

PENINGKATAN PRODUKSI SEFALOSPORIN C DARI *Acremonium chrysogenum* CB2/11/1.10.6 DENGAN OPTIMASI MEDIA MENGGUNAKAN METODE RESPON PERMUKAAN

Improvement of Cephalosporin C Production from *Acremonium chrysogenum* CB2/11/1.10.6 by Media Optimization using Response Surface Methodology

Erwahyuni E. Prabandari^{1*}, Dyah Noor Hidayati¹, Diana Dewi¹, Eni Dwi Islamiati², Khaswar Syamsu²

¹Balai Bioteknologi BPPT, Gedung 630 Kawasan Puspiptek Serpong

²Program Studi Bioteknologi, Fakultas Pascasarjana IPB, Kampus Darmaga, Bogor

*Email: erwahyuni.endang@bppt.go.id

ABSTRACT

Cephalosporin is a β -lactam antibiotic produced by *Acremonium chrysogenum* using submerged fermentation. Carbon and nitrogen are the most influential medium ingredients for cephalosporin formation. The purpose of this study was to obtain the best composition of media for cephalosporin C production. Response surface methodology was used for production optimization. The results showed that molasses of 70 g/L was the best carbon source, while the best nitrogen source was the combination of corn steep liquor, urea and ammonium sulphate. DL-methionine, carbon, and nitrogen source significantly affected the production of cephalosporin C. The mathematically modelled optimization showed that the highest production of cephalosporin C (3876 mg/L) was obtained using medium composition of 68.28 g/L molasses, 71.61 g/L nitrogen, and 0.4 g/L DL-methionine. Laboratory verification using the same medium composition produced 3696 mg/L of cephalosporin C, being 4.65% different from the mathematically optimized results. Medium optimization increased the cephalosporin C production which was 1.48 times higher than that using the previous medium, where the maximum production was only 2487 mg / L.

Keywords: Carbon, cephalosporin C, cultivation medium, nitrogen, *A. chrysogenum*

ABSTRAK

Sefalosporin C adalah golongan antibiotik β -lactam yang dihasilkan *Acremonium chrysogenum* melalui fermentasi cair. Komponen yang sangat berpengaruh terhadap produksi sefalosporin C adalah sumber karbon dan nitrogen. Penelitian ini bertujuan mendapatkan komposisi media terbaik untuk produksi sefalosporin C. Optimasi dilakukan menggunakan metode respon permukaan. Hasil menunjukkan bahwa molases 70 g/L adalah sumber karbon terbaik dan kombinasi *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat adalah sumber nitrogen terbaik. DL-methionin, sumber karbon, dan nitrogen berpengaruh nyata terhadap produksi sefalosporin C. Optimasi menggunakan model matematika menunjukkan produksi sefalosporin C tertinggi (3876 mg/L) yang diperoleh dengan komposisi media 68,28 g/L molases, 71,61 g/L nitrogen, dan 0,4 g/L DL-methionin. Verifikasi di laboratorium menggunakan komposisi media yang sama menghasilkan sefalosporin C sebesar 3696 mg/L, berbeda 4,65% dibanding dengan hasil optimasi matematis. Optimasi media mampu meningkatkan produksi sefalosporin C sebesar 1,48 kali dibanding media yang digunakan sebelumnya, dimana maksimal hanya menghasilkan 2487 mg/L.

Kata kunci: Karbon, sefalosporin C, media kultivasi, nitrogen, *A. chrysogenum*

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan bahan obat yang memegang peranan penting dalam mengatasi penyakit infeksi. Departemen Kesehatan RI (2013) menyatakan bahwa dari seluruh anggaran yang dialokasikan untuk obat-obatan yang digunakan di Indonesia, 23,3% diperlukan untuk pengadaan antibiotik. Setiap tahun, pemenuhan bahan baku antibiotika untuk kebutuhan dalam negeri masih diimpor dengan nilai lebih dari Rp 15 milyar. Selanjutnya data menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik di Indonesia masih didominasi oleh golongan penisilin dan turunannya (Kementerian Kesehatan 2016). Seiring pemakaian antibiotik penisilin, beberapa bakteri gram positif menjadi resisten karena dapat menghasilkan enzim penisilinase yang mampu menghidrolisis cincin β -laktam pada penisilin. Untuk mensiasati kelemahan pada antibiotik penisilin tersebut maka sebagai alternatif dapat digunakan penggunaan antibiotik yang tahan terhadap degradasi enzim penisilinase. Salah satu antibiotik dari golongan β -laktam yang tahan terhadap degradasi enzim penisilinase adalah sefalosporin.

Sefalosporin C adalah sefalosporin yang paling awal ditemukan. Sefalosporin C sebagai antibiotik yang potensial merupakan produk antibiotik yang banyak dihasilkan setelah penisilin. Berbagai senyawa turunan sefalosporin diperoleh dengan cara mengubah-ubah gugus sampingnya yang disebut sebagai sefalosporin semisintetik. Antibiotik tersebut mempunyai spektrum anti bakteri yang luas dan lebih resisten terhadap β -laktamase dibandingkan dengan penisilin. Salah satu keunggulan generasi terbaru sefalosporin yaitu memiliki efektivitas dengan penggunaan dosis yang minimal. Sebaliknya, antibiotik yang banyak digunakan saat ini tidak memiliki efektivitas sekuat sefalosporin dan turunannya. Tambahan lagi pasien yang alergi terhadap penisilin biasanya tahan terhadap antibiotik sefalosporin maupun turunannya (Muniz et al. 2007).

Kelebihan yang dimiliki oleh sefalosporin sebagai antibiotik mendorong penelitian lebih lanjut, bagaimana sefalosporin dapat dihasilkan secara maksimum. Gohar et al. (2013) melaporkan optimasi nutrisi fermentasi untuk produksi

sefalosporin C dari *Acremonium chrysogenum*. Peneliti lain yang melaporkan optimasi parameter untuk imobilisasi *A. chrysogenum* dalam produksi sefalosporin C (Rani et al. 2015).

Lotfy (2007) menyatakan komposisi media kultivasi yang paling berpengaruh dalam produksi sefalosporin diantaranya adalah sumber karbon dan nitrogen. Hal inilah yang menjadi dasar penelitian ini. Langkah pertama adalah menguji sumber karbon dan nitrogen yang dijadikan kandidat untuk dilakukan seleksi. Pengujian tersebut dilakukan untuk mendapatkan sumber karbon dan nitrogen terbaik sebagai media kultivasi. Berdasarkan pengujian hasil seleksi didapatkan bahan yang paling baik. Bahan tersebut kemudian dikombinasikan dengan *inducer* berupa DL-methionin.

Tahap selanjutnya yaitu proses optimasi bahan terpilih menggunakan salah satu metode optimasi yaitu metode respon permukaan (*Response Surface Methodology / RSM*) (Mandenius dan Brundin 2008). Metode respon permukaan merupakan gabungan dari teknik matematis dan statistik yang dapat menjelaskan hubungan antara peubah independen, baik secara sendiri-sendiri maupun interaksi, dengan respon yang ingin diukur adalah salah satu metode optimasi yang dianggap efisien. Optimasi dengan metode ini pada umumnya terbagi menjadi 3 bagian, yaitu: pemilihan peubah independen yang berpengaruh terhadap respon dan penentuan levelnya, pemilihan rancangan percobaan dan verifikasi dari persamaan yang diperoleh, serta penentuan titik optimum dari setiap peubah independen (Baş & Boyacı 2007).

Efisiensi yang tinggi dari metode ini menjadi alasan banyaknya peneliti yang menggunakannya untuk optimasi dalam proses fermentasi, baik untuk komposisi media (Kiran et al. 2016; Palukurty dan Somalanka 2016, Hegde et al. 2013), maupun kondisi proses (Kiran et al. 2016; Karthikeyan et al. 2010). Metode ini banyak dipilih karena dapat menjelaskan interaksi yang muncul antar peubah dan dapat memberikan respon secara simultan dalam waktu yang bersamaan. Penggunaan RSM melalui *software Design Expert* dapat menghasilkan tingkat keakuratan yang tinggi sekaligus meminimalisasi terjadinya kesalahan seperti pada penggunaan metode

konvensional. Melalui optimasi ini diharapkan dapat dihasilkan sefalosporin dalam jumlah yang maksimal.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan sumber karbon dan nitrogen dalam konsentrasi terbaik, dilanjutkan dengan optimasi sumber karbon, nitrogen serta DL-methionin terbaik menggunakan metode respon permukaan untuk menghasilkan sefalosporin dalam jumlah yang maksimum.

BAHAN DAN METODE

Komposisi media

Kapang *A. chrysogenum* ditumbuhkan dalam media agar yang setiap liternya mengandung 63,4 g *saboraud maltose agar*, 0,5 g pepton, 23 g *malt extract*, dan 9,4 g *bacteriological agar*. Inokulum disiapkan dalam media vegetatif yang setiap liternya mengandung 34 g *corn steep liquor*, 35 g sukrosa, 5 g CaCO₃, 1,75 g parafin cair, 0,5 g DL-methionin, dan 5,5 g amonium asetat. Adapun komposisi media kultivasi disesuaikan dengan optimasi yang sedang dilakukan dan dijelaskan pada masing-masing bagian optimasi.

Penyiapan inokulum

Kapang *A. chrysogenum* dalam agar miring berumur 10 hari disuspensi dengan 6 mL garam fisiologis. Kemudian sebanyak 0,5 mL diinokulasi pada media vegetatif. Media vegetatif yang telah dinokulasi kemudian diinkubasi pada inkubator kocok dengan agitasi 220 rpm, pada suhu 28°C selama 72 jam. Inokulum selanjutnya digunakan sebagai *starter* untuk media kultivasi.

Proses kultivasi

Inokulum hasil inkubasi pada media vegetatif diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam media kultivasi. Setelah itu media kultivasi diinkubasi pada inkubator kocok dengan agitasi 220 rpm, pada suhu 25 °C selama 120 jam.

Analisis total karbon

Analisis total Karbon dilakukan menggunakan metode dikromat (Horwitz dan Latimer 2005). Molases, sukrosa, minyak sawit dan glukosa masing-masing ditimbang dan ditambahkan 10 mL larutan kalium dikromat 1 N secara perlahan-lahan

kemudian ditambahkan 20 mL H₂SO₄ pekat dan dipanaskan selama 30 menit. Setelah pemanasan ditambahkan 200 mL aquadest, 5 mL asam fosfat pekat 85% dan 1 mL larutan dipenilamin. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada blanko tetapi tanpa penambahan sampel. Blanko dan sampel dititrasi dengan larutan ferosulfat 1 N hingga berwarna hijau, kemudian ditambah dengan 0,5 mL larutan K₂Cr₂O₇ 1 N dan dititrasi kembali dengan FeSO₄ 1N sampai berwarna hijau.

Media kultivasi seleksi sumber karbon

Media kultivasi seleksi sumber karbon dimodifikasi dari metode Bissolino et al. (1991). Hasil yang diperoleh dari analisis total karbon digunakan sebagai acuan dalam penentuan konsentrasi masing-masing bahan yang dijadikan kandidat sumber karbon, sehingga di dalam media kultivasi terdapat perbandingan karbon yang sama pada masing-masing bahan. Komposisi sumber karbon yang digunakan dalam media kultivasi masing-masing sebanyak 50 g/L malto dextrin, 40 g/L molases, 37,04 g/L sukrosa, 39,79 g/L glukosa dan 23,05 g/L minyak sawit dengan total karbon dalam masing-masing sumber karbon adalah 31,6% karbon, sedangkan komposisi media kultivasi yang lain yaitu 110 g/L CSL, 9 g/L ammonium sulfat, 2,1 g/L urea, 50 g/L malto dextrin, 5,6 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 g/L CaCO₃, 4 g/L parafin dan 10 g/L *trace element*. Kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C.

Penentuan konsentrasi sumber karbon

Penentuan konsentrasi terbaik dari sumber karbon terpilih mengacu pada penelitian Nigam et al. (2007). Level konsentrasi molases yang diuji dalam media kultivasi antara lain 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, dan 90 g/L dengan total karbon yang diuji pada masing-masing konsentrasi adalah 9,6; 19,2; 28,8; 38,8; 48; 57,6; 67,2; 76,8; 86,4% karbon. Masing-masing konsentrasi karbon yang telah ditentukan ditambahkan dengan komposisi media kultivasi yang lain yaitu 110 g/L CSL, 9 g/L ammonium sulfat, 2,1 g/L urea, 50 g/L malto dextrin, 5,6 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 g/L CaCO₃, 4 g/L parafin dan 10 g/L *trace element*. Kemudian disterilisasi selama 25 menit pada suhu 121°C.

Analisis nitrogen total

Analisis nitrogen total dilakukan menggunakan metode Kjeldahl. Urea, ammonium sulfat, ekstrak yeast dan *corn steep liquor* masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 g selenium dan 10 mL H₂SO₄ pekat. Destruksi semua bahan dalam labu Kjeldhal dengan kisaran suhu 200–250°C sampai cairan yang terdapat dalam labu jernih. Sampel dipindahkan ke dalam alat distilasi ditambah dengan NaOH dan H₃BO₃, lalu dititrasi dengan HCl 0,5 N sampai berwarna abu-abu. Volume HCl yang ditambahkan dibandingkan dengan blanko untuk perhitungan kadar N.

Media kultivasi seleksi nitrogen

Komposisi media kultivasi seleksi nitrogen didasarkan pada metode Bissolino et al. (1991) yang telah dimodifikasi. Hasil yang diperoleh dari analisis total nitrogen digunakan sebagai acuan dalam penentuan konsentrasi masing-masing bahan yang dijadikan kandidat sumber nitrogen, sehingga di dalam media kultivasi terdapat perbandingan nitrogen yang sama.

Komposisi media kultivasi seleksi nitrogen antara lain 7,89 g/L urea, 27,53 g/L ammonium sulfat, 56,809 g/L ekstrak yeast, 68,54 g/L *corn steep liquor* hasil fermentasi jagung buatan (CSL biotek), 199,126 g/L *corn steep liquor* hasil limbah fermentasi jagung (CSL), 20,21 g/L ammonium sulfat yang digabung dengan 2,1 g/L urea, 110 g/L *corn steep liquor* limbah fermentasi yang digabung dengan 12,32 g/L ammonium sulfat, 110 g/L *corn steep liquor* limbah fermentasi yang digabung dengan 3,53 g/L urea dan gabungan antara 110 g/L *corn steep liquor*, 5 g/L ammonium sulfat dan 2,1 g/L urea secara masing-masing digunakan sebagai sumber nitrogen dan komposisi media kultivasi yang lain yaitu 50 g/L malto dextrin, 5,6 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 g/L CaCO₃, 4 g/L parafin dan 10 g/L *trace element*.

Penentuan konsentrasi sumber nitrogen

Penentuan konsentrasi terbaik dari sumber nitrogen terpilih dilakukan menggunakan metode Demian dan Vaishnav (2006). Konsentrasi *corn steep liquor* : urea : ammonium sulfat yang diuji dalam media kultivasi antara lain 60 : 1.15 : 2.73 g/L, 70 : 1.34 : 3.18 g/L, 80 : 1.53 : 3.64

g/L, 90 : 1.72 : 4.09 g/L, 100 : 1.91 : 4.55 g/L, 110 : 2.1 : 5 g/L, 120 : 2.29 : 5.45 g/L, 130 : 2.71 : 5.91 g/L, 140 : 3.44 : 6.36 g/L, 150 : 4.69 : 6.82 g/L dengan total nitrogen yang diuji pada masing-masing konsentrasi adalah 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 126, 135% nitrogen. Masing-masing konsentrasi karbon yang telah ditentukan ditambahkan dengan komposisi media kultivasi yang lain yaitu 50 g/L malto dextrin, 5,6 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 g/L CaCO₃, 4 g/L parafin dan 10 g/L *trace element*.

Penentuan konsentrasi DL-methionin

Konsentrasi DL-methionin yang diuji dalam media kultivasi antara lain 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 g/L. Masing-masing konsentrasi DL-methionin yang telah ditentukan ditambahkan dengan komposisi media kultivasi yang lain yaitu 50 g/L malto dextrin, 110 g/L *corn steep liquor*, 2,1 g/L urea, ammonium sulfat 5 g/L, 5,6 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 g/L CaCO₃, 4 g/L parafin dan 10 g/L *trace element*.

Metode respon permukaan

Setelah didapatkan media produksi terpilih yaitu sumber karbon, sumber nitrogen dan DL-methionin dengan konsentrasi terbaik hasil dari penentuan konsentrasi terbaik digunakan sebagai titik tengah dalam rancangan optimasi dengan menggunakan metode respon permukaan. Produksi sefalosporin dilakukan sesuai dengan variasi kombinasi yang dirancang menggunakan *central composite design*. Rancangan yang digunakan meliputi tiga faktor, yaitu rancangan factorial 2³ dengan pengulangan sebanyak lima kali, *starting point* (titik awal) dengan pengulangan lima kali dan *center point* (titik tengah) dengan pengulangan delapan kali sehingga total unit percobaan menjadi 78. Perlakuan ini dilakukan dalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi 30 mL media kultivasi, kemudian sebanyak 10% inokulum diinokulasikan pada media kultivasi. Setelah itu media kultivasi diinkubasi pada inkubator kocok dengan agitasi 220 rpm, pada suhu 25 °C selama 120 jam.

Analisis data

Konsentrasi sefalosporin C dari media dengan sumber karbon, nitrogen dan DL-methionin terpilih dianalisa dengan analisis

sidik ragamnya untuk melihat perbedaan respon peubah. Sedangkan data optimasi media diolah menggunakan perangkat lunak *Design Expert* versi 7.0 (State Ease Inc, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jenis dan konsentrasi sumber karbon

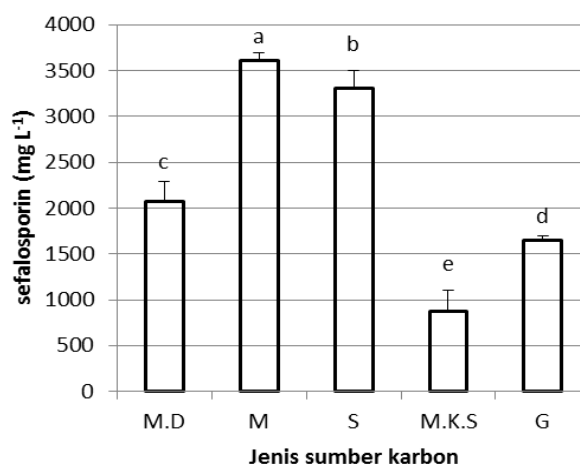
Pemilihan sumber karbon diawali dengan melakukan analisis total karbon. Hal ini dilakukan untuk mengetahui jumlah karbon yang terdapat dalam masing-masing bahan yaitu molases, sukrosa, minyak sawit, malto dektrin dan glukosa. Hasil analisa tersebut digunakan sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi masing-masing sumber karbon yang akan digunakan dalam proses seleksi. Hal ini dilakukan agar konsentrasi karbon di media dengan sumber yang berbeda dalam perbandingan jumlah yang sama (Lee et al. 2001).

Hasil analisis total karbon yang terdapat dalam Tabel 1 menunjukkan jumlah karbon yang berbeda dalam masing-masing bahan. Penggunaan karbon dalam media kultivasi berdasarkan kandungan total karbon pada media tersebut. Hal ini dilakukan agar perbandingan karbon dalam masing-masing bahan di dalam media kultivasi dalam jumlah yang setara.

Sumber karbon berfungsi dalam penyediaan kebutuhan energi untuk pertumbuhan mikroba dan juga dapat berfungsi sebagai substrat untuk enzim yang diperlukan oleh mikroba (El-Gendy 2012). Seleksi karbon yang dilakukan menghasilkan molases sebagai sumber karbon terbaik (Gambar 1). Mandenius dan Brundin (2008) menyatakan bahwa molases termasuk media kompleks dan di dalamnya selain masih terdapat kandungan gula yang cukup tinggi, kandungan gula yang terdapat di dalam molases juga beragam yaitu sukrosa dan beberapa gula reduksi dalam bentuk yang sederhana diantaranya adalah glukosa. Lintasan metabolisme glukosa sebagian besar mengikuti lintasan Embden-Meyerhof. Glukosa dikonversi menjadi glukosa-6-fosfat yang selanjutnya dalam beberapa tahapan dikonversi menjadi asam piruvat. Selain itu juga terdapat kandungan mineral seperti Mg, Ca, Fe dan Zn yang dibutuhkan untuk mencukupi kebutuhan mineral mikroorganisme.

Tabel 1. Kandungan total karbon menggunakan metode analisis Dikromat ($K_2Cr_2O_7$)

Bahan	Berat sampel (g)	Volume titran ($FeSO_4$) (mL)	Karbon (%)
Blanko	-	10,72	-
Molases	0,4	19	38,54
Glukosa	0,4	16	40,75
Sukrosa	0,4	14	42,22
Malto dektrin	0,4	28	31,93
Minyak	0,31	0,02	67,72



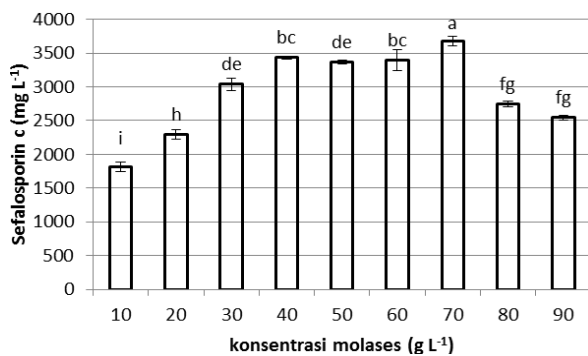
Gambar 1. Pengaruh jenis sumber karbon (M.D=Malto dektrin, M=Molases, S=Sukrosa, M.K.S= Minyak kelapa sawit, G=Glukosa) terhadap produksi sefalosporin C. (Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata perlakuan pada taraf uji 5%)

Sebagai antibiotik, sefalosporin dihasilkan oleh kapang pada akhir fase pertumbuhannya dengan mengkatalis enzim sefalosporin C sintetase (asetiltransferase), yang melibatkan transfer satu gugus asetil dari koenzim asetil A ke gugus hidroksimetil atom C-3 pada deasetilsefalosporin C (Schmitt et al. 2004). Enzim yang berperan dalam proses pembentukan sefalosporin dihasilkan mengikuti jalur Embden-Meyerhof yang menggunakan sumber karbon sebagai substrat untuk menghasilkan piruvat. Pada tahap selanjutnya piruvat diubah menjadi asetil-koA untuk bisa digunakan dalam proses metabolisme. Menurut Ruiz et al. (2010) enzim yang telah dibentuk pada fase akhir pertumbuhan kapang akan digunakan untuk mengkatalis produk metabolit sekunder yaitu sefalosporin.

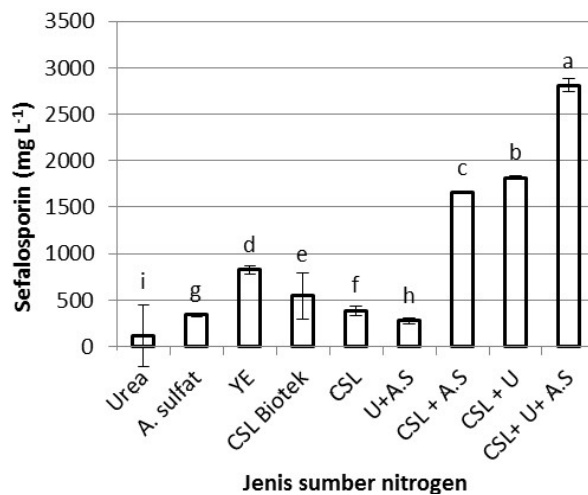
Tabel 2. Kandungan total nitrogen dengan menggunakan metode analisa kjeldhal

Bahan	Ws (mg)	Vs	Fp	N _{HCl}	% N
Ekstrak Yeast	500	45,0	2,5	0,0518	10,34
CSL Standart	505	24,7	2,5	0,0518	2,95
Urea	500	37,0	2,5	0,0518	74,39
Ammonium Sulfat	500	75,3	2,5	0,0518	21,34
CSL Biotek	510	24,1	2,5	0,0518	8,57
Blanko	-	16,5	2,5	0,0518	-

Keterangan: W_s=berat sampel, V_s=Volume titrasi, F_p=Faktor pengencer, N_{HCl}=Normalitas



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi molases terhadap produksi sefalosporin C (Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata perlakuan pada taraf uji 5%)



Gambar 3. Pengaruh jenis nitrogen (A.S=Ammonium sulfat, U=Urea, YE=Yeast Extract, CSL=Corn steep liquor) terhadap produksi sefalosporin C. (Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata perlakuan pada taraf uji 5%)

Hasil percobaan menunjukkan konsentrasi molases sebagai sumber karbon terpilih berpengaruh nyata terhadap produksi sefalosporin C. Terlihat pada Gambar 2, sefalosporin maksimal pada molases

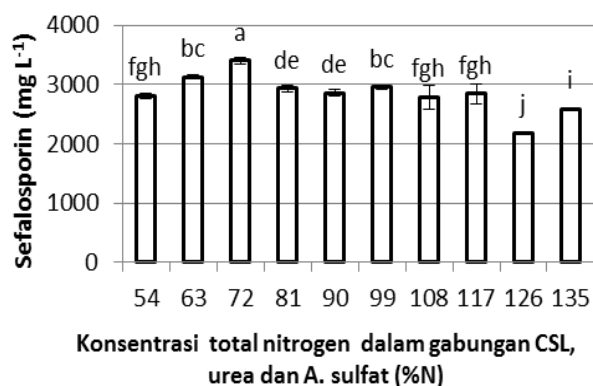
konsentrasi 70 g/L, dengan penambahan konsentrasi molases membuat produksi sefalosporin C menurun secara signifikan. Ruiz et al. (2010) menyatakan bahwa pada kapang *A. chrysogenum* mempunyai kecenderungan terjadi mekanisme penghambatan produksi sefalosporin oleh sumber karbon yang berlebih. Hal ini disebabkan asetil-koA yang dihasilkan dalam siklus Krebs ketika jumlah carbon mencapai jumlah tertentu menghasilkan korepresor untuk menginaktifkan gen *CreA* yang merupakan penghasil enzim asetiltransferase sehingga tidak dapat ditranskripsi (Ramos et al. 2004).

Jenis dan konsentrasi sumber nitrogen

Analisis nitrogen bertujuan untuk mengetahui jumlah nitrogen beberapa sumber nitrogen yaitu urea, ammonium sulfat, ekstrak yeast, *corn steep liquor* hasil fermentasi jagung buatan (CSL Biotek) yang dibuat mengikuti metode Anonim (2006). Hasil analisa ini digunakan sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi masing-masing sumber nitrogen yang akan digunakan dalam proses seleksi. Hal ini dilakukan agar konsentrasi nitrogen pada media dalam perbandingan jumlah yang sama (Lee et al. 2001).

Hasil analisis nitrogen (Tabel 2) menunjukkan jumlah nitrogen yang berbeda dalam masing-masing bahan. Penyusunan komposisi media kultivasi berdasarkan pada kandungan nitrogen total, dengan tujuan agar perbandingan nitrogen dalam masing-masing bahan di dalam media kultivasi dalam jumlah yang sama.

EI-Gendy (2012) menyatakan bahwa sumber nitrogen berfungsi sebagaipenyedia protein dan asam amino bagi kebutuhan nutrisi mikroba selama proses



Gambar 4. Pengaruh total nitrogen terhadap produksi sefalosporin. (Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata perlakuan pada taraf uji 5%)

Berdasarkan seleksi nitrogen yang dilakukan bahwa penggunaan sumber nitrogen secara bersama-sama antara *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat merupakan sumber nitrogen terbaik (Gambar 3). Manfaati (2010) menyatakan bahwa penggunaan ammonium sulfat dalam media kultivasi menghasilkan kondisi asam karena ion ammonium yang dikonsumsi akan melepaskan asam bebas. Ion ammonium dalam kultur jamur akan menghambat penyerapan asam amino, sehingga asam amino yang tersedia dalam media tidak digunakan secara keseluruhan untuk pertumbuhan, sedangkan penggunaan urea dalam media kultivasi menurut Voelker dan Altaba (2001) berfungsi untuk mempertahankan pH di dalam media kultivasi yang cenderung meningkat akibat perombakan asam amino. Sedangkan CSL merupakan sumber nitrogen yang kaya akan asam amino yang dibutuhkan dalam biosintesis sefalosporin (Brakhage 2013). Kandungan asam amino yang terdapat dalam CSL diantaranya adalah valin dan sistein yang merupakan salah satu asam amino unsur penyusun jalur biosintesis sefalosporin (Schmitt et al. 2004). Sesuai dengan asumsi awal bahwa dengan penggunaan ketiga sumber nitrogen yaitu CSL, urea dan ammonium sulfat secara bersama-sama dengan fungsi yang sinergi pada jalur metabolisme kapang akan meningkatkan produksi sefalosporin.

Hasil percobaan menunjukkan konsentrasi CSL, urea dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen terpilih berpengaruh nyata terhadap produksi sefalosporin. Terlihat pada Gambar 4,

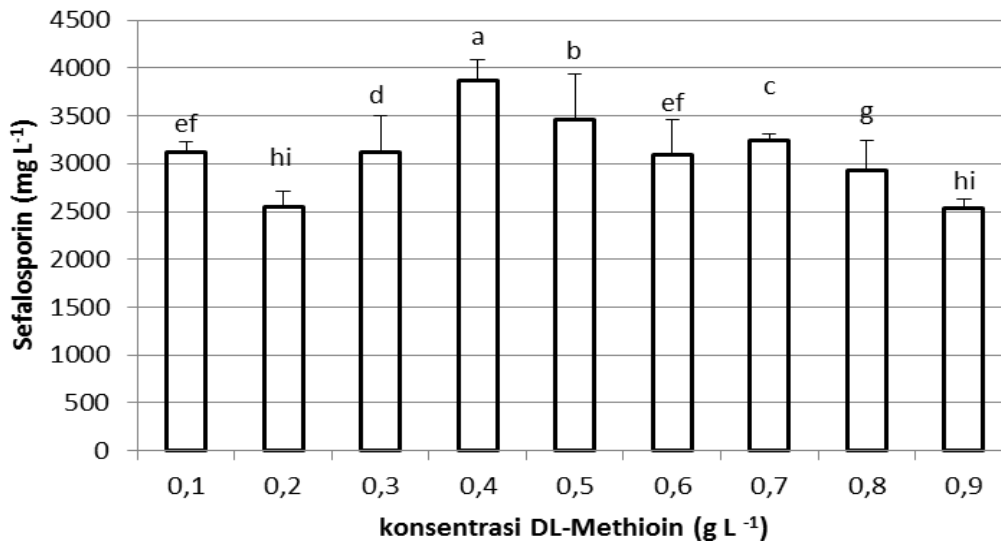
sefalosporin tertinggi diperoleh pada kandungan nitrogen total 72%, dengan penambahan konsentrasi nitrogen berlebih membuat produksi sefalosporin menurun secara signifikan, hal ini sesuai dengan pernyataan Tudzynski (2014) yang menyatakan bahwa nitrogen merupakan unsur yang penting untuk pertumbuhan kapang karena digunakan untuk menyusun asam amino yang digunakan untuk pertumbuhan. Selain itu juga digunakan untuk biosintesis sefalosporin, tetapi dengan jumlah nitrogen yang tinggi justru akan menekan produksi sefalosporin. Menurut Li et al. (2013) menyatakan bahwa konsentrasi nitrogen yang tinggi menyebabkan efek represi. Fenomena katabolik represi nitrogen amonium sulfat telah dilaporkan mempengaruhi banyak enzim katabolik, termasuk yang memainkan peran penting dalam biosintesis sefalosporin seperti pada transkripsi gen *CreA*.

Level konsentrasi DL-methionin

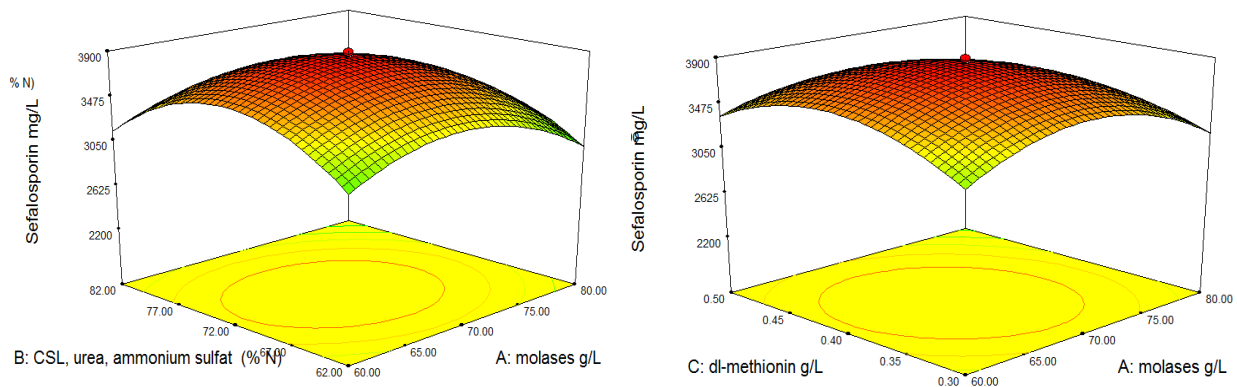
Penentuan level konsentrasi DL-methionin dilakukan untuk mengetahui batas toleransi penggunaan methionin dalam media kultivasi untuk produksi sefalosporin. Pada pengujian level konsentrasi yang terlihat pada Gambar 5, penggunaan methionin dalam menghasilkan sefalosporin optimal pada konsentrasi 0,4 g/L. Menurut Martin dan Demain (2002) methionin dalam media produksi sefalosporin mempunyai fungsi sebagai penginduksi enzim yang berperan dalam jalur biosintesis sefalosporin, selain itu methionin juga berfungsi menstimulasi kapang *A. chrysogenum* dalam pembentukan arthrospora yaitu fase dimana sefalosporin optimal dihasilkan, tetapi dengan penggunaan methionin yang berlebihan akan bersifat racun pada kapang karena methionin dalam biosintesis sefalosporin oleh *A. chrysogenum* berfungsi juga sebagai sumber sulfur, sulfur akan direduksi menjadi sulfida dan sebagian dalam bentuk sulfur dioksida atau hidrogen sulfida yang keberadaannya bersifat racun (Lee et al. 2001).

Optimasi komposisi media produksi

Pengaruh variabel bebas terhadap respon dapat digambarkan menggunakan grafik respon. Penelitian ini menggunakan



Gambar 5. Pengaruh rasio konsentrasi DL-methionin terhadap produksi sefalosporin C. (Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata perlakuan pada taraf uji 5%)



Gambar 6. Kurva permukaan respon (3 dimensi) antara variabel terikat terhadap variabel bebas berupa respon konsentrasi sefalosporin

Tabel 3. Level konsentrasi masing-masing faktor pada *central composite design*

Faktor	Kode	Level				
		-1,682	-1	0	1	1,682
Molases (g/L)	X ₁	53,18	60	70	80	86,82
CSL, urea, ammonium sulfat (% N)	X ₂	55,18	62	72	82	88,82
DL-Methionin (g/L)	X ₃	0,23	0,3	0,4	0,5	0,568

tiga variabel bebas yaitu molases sebagai sumber karbon, *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen serta DL-methionin sebagai *inducer*. Grafik permukaan respon (Gambar 6) menunjukkan interaksi antara tiga variabel bebas dan pengaruhnya terhadap masing-masing respon (Techapun et al. 2002).

Konsentrasi sefalosporin mencapai maksimum pada kisaran level batas atas dan bawah dari masing-masing variabel.

Kisaran level konsentrasi molases yang digunakan yaitu seperti tercantum pada Tabel 3, dimana 60 g/L sebagai batas bawah dan 80 g/L sebagai batas atas dan titik tengah yaitu 70 g/L. Untuk sumber nitrogen yang terdiri dari *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat, batas bawah yang digunakan adalah 62% N, batas atas yang digunakan adalah 82% N dan titik tengah yaitu 72% N serta DL-methionin dengan kisaran 0.3 g/L sebagai batas bawah, 0.5 g/L sebagai batas

atas dan titik tengah yaitu 0,4 g/L.

Konsentrasi sefalosporin C maksimum yang diprediksi oleh model adalah sebesar 3876 mg/L, yang akan tercapai pada komposisi media 68,28 g/L molases, 71,61% N yang merupakan gabungan dari *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat dan 0,4 g/L DL-methionin. Verifikasi di laboratorium menggunakan komposisi media optimal diperoleh sefalosporin C dengan konsentrasi 3696 mg/L. Konsentrasi tersebut mencapai 95,36% dari hasil prediksi model. Menurut Xu et al. (2008) hasil verifikasi prediksi model dengan ketepatan pengulangan lebih dari 90% menunjukkan bahwa penggunaan model untuk optimasi sudah sesuai.

Hasil optimasi menunjukkan bahwa konsentrasi sefalosporin meningkat jika dibandingkan sebelum dilakukan optimasi. Sebelum dilakukan optimasi konsentrasi sefalosporin yang diperoleh adalah 2487 mg/L, sedangkan hasil optimasi menghasilkan sefalosporin 3696 mg/L. Berdasarkan hasil tersebut dengan penggunaan media hasil optimasi dapat meningkatkan hasil sefalosporin sebanyak 1,48 kali dari media standar yang biasa digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa pemilihan variabel serta level variabel pada optimasi media fermentasi sudah tepat.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Molases adalah sumber karbon terbaik dan pada pengujian level konsentrasi, molases pada level 70 g/L merupakan konsentrasi terbaik untuk menghasilkan sefalosporin C.
2. Sumber nitrogen terbaik untuk produksi sefalosporin C adalah gabungan antara *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat. Pada pengujian level konsentrasi gabungan *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat dengan total nitrogen 72% N merupakan konsentrasi terbaik.
3. Prediksi model hasil optimasi menggunakan metode respon permukaan menghasilkan sefalosporin C sebesar 3876 mg/L pada komposisi media 68,28 g/L molases, 71,61% N yang merupakan gabungan dari *corn steep liquor*, urea dan ammonium sulfat dan 0,4 g/L DL-methionin. Verifikasi di

laboratorium dengan komposisi media hasil optimasi menghasilkan sefalosporin C sebesar 3696 mg/L, yang mencapai 95,36% dari prediksi model.

DAFTAR PUSTAKA

- Bas D, Boyaci IH (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Engineer* 78:836-845. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024
- Bissolino P, Alpegiani M, Perrone E, Orezzi P, Cassinelli G, Franceschi G (1991) Beta-lactam derivatives of the 4-acylcephem sulphone and 3-acylpenam sulphone-type. Patent No US 5077286 A
- Brakhage AA (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* 11:21-32. doi: 10.1038/nrmicro2916
- Demian AL, Vaishnav P (2006) Involvement of nitrogen-containing compounds in β -lactam biosynthesis and its control. *Crit Rev Biotechnol* 26: 67-82. doi: 10.1080/07388550600671466
- Departemen Kesehatan RI (2013) Pelayanan Informasi Obat Nasional. Dirjen YanFar dan Alkes. Depkes
- El-Gendy MMA (2012) Production of glucoamylase by marine endophytic *Aspergillus* sp. JAN-25 under optimized solid-state fermentation conditions on agro residues. *Australian J Basic Appl Sci* 6:41-54
- Gohar UF, Mukhtar H, UI-Haq I (2013) Studies on the nutritional parameters for cephalosporin biosynthesis from *Acremonium chrysogenum* by submerged fermentation. *Pak J Bot* 45:1057-1062
- Hegde S, Bhadri G, Narsapur K, Koppal S, Oswal P, Turmuri N, Jumnal V, Hungund B (2013) Statistical optimization of medium components by response surface methodology for enhanced production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter persimmonis*. *J Bioprocess Biotechniq* 4:1. doi: 10.4172/2155-9821.1000142
- Horwitz W, Latimer GW (2005) Official methods of analysis of AOAC International. 18th edition, Vol 1:

- Agricultural chemicals, contaminants, drugs. AOAC International, Maryland USA
- Karthikeyan K, Nanthakumar K, Shanthi K, Lakshmanaperumalsamy P (2010) Response surface methodology for optimization of culture conditions for dye decolorization by a fungus, *Aspergillus niger* HM11 isolated from dye affected soil. *Iran J Microbiol* 2: 213-222
- Kementerian Kesehatan RI (2016) Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2015. Kementerian Kesehatan RI ISBN 978-602-416-065-4. Jakarta
- Kiran B, Pathak K, Kumar R, Deshmukh D (2016) Statistical optimization using central composite design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. *Ecol Eng* 92:73–81. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.03.026
- Lee MS, Lim JS, Kim CH, Oh KK, Hong SI, Kim SW (2001) Effect of nutrients and culture conditions on morphology in the seed culture of *Cephalosporium acremonium* ATCC 20339. *Biotechnol Bioprocess Eng* 6:156-160. doi: 10.1007/BF02931963
- Li J, Pan Y, Liu G (2013) Disruption of the nitrogen regulatory gene *AcareA* in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of cephalosporin production and repression of nitrogen metabolism. *Fungal Genet Biol* 61:69-79. doi: 10.1016/j.fgb.2013.10.006
- Lotfy WA (2007) Production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* grown on beet molasses: Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Res J Microbiol* 2:1-12. doi: 10.3923/jm.2007.1.12
- Mandenius CF, Brundin A (2008) Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog* 24:1191-1203. doi: 10.1002/btpr.67
- Manfaati R (2010) Kinetika dan variabel optimum fermentasi asam laktat dengan media campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu oleh *Rhizopus oryzae*. Thesis. Universitas Diponegoro, Semarang
- Martin JF, Demain A (2002) Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. *Trends in Biotechnol.* 20:502-507. doi: 10.1016/S0167-7799(02)02070-X
- Muniz CC, Zelaya TEC, Esquivel GR, Fernandez FJ (2007) Penicillin and cephalosporin production: A Historical perspective. *Rev Latinoam Microbiol* 49:88-98
- Nigam VK, Verma R, Kumar A, Kundu S, Ghosh P (2007) Influence of medium constituents on the biosynthesis of cephalosporin-C. *Electron J Biotechnol* 10:230-239. doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-8
- Palukurty MA, Somalanka SR (2016) Optimization of nutritional parameters for production of alpha amylase using *Aspergillus oryzae* MTCC 3017 by central composite design. *Int J Ind Biotechnol Biomaterial* 2:1-10. doi: 10.13140/RG.2.1.4326.5520
- Ramos I, Guzman S, Escalante L, Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 155:267-274. doi: 10.1016/j.resmic.2004.01.004
- Rani AS, Goutham HRVN, Spurthi BS (2015) Optimization of various parameters used in immobilizing *Acremonium chrysogenum* 1391 for cephalosporin production. *Int J Sci Tech* 3:42-46
- Ruiz B, Chaves A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanches M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanches S, Langley E (2010) Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol* 36:146–167. doi: 10.3109/10408410903489576
- Schmitt EK, Hoff B, Kuck U (2004) Regulation of cephalosporin biosynthesis. In: Brakhage AA (ed) *Molecular Biotechnology of Fungal β -Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* Vol 88, Springer, New York, pp 1–43

- Techapun C, Charoenrat T, Watanabe M, Sasaki K, Poosaran N (2002) Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochem Eng J* 12:99-105. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00047-5
- Tudzynski B (2014) Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front Microbiol* 5:656. doi: 10.3389/fmicb.2014.00656
- Voelker F, Altaba S (2001) Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiol* 147:2447-2459. doi: 10.1099/00221287-147-9-2447
- Xu Y, Li Y, Xu S, Liu Y, Wang X, Tang J (2008) Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:558-566. doi: 10.1631/jzus.B0820038