PRODUKSI ASAM POLIGLUTAMAT MELALUI FERMENTASI MENGGUNAKAN *Bacillus subtilis* DENGAN VARIASI KONSENTRASI ASAM SITRAT

Citra Noer Aqsha[1], Deni Ramdhani[1], Dini Nurcahya[1], Ratna Yulistya Ningrum[1], Riski Harliyansyah[1], Keryanti[1*], Ade Safaat[2]

[1] Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung, Jl. Gegerkalong Hilir, Ciwaruga, Kabupaten Bandung Barat

[2] Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10, Kota Bandung

*E-mail: keryanti@polban.ac.id

ABSTRAK

Pada penelitian ini dilakukan produksi asam poliglutamat dari asam L-glutamat dengan fermentasi menggunakan mikroorganisme *Bacillus subtilis.* Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menentukan variasi konsentrasi asam sitrat optimum dalam media fermentasi yang dapat menghasilkan asam poliglutamat dengan jumlah paling banyak. Konsentrasi asam sitrat dalam media fermentasi divariasikan pada rentang 20–50 g/L. Analisis hasil fermentasi meliputi perhitungan berat kering sel, berat asam poliglutamat, dan nilai *yield*. Isolasi asam poliglutamat dilakukan melalui tahapan sentrifugasi, pengendapan dengan metanol, dialisis dan liofilisasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi terbaik dalam memproduksi asam poliglutamat dari asam L-glutamat yaitu pada konsentrasi asam sitrat 20 g/L dengan hasil asam poliglutamat sebesar 12 mg dan *yield* 0,6%.

Kata Kunci: Asam poliglutamat, asam sitrat, *Bacillus subtilis*, fermentasi.

ABSTRACT

In this study, the production of polyglutamic acid from L-glutamic acid was carried out by fermentation using the microorganism *Bacillus subtilis*. The purpose of this study was to find variations in the concentration of citric acid in the fermentation media that can produce high amount of polyglutamic acid. The concentration of citric acid in the fermentation medium was varied in the range of 20–50 g/L. The fermentation broth was analyzed for the calculation of cell dry weight, polyglutamic acid weight, and yield. Isolation of polyglutamic acid was carried out through centrifugation, precipitation with methanol, dialysis and lyophilization. The results showed that the best variation of citric acid in producing polyglutamic acid was 20 g/L citric acid by producing polyglutamic acid from L-glutamic acid of 0.012 g and yield of 0.6%.

Keywords: *Bacillus subtilis*, citric acid, fermentation, polyglutamic acid.

PENDAHULUAN

Asam poliglutamat merupakan suatu biopolimer yang dapat didegradasi oleh alam, terutama diproduksi oleh galur *Bacillus subtilis* (Kubota, dkk., 1993). Polimer ini diklasifikasikan sebagai pseudo-poli asam amino yang hanya mengandung asam glutamat sebagai monomernya, baik asam D-glutamat maupun asam L-glutamat

(Cormwick dan Gross, 1995). Senyawa asam poliglutamat memiliki potensi untuk pemurnian air, menghilangkan ion logam radioaktif dan logam berat pada pengolahan limbah industri, sebagai pelembab yang tahan lama berbasis fungsi yang membantu kulit melawan kekeringan, peningkatan elastisitas dan kehalusan kulit, penghambat melanin, serta pemeliharaan pH kulit pada industri kosmetik, sebagai pembawa biokompatibilitas obat-obatan pada industri farmasi, dan sebagai superabsorben pada sanitasi (Najar dan Das, 2015). Sampai saat ini, Indonesia masih mengimpor kebutuhan asam poliglutamat. Sehingga penelitian untuk memproduksi asam poliglutamat baik mencari kondisi optimum maupun variasi bahan baku yang digunakan sangat berpeluang untuk dilakukan.

Komposisi nutrisi dalam media fermentasi sangat berpengaruh terhadap produk asam poliglutamat yang dihasilkan. Beberapa penelitian telah dilakukan dengan memvariasikan komposisi komponen media fermentasi menggunakan *B. subtilis.* Sidik, dkk (2008) telah melakukan penelitian pembuatan asam poliglutamat melalui fermentasi dari asam L-glutamat murni sebagai sumber karbon. Dari penelitian tersebut dihasilkan ekstrak asam poliglutamat sebanyak 53,3 g pada variasi 3% asam L-glutamat. Penelitian yang dilakukan oleh Sidik dkk. (2011) melakukan pengujian pengaruh variasi konsentrai amonium sulfat sebagai sumber nitrogen dalam fermentasi asam poliglutamat. Dari penelitian tersebut dihasilkan asam poliglutamat terbanyak sebesar 61,6 mg pada konsentrasi amonium sulfat 0,75% (b/v)

Goto dan Kunioka (1992) melakukan fermentasi untuk menghasilkan asam poliglutamat dengan memvariasikan jenis sumber karbon yaitu glukosa, asam asetat, asam sitrat, asam malat, asm suksinat dan asam fumarat. Dari penelitian tersebut dihasilkan bahwa sumber karbon terbaik untuk produksi asam poliglutamat menggunakan *B. subtilis* yaitu asam sitrat. Pada penelitian tersebut belum dilakukan variasi konsentrasi asam sitrat dalam media fermentasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi asam sitrat dalam media fermentasi untuk produksi asam pologlutamat menggunakan *B. substilis.*

METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dilakukan dalam penelitian yakni *B. subtilis*, asam asam sitrat, dekstrin, alkohol, media pemeliharaan (0,5 g natrium klorida; 0,5 g bacto pepton; 0,3 g ekstrak daging; 2,7 g agar bakto; 100 mL air suling), media inokulum (1 g polipepton; 0,06 g ekstrak ragi 0,03 g; magnesium sulfat heptahidrat) dan media fermentasi (3% asam L-glutamat; 0,5 g amonium sulfat; 0,1 g kalium dihidrogen fosfat; 0,05 g natrium dihidrogen fosfat dihidrat; 0,05 g magnesium sulfat heptahidrat; 0,002 g mangan sulfat monohidrat; 0,05 g besi (III) klorida heksahidrat; 0,02 kalsium klorida, 50 μg biotin; 100 mL air suling).

Alat-alat yang digunakan yaitu pH meter, termometer, *autoclave*, *oven*, blender, alat-alat gelas laboratorium, pembakar spiritus, jarum ose,

mikropipet, *incubator shaker*, cawan petri, bola hisap, sentrifuge, membran selofan, panci, kompor, batang pengaduk, botol sampel, dan neraca analitik.

Pemeliharaan Kultur

Pemeliharaan kultur *B. subtilis* dilakukan dalam media agar miring yang dibuat dengan cara melarutkan semua komponen penyusun yang telah disebutkan sebelumnya ke dalam 100 mL air suling yang dipanaskan hingga larut. Lalu bahan dipipet sebanyak 5 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tutup lubang tabung reaksi dengan kapas, kemudian disterilisasi pada suhu 121^{o}C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit. Setelah disterilisasi, tabung reaksi dimiringkan dan didiamkan hingga memadat.

Selanjutnya *B. subtilis* ditanam ke dalam media agar miring menggunakan jarum ose untuk diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam (Sidik, dkk., 2011). Bakteri yang telah dibiakkan kemudian disuspensikan dengan air suling steril untuk dibiakkan secara aerob dalam media inokulum.

Aktivasi Kultur

Media inokulum dibuat dengan cara melarutkan semua komponen penyusun ke dalam 30 mL air suling kemudian disterilisasi dalam autoclave selama 20 menit pada suhu 121^{o}C dengan tekanan 15 psi. Media inokulum yang sudah di sterilisasi ditambahkan 3 mL suspensi *B. subtilis* dan dikocok selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 37^{o}C. Pada media inokulum ditambahkan 30 mL larutan gliserol 20% (b/v) dan dipanaskan pada suhu 60^{o}C selama 10 menit (Sidik, dkk., 2011). Kultur bakteri dalam media inokulum disimpan pada suhu -20^{o}C untuk penyimpanan sebelum digunakan untuk fermentasi.

Fermentasi

Prosedur fermentasi dilakukan berdasarkan penelitian Sidik dkk. (2011) yang telah dimodifikasi dengan menggunakan variasi konsentrasi asam sitrat. Media yang telah diaktivasi dipindahkan (subkultur) ke media fermentasi pada beberapa variasi konsentrasi asam sitrat yaitu 20 g/L, 30 g/L g dan 50 g/L ke dalam 100 mL total volume media fermentasi. Pengaturan pH dilakukan pada media fermentasi yaitu sampai 7,5 dengan menggunakan natrium hidroksida dan disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121^{o}C dengan tekanan 15 psi. Media fermentasi yang telah steril ditambahkan kultur bakteri yang telah diaktivasi dalam 4 media inokulum, lalu dikocok pada kecepatan 150 rpm dan suhu 37^{o}C. Sampel diambil setiap 12 jam mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-96.

Penentuan Berat Kering Sel

Berat kering sel ditentukan dengan cara mengambil sekitar 5 mL sampel setiap 12 jam sekali untuk setiap variasi percobaan. Setiap sampel kemudian disentrifugasi lalu dipisahkan sel dari supernatannya. Sel yang dihasilkan disimpan di oven untuk diukur berat keringnya secara gravimetri hingga konstan.

Isolasi Asam Poliglutamat

Empat volume metanol ditambahkan ke dalam supernatan yang terbentuk, lalu campuran tersebut dibiarkan selama semalam agar terbentuk endapan, kemudian endapan yang telah terbentuk dikumpulkan dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 4.000 rpm. Endapan yang telah terkumpul dilarutkan dalam air suling 0,5 g/100 mL kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit pada kecepatan 4.500 rpm (Sidik, dkk., 2011).

Dialisis

Larutan hasil pengendapan dari proses sentrifugasi dimurnikan kembali ke dalam membran selofan dan dialisis dalam air suling hingga semua garam-garam pengotor yang masih terdapat dalam supernatan keluar, sehingga supernatan yang didapatkan akan semakin murni (Sidik, dkk., 2011).

Liofilisasi

Larutan hasil proses dialisis diekstrak dan diliofilisasi dengan menggunakan alat pengering beku (*freeze drying*) sehingga diperoleh ekstrak asam poliglutamat berbentuk serbuk (Sidik, dkk., 2011).

Perhitungan Yield

Rumus:

$$Yield = \frac{x}{y}\ x\ 100\%$$

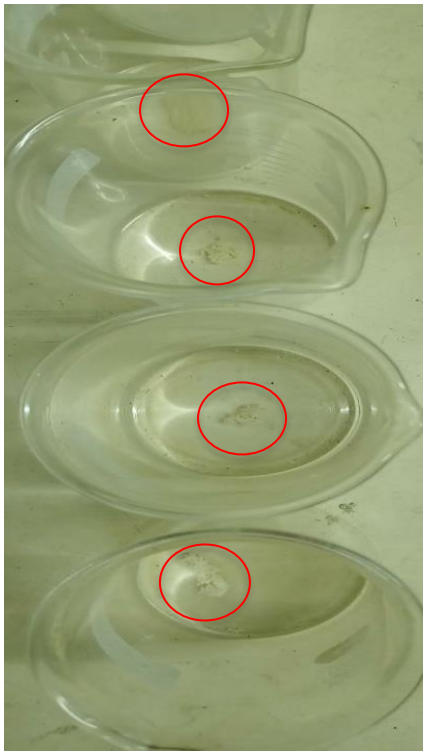
Ket:

x: massa asam poliglutamat hasil percobaan

y: massa asam sitrat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi asam poliglutamat dari asam L-glutamat dan asam sitrat telah dilakukan menggunakan metode fermentasi dengan bakteri *Bacillus subtilis.* Asam poliglutamat yang dihasilkan merupakan produk ektraseluler dari *Bacillus subtilis* yang disekresikan sebagai cairan kental (Sidik, dkk., 2008). Setelah melalui serangkaian tahapan isolasi asam poliglutamat meliputi pengendapan, sentrifugasi, dialisis, dan liofilisasi diperoleh ekstrak asam poliglutamat berupa serbuk berwarna putih yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Serbuk Asam Poliglutamat

Berdasarkan kurva pertumbuhan *B. substilis* hasil penelitian Sidik dkk. (2008), pada jam ke-12 sampai jam ke-60 terjadi fase eksponensial, sedangkan setelah melewati jam ke-60 mulai memasuki fase stasioner dan kematian

Dari penelitian tersebut pula dinyatakan bahwa produksi asam poliglutamat pada konsentrasi asam L-glutamat 3% dengan penambahan asam sitrat 2 g dalam 100 mL media fermentasi menunjukkan waktu optimum pertumbuhan bakteri pada jam ke-48. Pada jam tersebut dihasilkan asam poliglutamat sebesar 53,3 mg dengan viskositas tertinggi yaitu sebesar 1.0646 cP. Berdasarkan hasil tersebut, pada penelitian ini dilakukan analisis konsentrasi asam poliglutamat dan berat kering sel serta perhitungan *yield* pada jam ke-48 fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Produksi asam poliglutamat dan berat sel kering berdasarkan variasi konsentrasi asam sitrat pada jam ke-48

Konsentrasi Asam sitrat (g/L)	Berat sel kering (g)*	Berat Asam Poliglutamat (mg)*	Yield (%)
20	0,3265	12	0,6
30	0,3230	9,7	0,32
50	0,3471	8,8	0,18

Ket: *berat dari hasil fermentasi dengan total volume media 100 mL

Berdasarkan Tabel 1, nilai berat sel kering cenderung meningkat dengan adanya peningkatan konsentrasi asam sitrat dalam media fermentasi. Asam sitrat berperan sebagai sumber karbon untuk mendukung pertumbuhan bakteri *B. subtilis* yang ditambahkan ke media fermentasi yang mengandung asam L-glutamat (Goto dan Kunioka, 1992).

Berdasarkan hasil penelitian ini, asam poliglutamat paling banyak dihasilkan pada variasi konsentrasi asam sitrat 20 g/L yaitu 12 mg. Menurut Goto dan Kunioka (1992), penambahan asam sitrat ke media fermentasi dapat meningkatkan produksi asam L-glutamat melalui isocitric dan α-asam ketoglutarat yang nilainya meningkat sehingga produksi asam poliglutamat meningkat. Namun, pada konsentrasi asam sitrat yang lebih tinggi yaitu sebesar 30 g/L dan 50 g/L, asam poliglutamat yang dihasilkan pada penelitian ini justru menurun menjadi sebesar 9,7 mg dan 8,8 mg. Hal ini dapat terjadi karena penambahan asam sitrat berlebih akan dimanfaatkan mikroba untuk pertumbuhan dan produksi polisakarida.

SIMPULAN

Variasi konsentrasi asam sitrat terbaik pada proses fermentasi asam poliglutamat dari asam L-glutamat 3% menggunakan bakteri *B. subtilis* yaitu 20 g/L dengan menghasilkan asam poliglutamat sebesar 12 mg dan *yield* 0,6%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Politeknik Negeri Bandung yang telah mendukung pendanaan penelitian yang kami lakukan melalui Program Kreativitas Mahasiswa 2021.

DAFTAR RUJUKAN

Cromwick, A.M. & Gross, R.A. 1995. Effects of manganese (II) on Bacillus licheniformis ATCC 9945A physiology and γ-poly (glutamic acid) formation. *Int. J. Macromol*. 17. 259-267.

Drugbank. 2021. *Glutamic Acid*. https://go.drugbank.com/drugs/DB

00142 (diakses pada tanggal 13 Juni 2021)

Goto, A. & Kunioka, M. (1992) 'Biosynthesis and Hydrolysis of Poly(γ-glutamic acid) from Bacillus subtilis IF03335', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(7), pp. 1031–1035. doi: 10.1271/bbb.56.1031.

Gregersen, Eric. 2009. *Glutamic Acid*. https://www.britannica.com/scienc e/ glutamic-acid (diakses pada tanggal 13 Juni 2021)

Kulkarni, C, dkk. 2005. L-Glutamic Acid and Glutamine: Exciting Molecules of Clinical Interest. *Indian J Pharmacol. Vol. 37(3)*, hh. 148-154.

Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H. Satioh, A., Tanaka, T. & Taniguchi, M. 1993. Production of poly (γ-glutamic acid) by B. subtilis F-2-01. Biosci. Biotech. Biochem. 57. 1212-1213.

Najar dan Das. 2015. Poly-glutamic Acid (PGA) - Structure, synthesis, Genomic Organization and Its Application: A Review. I*ndia: Sikkim University* Vol. 6(6), hh. 2259. https://www.researchgate.net/publi cation/326684246poly glutamicacidpgastructuresynthesis genomicorganizationanditsapplicat ionareview. (diakses pada tanggal 13 Juni 2021)

Patil, R. S., V. Chormode, dan M. V. Desphande. 2000. Ch*itinolytic Enzymes: an Exploration. Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 26, hh. 473-483. 10

Sidik Abubakar, dkk. 2008. Produksi Poli-γ-Asam Glutamat dari Bacillus subtilis B112 dengan Variasi Konsentrasi Asam L-Glutamat Sebagai Sumber Karbon dalam Media Fermentasi. https://www.researchgate.net/publi cation/2365002886 (diakses pada 10 Juni 2021)

Sidik Abubakar, dkk. 2011. Produksi Poli- γ -Asam Glutamat dari Bacillus Subtilis B112 dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sufat sebgau Sumber Nitrogen dalam Media Fermentasi. *Sains dan Terapan Kimia*, Vol.5, No. 1 (Januari 2011), 45 - 55