelah masa inkubasi.

Produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 menggunakan pati sagu sebagai sumber C dapat meningkat signifikan dari 52,28% menjadi 71,35% setelah kondisi fermentasi di optimasi. Dengan demikian, *Bacillus* sp. PSA10 merupakan strain penghasil PHB yang potensial untuk digunakan untuk skala industri karena kemampuannya menggunakan sumber karbon yang lebih murah sehingga biaya produksi dapat diturunkan.



Gambar 3. Pengaruh Kondisi lingkungan terhadap pertumbuhan dan produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 : pH awal media (a), suhu kultivasi (b), dan kecepatan agitasi (c).



Gambar 4. Pengaruh waktu inkubasi terhadap pertumbuhan dan produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10.

Simpulan dan Saran

Simpulan

Kondisi optimum *Bacillus* sp. PSA10 dalam memproduksi PHB adalah konsentrasi inokulum 5% (v/v), pati sagu 2% (b/v),

(NH₄)₂SO₄ 1,0 g/l, Na₂HPO₄.7H₂O 6,7 g/l, KCl 0 g/l, pH awal media 7, suhu kultivasi 37°C, kecepatan agitasi 150 rpm dan waktu inkubasi 48 jam. Produksi PHB *Bacillus* sp. PSA10 pada kondisi optimum meningkat dari 52,28% menjadi 71,35% (g PHB/g berat kering sel) setelah 48 jam inkubasi.

Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan mengenai produksi PHB dengan fermentasi sistem *fed-batch* atau *continuous* untuk menguji efektivitas produksi PHB oleh *Bacillus* sp. PSA10 menggunakan pati sagu sebagai substratnya.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai oleh Hibah program Doktor tahun anggaran 2009 kepada Nur Arfa Yanti.

Daftar Pustaka

- Ali, A. Soetarto, E.S. dan Widada, J.S. 2006. Purifikasi dan Karakterisasi Krom Reduktase *Bacillus* sp LKA9. *Biota*, XI (2): 92–100.
- Anderson, A.J. dan Dawes, E.A. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54 (4): 450–472.
- Aslim, B., Yuksekdog, Z.N. dan Beyatli, Y. 2002. Determination of PHB Growth Quantities of Certain *Bacillus* Species Isolated from Soil. *Turkish Electronic J. Biotechnology*, 24–30.
- Baei, M.S., Najafpour, G.D., Lasemi, Z., Tabandeh, F., Younesi, H., Issazadeh, H. dan Khodabandeh, M. 2010. Optimization of PHAs Production from Dairy Industry Wastewater (Cheese whey) by *Azohydromonas lata* DSMZ 1123. *Iranica J. Energy & Environment*, 1 (2): 132–136.
- Borah, B., Thakur, P.S. dan Nigam, J.N. 2002. The influence of Nutritional and Environmental conditions on the Accumulation of Poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J. Applied Microbiology*, 92: 776–783.
- Byrom, D. 1987. Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics. *Tibtech*, 5: 246–250.
- Grothe, E., Young, M. dan Chisti, Y. 1999. Fermentation Optimization for the Production of Poly (β -hydroxybutyric acid) Microbial Thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 132–141.
- Kim, B.S. dan Chang, H.N. 1998. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) from Starch by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnology Letters*, 20 (2): 109–112.
- Kulpreecha, S., Mutitakul, R. dan Shioya, S. 1997. The Optimal Condition for Poly (Hydroxybutyrate) Production from *Bacillus* sp. BA-019. *Annual Reports of IC Biotechnology*, 20: 765–774.
- Labuzek, S. dan Radecka, I. 2001. Biosynthesis of PHB Tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J. of Applied Microbiology*, 90: 353–357.
- Lee, S.Y. 1996. Plastic Bacteria? Progress and Prospect for Polyhydroxyalkanoate Production in Bacteria. *Tibtech*, 14: 431–438.
- Mahmoudi, M., Baei, M.S., Najafpour, G. D., Tabandeh, F. dan Eisazadeh, H. 2010. Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. *African J. Biotechnology*, 9 (21): 3151–3157.
- Md. Din, M.F., Ujang, Z., Van Loosdrecht, M.C.M., Ahmad, A. dan Sairan, M.F. 2006. Optimization of Nitrogen and Phosphorus Limitation for Better Biodegradable Plastic Production and Organic Removal using Single Fed-batch Mixed Cultures and Renewable Resources. *Water Science & Technology*, 53 (6): 15–20.
- Patwardhan, P.R. dan Srivastava, A.K. 2004. Model-based Fed-batch Cultivation of *Ralstonia eutropha* for Enhanced Biopolymer Production. *Biochemical Engineering J.*, 20: 21–26.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P. dan Ramsay, J.A. 1990. Production of Poly-(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids. *Appl. and Environ. Microbiology*, 56 (7): 2093–2098.
- Sabra, W. dan Abou-Zeid, D.M. 2008. Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. *Research J. Microbiology*, 3 (5): 308–318.
- Sangkarak, K. dan Prasertsan, P. 2008. Nutrient Optimization for Production of Polyhydroxybutyrate from Halotolerant Photosynthetic Bacteria Cultivated Under Aerobic-dark Condition. *Electronic J. Biotechnology*, 11 (3): 1–12.
- Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F. dan Dawes, E.A. 1972. The Role of Oxygen Limitation in the Formation of Poly- β -hydroxybutyrate during Batch and Continuous Culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry J.*, 128: 1193–1201.
- Shi, H., Kyuwa, K., Takasu, M. dan Shimizu, K. 2001. Temperature-Induced Expression of *phb* Genes in *Escherichia coli* and the Effect of Temperature Patterns on the Production of Poly-3-Hydroxybutyrate. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 91 (1): 21–26.

- Vijayendra, S.V.N., Rastogi, N.K., Shamala, T.R. Anil Kumar, P.K., Kshama, L. dan Joshi, G.J. 2007. Optimization of Polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with Corn Steep Liquor as a Nitrogen Source. *Indian J. Microbiology*, 47: 170–175.
- Yanti, N.A., Sembiring, L. dan Margino, S. 2009. Selection of the Potential Bacterial Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Producer from Sago Starch Processing Area. *Proceeding Advances in Biological Science: Respect to Biodiversity from Molecular to Ecosystem for Better Human Prosperity*. Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 16–17 Oktober 2009.
- Yuksekdag, Z.N., Aslim, B., Beyatli, Y. dan Mercan, N. 2004. Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Incubation Times on Poly-Beta-hydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African J. Biotechnology*, 3 (1): 63–66.
- Yilmaz, M., Soran, H. dan Beyatli, Y. 2005. Determination of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) Production by some *Bacillus* spp. *World J. Microbiology & Biotechnology*, 21: 565–566.