

PURIFIKASI *POLY-B HYDROXY BUTYRATE* DARI GLUKOSA DALAM *CUPRIAVIDUS NECATOR*

Dhena Ria Barleany¹, Wiratni², Maryati³, Nisrina Utami³

¹Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

²Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Gadjah Mada

³Alumni Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

Email : ¹dbarleany@yahoo.com

ABSTRAK

Poly β-hydroxybutyrate (PHB) merupakan polimer yang paling umum dijumpai dari kelas *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) dan merupakan jenis plastik dengan sifat 100% *biodegradable*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan pengaruh kondisi *lysis* dan ekstraksi dalam menghasilkan *yield* PHB di dalam *Cupriavidus necator* dengan substrat glukosa. *Cupriavidus necator* ditumbuhkan dalam medium Ramsay dan sumber karbon berupa glukosa menggunakan fermentor sistem *batch*. Hasil fermentasi dicuci dengan NaCl 0.625%, kemudian dilakukan sentrifugasi sehingga diperoleh pelet sel dan beningan (*supernatant*). Proses purifikasi dilakukan melalui dua tahap, yaitu lisis dan ekstraksi. Tahap *lysis* dilakukan menggunakan hidrogen peroksida (H₂O₂) dengan konsentrasi 5% dan 10% dan variasi temperatur 40 °C dan 80 °C. Ekstraksi PHB menggunakan kloroform (CHCl₃) dengan temperatur operasi 30 °C dan 50 °C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* PHB (gr PHB/gr sel kering) tidak dipengaruhi secara signifikan oleh masing-masing variabel konsentrasi H₂O₂, temperatur lisis dan temperatur ekstraksi, tetapi dipengaruhi secara signifikan oleh interaksi ketiga variabel tersebut. Metode ANOVA dengan *two-factor factorial design* menunjukkan bahwa interaksi antara ketiga variabel didapat nilai *F*_{0,05,1,8}(9.482) yang lebih besar dari nilai *F*_{0,05,1,8}(5.32). *Yield* PHB terbesar diperoleh pada konsentrasi H₂O₂ 5%, temperatur lisis 40 °C dan temperatur ekstraksi 50 °C.

Kata kunci: lisis, ekstraksi, ANOVA

ABSTRACT

Poly β-hydroxybutyrate (PHB) is the most popular polymer from the class of *Polyhydroxyalkanoate* (PHA), and is 100% *biodegradable*. The aim of this research is to study the effect of *lysis* and extraction condition to produce high yield of PHB in *Cupriavidus necator* using glucose as substrate. *Cupriavidus necator* was grown in a batch fermenter system, using Ramsay medium and glucose as carbon source for nutrition. Fermentation product was then washed using NaCl 0.625% and centrifuged so that became two layer consisted of pellet cell and supernatant. Purification process was then held through two steps, they were *lysis* and extraction. *Lysis* step was done using variations 5% and 10% of hydrogen peroxyde (H₂O₂) and temperatures of operation are 40°C and 80°C. PHB was extracted using chloroform (CHCl₃) with two variations of temperature 30°C and 50°C. Result of this research showed that PHB yield (gr PHB/gr dry cell) was not significantly effected by variable of H₂O₂ concentration, *lysis* temperature, and extraction temperature, but was significantly effected by interaction of those three variables. ANOVA method with two factor factorial design showed that interaction of three variables resulted *F*_{0,05,1,8}(9.482); higher than *F*_{0,05,1,8}(5.32). Highest value of PHB yield was got at concentration H₂O₂ reached 5%, *lysis* temperature 40°C and extraction temperature 50 °C.

Keywords: *lysis*, extraction, ANOVA

1. PENDAHULUAN

Hampir 100 % plastik yang digunakan oleh masyarakat Indonesia bahkan dunia diproduksi dari minyak bumi atau gas alam. Plastik yang berbasis petroleum (*petroleum based plastic*) mendatangkan pengaruh negatif terhadap lingkungan, karena tidak dapat didegradasi secara biologi sehingga sisa pemanfaatannya menimbulkan sampah yang menumpuk.

Polyhydroxyalkanoate (PHA) merupakan jenis plastik dengan sifat 100% *biodegradable*. Biopolimer ini terdegradasi sempurna menjadi air dan karbon dioksida pada kondisi aerob dan terdegradasi menjadi metana pada kondisi anaerob. Proses degradasi ini terjadi melalui aktivitas mikroorganisme di dalam tanah, laut, air danau, dan kotoran. *Poly β-hydroxybutyrate* (PHB) merupakan polimer yang paling umum dijumpai dari kelas PHA, dan mulai diproduksi secara komersial pada tahun 1989.

Cupriavidus necator mengakumulasi PHB di dalam selnya dan membutuhkan teknik purifikasi yang tepat untuk proses panennya. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa strategi *lysis* dan ekstraksi yang tepat dapat meningkatkan produktivitas PHB di dalam mikroorganisme tersebut, sehingga secara ekonomi dapat bersaing dengan biaya produksi material plastik konvensional.

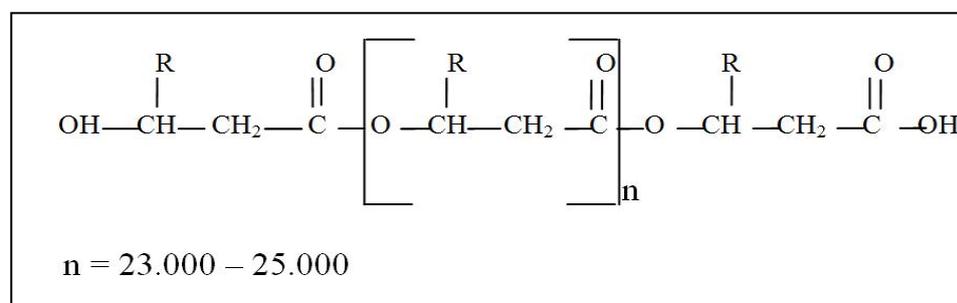
Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan data pengaruh kondisi lisis dan ekstraksi dalam menghasilkan *yield* PHB di dalam *Cupriavidus necator* dengan substrat glukosa.

Penelitian ini dilakukan dengan proses fermentasi *batch* dan difokuskan pada proses purifikasi PHB, yaitu proses lisis dan ekstraksi. Proses lisis dilakukan dengan menggunakan larutan *Hydrogen Peroxyde* (H₂O₂), sedangkan proses ekstraksi dengan menggunakan larutan *Chloroform* (CHCl₃).

2. TINJAUAN PUSTAKA

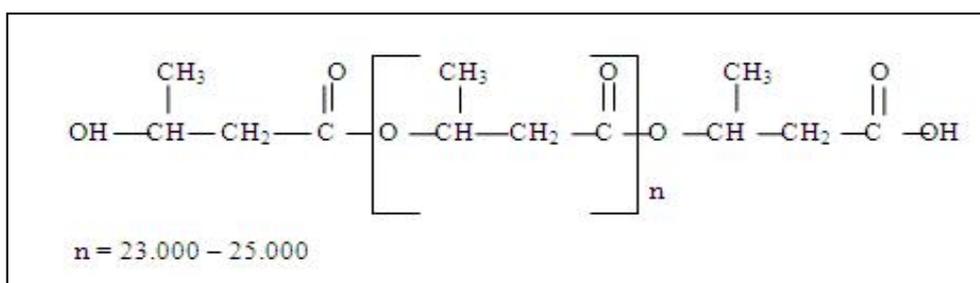
Bioplastik merupakan salah satu jenis biomaterial, yaitu poliester yang diproduksi oleh mikroba, yang dibiakkan pada kondisi nutrisi dan lingkungan tertentu. Pembentukan biopolimer oleh bakteri ada dua macam yaitu *in vivo* dan *in vitro*. Proses *in vivo* adalah proses dimana pembentukan polimer berlangsung didalam sel bakteri, sedangkan *in vitro* proses pembentukan polimer berlangsung di luar sel. Produksi polimer secara *in vivo* dan *in vitro* ini mempunyai tingkat kesulitan yang berbeda-beda. Pada umumnya, produksi secara *in vivo* lebih sulit dibandingkan dengan produksi secara *in vitro*, namun polimer yang dihasilkan juga mempunyai kualitas yang berbeda, produksi secara *in vivo* menghasilkan kualitas polimer yang lebih baik, yang kemudian digunakan dalam bidang kedokteran.

Beberapa material bioplastik yang sedang banyak dikembangkan adalah *polyhydroxyalkanoates* (PHAs), *polylactides*, *aliphatic polyesters*, polisakarida, dan *copolimers* serta kombinasi *starch* dengan polipropilen (Lee, 1996). Kombinasi *starch* dengan polipropilen bersifat semi *biodegradable* sedangkan PHA 100% *biodegradable* (Patwardhan dan Srivastava, 2004). PHA merupakan *polyester* dari berbagai *hydroxyalkanoate* yang disintesa oleh banyak mikroorganisme sebagai material cadangan energi pada saat nutrisi esensial seperti nitrogen atau fosfor dalam keadaan terbatas dan kondisi sumber karbon berlebih. PHA memiliki temperatur leleh serta sifat mekanis seperti *Modulus Young* dan *tensile strength* yang mirip dengan beberapa jenis termoplastik sintetis seperti polipropilen. PHA juga merupakan polimer yang kuat, tahan terhadap kelembaban, dan *biocompatible* (Lee, 1996). Struktur molekul PHA seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur molekul *Polyhydroxyalkanoate* (PHA)

Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) merupakan jenis polimer yang paling banyak dikenal dan dipelajari dari kelas PHA, memiliki titik leleh 175°C dan terdekomposisi pada 200°C (Anderson dan Dawes, 1990). Struktur molekul PHB seperti terlihat pada Gambar 2 sebagai berikut:



Gambar 2. Struktur molekul Poly- β -hydroxybutyrate (PHB)

Pertama kali Lemoigne pada tahun 1926 mendeteksi PHB, kemudian sejak saat itu banyak ditemukan di dalam berbagai kelompok taksonomi dari prokariotik (Patwardhan dan Srivastava, 2004). Pemanfaatan PHB antara lain sebagai film pembungkus, tas, kontainer, beberapa peralatan seperti gelas dan *diapers*, juga digunakan sebagai *biodegradable carrier* untuk obat-obatan dan insektisida atau pupuk (Lee, 1996).

PHB merupakan salah satu cadangan energi bagi sel mikroorganisme, yang memiliki tiga fungsi utama, yaitu (Bernat et al., 2008): akumulasi energi pada saat suplai energi dari lingkungan luar lebih besar dibandingkan dengan kebutuhan sel untuk pertumbuhan, utilisasi pada saat suplai dari sumber luar tidak cukup tersedia untuk *maintenance* sel, degradasi untuk memproduksi energi.

Pada kondisi pertumbuhan yang sesuai, PHB dapat terakumulasi lebih dari 85% dari berat sel kering oleh *Alcaligenes eutrophus* (Anderson dan Dawes, 1990). *Alcaligenes eutrophus* merupakan nama lain dari *Wautersia eutropha* (Patwardhan dan Srivastava, 2008).

Perbandingan sifat PHB dengan plastik konvensional (polipropilen) disajikan dalam Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Perbandingan sifat PHB dengan polipropilen

Parameter	PHB	Polipropilen
Titik lebur T_m , ($^{\circ}C$)	171 – 182	171 – 186
Glass transition, T_g ($^{\circ}C$)	5-10	-15
Crystallinity (%)	65-80	65-70
Densitas (g/cm^3)	1,23-1,25	0,905-0,94
Berat molekul, MW	2,105	5,105
Flexural modulus (Gpa)	3,5-4	1,7
Kuat tarik (Mpa)	40	39
Extension to break (%)	6-8	400
Ketahanan terhadap sinar UV	Baik	Kurang baik
Ketahanan terhadap solvent	Kurang baik	Baik
Permeabilitas oksigen ($cm^3 m^{-2}atm^{-1}d^{-1}$)	45	1700
Biodegradabilitas	Baik	-

Review dari beberapa hasil penelitian terbaru (Braunegg et al., 1998; Patwardhan dan Srivastava, 2004) mengindikasikan bahwa *Ralstonia eutropha* merupakan organisme yang paling banyak dipilih dalam produksi PHB. Hasil penelitian Vaneechoutte et al. pada tahun 2004 menyimpulkan bahwa spesies *Ralstonia eutropha* diklasifikasikan ke dalam genus *Wautersia*, dan berdasarkan eksperimen hibridisasi DNA-DNA serta evaluasi karakteristik menunjukkan bahwa *Wautersia eutropha*, spesies dari genus *Wautersia*, sekarang ini sinonim dengan *Cupriavidus necator*, spesies dari genus *Cupriavidus*.

Tabel 2. Komposisi medium *Cupriavidus necator* (Ramsay et al., 1990)

Komposisi	Konsentrasi
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	6,7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
Ferri ammonium sulfat	60 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg/l
<i>Trace element*</i>	1 mL

**Trace element* (per liter aquades): FeSO₄·7H₂O 20 g/l, H₃BO₄ 0,3 g/l, CaCl₂·6H₂O 0,2 g/l, ZnSO₄·7H₂O 0,03 g/l, MnCl₂·4H₂O 30 mg/l, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 30 mg/l, NiSO₄·7H₂O 30 mg/l, CuSO₄·5H₂O 10 mg/l

Ada dua macam proses pemurnian PHB, yaitu *Chemical Lysis* dan *Mechanical Disruption*. Perbedaan dua macam proses ini terletak pada proses *lysis* atau penghancuran dinding selnya. *Chemical lysis* menggunakan bahan kimia sedangkan *mechanical disruption* menggunakan proses mekanik, salah satunya dengan menciptakan bunyi frekuensi tinggi.

Proses kimiawi konvensional terdiri atas dua proses konsekutif, yaitu penghancuran dinding sel (proses *lysis*) dengan bahan kimia diikuti ekstraksi PHB dari *suspense* sel dengan pelarut non polar. Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan, didapatkan bahwa NaOCl sebagai *digester* dapat menyebabkan degradasi berat molekul PHB sampai dengan 50% (Asa, 2006).

Solvent yang bisa digunakan dalam pengambilan PHB adalah *methylene chloride*, *propylene carbonate*, *dichloroetane* dan *chloroform*. PHB murni diperoleh dengan menguapkan *chloroform*, dan kemudian didapatkan PHB berupa serbuk berwarna putih (Hahn dkk., 1995).

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap percobaan utama. Tahap pendahuluan terdiri dari persiapan starter dan fermentasi, kemudian dilanjutkan dengan tahap percobaan utama yaitu purifikasi.

3.2 Prosedur Penelitian

a. Persiapan Starter

Pembuatan starter dimulai dengan menginokulasikan bakteri *Cupriavidus necator* ke medium NGY yang telah disiapkan dalam erlenmeyer dan telah disterilkan sebelumnya. Komposisi medium NGY adalah *beef extract* 2 gr/liter, *peptone* 5 gr/liter, *yeast* 3 gr/liter, dan glukosa 10 gr/l. Selanjutnya larutan starter diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30°C dan kecepatan 150 rpm. Setelah 16 jam, erlenmeyer berisi larutan *starter* dimasukkan ke dalam bioreaktor yang telah berisi medium Ramsay di dalam *laminar air flow* (LAF).

b. Fermentasi

Produksi PHB dilakukan dalam bioreaktor dengan kapasitas 1,5 liter yang dilengkapi *magnetic stirrer* dan sistem aerasi menggunakan udara yang dilewatkan *microfilter*, dengan kecepatan *volumetric* udara 0,3 liter/menit. Percobaan dilakukan menggunakan sistem *batch*.

c. Tahap Percobaan utama

Tahap percobaan utama merupakan tahap purifikasi. Pelet sel dimasukkan ke dalam *conical tube* kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0,625%. Untuk memisahkan pelet sel dan larutan NaCl, *conical tube* dimasukkan ke dalam *centrifuge* dan dilakukan proses sentrifugasi pada skala 4 selama 15 menit, kemudian larutan NaCl pada lapisan atas dibuang. Proses *lysis*, H₂O₂ sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung, kemudian dimasukkan kedalam *shaker bath* selama 4 jam. Setelah 4 jam, dilakukan proses sentrifugasi terhadap *conical tube* pada skala 4 selama 15 menit, kemudian lapisan larutan H₂O₂ dibuang. Larutan segar H₂O₂ sebanyak 5 ml kembali ditambahkan ke dalam *conical tube*, kemudian dimasukkan lagi ke dalam *shaker bath* pada temperatur yang telah ditentukan selama 4 jam. Setelah *dicentrifuge* pada skala 4 selama 15 menit dan H₂O₂ dibuang, padatan dikeringkan dalam *petridisk*. Proses ekstraksi, padatan kering dipindahkan ke dalam tabung kaca bertutup dan

ditambahkan CHCl_3 sampai penuh, kemudian dimasukkan ke dalam *shaker bath* selama 24 jam pada temperatur yang telah ditentukan. Padatan merupakan sel kering mati sedangkan cairan adalah PHB yang larut dalam CHCl_3 . Cairan dimasukkan ke dalam *petridisk* hingga kering dan diperoleh produk PHB.

3.3 Alat dan Bahan

a. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan starter dan produksi PHB terdiri dari labu erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, *auto clave*, *magnetic stirrer*, neraca analitis digital, *incubator shaker*, *conical tube* 15ml, *centrifuge*, *vortex mixer*, *laminar air flow* (LAF), tabung reaksi, bioreaktor dan *aeration apparatus*.

Alat-alat yang digunakan pada proses purifikasi PHB meliputi labu erlenmeyer 500 ml, gelas ukur, *shaker bath*, pipet ukur 10 ml, oven, *petridisk*, eksikator, *conical tube* 15 ml, *centrifuge*, gelas kimia, tabung kaca, *vortex mixer* dan neraca analitis digital.

b. Bahan – bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan untuk fermentasi adalah Bakteri *Cupriavidus necator* (CCUG 52238 T) didapat dari Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, glukosa monohidrat, p.a, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.a, KH_2PO_4 , p.a, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.a, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, p.a, ferri amonium sulfat, p.a, *trace element*, aquadest, *beef extract*, p.a, (OXOID, *Yeast Extract*, p.a, Peptone, p.a. Bahan untuk proses purifikasi adalah NaCl , H_2O_2 , dan CHCl_3 , p.a.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel berubah pada penelitian ini adalah konsentrasi H_2O_2 , suhu *lysis* dan suhu ekstraksi. Konsentrasi H_2O_2 yang digunakan adalah 5% dan 10%. Suhu *lysis* yang digunakan adalah 40°C dan 80°C , sedangkan suhu ekstraksi yang digunakan adalah 30°C , dan 50°C .

Kondisi operasi yang tetap adalah konsentrasi glukosa awal yang digunakan yaitu 10 gram/l, laju alir udara masuk bioreaktor yang dijaga konstan sebesar 0,3 l/menit dan volume medium fermentasi 500ml.

3.5 Metode Pengumpulan dan Analisa Data

Data yang diperoleh berupa berat PHB dalam berbagai variasi konsentrasi dan temperatur pada proses purifikasi. Berat PHB kemudian dikonversikan ke dalam satuan *yield* (gram PHB/gram sel basah) untuk mendapatkan data pengaruh kondisi *lysis* dan ekstraksi. Sel basah merupakan hasil panen berupa *broth* yang telah dilakukan proses sentrifugasi. Sel basah kemudian dikeringkan di dalam oven hingga berat konstan, dan ditimbang sebagai gram sel kering. Kadar air sel adalah selisih antara air yang terdapat di dalam sel basah dengan sel kering, dibagi dengan berat sel kering. Kadar air ini kemudian digunakan untuk mengkonversikan *yield* (gram PHB/gram sel basah) ke dalam satuan *yield* (gram PHB/gram sel kering).

Data percobaan yang diperoleh kemudian diolah secara statistik dengan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui seberapa besar pengaruh variabel proses terhadap *yield* PHB.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data *yield* PHB dalam berbagai variasi kondisi *lysis* dan ekstraksi pada sistem purifikasi yang kemudian diplotkan dalam bentuk grafik. Data tersebut tercantum dalam Tabel 3 berikut ini:

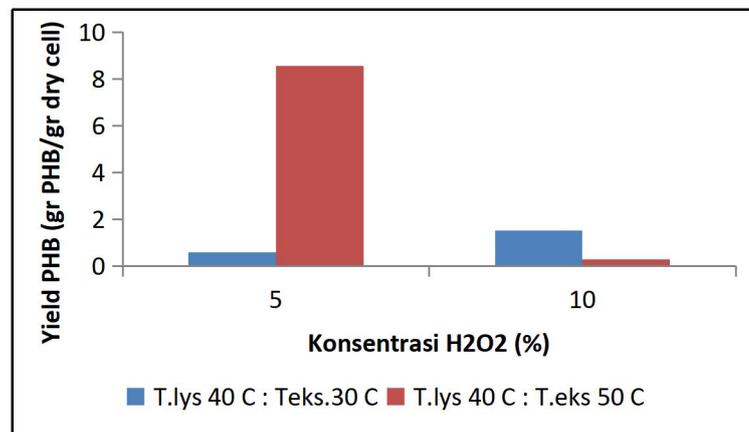
4.1 Pengaruh Konsentrasi H_2O_2 Terhadap *Yield* PHB

Gambar 3 menunjukkan bahwa variabel konsentrasi H_2O_2 dalam sistem purifikasi PHB memiliki pengaruh terhadap *yield* PHB yang dihasilkan. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya nilai *yield* PHB yang bervariasi seiring dengan perubahan konsentrasi H_2O_2 dari 5% dan 10%. *Yield* PHB terbesar diperoleh pada saat konsentrasi H_2O_2 5%, yang merupakan konsentrasi yang rendah yang digunakan pada penelitian ini. Ketika kondisi sistem purifikasi berubah, seperti terlihat pada Gambar 3 (a) pada temperatur *lysis* 40°C dan temperatur ekstraksi 30°C dan Gambar 3 (b) pada temperatur *lysis* 80°C dan temperatur ekstraksi 50°C , *yield* PHB yang tinggi justru diperoleh pada saat konsentrasi H_2O_2 10%.

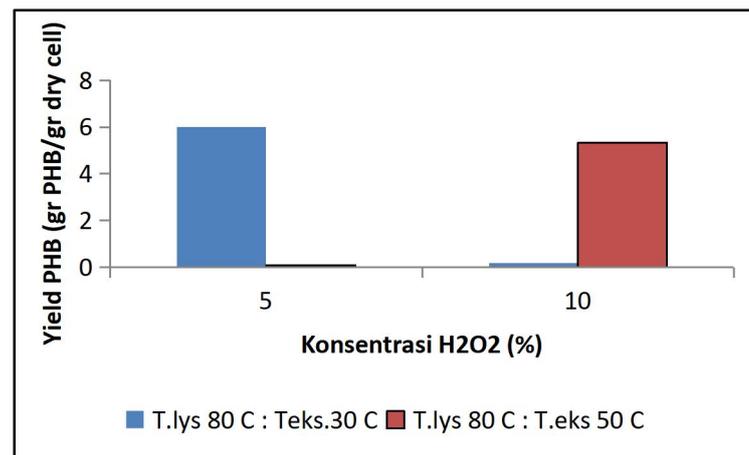
Tabel 3 Data yield PHB yang dihasilkan dalam variasi kondisi lysis dan ekstraksi pada sistem purifikasi produksi PHB

T. lysis (°C)	T.ekstraksi (°C)	Konsentrasi H ₂ O ₂ (%)	yield PHB	
			Sample 1	Sample 2
40	30	5	0.57	0.71
40	50	5	8.55	6.54
80	30	5	6.01	4.79
80	50	5	0.09	0.10
40	30	10	1.51	1.90
40	50	10	0.29	0.33
80	30	10	0.17	0.19
80	50	10	5.33	23.15

Pengaruh variasi konsentrasi H₂O₂ terhadap yield PHB yang dihasilkan tersaji pada Gambar 3 berikut ini:



(a)



(b)

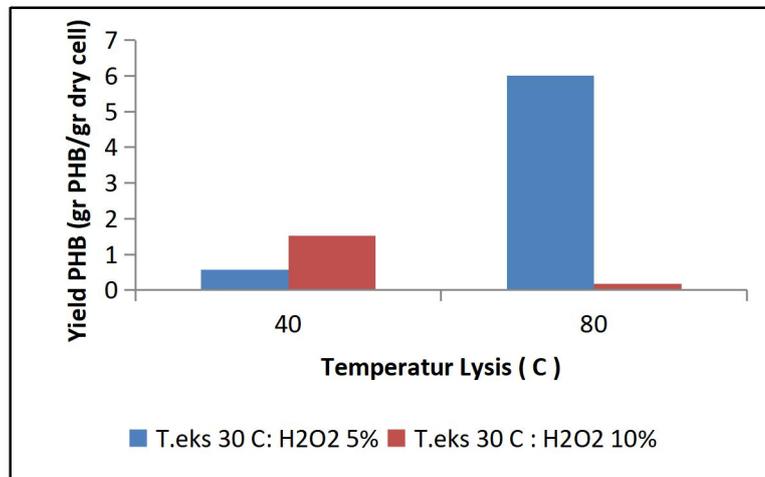
Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi H₂O₂ dengan yield PHB yang dihasilkan pada (a) T. lysis 40 °C :T.ekstraksi 30 °C dan 50 °C, (b) T. lysis 80 °C:T.ekstraksi 30 °C dan 50 °C

Pada proses lysis dinding sel bakteri, H₂O₂ sebagai *digester* mendifusi kedalam sel bakteri, kemudian terdekomposisi menjadi air dan radikal bebas O₂. Radikal bebas dalam bentuk O₂ inilah yang menyerang dinding sel bakteri, kemudian granula PHB dapat terlepas dan melarut kedalam fase *chloroform*. Tinggi rendahnya konsentrasi H₂O₂ menentukan besar kecilnya radikal bebas O₂ yang

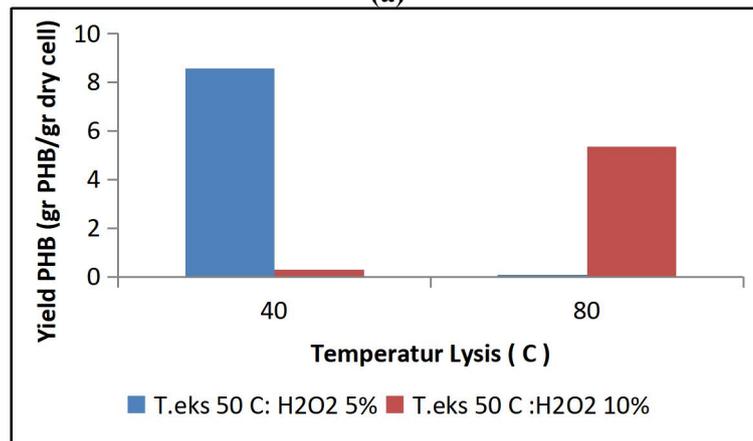
terbentuk, yang dapat merusak dinding sel, sehingga dapat menentukan banyaknya granula PHB yang terlepas kedalam fase *chloroform*.

4.2 Pengaruh Temperatur Lysis Terhadap Yield PHB

Kondisi lain yang divariasikan dalam sistem purifikasi PHB adalah temperatur *lysis*. Pengaruh temperatur *lysis* terhadap *yield* PHB yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4 berikut ini:



(a)



(b)

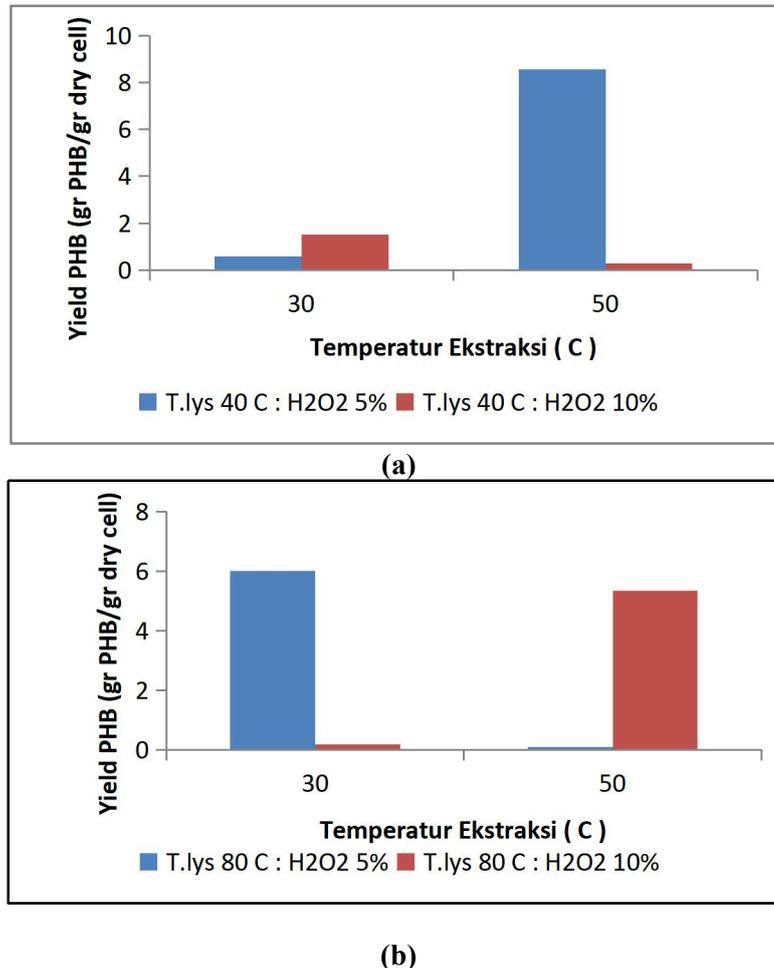
Gambar 4. Hubungan antara temperatur lysis dengan yield PHB yang dihasilkan pada, (a) T.ekstraksi 30 °C : H₂O₂ 5% dan 10%, (b) T.ekstraksi 50°C : H₂O₂ 5% dan 10%

Temperatur *lysis* dalam sistem purifikasi PHB juga memiliki pengaruh terhadap *yield* PHB yang diperoleh. Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa adanya temperatur *lysis* yang berbeda menghasilkan nilai *yield* PHB yang berbeda pula. Yield PHB terbesar diperoleh pada saat kondisi temperatur *lysis* 40 °C pada temperatur ekstraksi 50 °C dan konsentrasi H₂O₂ 5%. Pada kondisi purifikasi yang berbeda, temperatur *lysis* 40 °C menghasilkan *yield* PHB yang lebih kecil dibandingkan dengan temperatur *lysis* 80 °C, seperti terlihat pada Gambar 4 (a) pada temperatur ekstraksi 30 °C dan konsentrasi H₂O₂ 5% dan Gambar 4 (b) pada temperatur ekstraksi 50 °C dan konsentrasi H₂O₂ 10%.

Tinggi rendahnya temperatur *lysis* mempengaruhi kecepatan terjadinya proses *lysis* oleh H₂O₂. Temperatur *lysis* 80 °C menghasilkan *yield* PHB yang besar pada kondisi temperatur ekstraksi 30 °C dan H₂O₂ 5%, serta temperatur ekstraksi 50°C dan H₂O₂ 10%. Kondisi ini terjadi karena kecepatan proses penghancuran dinding sel seimbang dengan kecepatan melarutnya PHB dalam *chloroform*. Temperatur *lysis* yang menghasilkan *yield* PHB yang kecil terjadi karena ketidakseimbangan proses penghancuran dinding sel dengan kecepatan melarutnya PHB dalam *chloroform*, sehingga H₂O₂ tidak hanya menyerang dinding sel, tetapi juga menyerang granula PHB yang belum sempat melarut ke dalam fase *chloroform*.

4.3 Pengaruh Temperatur Ekstraksi Terhadap *Yield* PHB

Berdasarkan penelitian dengan variasi temperatur ekstraksi pada sistem purifikasi, diperoleh data yang menunjukkan pengaruh temperatur ekstraksi terhadap *yield* PHB dan ditunjukkan pada Gambar 5 berikut:



Gambar 5. Hubungan antara temperatur ekstraksi dengan *yield* PHB yang dihasilkan pada, (a) *T.lysis* 40 °C: H₂O₂ 5% dan 10% (b) *T.lysis* 80 °C: H₂O₂ 5% dan 10%.

Berdasarkan Gambar 5, *yield* PHB terbesar diperoleh pada saat kondisi temperatur ekstraksi 50 °C, pada temperatur *lysis* 40 °C dan konsentrasi H₂O₂ 5%. Temperatur ekstraksi 50 °C, juga menghasilkan *yield* yang besar pada kondisi temperatur *lysis* 80 °C dan konsentrasi H₂O₂ 10%. Tidak semua temperatur ekstraksi 50 °C menghasilkan *yield* PHB yang besar. Temperatur ekstraksi 50 °C justru menghasilkan *yield* PHB yang lebih kecil dibandingkan dengan *yield* PHB yang dihasilkan pada temperatur ekstraksi 30 °C, seperti terlihat pada Gambar 5 (a) pada temperatur *lysis* 40 °C dan konsentrasi H₂O₂ 10% dan Gambar 5 (b) pada temperatur *lysis* 80 °C dan konsentrasi H₂O₂ 5%. Data-data tersebut menunjukkan bahwa tinggi rendahnya temperatur ekstraksi juga tidak dapat menentukan perolehan *yield* PHB.

Berdasarkan analisa dari data-data yang diperoleh, disimpulkan bahwa *yield* PHB tidak dapat ditentukan hanya dari masing-masing individu variabel (konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis*, dan temperatur ekstraksi). Hal tersebut dikarenakan dalam sistem purifikasi PHB, variabel-variabel yang digunakan memiliki pengaruh yang cukup besar dalam menghasilkan *yield* PHB, tetapi variabel-variabel tersebut tidak dapat dipisahkan satu sama lain, sehingga tidak dapat ditentukan variabel mana yang lebih berpengaruh terhadap perolehan *yield* PHB (gr PHB/gr *dry cell*).

4.4 Metode ANOVA (*Analysis of Variance*) Untuk Konsentrasi H₂O₂, Temperatur *Lysis* dan Temperatur Ekstraksi

Untuk memperkirakan seberapa signifikan pengaruh variabel proses (konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis* dan temperatur ekstraksi) terhadap perolehan PHB, eksperimen dilakukan dalam *two-factor factorial design* (Montgomery, 2001) seperti tergambar dalam Tabel 4. berikut ini:

Tabel 4. ANOVA untuk konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis*, dan temperatur ekstraksi

<i>Source of variation</i>	<i>Sum of Square</i>	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>Mean Square</i>	F _o	KET
Konsentrasi H ₂ O ₂ (A)	1.902	1	1.902	0.094	tidak signifikan
Temperatur <i>Lysis</i> (B)	23.583	1	23.583	1.168	tidak signifikan
Temperatur Ekstraksi (C)	50.859	1	50.859	2.518	tidak signifikan
AB	56.955	1	56.955	2.820	tidak signifikan
AC	30.572	1	30.572	1.514	tidak signifikan
BC	2.643	1	2.643	0.131	tidak signifikan
ABC	191.514	1	191.514	9.482	Signifikan
Error	161.573	8	20.197		
Total	519.601	15			

Berdasarkan Montgomery tahun 2001, nilai F_{0,05,1,8} adalah 5.32. Ketika ditinjau berdasarkan masing-masing variabel yang berpengaruh, baik itu konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis* maupun temperatur ekstraksi, terlihat bahwa nilai F_o lebih kecil dibandingkan nilai F_{0,05,1,8}. Hal tersebut berarti bahwa dalam *confidence interval* 95%, variabel-variabel tersebut tidak signifikan dalam mempengaruhi *yield* PHB yang diperoleh. Sama halnya ketika variabel-variabel tersebut ditinjau berdasarkan interaksi antara dua variabel (konsentrasi H₂O₂ dengan temperatur *lysis*, konsentrasi H₂O₂ dengan temperatur ekstraksi, maupun temperatur *lysis* dengan temperatur ekstraksi), terlihat bahwa interaksi tersebut tidak signifikan dalam mempengaruhi *yield* PHB. Namun ketika seluruh variabel ditinjau berdasarkan interaksi antara ketiga variabel yang berpengaruh (konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis*, dan temperatur ekstraksi), nilai F_o lebih besar dari nilai F_{0,05,1,8}, yang berarti bahwa interaksi ketiga variabel tersebut signifikan.

Dengan kata lain, *yield* PHB (gr PHB/gr *dry cell*) tidak dipengaruhi secara signifikan oleh masing-masing individu variabel konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis*, maupun temperatur ekstraksi. *Yield* PHB juga tidak dipengaruhi secara signifikan oleh interaksi dua variabel, melainkan dipengaruhi oleh interaksi dari ketiga variabel.

5. SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi *lysis* dan ekstraksi yang tepat sangat diperlukan untuk memperoleh *yield* PHB yang maksimal dalam sistem purifikasi PHB. *Yield* PHB (gr PHB/gr *dry cell*) tidak dipengaruhi secara signifikan oleh masing-masing variabel konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis* dan temperatur ekstraksi, tetapi dipengaruhi secara signifikan oleh interaksi ketiga variabel tersebut. *Yield* PHB terbesar diperoleh pada kondisi konsentrasi H₂O₂ 5%, temperatur *lysis* 40 °C, dan temperatur ekstraksi 50 °C.

Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan dengan variasi konsentrasi H₂O₂, temperatur *lysis* dan temperatur ekstraksi yang lebih banyak untuk mendapatkan kondisi optimal dalam sistem purifikasi PHB.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A.J dan Dawes, E.A.. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54. 450-472
- Bernat, K., Wojnowska_Baryla, I., dan Dobrzyńska, A.. 2008. Denitrification with Endogenous Carbon Source at Low C/N and It/s Effect on P(3HB) accumulation. *Bioresource Technology* 99. 2410-2418. Elsevier Ltd.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., dan Genser, K.F.. 1998. Polyhydroxyalkanoates, Biopolymers from Renewable Resources: Physiological and Engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65.127-161
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., dan Chang, H. N.. 1995. Recovery and Characterization of Poly- β -Hydroxybutyrate Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. & Environ. Microbiol.* 61 (1). 34 – 39.
- Lee, S.Y.. 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49. 1-14
- Montgomery, D.C.. 2001. Design and Analysis of Experiments. 5thed., pp 170-210. John Wiley and Sons. Inc.. New York.
- Asa, P.. 2006. *Perbandingan Metode Dispersi NaOCl-Kloroform dan Metode Dispersi H₂O₂-Kloroform dengan Efek Heat shock pada Purifikasi PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) dalam Proses Pembuatan Biodegradable Plastic*. Laporan Penelitian. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Patwardhan, P., dan Srivastava, a.K.. 2008. Fed-Batch Cultivation of *Wautersia eutropha*. *Bioresource Technology* 99. 1787-1792. Elsevier Ltd
- Patwardhan, P.R., dan Srivastava, A.K.. 2004. Model-Based Fed Batch Cultivation of *R. eutropha* for Enhanced Biopolymer Production. *Biochemical Engineering Journal*. 20. 21-28. Elsevier B.V.
- Ramsay, B.A., Iomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., dan Ramsay, J.A.. 1990. Production of Poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) Acids. *Appl. & Environ. Microbiol.* 56 (7). 2093-2098