

OPTIMASI VOLUME PREKURSOR *Phenylacetic Acid* (PAA) PADA PRODUKSI PENISILIN G DARI *Penicillium chrysogenum*

Henny Rochaeni¹, Silvia Rachmy²

¹Program Studi Analis Kimia, ²Program Studi Pengolahan Limbah Industri
Politeknik AKA Bogor
Jalan Pangeran Sogiri No. 283 Tanah Baru, Bogor, Jawa Barat 16154

Abstrak

Salah satu metode untuk meningkatkan produktivitas penisilin G dari jamur *Penicillium chrysogenum* adalah dengan cara Optimasi PAA karena komposisi dari medium yang digunakan untuk kultivasi mikroorganisme dapat secara langsung berpengaruh pada fenotip fisiologis dan kinerja fermentasi mikroorganisme tersebut. Sampel jamur *Penicillium chrysogenum* terdiri atas koloni 2 dan 3 yang kemudian diberi perlakuan yang berbeda dengan menambahkan prekursor PAA dengan volume yang dibagi menjadi 3 variasi, yakni PAA 0,5 mL, 0,6 mL, dan 0,7 mL. Semua sampel kemudian dianalisis lebih lanjut dengan metode HP-LC dan analisis gula. Dari penelitian ini didapatkan hasil, pemberian PAA 0,7 menghasilkan rata-rata penisilin-G dalam jumlah yang paling besar (3787,2 dan 4021,4 ppm) dibandingkan dengan pemberian PAA 0,5 dan PAA 0,6. Koloni 3 memiliki morfologi yang mendekati dengan morfologi koloni ideal yang dapat menghasilkan penisilin-G di atas 5000 ppm, yaitu berwarna hijau gelap dengan struktur yang menyerupai gunung dengan sebuah kawah di bagian tengah. Akan tetapi, belum bisa ditentukan volume PAA yang dapat digunakan untuk menghasilkan penisilin-G dengan jumlah maksimal.

Kata kunci: *Penicillium chrysogenum*, penisilin, *phenylacetic acid*

Abstract

One method to increase the productivity of penicillin G from the *Penicillium chrysogenum* fungus is PAA optimization because the composition of the media used for the cultivation of microorganisms can directly affect the physiological phenotype and fermentation performance of these microorganisms. *Penicillium chrysogenum* fungi samples consisted of colonies 2 and 3 which were then given different treatments by adding PAA precursors with a volume divided into 3 variations, namely PAA 0.5 mL, 0.6 mL, and 0.7 mL. All samples were then further analyzed by HP-LC method and sugar analysis. From this study, the results showed that offering PAA 0.7 resulted in the largest average amount of penicillin-G (3787.2 and 4021.4 ppm) compared to giving PAA 0.5 and PAA 0.6. Colony 3 has a morphology that met an ideal colony morphology that can produce penicillin-G above 5000 ppm, which is dark green in color with a structure that has the mountain with a crater in the middle. However, it has not been determined the volume of PAA that can be used to produce the maximum amount of penicillin-G.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, penicillin, *phenylacetic acid*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas di Indonesia, sehingga kebutuhan penangkal penyakit seperti antibiotika cukup besar diperlukan. Pola hidup dan kondisi lingkungan yang buruk memacu timbulnya penyakit baru yang pada tingkatannya memerlukan pengobatan

dengan kebutuhan akan penemuan obat baru. Antibiotika yang beredar saat ini perlu dikembangkan lebih lanjut karena banyak penyakit infeksi berspektrum luas yang sulit disembuhkan dengan jenis antibiotika yang ada dikarenakan terjadinya resistensi.

Kebutuhan antibiotika yang meningkat terus dimana sebagian besarnya masih diimpor dari luar negeri, hendaknya memacu Indonesia untuk dapat memproduksi sendiri antibiotik yang dikembangkan secara maksimal baik menggunakan mikroorganisme yang sudah diketahui maupun menggunakan mikroorganisme yang diisolasi sendiri sehingga kelak Indonesia dapat mandiri dalam hal produksi antibiotika.

Penicillium chrysogenum adalah jamur berfilamen yang digunakan untuk memproduksi antibiotik penisilin. Jamur ini mampu mensintesis penisilin dengan rantai samping hidrofobik khusus ketika prekursor yang sesuai ditambahkan pada media fermentasi. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa asam fenilasetat atau *phenylacetic acid* (PAA) merupakan prekursor terbaik untuk produksi penisilin ini (Reena & Panneerselvam, 2010). Efektivitas dari prekursor rantai samping tergantung pada toksisitas dan ketahanannya terhadap oksidasi oleh *P. chrysogenum*. Pada kondisi tidak adanya prekursor rantai samping eksogen, hasil metabolisme utama dari *P. chrysogenum* adalah *6-aminopenicillanic acid* (6-APA) dan beberapa isopenicillin N. Dengan kondisi tersebut, *mono-substituted acetic acid* terdapat pada konsentrasi intraselular yang

rendah dan digunakan untuk membentuk sejumlah kecil penisilin seperti *benzilpenisilin*, *2-pentenylpenicillin*, *n-amylnpenicillin*, *n-heptylpenicillin* dan *p-hydroxybenzylpenicillin* (Kardos & Demain, 2011).

Golongan penicillin dan turunannya termasuk dalam kategori antibiotik lini pertama, yaitu antibiotik yang direkomendasikan untuk mengatasi gejala infeksi awal. Antibiotik lini pertama ini biasanya lebih tua dan lebih murah dibandingkan antibiotik kategori lini kedua yang memiliki cakupan lebih luas terhadap mikroorganisme dibandingkan dengan pendahulunya (Kardos & Demain, 2011).

Saat ini antibiotik golongan penicillin dan turunannya menghilang sejak 3-4 tahun terakhir dari pasaran obat di Indonesia. Obat tersebut telah digantikan oleh antibiotik golongan sefalosporin dan antibiotik lini kedua lainnya yang harganya lebih mahal sehingga sulit terjangkau oleh masyarakat, terlebih untuk beberapa jenis mikroba, perbedaan tingkat kesuksesan kedua kategori antibiotik tersebut tidak signifikan (Piccirillo, 2001).

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari dan memahami pengaruh penambahan prekursor *Phenylacetic acid* (PAA) terhadap produksi Penisilin-G pada jamur *Penicillium chrysogenum* dan

menentukan volume PAA optimal yang dibutuhkan untuk menginduksi produksi Penisilin-G dari hasil analisa HPLC, gula total, dan perbandingan morfologi antar koloni tersebut.

METODOLOGI PENELITIAN

Pembuatan Media Sporulasi (MP-1)

Bahan	u/100 mL	u/500 mL	u/1000 mL
Yeast extract	0,5 g/L	2,5 g/L	5 g/L
Cane molasses	0,75 g/L	3,75 g/L	7,5 g/L
Glyserin	0,75 g/L	3,75 g/L	7,5 g/L
NaCl	1 g/L	5 g/L	10 g/L
CaSO ₄	0,025 g/L	0,125 g/L	0,25 g/L
Larutan stok	0,1 mL	5 mL	10 mL
Bacto agar	2,5 g	12,5 g	25 g
H ₂ O	100 mL	500 mL	1000 mL

Penimbangan dilakukan terhadap masing-masing bahan yang dibutuhkan, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 1000 ml satu per satu sambil dilakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Setelah semua bahan tercampur dengan baik selanjutnya dilakukan pengukuran pH awal dengan menggunakan pH meter yang dikalibrasi, kemudian dilakukan penyesuaian pH sampai dengan pH 6,8 dengan menambahkan larutan NaOH 2N. Labu erlenmeyer tersebut ditutup dengan sumbat kapas dan aluminium foil. Dilakukan sterilisasi

dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121⁰C. Setelah itu, media dituang ke dalam cawan petri di dalam laminar air flow dan dibiarkan mendingin pada suhu ruang. Media kemudian ditutup dan disimpan dalam wadah plastik yang ditutup rapat sebelum digunakan.

Pembuatan Media Vegetatif (MP-2)

Bahan	g/L	g/100 mL	g/200 mL	g/300 mL
CSL	61	6,1	12,2	18,3
Sukrose	20	2	4	6
CaCO ₃	5	0,5	1	1,5
H ₂ O	1000 mL	100 mL	200 mL	300 mL

Penimbangan dilakukan terhadap masing-masing bahan yang dibutuhkan, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 1000 ml satu per satu dengan H₂O dan CaCO₃ terlebih dahulu sambil dilakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Diukur pH awal dari seluruh campuran bahan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. Dilakukan penyesuaian pH sampai didapatkan nilai pH 5,8 dengan menambahkan larutan NaOH 2N. Masing-masing labu erlenmeyer 250 ml yang sudah diisi dengan 3 buah glass beads kemudian diisi dengan 20 ml medium. Ditutup dengan sumbat kapas dan aluminium foil kemudian dilakukan

sterilisasi dengan autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121⁰C.

Pembuatan Media Fermentatif (MP-3)

Bahan	g/L
CSL	42
Laktosa	130
KH ₂ PO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5
CaCO ₃	10
Na ₂ SO ₄	1,5
H ₂ O	1000 mL

Pertama-tama, dilakukan penimbangan tiap-tiap bahan di atas sesuai dengan kebutuhan pembuatan. Kemudian dimasukkan satu per satu ke dalam labu erlenmeyer atau gelas ukur 2000 mL sambil dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Diukur pH awal-nya dan dilakukan *adjust* pH sampai mencapai nilai pH sekitar 5,9 dengan cara menambahkan larutan NaOH 4N sedikit demi sedikit. Diambil 30 mL dengan pipet ukur dimasukkan ke dalam beberapa labu erlenmeyer sesuai keperluan pembuatan. Ke dalam tiap-tiap labu erlenmeyer 250 mL sebelumnya ditambahkan 0,15 mL soybean oil dan 3 butir glass beads. Diberikan 3 perlakuan PAA yang berbeda yaitu 0,5 mL; 0,6 mL; dan 0,7 mL PAA Labu erlenmeyer ditutup dengan sumbat kapas dan alumunium foil untuk kemudian disterilisasi di autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121⁰C.

Pembuatan Media NA

Dilakukan penimbangan NA sesuai kebutuhan yang kemudian dilarutkan di dalam labu Erlenmeyer berisi aquades sesuai kebutuhan lalu distirrer di atas hot plate sambil dilakukan pengukuran pH awal sampai mencapai pH 7 dengan menambahkan larutan NaOH 4N tetes demi tetes. Labu erlenmeyer tersebut lalu ditutup dengan sumbat kapas dan alumunium foil. Kemudian disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121⁰C. Selesai disterilisasi, dilakukan penuangan media NA steril ke dalam beberapa cawan petri di dalam laminar air flow. Setelah media memadat, cawan Petri ditutup dan dimasukkan ke dalam kantung plastik.

Pembuatan Larutan NaCl 0,9% + 2 Tetes Tween

Padatan NaCl 0,9 gram dimasukkan ke dalam *becker glass* 300 mL dan dilakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Ditambahkan 2 tetes larutan Tween ke dalam *becker glass* tersebut. Setelah semuanya larut, diambil sebanyak 9 ml untuk dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi. Beberapa tabung reaksi itu kemudian disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121⁰C.

Pembuatan HCl 4N 100 mL

Sebanyak 165,6 ml larutan HCl 37% dimasukkan ke dalam labu ukur 500 ml. Lalu ditambahkan akuades ke dalam labu ukur sampai mencapai batas tera 100ml. Pengerjaan ini dilakukan di dalam ruang asam.

Pembuatan NaOH 4N 100 mL

Diambil sebanyak 23,71 ml larutan NaOH 50%, dimasukkan ke dalam labu ukur. Dilakukan pengenceran dengan menambahkan akuades sampai batas tera 100 ml.

Pembuatan Reagen DNS

3,5 DNS 10,6 gram, 19,8 gram NaOH, dan akuades 1416 mL dicampur dan dilarutkan terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan 306 gram natrium kalium tartrat, 7,6 mL fenol dan 8,3 gram Na-metabisulfat. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Diambil sebanyak 3 mL untuk dititrasi dengan 0,1 N HCl dan indikator PP (sampai berubah warna ke warna semula setidaknya membutuhkan 5-6 mL HCl). Jika kurang dari 5-6 mL HCl, maka ditambahkan NaOH sebanyak 2 gram untuk setiap penambahan 1 mL HCl.

Pembuatan Larutan Alkohol 70%

Ke dalam gelas ukur 100 mL ditambahkan 70 mL alkohol 96% kemudian

ditambahkan akuades sampai batas tera 100 mL.

Transfer Spora dari Agar Miring ke MP-2 dan Uji Sterilitas

Bahan-bahan yang perlu disiapkan diantaranya larutan NaCl 0,9%, agar slant *Penicillium chrysogenum*, media MP-2, media NA, media MP-1, dan alkohol 70%. Alat-alat yang digunakan antara lain *laminar air flow*, pipet ukur steril, bulb, *incubator shaker*, oose, inkubator 25⁰C dan 37⁰C.

Bahan-bahan seperti *agar slant*, media MP-1, media MP-2, media NA dan larutan NaCl 0,9% disemprot dengan alkohol 70%. Kemudian dimasukkan ke dalam *laminar air flow* yang sudah dipersiapkan sebelumnya. Diambil 6 mL larutan NaCl 0,9%. Dimasukkan ke dalam agar slant *Penicillium chrysogenum* dan digoreskan-goreskan ujung pipet ukur hingga miselia *Penicillium chrysogenum* larut. Dari agar slant tersebut diambil sebanyak 1 mL suspensi spora untuk dimasukkan ke dalam media MP-2. Setelah itu, dilakukan uji sterilitas dengan melakukan *streak* dari slant ke media MP-1 dan media NA di dalam cawan petri. Media MP-2 yang sudah diinokulasikan dengan kultur *Penicillium chrysogenum* terpilih dishaker selama 7 hari. Sedangkan hasil streak pada media MP-1 dan media

NA disimpan di dalam inkubator 25⁰C dan 37⁰C untuk kemudian dilihat apakah terdapat kontaminasi atau tidak pada masing-masing kultur.

Transfer Media dari Media MP-2 ke Media MP-3

Media MP-2, media MP-3, media MP-1 dan media NA dimasukkan ke dalam *laminar air flow* yang sebelumnya sudah disiapkan. Dengan menggunakan pipet ukur steril sebanyak 1,5 mL dari media MP-2 dimasukkan ke dalam media MP-3. Kemudian, dilakukan uji sterilitas dengan melakukan *streak* dari tiap media MP-2 ke dalam media MP-1 dan NA di dalam cawan petri.

Analisis HP-LC (*High Performance-Liquid Chromatography*)

Media MP-3 yang sudah dishaker selama 10 hari merupakan sampel yang dianalisa untuk menghitung jumlah penisilin-G yang dihasilkan dan jumlah PAA yang tersisa dalam media MP-3.

Alat-alat yang digunakan antara lain alat sentrifuge, alat HPLC, tabung sentrifuge 15 mL, tutup tabung *sentrifuge*, mikropipet 1 mL, tabung vial, dan tabung erlenmeyer 250 mL.

Tabung-tabung erlenmeyer 250 mL yang berisi media MP-3 disiapkan. Dari tiap tabung tersebut diambil sebanyak 10 mL, lalu dimasukan ke tabung sentrifuge

15 mL. Setelah ditutup dengan tutupnya, semua tabung dimasukkan ke dalam alat sentrifuge yang diatur kecepatannya 3500 rpm selama 15 menit. Selesai disentrifuge, diukur jumlah padatan yang mengendap sebagai PMV (*Packed Mass Volume*), sementara itu supernatannya dipindahkan ke dalam kuvet sebanyak 400 μ L untuk disentrifuge kembali dengan kecepatan 130000 rpm selama 15 menit. Lalu, 200 μ L supernatan dipindahkan ke dalam tabung vial untuk dianalisa pada alat HPLC. Tiap-tiap sampel diatur tingkat pengencerannya agar konsentrasi penisilin-G dan PAA yang terukur masih berada dalam batas kurva standar yang digunakan.

Analisis Gula Total

Pertama-tama sampel yang akan diuji ditimbang dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi kecil. Sesudah dilakukan penimbangan ditambahkan 0,5 mL larutan HCl 4N ke dalam masing-masing sampel. Waterbath diatur untuk suhu >96⁰C. Sampel yang telah diberi penambahan 0,5 mL HCl 4N dipanaskan dalam waterbath selama 20 menit. Setelah 20 menit, ditambahkan 1 mL NaOH 2N ke dalam sampel tersebut.

Tabung reaksi besar dipersiapkan dan ke dalamnya dimasukkan sebanyak 3 mL dan 6 mL larutan DNS untuk sampel dan blanko. Selain itu, labu ukur 50 mL

dan corong juga dipersiapkan. Sampel yang akan dianalisis tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, dibilas sebanyak 3 kali serta ditambahkan akuades hingga mencapai batas tera 50 mL dan dipindahkan kembali ke tabung reaksi kecil yang sudah dibilas.

Tabung reaksi besar yang sudah berisi 3 mL larutan DNS ditambahkan 800 μ L akuades dan 200 μ L sampel untuk pengenceran 5x. Sedangkan untuk kontrol sampel dilakukan pengenceran 10x dengan ditamhkannya 900 μ L akuades dan 100 μ L kontrol sampel. Kemudian divortex dan dipanaskan selama 2 menit di waterbath dengan suhu $> 96^{\circ}\text{C}$. Blanko yang berisi 6 mL larutan DNS juga dipanaskan.

Terakhir, dilakukan pengukuran spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm untuk mengetahui nilai absorbansi sampel tersebut. Setelah didapatkan nilai absorbansi melalui pengukuran, data-data yang didapat diproses dan dihitung hingga mendapatkan nilai gula totalnya.

HASIL PENELITIAN

Penicillium chrysogenum merupakan spesies jamur yang dipakai untuk memproduksi antibiotik penisilin yang sangat penting dalam dunia kesehatan sehingga dilakukanlah produksi secara komersial dengan cara biosintesa, semisintesa dan sintesa kimia total.

Terdapat dua cara dalam biosintesa yaitu *surface culture method* (jamur *P. chrysogenum* ditumbuhkan pada permukaan wadah yang berisi media padat yang lembab/cair) dan *submerged agitated method* (jamur *P. chrysogenum* ditumbuhkan dengan media cair yang selalu digoyang) (Abraham *et al.*, 1941).

Optimasi PAA merupakan salah satu metode untuk meningkatkan produktivitas penisilin G dari jamur *Penicillium chrysogenum* karena komposisi dari medium yang digunakan untuk kultivasi mikroorganisme dapat secara langsung berpengaruh pada fenotip fisiologis dan kinerja fermentasi mikroorganisme tersebut. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Reena *et al* pada 2011, penggunaan Phenylacetic Acid (PAA) sebagai prekursor menunjukkan hasil yang optimal jika dibandingkan dengan Phenyl ActeAmide (PAAM) dan Phenoxyacetic Acid (POAA).





Dalam pelaksanaan penelitian ini, tujuan utamanya adalah untuk mengoptimasi volume PAA yang digunakan (dalam percobaan ini digunakan PAA dengan volume 0,5 mL, 0,6 mL, dan 0,7 mL) terhadap sampel koloni jamur *Penicillium chrysogenum* (digunakan koloni 2 dan koloni 3) untuk dapat menghasilkan antibiotik penisilin-G sehingga dapat dilakukan *scale up* di fermentor secara efektif dan efisien.

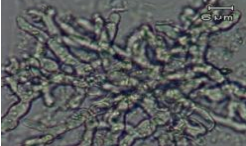

Pengamatan morfologi terhadap setiap sampel koloni *Penicillium chrysogenum* yang dianalisa dilakukan secara kasat mata atau menggunakan mikroskop kemudian difoto. Pengamatan morfologi dilakukan dua kali. Pertama, pengamatan bentuk tumbuh koloni saat jamur akan diambil sampelnya dan dipindahkan dari agar miring tempat penyimpanannya ke medium vegetatif MP-2. Pengamatan ini dilakukan secara kasat mata. Pengamatan morfologi kedua dilakukan sebelum sampel dipindahkan dari media vegetatif MP-2 ke media

fermentasi MP-3. Pengamatan ini dilakukan dibawah mikroskop untuk memilih sampel yang tepat untuk difermentasi. Hasil pengamatan kemudian difoto dan dibandingkan dengan literatur. Dari foto tersebut diamati dan dicatat ciri-ciri morfologinya apakah sesuai atau berbeda dengan ciri-ciri morfologi sampel koloni *Penicillium chrysogenum* yang dapat menghasilkan penisilin-G di atas 5000 ppm.

Berikut adalah hasil pengamatan morfologi terhadap sampel koloni 2 dan koloni 3.

Tabel 1. Morfologi *Penicillium chrysogenum* sampel koloni 2 dan 3

No	Koloni	Gambar Morfologi
1	Koloni 2 Warna : hijau muda Struktur : bagian tengah tidak tersusun rapi dan belum menyerupai bentuk kawah.	
2	Koloni 3 Warna : hijau tua Struktur : bentuk hampir bulat sempurna, bagian tengah hampir rapi dan menyerupai bentuk kawah.	
3	Koloni 2.1 dalam media vegetatif (MP-2) Perbesaran: 50x	
4	Koloni 2.2 dalam media vegetatif (MP-2) Perbesaran: 50x	

No	Koloni	Gambar Morfologi
5	Koloni 3.1 dalam media vegetatif (MP-2) Perbesaran: 50x	
6	Koloni 3.2 dalam media vegetatif (MP-2) Perbesaran: 50x	

Apabila diamati dari perbedaan morfologi tiap sampel koloni *Penicillium chrysogenum* yang diuji, berdasarkan Tabel 1 di atas, koloni 3 merupakan koloni yang lebih baik jika dibandingkan dengan koloni 2. Koloni 3 memiliki struktur morfologi yang paling mendekati ciri-ciri struktur morfologi koloni *Penicillium chrysogenum* yang dapat menghasilkan penisilin-G di atas 5000 ppm menurut Stefaniak *et al.*, (1946) yaitu memiliki warna hijau gelap serta membentuk struktur menyerupai gunung dengan kawah yang ada di tengah.

Masing-masing sampel kemudian diberi perlakuan yang berbeda dengan menambahkan prekursor PAA dengan volume yang dibagi menjadi 3 variasi, yakni PAA 0,5 mL, 0,6 mL, dan 0,7 mL. Semua sampel kemudian dianalisis lebih lanjut dengan metode HP-LC dan analisis gula.

Phenylacetic Acid (PAA) sampai saat ini merupakan prekursor yang terbukti paling baik untuk menginduksi sintesis penisilin-G. Percobaan dengan

menggunakan volume PAA yang bervariasi diharapkan dapat mengetahui volume optimal yang dapat mempercepat dan memperbanyak produksi penisilin-G dari koloni *Penicillium chrysogenum* secara efektif dan efisien. (Lee *et al.*, 1994).

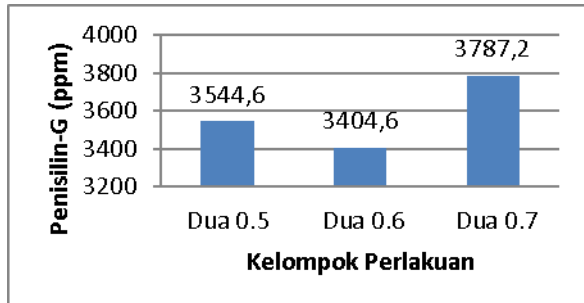
Menurut Baker & Lonergan (2002), dalam suatu senyawa penisilin-G sepertiganya merupakan senyawa PAA. Agar lebih jelasnya perlu dibandingkan struktur kimia masing-masing yaitu antara struktur kimia penisilin-G dan PAA, serta struktur dasar penisilin pada umumnya.

HP-LC merupakan suatu alat yang sangat bermanfaat dalam suatu analisis kimia serta memiliki prinsip penggunaan yang sama dengan kromatografi lapis tipis dan kolom. HPLC memperbolehkan penggunaan partikel yang berukuran sangat kecil untuk material terpadatkan dalam kolom yang mana akan memberi luas permukaan lebih besar berinteraksi antara fase diam dan molekul-molekul yang melintasinya sehingga memungkinkan terjadinya pemisahan yang

lebih baik dari komponen-komponen dalam campuran (Stefaniak *et al.*, 1946).

Analisis HP-LC dan gula total dilakukan pada dua hari yang berbeda untuk masing-masing koloni (awal pengerjaan masing-masing koloni berselang 3 hari). Dari analisa dengan menggunakan HP-LC ini didapatkan data mengenai jumlah penisilin-G yang dihasilkan, PAA yang digunakan, pemakaian gula sebagai sumber karbon yang dipakai serta pH dan PMV (Packed Mass Volume).

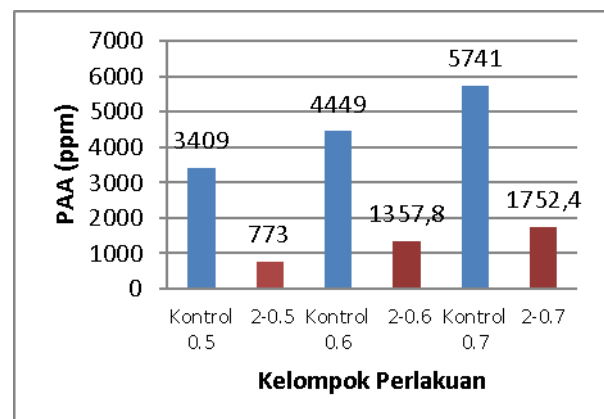
Gambar 1 sampai Gambar 5 memperlihatkan perbandingan hasil analisis HP-LC dan gula total masing-masing perlakuan pada sampel koloni 2.



Gambar 1. Perbandingan hasil penisilin-G rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 2

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa dari penelitian yang dilakukan pada koloni 2, sampel dengan kandungan PAA sebanyak 0.7 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata paling tinggi, yaitu sebesar 3787,2 ppm, dibandingkan dengan sampel yang diberi PAA sebanyak 0,5 mL dan 0,6 mL. Hal ini mungkin disebabkan oleh

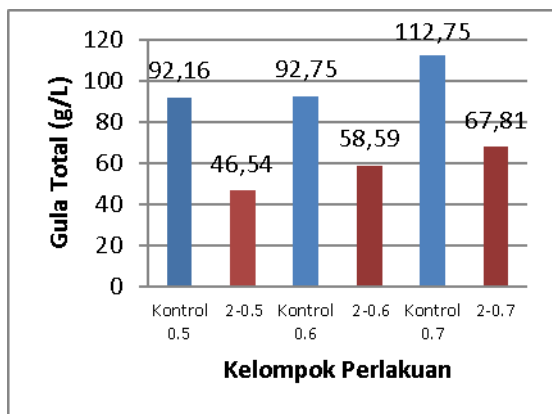
keefisienan metabolisme koloni *Penicillium chrysogenum* yang ada pada sampel tersebut. Dengan melihat hasil tersebut, maka koloni 2 belum dapat dilanjutkan *scale-up* pada fermentor karena jumlah penisilin-G minimal yang dibutuhkan untuk *scale-up* adalah 5000 ppm karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana memaksimalkan produksi penisilin pada koloni 2 untuk mendapatkan *trend* jumlah penisilin-G seperti yang diharapkan. Perlu juga dilakukan perbandingan dari segi morfologi agar didapatkan koloni yang lebih unggul.



Gambar 2 Perbandingan nilai PAA rata-rata saat HPLC pada semua kelompok perlakuan koloni 2

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui rata-rata konsentrasi PAA yang tersisa dalam medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. Kelompok perlakuan dengan PAA sebanyak 0,7 memiliki konsentrasi PAA sisa yang paling banyak, yaitu 1752,4 ppm, dibanding

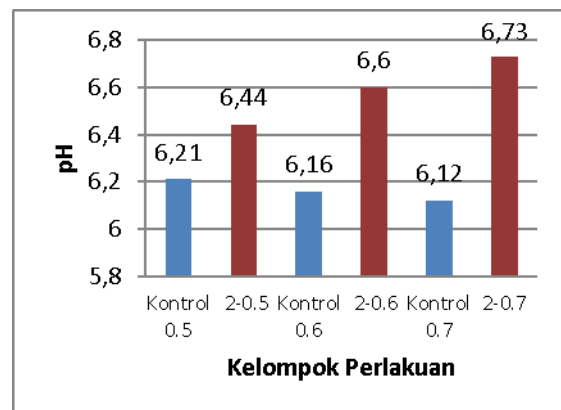
kelompok perlakuan lainnya. Dari Gambar 2 dapat diperkirakan konsumsi PAA pada masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan yang mendapatkan PAA sebesar 0,5 mL diperkirakan mengkonsumsi PAA sebanyak 2636 ppm. Kelompok perlakuan PAA 0,6 mL diperkirakan mengkonsumsi PAA sebesar 3091,2 ppm. Konsumsi PAA terbesar diperkirakan terjadi pada kelompok perlakuan PAA 0,7 mL yaitu 3988,6 ppm.



Gambar 3 Perbandingan gula total rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 2

Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui rata-rata konsentrasi gula total yang terdapat dalam medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. Kelompok perlakuan PAA 0,5 pada koloni 2 mengkonsumsi gula rata-rata sebesar 45,62 g/L. Kelompok perlakuan PAA 0,6 dan PAA 0,7 masing-masing diperkirakan menghabiskan gula rata-rata sebesar 34,16 g/L dan 44,94 g/L. Konsumsi gula yang cenderung menurun ini diperkirakan

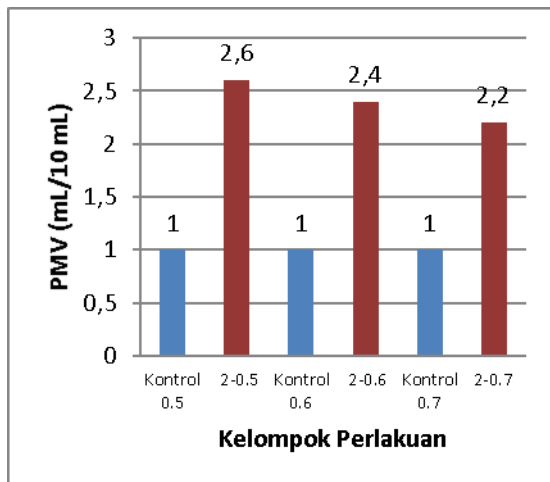
memiliki hubungan dengan konsumsi PAA dari masing-masing kelompok perlakuan yang cenderung meningkat. Dengan kata lain, dapat dikatakan bahwa semakin banyak mikroba mengkonsumsi PAA untuk mensintesis penisilin-G, semakin sedikit sumber karbon yang dikonsumsi untuk pertumbuhan mikroba tersebut.



Gambar 4. Perbandingan pH rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 2

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui rata-rata pH medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. pH perlakuan cenderung naik dan lebih tinggi daripada pH kontrolnya. Hal ini dapat dikarenakan PAA dalam media tersebut berkurang karena ada yang di konsumsi oleh mikroba. Seperti yang kita ketahui, *phenylacetic acid* (PAA) bersifat asam sehingga semakin banyak PAA yang terkandung dalam medium, semakin rendah pula pH nya. Hasil ini mendukung data sebelumnya yang menyatakan bahwa koloni 2 yang diberi PAA 0,7 mL mengkonsumsi PAA paling banyak

dibandingkan perlakuan PAA 0,5 dan PAA 0,6 karena kenaikan pH dari koloni 2 perlakuan PAA 0,7 ini juga yang paling tinggi, yaitu naik sebesar 0,61, diantara perlakuan lainnya yang hanya mengalami kenaikan pH sebesar 0,23 dan 0,5.



Gambar 5 Perbandingan PMV rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 2

Pada Gambar 5 dapat terlihat bahwa PMV yang didapat pada saat panen cenderung semakin menurun dari perlakuan dengan PAA 0,5 sampai perlakuan dengan PAA 0,7. *Packed Mass Volume* (PMV) dapat dikorelasikan dengan massa sel mikroba yang ada dalam medium perlakuan. Semakin besar PMV maka semakin besar massa sel mikroba yang juga berarti semakin banyak terjadi pertumbuhan sel. Hasil ini dapat dijelaskan oleh data sebelumnya yang menyatakan bahwa koloni dengan PAA 0,5 mengkonsumsi gula paling banyak diantara koloni dengan PAA 0,6 dan PAA 0,7. Dengan semakin banyaknya gula yang dikonsumsi maka semakin besar pula

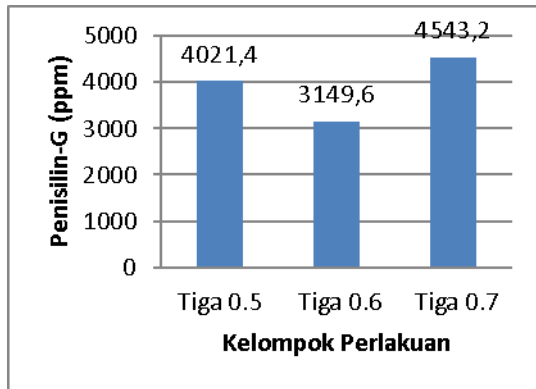
pertumbuhannya sehingga PMV yang didapat juga semakin besar.

Berdasarkan Gambar 5 di atas, sampel koloni 2 yang diberikan PAA 0,5 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata sebanyak 3544,6 ppm dan dari Tabel 3.5 tersebut dapat diketahui rata-rata PAA yang tersisa dalam medium adalah sebanyak 773 ppm, sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,5 adalah sebanyak 46,54 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,44 dan 2,2 mL/10 mL.

Pada hasil analisa koloni 2 yang diberikan PAA 0,6 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata sebanyak 3404,6 ppm dan rata-rata PAA yang tersisa dalam medium adalah 1357,8 ppm, sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,6 adalah sebanyak 58,59 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,60 dan 2,4 mL/10 mL.

Pada sampel koloni 2 dengan prekursor PAA yang ditambahkan sebanyak 0,7 mL, penisilin-G rata-rata yang dihasilkan sebanyak 3787,2 ppm. Rata-rata PAA yang tersisa dalam medium adalah 1757,2 ppm sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,7 mL sebanyak 67,81 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,73 dan 2,6 mL/10 mL.

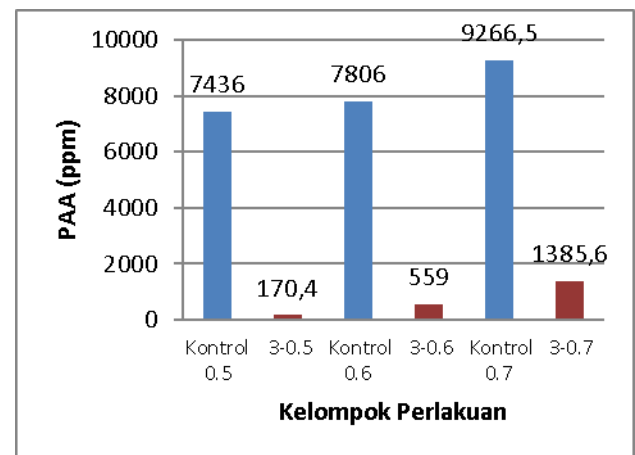
Gambar 6 sampai Gambar 10 memperlihatkan perbandingan hasil analisis HP-LC dan gula total masing-masing perlakuan pada sampel koloni 3.



Gambar 6 Perbandingan hasil penisilin-G rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 3

Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui bahwa dari penelitian yang dilakukan pada koloni 3, sampel dengan kandungan PAA sebanyak 0.7 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata paling tinggi, yaitu sebesar 4543,2 ppm, dibandingkan dengan sampel yang diberi PAA sebanyak 0,5 mL dan 0,6 mL. Hal ini mungkin disebabkan oleh keefisienan metabolisme koloni *Penicillium chrysogenum* yang ada pada sampel tersebut. Dengan melihat hasil tersebut, maka koloni 3 belum dapat dilanjutkan *scale-up* pada fermentor karena jumlah penisilin-G minimal yang dibutuhkan untuk *scale-up* adalah 5000 ppm karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana memaksimalkan produksi penisilin pada koloni 3 untuk

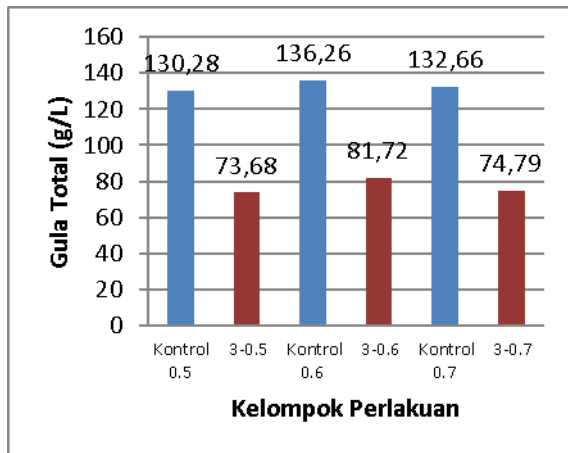
mendapatkan *trend* jumlah penisilin-G seperti yang diharapkan. Perlu juga dilakukan perbandingan dari segi morfologi agar didapatkan koloni yang lebih unggul.



Gambar 7 Perbandingan nilai PAA rata-rata saat HPLC pada semua kelompok perlakuan koloni 3

Pada Gambar 7 dapat diketahui rata-rata konsumsi PAA masing-masing perlakuan dibandingkan dengan kontrolnya. Berdasarkan Gambar 3.8 dapat diketahui rata-rata konsentrasi PAA yang tersisa dalam medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. Kelompok perlakuan dengan PAA sebanyak 0,7 memiliki konsentrasi PAA sisa yang paling banyak, yaitu 1385,6 ppm, dibanding kelompok perlakuan lainnya. Dari Gambar 3.8 dapat diperkirakan konsumsi PAA pada masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan yang mendapatkan PAA sebesar 0,5 mL diperkirakan

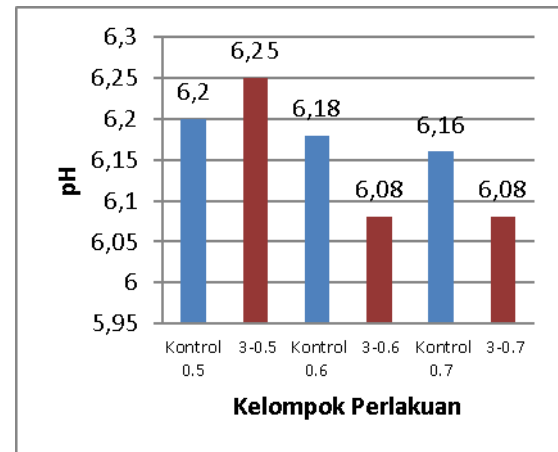
mengonsumsi PAA sebanyak 7266 ppm. Kelompok perlakuan PAA 0,6 mL diperkirakan mengonsumsi PAA sebesar 7247 ppm. Konsumsi PAA terbesar diperkirakan terjadi pada kelompok perlakuan PAA 0,7 mL yaitu 7880,9 ppm.



Gambar 8 Perbandingan gula total rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 3

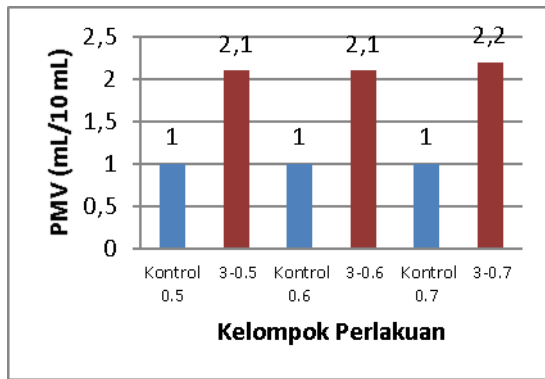
Berdasarkan Gambar 8 dapat diketahui rata-rata konsentrasi gula total yang terdapat dalam medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. Kelompok perlakuan PAA 0,5 pada koloni 3 mengonsumsi gula rata-rata sebesar 56,6 g/L. Kelompok perlakuan PAA 0,6 dan 0,7 masing-masing diperkirakan menghabiskan gula rata-rata sebesar 54,54 g/L dan 57,87 g/L. Karakter koloni 3 dalam mengonsumsi gula terlihat berbeda dengan karakter yang dimiliki oleh koloni 2. Pada koloni 3, jika PAA yang di konsumsi sedikit, maka konsumsi gula juga cenderung mengikuti (menjadi lebih

sedikit), begitu pula sebaliknya. Hal ini mungkin dikarenakan karakteristik dari masing-masing koloni yang beragam.



Gambar 9 Perbandingan pH rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 3

Berdasarkan Gambar 9 dapat diketahui rata-rata pH medium pada saat panen dilaksanakan dan dibandingkan dengan masing-masing kontrolnya. pH perlakuan PAA 0,5 pada koloni 3 lebih tinggi daripada pH kontrolnya, penyebabnya mungkin sama seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, bahwa kenaikan pH bisa terjadi akibat PAA dalam media tersebut berkurang karena ada yang di konsumsi oleh mikroba. Sementara itu penurunan pH dibandingkan dengan kontrolnya pada kelompok percobaan PAA 0,6 dan PAA 0,7 dapat disebabkan oleh banyaknya asam laktat yang terbentuk sebagai hasil dari terjadinya fermentasi.



Gambar 10 Perbandingan PMV rata-rata pada semua kelompok perlakuan koloni 3

Pada Gambar 10 dapat terlihat bahwa PMV yang didapat pada saat panen cenderung semakin menurun dari perlakuan dengan PAA 0,5 sampai perlakuan dengan PAA 0,7. Pada koloni 3, kelompok perlakuan dengan PAA 0,7 yang mengkonsumsi PAA dan gula paling tinggi juga memiliki PMV yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada koloni 3 lainnya.

Pada hasil analisa koloni 3 yang diberikan PAA 0,5 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata sebanyak 3149,6 ppm dan rata-rata PAA yang tersisa dalam medium adalah sebesar 559 ppm, sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,6 adalah sebanyak 81,72 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,08 dan 2,1 mL/10 mL.

Pada hasil analisa koloni 3 yang diberikan PAA 0,6 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata sebanyak 4021,4 ppm dan rata-rata PAA

yang tersisa dalam medium adalah 170,4 ppm, sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,6 adalah sebanyak 73,68 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,25 dan 2,1 mL/10 mL.

Pada hasil analisa koloni 3 yang diberikan PAA 0,7 mL menghasilkan penisilin-G dengan nilai rata-rata sebanyak 4021,4 ppm dan rata-rata PAA yang tersisa dalam medium adalah sebanyak 1385,6 ppm, sedangkan rata-rata gula yang tersisa dari sampel koloni 2 PAA 0,7 adalah sebanyak 74,79 g/L serta rata-rata pH dan PMV masing-masing sebanyak 6,08 dan 2,2 mL/10 mL.

Dari hasil analisa yang didapatkan, jumlah penisilin-G pada koloni 2 dapat dilakukan *scale-up* pada fermentor karena jumlah penisilin-G minimal yang dibutuhkan untuk *scale-up* adalah 5000 ppm karenanya perlu dilakukan seleksi koloni berkelanjutan untuk mendapatkan *trend* jumlah penisilin-G seperti yang diharapkan. Apabila dilihat dari rentang nilai pH-nya, sudah baik karena memiliki rentang pH berkisar antara 6-7.

Hasil analisa HP-LC menunjukkan bahwa baik koloni 2 dan koloni 3 menghasilkan penisilin-G rata-rata pada pemberian PAA 0,7 mL (3782,2 ppm) dan (4543,2 ppm). Rata-rata konsentrasi gula total koloni 2 dan 3 pada masing-masing perlakuan tidak termasuk tinggi yaitu

46,54 g/L, 58,59 g/L, dan 67,81 g/L, 73,68 g/L, 81,72 g/L, dan 74,79 g/L. Sumber karbon akan dirombak dan digunakan untuk membangun massa sel dan membentuk produk. Komposisi dari medium yang digunakan untuk fermentasi secara langsung berpengaruh pada kemampuan produksi mikroorganisme tersebut, yang juga akan berdampak pada efektivitas dan efisiensi dalam aplikasi industri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Reena A. dan Panneerselvam A. (2010), diketahui bahwa dibandingkan dengan glukosa, laktosa merupakan sumber karbon yang lebih baik untuk fermentasi penisilin ini. Konsentrasi gula laktosa di dalam media fermentasi harus dipertimbangkan dengan seksama. Konsentrasi gula total yang lebih tinggi (di atas 200 g/L) masih dapat ditoleransi oleh ragi dan jamur seperti *P. chrysogenum* yang mampu merombak 20 – 40 g/L gula total menjadi asam laktat pada saat proses fermentasi berlangsung. Pada konsentrasi tertentu, sumber karbon dan katabolit karbon dapat menghambat satu atau beberapa enzim yang berperan dalam proses pembentukan produk dalam hal ini penisilin-G. Salah satu pendekatan untuk mencegah penghambatan tersebut adalah dengan memberikan sumber karbon secara terus menerus pada konsentrasi tertentu di bawah konsentrasi penghambatan (Shuler dan Kargi, 1992). Menurut Stanbury *et al.*,

(2016), konsentrasi gula total yang paling sesuai untuk pertumbuhan koloni *P. chrysogenum* adalah diantara 80 – 120 g/L sehingga dapat mendukung pembentukan sporanya dan tetap dapat menghasilkan penisilin-G.

Konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi penyerapan nutrisi dan aktivitas fisiologi mikroba sehingga mempengaruhi pertumbuhan biomassa dan pembentukan produk. Ragi dan jamur memiliki pH optimal pertumbuhan pada rentang 4,5 – 5,5 namun pH optimal pertumbuhan tidak selalu sama dengan pH optimal pembentukan produk. Produksi penisilin-G maksimum oleh *P. chrysogenum* diperoleh pada rentang pH 6,0 – 7,0. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rata-rata pH yang masih berada dalam rentang pH optimal 6,0 – 7,0 untuk menghasilkan penisilin-G. Pengendalian pH pada proses fermentasi ini cukup sulit dilakukan karena terjadinya penurunan konsumsi glukosa dan cepat terbentuknya asam laktat menyebabkan terjadinya penurunan pH. Penambahan CaCO_3 pada media MP-2 dan media MP-3 dapat mencegah terjadinya penurunan pH (Shuler dan Kargi, 1992).

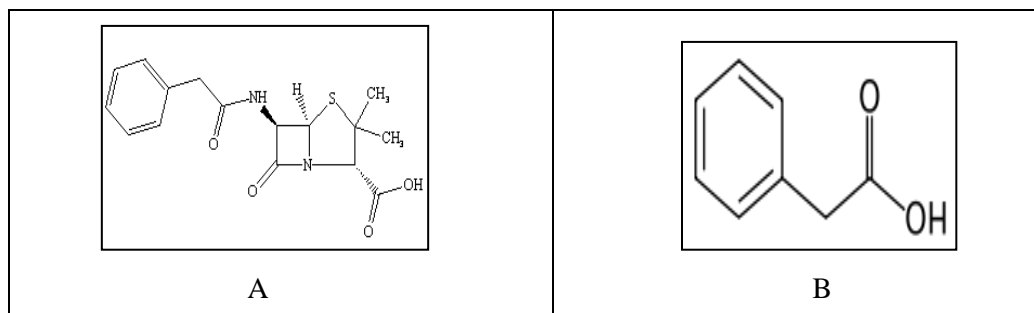
Pada proses fermentasi, asam fenilasetat (PAA) ditambahkan pada medium fermentasi sebagai senyawa prekursor pada pembentukan penisilin-G. Penambahan fenilasetat (PAA) diharapkan

dapat mempercepat dan memperbanyak produksi penisilin-G dari koloni *P. chrysogenum*.

Pada penelitian ini, ditemukan bahwa volume PAA 0,7 mL menghasilkan penisilin-G dalam jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan volume PAA yang lebih rendah, akan tetapi rata-rata PAA dari masing-masing ulangan koloni tidak selalu berada pada rata-rata konsentrasi PAA

optimal yang diperlukan untuk pembentukan penisilin-G sehingga penisilin-G yang dihasilkan belum mencapai 5000 ppm (Lee *et al.*, 1994).

Menurut Baker & Lonergan (2002), dalam suatu senyawa penisilin-G sepertiganya merupakan senyawa PAA. Agar lebih jelasnya perlu dibandingkan struktur kimia masing-masing yaitu antara struktur kimia penisilin-G dan PAA, serta struktur dasar penisilin pada umumnya.



Gambar 11 Struktur Kimia (A) Penisilin G dan (B) PAA

Berdasarkan Gambar 11 di atas tersebut, struktur kimia PAA pada Gambar B juga terdapat pada struktur kimia penisilin-G (A). Sehingga dapat dikatakan bahwa sepertiga dari senyawa penisilin-G adalah senyawa PAA. Secara teoritis apabila ingin dihasilkan penisilin-G sebanyak 5000 ppm maka jumlah PAA yang ditambahkan haruslah sebesar sepertiganya yaitu sebanyak 1667,67 ppm senyawa PAA (Stanbury *et al.*, 2016).

Sintesis penisilin G dari *Penicillium chrysogenum* diinduksi oleh Phenylacetic Acid (PAA) dan garamnya. Namun, juga dapat ditekan oleh keberadaan glukosa, laktosa, fruktosa, dan sumber karbon lainnya. PAA memang berperan untuk menginduksi pembentukan penisilin G, namun PAA juga berperan sebagai penghambat pertumbuhan jamur pada konsentrasi yang melebihi derajat optimumnya (Rodriguez, M.E. *et al.*, 1994).

Berdasarkan informasi tersebut, maka konsentrasi PAA yang diberikan pada semua perlakuan sudah mencukupi bahkan ada yang melebihi konsentrasi yang dibutuhkan oleh *Penicillium chrysogenum* untuk menghasilkan penisilin-G di atas 5000 ppm. Meskipun berdasarkan percobaan ini konsentrasi penisilin-G yang dihasilkan pada semua koloni adalah sampel yang diberikan PAA

dengan volume 0,7 mL, namun menurut kami hasil ini kurang memuaskan karena apabila dibandingkan dengan sampel yang diberikan PAA dengan volume 0,5 mL hasilnya tidak berbeda jauh.

Hasil produksi penisilin-G yang tidak sesuai dengan keinginan bisa jadi disebabkan oleh konsentrasi PAA yang diberikan terlalu berlebih sehingga bersifat toksik bagi *Penicillium chrysogenum*, bisa juga disebabkan oleh metabolisme dari koloni sampel yang tidak efektif dan efisien sehingga diperlukan seleksi koloni dan penelitian berkelanjutan agar hasil produksi penisilin-G yang diharapkan dapat tercapai.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian dalam penelitian ini adalah :

1. Pada koloni 2 dan 3, pemberian PAA 0,7 menghasilkan rata-rata penisilin-G dalam jumlah yang paling besar (3787,2 dan 4021,4 ppm) dibandingkan dengan pemberian PAA 0,5 dan PAA 0,6. Namun pengaruh pemberian PAA terhadap produksi penisilin-G koloni 2 dan 3 ini tidak berbanding lurus.

2. Koloni 3 memiliki morfologi yang mendekati dengan morfologi koloni ideal yang dapat menghasilkan penisilin-G di atas 5000 ppm, yaitu berwarna hijau gelap dengan struktur yang menyerupai gunung dengan sebuah kawah di bagian tengah.
3. Belum bisa ditentukan volume PAA yang dapat digunakan untuk menghasilkan penisilin-G dengan jumlah maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- E.P. Abraham, Further Observations On Penicillin, *The Lancet*, Volume 238, Issue 6155(1941)Pages 177-189
- Kardos, Nelson & Demain, Arnold. (2011). Penicillin: The medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied microbiology and biotechnology*. 92. 677-87. 10.1007/s00253-011-3587-6.
- Lee, K.H., Lee, S.C. and Lee, W.K. (1994), Penicillin G extraction from model media using an emulsion liquid membrane: A theoretical model of product decomposition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 59: 365-370.
- Piccirillo, J.F. (2001). Impact of first-line vs second-line antibiotics for the treatment of acute uncomplicated sinusitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 286. 1849-56.
- Reena A and Panneerselvam A (2011) Isolation, Screening and optimization of *Penicillium Chrysogenum*, from the soil samples of Muthupet Marshes, Tamilnadu. *Ind.J.Applied.Microbiol*, 13(1): 19-23
- Rodriguez, M., Guereca, L., Valle, F., Quintero, R. and LópezMunguía, A., (1992) *Process Biochem.*, 27, 217–223
- Shuler, M. & Kargi, Fikret. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. xvi.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A. & Hall, S.J.. (2016). *Principles of Fermentation Technology: Third Edition*.
- Stefaniak, J. J., Gaiey, F. B., Brown, C. S., And Johnson, M. J. (1946) Pilot plant equipment for submerged penicillin production. In press.