

PRODUKSI PENISILIN OLEH *Penicillium chrysogenum* L112 DENGAN VARIASI KECEPATAN AGITASI PADA FERMENTOR 1 L

Saadah D. Rachman¹, Agus Safari¹, Fazli¹, Dian S. Kamara¹, Abubakar Sidik¹, Linar Z. Udin²,
Safri Ishmayana¹

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran,
Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

²Pusat Penelitian Kimia Terapan LIPI Bandung, Jln. Cisitua-Sangkuriang Bandung 40135
Corresponding author email: ishmayana@unpad.ac.id

ABSTRAK

Penisilin merupakan golongan antibiotika β -laktam yang memiliki nilai komersial tinggi karena digunakan secara luas untuk memproduksi antibiotik semisintetik lain (amoksilin, ampisilin) serta mempunyai kemampuan mengatasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Proses produksi penisilin pada skala industri dilakukan dalam skala besar memerlukan kondisi agitasi optimum. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh agitasi terhadap pembentukan penisilin dari *Penicillium chrysogenum* L112, yang mempunyai aktivitas antibiotika tertinggi terhadap beberapa bakteri uji. *P. chrysogenum* L112 yang telah diregenerasi pada suhu 30°C selama 7 hari disuspensikan dengan air suling steril. Suspensi ini diinokulasikan ke dalam media vegetasi sebanyak 2% (v/v). Selanjutnya diaktivasi pada 120 rpm dan 28°C selama 60 jam. Hasil aktivasi diinokulasi ke dalam media fermentasi sebanyak 10% (v/v), fermentasi menggunakan fermentor skala 1 L dengan kondisi pH 7, aerasi 1 vvm, suhu 28°C selama 240 jam. Kecepatan agitasi divariasikan pada 100, 150 dan 200 rpm. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan contoh untuk keperluan analisa yang meliputi pengukuran pH, berat kering sel, uji aktivitas antibiotika dan konsentrasi glukosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa agitasi dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap kemampuan *Penicillium chrysogenum* L112 dalam menghasilkan penisilin. Setiap bakteri uji memberikan respon yang berbeda terhadap aktivitas antibiotika penisilin yang dihasilkan. Aktivitas antibiotika penisilin terbaik ditunjukkan pada agitasi 150 rpm pada waktu inkubasi 192 jam dengan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap *Escherichia coli* dengan zona bening 37 mm.

Kata Kunci: penisilin, antibiotika, *Penicillium chrysogenum*, fermentasi

ABSTRACT

*Penicillin refers to a group of β -lactam antibiotics with high commercial value because it is precursor for semi synthetic antibiotics such as amoxicillin and ampicillin. It also has high antibacterial activity. Penicillin production in industrial scale uses large fermentation reactor which require optimum agitation. The present study was conducted to investigate the effect of agitation speed on penicillin production using *Penicillium chrysogenum* L112, which have high antibiotics activity against some bacteria. *P. chrysogenum* L112 which regenerated at 30°C for 7 days was suspended with distilled water. The suspension was inoculated to vegetation media to reach 2% (v/v) final concentration. It was then followed by activation at 28°C for 60 hours with 120 rpm agitation speed. The activated culture was inoculated to fermentation media to give 10% (v/v) final concentration in a 1 L fermenter at pH 7 and 28°C, aeration of 1 vvm, for 240 hours. Agitation speed was varied at 100, 150 and 200 rpm. Sample was collected every 24 hours and checked for its pH, dry cell weight, and antibiotics activity. The results of the present study indicate that agitation speed and time of incubation affected the *P. chrysogenum* ability to produce penicillin. The crude extract showed different effect when tested against different bacteria, which indicate different amount of penicillin produced. The best antibiotics activity was found at 150 rpm agitation speed, incubation time of 192 hours. The highest inhibition was found for *Escherichia coli* which showed 37 mm clear zone.*

Keywords: penicillin, antibiotics, *Penicillium chrysogenum*, fermentation

PENDAHULUAN

Antibiotika adalah substansi alamiah hasil metabolisme sekunder mikroorganisme yang mempunyai kemampuan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme lain. Definisi tersebut sangat terbatas karena sangat banyak molekul yang diperoleh melalui sintesis kimia, mempunyai aktivitas terhadap mikroorganisme. Sekarang istilah antibiotika berarti semua substansi baik yang berasal dari alam ataupun sintetik yang mempunyai toksisitas selektif terhadap satu atau beberapa mikroorganisme tujuan, tetapi mempunyai toksisitas lemah terhadap inang (manusia atau hewan) dan dapat diberikan melalui jalur umum (Elander 2003).

Penisilin pertama kali diterapkan untuk aplikasi klinik tahun 1942. Beberapa kelebihan penisilin yaitu mempunyai spectrum yang luas, aktif terhadap bakteri gram positif dan mempunyai toksisitas yang rendah sehingga penggunaan penisilin G dengan dosis tinggi tidak menyebabkan alergi (Crueger & Crueger 1984). Keberadaan gen yang berperan pada proses biosintesis penisilin dipercaya sangat penting untuk organisme penghasil sehingga dapat bersaing dengan organisme lainnya, namun molekul ini kemungkinan juga berperan dalam proses signaling (Weber *et al.* 2012). Salah satu jamur yang dikenal luas dapat menghasilkan penisilin adalah *Penicillium chrysogenum* (Houbraken *et al.* 2012; Kardos & Demain, 2011).

Produksi penisilin dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya oksigen terlarut, karbondioksida terlarut, glukosa, serta variasi fraksi volume fase abiotik dan biotik (Birol *et al.* 2002; Rani *et al.* 2003; El-Sabbagh *et al.* 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Birol *et al.* (2002) menunjukkan bahwa produksi penisilin G optimum mencapai 0,059 g/L dengan waktu inkubasi 150 jam, suhu 25°C, serta oksigen terlarut 1,16 mmol/L. El-Sayed & Rehm (1987) melakukan produksi penisilin G dengan metode amobilisasi *P. chrysogenum* ATCC 10238 menggunakan kalsium alginat dalam kolom dan fermentor. Rani *et al.* (2003) juga melakukan penelitian produksi penisilin G menggunakan *continuous stirred tank reactor* dengan metode amobilisasi *P. chrysogenum* dengan agar. Produksi penisilin G maksimum mencapai 0,641 g/L dengan kondisi media fermentasi terdiri dari laktosa monohidrat 0,13 g/L, asam fenil asetat 0,004 g/L dan amonia 0,4 mL pada suhu 27°C pH 6 serta waktu inkubasi 120 jam. Kondisi

stirred tank yang digunakan adalah volume 1 L, tinggi cairan 16 cm, L/D (diameter tank 4,338 cm, kecepatan aerasi 1 L/(L menit), kecepatan agitasi 300 rpm dan kecepatan alir umpan 25 mL/jam.

Agitasi merupakan salah satu faktor yang cukup penting dalam memproduksi penisilin (Smith & Lilly 1990) karena setiap mikroorganisme, termasuk *P. chrysogenum* L112, memerlukan kecepatan agitasi tertentu untuk dapat memproduksi penisilin secara maksimal. Pembentukan produk metabolisme mikroorganisme sering menyebabkan perubahan oksigen terlarut serta komposisi media fermentasi. Untuk mempertahankan pertumbuhan yang cepat, kecepatan agitasi harus diatur pada kondisi optimum mikroorganisme tersebut. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan variasi kecepatan agitasi untuk mencari kecepatan agitasi untuk menghasilkan penisilin maksimum.

METODE PENELITIAN

Bahan

Mikroorganisme. Mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi penisilin G adalah *Penicillium chrysogenum* L112 yang diperoleh dari Pusat Pengembangan dan Penelitian Kimia Terapan LIPI Bandung. Selain itu untuk bakteri uji digunakan *Bacillus subtilis*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, dan *Eschericia coli* yang juga diperoleh dari Pusat Pengembangan dan Penelitian Kimia Terapan LIPI Bandung.

Bahan kimia. Ekstrak ragi, asam fenil asetat, bakto pepton, potato dextrose agar, glukosa, agar bakto, susu bubuk, anti foam, natrium karbonat, kalium-natrium tatarat, natrium bikarbonat, natrium sulfat anhidrat, asam sulfat pekat, ammonium molibdat tetrahidrat, natrium hidrogen arsenat heptahidrat, metil merah, metil biru, alkohol, natrium hidroksida, asam klorida dan air suling.

Alat.

Inkubator, shaker incubator, autoklaf, fermentor, mikropipet, alat sentrifugasi, oven, neraca analitis, pH meter, spektrofotometer, kawat ose, penangas air, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Metode

Regenerasi *P. chrysogenum* L112. Sebanyak satu ose biakan *P. chrysogenum* L112

dipindahkan ke media agar miring steril (2% PDA). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

Regenerasi bakteri uji. Sebanyak satu ose biakan bakteri diambil dan dipindahkan ke media agar miring steril (2,3% nutrisi agar). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Aktivasi. Biakan *P. chrysogenum* L112 yang telah diregenerasi disuspensikan dengan air suling steril. Suspensi jamur (2% v/v dari media vegetatif) diinokulasikan ke dalam media vegetatif yang mengandung 3,4% b/v susu skim dan 3,5% b/v glukosa dan diaktivasi dengan kecepatan pengocokan 120 rpm selama 60 jam pada suhu 28°C.

Fermentasi. Hasil aktivasi diinokulasikan (inokulum yang ditambahkan 10% dari volume media fermentasi) ke dalam media fermentasi (mengandung 11% b/v susu skim, 5% b/v glukosa, 1% b/v ekstrak ragi, 1% b/v bacto pepton, 1 mg/L antifoam, dan 1 mg/L asam fenil asetat), kemudian diinkubasi dengan variasi agitasi selama 240 jam pada suhu 28°C. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan fermentor skala 1 L. Kondisi fermentor yang digunakan: pH 7, aerasi 1 vvm (volume gas per volume larutan per menit), suhu 28°C. Agitasi divariasikan pada 100, 150 dan 200 RPM. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan contoh untuk keperluan analisis.

Penentuan berat kering sel. Contoh hasil sampling disentrifugasi pada 3000 RPM selama 30 menit. Selanjutnya dicuci dengan asam klorida 0,5 N dan air suling. Endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C selama 72 jam atau sampai didapatkan berat kering sel yang konstan.

Pengukuran pH. Nilai pH contoh hasil sampling diukur dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu.

Uji aktivitas antibiotika. Sebanyak 10 µL suspensi bakteri dicampurkan dengan 16 mL larutan agar yang telah disterilkan dan masih dalam keadaan cair dan dihomogenkan. Selanjutnya dituangkan dalam cawan Petri steril. Setelah media agar membeku kemudian dilubangi sehingga terbentuk lubang dengan diameter 10 mm. kemudian 10 µL supernatan dimasukkan ke dalam lubang. Selanjutnya media agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur untuk menentukan aktivitas antibiotika. Semakin

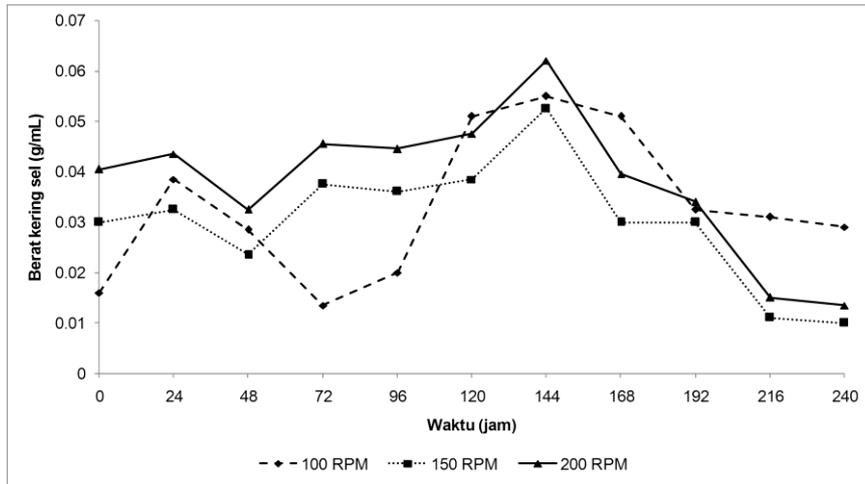
luas zona bening, semakin tinggi aktivitas antibiotika.

HASIL DAN PEMBAHASAN

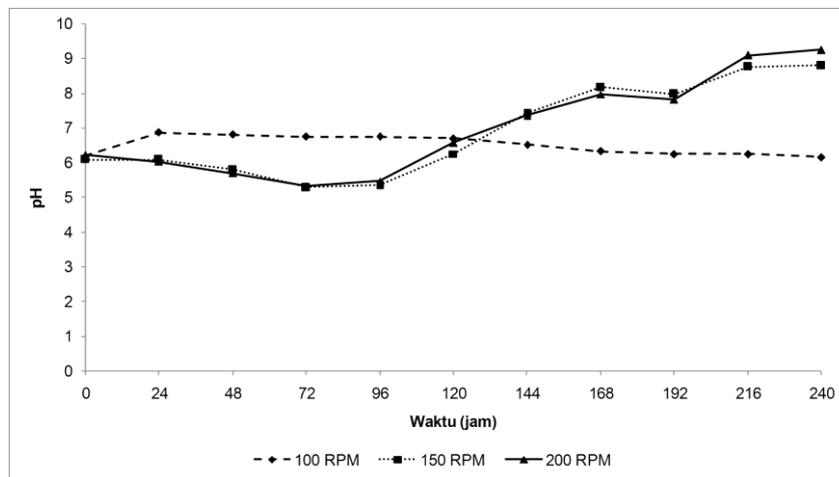
Berat kering sel. Pengukuran berat kering sel dilakukan setiap 24 jam dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 1. Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa berat kering sel cenderung naik pada jam ke-48 kecuali untuk media dengan agitasi 100 RPM. Pada jam ke-168 sampai jam ke-240 berat kering sel cenderung turun untuk semua jenis variasi agitasi. Berat kering sel tertinggi terjadi pada jam ke-144 yaitu mencapai 0,124 g/mL. Berat sel yang meningkat karena sel mengalami pertumbuhan sehingga jumlah sel semakin banyak, akibatnya berat kering sel akan terus bertambah.

Pertumbuhan terjadi pada fase eksponensial menyebabkan terjadi kenaikan berat kering sel yang cukup baik. Pada fase ini sel mulai aktif melakukan metabolisme seperti sintesis produk asam seperti asam piruvat, asam nukleat dan senyawa makromolekul lainnya (Volk & Wheeler, 1993). Selama fase eksponensial, sel-sel berada dalam keadaan yang stabil. Bahan sel baru terbentuk dengan laju konstan tetapi bahan yang baru itu sendiri bersifat katalis sehingga massa bertambah secara eksponensial. Berat kering sel turun disebabkan oleh nutrisi yang semakin berkurang karena dikonsumsi oleh *P. chrysogenum* untuk pertumbuhan dan metabolisme, akibatnya sel harus bersaing untuk mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan. Untuk sel yang tidak mampu bersaing akan mengalami kematian sel. Banyaknya sel yang mati akan menyebabkan berat kering sel menjadi turun, pada jam ke-24 berat kering sel cenderung turun karena sel terlebih dahulu harus melakukan adaptasi terhadap media cair setelah sebelumnya dibiakkan dalam media padat sehingga pertumbuhan tidak segera terjadi (Volk & Wheeler, 1993).

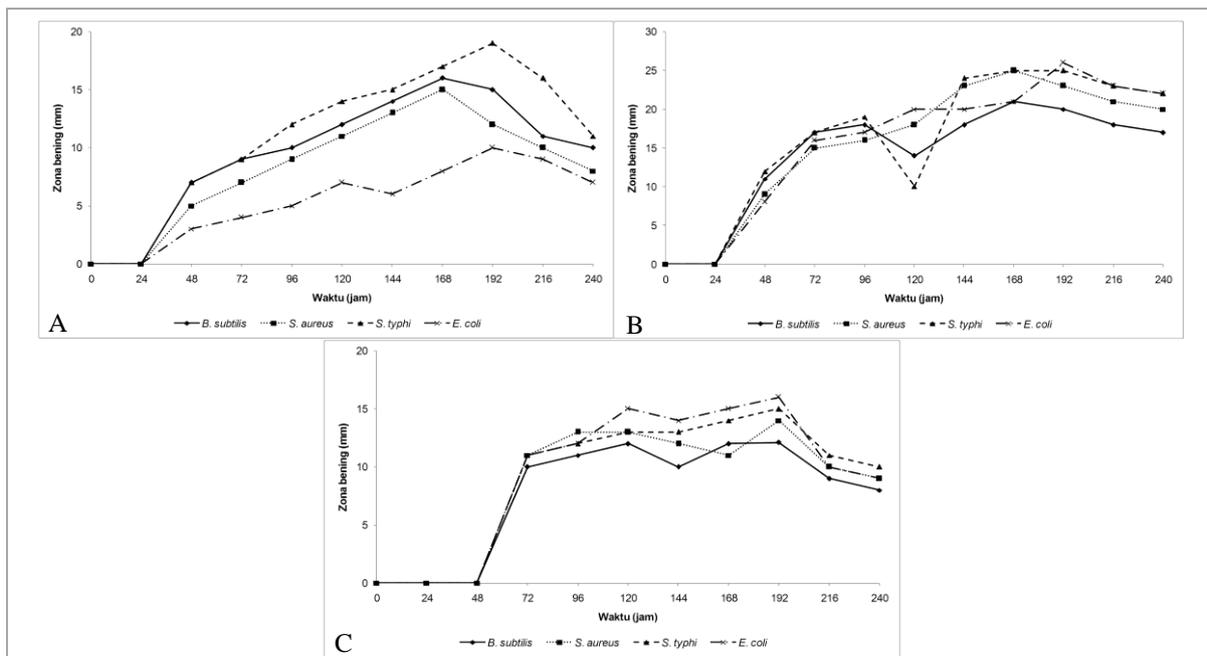
Pada jam ke-144 berat kering sel mulai turun karena sel mulai memasuki fase kematian. Pada fase ini biasanya pertumbuhan berhenti atau laju kematian lebih tinggi dibandingkan laju pertumbuhan sel, sehingga jumlah sel akan berkurang (Volk & Wheeler 1993). Hal ini menandakan pergantian sel, beberapa sel tumbuh dengan nutrisi yang dihasilkan oleh sel-sel yang mati dan mengalami lisis.



Gambar 1. Perubahan berat kering sel selama proses fermentasi



Gambar 2. Perubahan pH media fermentasi selama produksi penisilin



Gambar 3. Diameter zona hambatan hasil pengujian media fermentasi *P. chrysogenum* terhadap *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi* dan *E. coli* dengan kecepatan aerasi (A) 100 (B) 150 dan (C) 200 RPM.

pH Media Fermentasi. Koffler *et al.* (1945) dan Deo & Gaucher (1984) mengemukakan bahwa nilai pH tidak konstan selama fermentasi berlangsung. Nilai pengukuran pH selama proses fermentasi ditampilkan pada Gambar 2. Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa dari media dengan agitasi 200 dan 150 RPM pada jam ke-24 sampai jam ke-72 pH turun menjadi 5,31 dan 5,28 dan pada jam ke-96 sampai jam ke-168 pH naik menjadi 7,96 dan 8,16. Pada jam ke 192 pH turun menjadi 7,81 dan 7,97. Pada jam ke-216 sampai jam ke-240 pH kembali naik menjadi 9,24 dan 8,79. Untuk media dengan kecepatan agitasi 100 RPM pada jam ke-24 naik menjadi 6,86. Pada jam ke 48 sampai jam ke 240 turun menjadi 6,15. Perubahan pH ini terjadi karena selama berlangsungnya fermentasi terbentuk asam-asam organik seperti asam asetat dan asam piruvat (Judoamidjojo dkk 1992). Senyawa-senyawa asam yang terbentuk ini menyebabkan pH media menjadi turun, selanjutnya asam-asam ini digunakan oleh *P. chrysogenum* untuk keperluan pertumbuhan dan dihasilkannya basa nitrogen (Koffler *et al.* 1945).

Aktivitas antibiotika. Aktivitas antibiotika diujikan terhadap dua bakteri Gram negatif (*S. thypi* dan *E. coli*) dan dua bakteri Gram positif (*B. subtilis* dan *S. aureus*). Hasil pengujian ditunjukkan pada Gambar 3. Pada kecepatan agitasi 200 RPM aktivitas antibiotika terhadap bakteri uji memberikan pola yang hampir sama, yaitu diameter hambatan cenderung naik pada jam ke-120 dan tetap tinggi sampai jam ke-192. Pada jam ke-216 diameter hambatan cenderung turun. Aktivitas antibiotika tertinggi terdeteksi pada jam ke-192 untuk semua bakteri yang diuji. Diameter hambatan untuk *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi* dan *E. coli* masing-masing sebesar 12, 14, 15 dan 16 mm. Pada kecepatan agitasi 150 RPM, aktivitas antibiotika tertinggi untuk bakteri Gram negatif *S. thypi* dan *E. coli* juga terdeteksi pada jam ke-192 masing-masing dengan diameter hambatan sebesar 25 dan 26 mm. Sedangkan untuk bakteri Gram positif *B. subtilis* dan *S. aureus* aktivitas antibiotika terdeteksi lebih awal, yaitu pada jam ke-168 dengan diameter hambatan masing-masing sebesar 21 dan 25 mm. Kecepatan agitasi 100 RPM memberikan aktivitas antibiotika yang mirip dengan kecepatan agitasi 150 RPM, yaitu aktivitas tertinggi untuk bakteri Gram negatif pada jam ke-192 dan untuk Gram positif pada jam ke-168. Namun, aktivitas antibiotika yang dihasilkan dengan kecepatan agitasi 100 RPM lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas

antibiotika dengan kecepatan agitasi 150 RPM. Pada kecepatan agitasi 100 RPM aktivitas tertinggi terdeteksi untuk *S. thypi* dengan diameter hambatan 19 mm pada jam ke-192.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kecepatan agitasi mempengaruhi produksi penisilin yang ditunjukkan dengan aktivitas antibiotika yang berbeda ketika kecepatan agitasi yang digunakan pada proses fermentasi berbeda. Kecepatan agitasi paling baik ditunjukkan pada produksi penisilin dengan kecepatan agitasi 150 RPM dengan diameter hambatan sebesar 26, 25, 25 dan 21 mm masing-masing untuk *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* dan *B. subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Birol, G, Ündey, C, Parulekar, SJ & Cinar, A 2002, 'A morphologically structured model for penicillin production', *Biotechnology and Bioengineering*, vol 77, no. 5, pp. 538-552.
- Crueger, W & Crueger, A 1984, *Biotechnology: a textbook of industrial microbiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Deo, YM & Gaucher, GM 1984, 'Semicontinuous and continuous production of penicillin-G by *Penicillium chrysogenum* cells immobilized in κ -carrageenan beads', *Biotechnology and Bioengineering*, vol 26, pp. 285-295.
- Elander, RP 2003, 'Industrial production β -lactam antibiotics', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 61, pp. 385-392.
- El-Sabbagh, N, McNeil, B & Harvey, LM 2006, 'Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*', *Enzyme and Microbial Technology*, vol 39, pp. 185-190.
- El-Sayed, AMM & Rehm, HJ 1987, 'Semicontinuous penicillin production by two *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in calcium alginate beads', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 26, no. 3, pp. 211-214.
- Houbraken, J, Frisvad, JC, Seifert, KA, Overy, DP & Tuthill, DM 2012, 'New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*', *Persoonia*, vol 29, pp. 78-100.

- Judoamidjojo, M, Darwis, AA & Said, EG 1992, *Teknologi Fermentasi*, Bumi Aksara , Jakarta.
- Kardos, N & Demain, AL 2011, 'Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 92, pp. 677-687.
- Koffler, H, Emerson, RL, Perlman, D & Burris, RH 1945, 'Chemical changes in submerged penicillin fermentation', *Journal of Bacteriology*, vol 50, no. 5, pp. 517-548.
- Rani, SA, Jetty, A & Ramakrishna, SV 2003, 'Penicillin production in continuous stirred tank reactor by *Penicillium chrysogenum* immobilized in agar', *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol 17, no. 2, pp. 119-122.
- Smith, JJ & Lilly, MD 1990, 'The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*', *Biotechnology and Bioengineering*, vol 35, pp. 1011-1023.
- Volk, WA & Wheeler, MF 1993, *Mikrobiologi Dasar*, Erlangga, Jakarta.
- Weber, SS, Bovenberg, RAL & Driessen, AJM 2012, 'Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics', *Biotechnology Journal*, vol 7, pp. 225–236.