

JURNAL

PRODUKSI PENISILIN OLEH *Penicillium chrysogenum* DENGAN PENAMBAHAN FENILALANIN

Disusun Oleh:

Vania Aprilina Tanuwijaya

NPM: 100801164



UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2015

PRODUKSI PENISILIN OLEH *Penicillium chrysogenum* DENGAN PENAMBAHAN FENILALANIN

Penicillin Production by *Penicillium chrysogenum* with Addition of Phenylalanine

Vania Aprilina Tanuwijaya¹, B. Boy Rahardjo Siharta², Sinung Pranata³
Program Studi Teknobiologi Industri, Fakultas Teknobiologi
Universitas Atma Jaya Yogyakarta
vania.aprilina@gmail.com

Abstrak

Penggunaan fenilalanin adalah sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan *Penicillium chrysogenum*. Produksi penisilin memerlukan sumber karbon, yang dalam penelitian ini menggunakan sukrosa dari molase. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kadar penambahan fenilalanin yang optimum dalam menghasilkan penisilin oleh *Penicillium chrysogenum*, sehingga dapat menghasilkan penisilin yang dapat menghambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pengambilan sampel air lindi, pengambilan molase, uji kemurnian, pembuatan starter, pembuatan medium produksi, pengukuran berat kering, pengukuran pH, pengukuran kadar N total, penentuan kadar gula reduksi, dan uji aktivitas bakteri berdasarkan zona hambat. Medium produksi dibuat dengan menambahkan fenilalanin dengan kadar 0,2; 0,4; dan 0,6 gram. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan variasi kadar fenilalanin. Analisis Data menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95%, bila ada beda nyata dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil dari penelitian ini diketahui bahwa fenilalanin dapat digunakan sebagai sumber nitrogen untuk proses pertumbuhan *Penicillium chrysogenum*, tetapi menghambat proses pembentukan penisilin. Hasil produksi penisilin dari penelitian ini tidak mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* pada tahap uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan zona hambat.

Kata kunci : Penisilin, *Penicillium chrysogenum*, Fenilalanin, asam amino

Abstract

Phenylalanine use is for nitrogen source for growth of *Penicillium chrysogenum*. Penicillin production needs carbon source, in this research use sucrose from molasses. The purpose of this research is to know amount of optimum phenylalanine to produce penicillin from *Penicillium chrysogenum*, that can produce penicillin to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This research have several step that is take sampel of leachate, take sampel of molasses, purity test of bacteria, starter, production medium, biomass measurement, pH measurement, concentration of nitrogen, concentration of reducing sugar, and bacteria activity. Medium is made with adding phenylalanine 0.2; 0.4; and 0.6 gram. Experimental design use completely randomized design factorial with variation of phenylalanine. Analysis data use ANAVA with confidence level 95%, if there is significant difference continued by *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). The result of this research is phenylalanine can be used as nitrogen source for growth of *Penicillium chrysogenum*, but phenylalanine can inhibit process of penicillin production. Result of production penicillin by this study is not able to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in the test phase of antibacterial activity by using the inhibition zone.

Key words : Penicillin, *Penicillium chrysogenum*, Phenylalanine, Amino acid

Pendahuluan

Antibiotik didefinisikan sebagai suatu senyawa biologi pada konsentrasi yang sedikit dapat menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme (Prescott dan Dunn, 1959). Daya hambat penisilin berupa penghambat pertumbuhan (bakteriostatik) dan aksi mematikan (efek bakteriosidal) yang menghasilkan penurunan bakteri pada perhitungan langsung (Schlegel, 1986).

Penisilin diproduksi oleh galur *Penicillium notatum* atau *Penicillium chrysogenum* yang diinokulasikan pada medium dengan nutrisi yang sesuai. Fermentasi pada fase inisiasi melibatkan pertumbuhan dari jamur. Ketika pertumbuhan pada fase stationer terjadilah produksi penisilin. Laju produksi antibiotik merupakan hasil dari sintesis selama proses fermentasi (Demain, 1959).

Pemilihan medium yang murah dan berkualitas bagi industri antibiotik sangat penting. Penggunaan molase dan air lindi dapat menjadi alternatif digunakan sebagai medium untuk pertumbuhan *Penicillium chrysogenum*. Air lindi dapat digunakan sebagai sumber nitrogen (Laksmi dan Rahayu, 1995) dan molase dapat digunakan sebagai sumber karbon karena mengandung konsentrasi karbohidrat sebesar 45-60% (Faraooq dkk., 2012).

Proses utama fermentasi dipengaruhi oleh suhu, pH dan konsentrasi nutrisi (sumber karbon, sumber nitrogen, termasuk oksigen (Gaden, 2000). *Penicillium chrysogenum* dapat menggunakan fenilalanin sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhannya dan fenilalanin mampu memproduksi fenil asetat yang merupakan prekursor penisilin G (Veiga dkk., 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar fenilalanin yang optimum dalam menghasilkan penisilin oleh *Penicillium chrysogenum* dan mengetahui aktivitas penisilin oleh *Penicillium chrysogenum* yang diberi tambahan fenilalanin terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Metode Penelitian

Bahan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Teknobia-Industri dan Laboratorium Teknobia-Pangan Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan April 2014 sampai Agustus 2014.

Mikroorganisme yang digunakan adalah *Penicillium chrysogenum*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. Bahan yang digunakan air lindi, molase, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), medium nitrat cair, medium *Bromo Cresol Purple Milk* (BPCM), medium kasein cair, aquades, asam sulfanilat, *Naphthyl Ethylendiamin* (NED), laktofenol, reagen Nelson, reagen Arsenomolibnat, reagen Ehrlich, larutan iodine, indikator PP, indikator *Methyl Red* (MR), eter, larutan H₂SO₄ pekat, larutan HCL 0,1 N, kepingan keramik porselin, cat nigrosin, cat Gram A, B, C, dan D, glukosa, sukrosa, laktosa, gula anhidrat, larutan buffer pH 7 dan 9, spiritus, dan larutan alkohol 80%.

Tahapan penelitian

1. Pengambilan Sampel Air Lindi (Saputra, 2012)

Titik pengambilan sampel air lindi adalah di bagian *inlet* kolam (saluran masuk kolam pertama) karena pada bagian ini, proses utama yang terjadi adalah proses interaksi biologis antara ganggang dengan mikroorganisme lainnya. Sampel air lindi diambil dengan menggunakan jerigen 5 liter. Jerigen dibersihkan bagian dalamnya sebanyak tiga kali menggunakan air lindi yang akan diambil sebagai sampel. Setelah itu, air lindi diambil menggunakan jerigen tersebut bagian *inlet* atau saluran masuk air lindi pada kolam. Setelah penuh, jerigen ditutup rapat dan dibawa dengan hati-hati ke laboratorium.

2. Pengambilan Sampel Molase (Saputra, 2012)

Sampel molase diambil dari Pabrik Gula Madukismo dengan menggunakan jerigen 5 liter. Jerigen dibersihkan bagian dalamnya sebanyak tiga kali menggunakan molase yang akan diambil sebagai sampel. Setelah itu,

molase diambil menggunakan jerigen tersebut. Setelah penuh, jerigen ditutup rapat dan dibawa dengan hati-hati ke laboratorium.

3. Pembuatan Medium untuk Perbanyak Mikroorganisme (Jutono dkk., 1973)

a. Medium PDA

Sebanyak 3,9 gram PDA dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian diaduk menggunakan gelas pengaduk, sambil dipanaskan hingga larut. Bahan yang telah homogen kemudian bisa dibagi ke dalam tabung reaksi sebanyak 5-10 ml (ketika untuk perbanyak jamur), lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit.

b. Medium *Nutrient Agar*

Sebanyak 2,8 gram NA dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan hingga larut. Bahan yang telah homogen kemudian bisa dibagi ke dalam tabung reaksi sebanyak 5-10 ml (ketika untuk perbanyak bakteri), lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit

c. Medium *Nutrient Broth*

Sebanyak 1,3 gram *Nutrient Broth* dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan hingga larut. Bahan yang telah homogen kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit.

4. Uji Kemurnian *Penicillium chrysogenum* (Jutono dkk., 1973)

a. Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi *Penicillium chrysogenum* dilakukan dengan cara pengecatan menggunakan larutan laktofenol. Pertama-tama, gelas benda dan gelas penutup dibersihkan menggunakan alkohol, kemudian difiksasi. Larutan laktofenol diteteskan sebanyak 1-2 tetes di atas gelas benda, kemudian miselium biakan murni jamur *Penicillium chrysogenum* diambil sedikit dengan jarum ose secara steril dan diletakkan di atas gelas benda yang telah ditetesi dengan larutan laktofenol. Setelah itu, miselium jamur tersebut diratakan menggunakan jarum ose agar terpisah satu sama

lain, kemudian ditutup menggunakan gelas penutup. Preparat tersebut diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan kamera.

b. Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi koloni *Penicillium chrysogenum* dilakukan dengan menggunakan metode *spread plate*. Pertama-tama, suspensi spora *Penicillium chrysogenum* dibuat dengan cara menambahkan aquades steril sebanyak 9 ml ke medium PDA miring yang telah diinokulasi dengan *Penicillium chrysogenum*, kemudian digojog sebanyak beberapa kali agar tercampur rata. Setelah itu, sebanyak 0,1 ml suspensi spora tersebut diambil dan diinokulasikan pada permukaan medium agar pada petridish, kemudian diratakan dengan menggunakan trigalski. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (27 °C) selama 2-4 hari hingga terjadi sporulasi. Morfologi koloni *Penicillium chrysogenum* yang terbentuk selanjutnya diamati dan dibandingkan dengan dasar teori Fardiaz (1992) dengan beberapa parameter, seperti bentuk, ukuran, warna, dan permukaan koloni.

5. Uji Kemurnian Mikroorganisme Uji (Jutono dkk., 1973)

a. Pengamatan Morfologi Koloni

Mikroorganisme uji diambil sebanyak satu ose, kemudian diinokulasikan secara goresan pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan pengamatan morfologi koloni mikroorganisme uji yang meliputi bentuk, permukaan koloni, dan warna koloni.

b. Pengamatan Morfologi Sel

Mikroorganisme uji diambil sebanyak satu ose, kemudian diinokulasikan secara goresan pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Setelah itu, morfologi sel mikroorganisme uji diamati dengan menggunakan pengecatan negatif, yaitu dengan cara gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol, selanjutnya mikroorganisme uji diambil secara aseptis sebanyak 1 ose dan diletakkan

di atas gelas benda. Cat nigrosin diambil dan diteteskan pada salah satu ujung gelas benda, kemudian dengan gelas benda yang lain ditarik permukaannya dari ujung satu ke ujung lain hingga cat menjadi rata, sehingga menjadi lapisan tipis. Selanjutnya, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 dan dilakukan pengambilan menggunakan kamera.

c. Pengecatan Gram

Pengecatan Gram dilakukan untuk mengetahui sifat Gram mikrobia uji. Pertama-tama, gelas benda dibersihkan dengan alkohol dan dipanaskan dengan lampu spritus sampai kering. Setelah itu, satu lup suspensi bakteri diambil dengan ose secara aseptis selanjutnya diratakan seluas ± 1 cm dan dikeringkan menggunakan *hair dryer*. Selanjutnya, 2-3 tetes cat Gram A diteteskan pada permukaan lapisan bakteri dan didiamkan selama 1 menit. Hasil pengecatan Gram A di cuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Setelah kering, cat Gram B diteteskan dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan *hair dryer*, selanjutnya dicuci dengan cat Gram C, didiamkan selama 30 detik dan dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Selanjutnya, ditetesi dengan cat Gram D sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 2 menit, kemudian dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Hasil diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100, kemudian dilakukan pengambilan gambar menggunakan kamera. Jika sel berwarna biru, berarti bakteri bersifat Gram positif dan jika berwarna merah, berarti bersifat Gram negatif. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

d. Uji Motilitas

Biakan mikroorganisme uji diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan secara tusukan ke dalam medium NA tegak, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Setelah itu, pertumbuhan bakteri tersebut diamati. Jika pertumbuhannya menyebar, berarti bakteri

tersebut bersifat motil dan sebaliknya. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

e. Uji Katalase

Biakan mikroorganisme uji diambil sebanyak satu ose dan ditetesi dengan H₂O₂ 3 % sebanyak 1-2 tetes pada gelas benda. Bila dihasilkan buih atau gelembung, maka hasilnya positif. Jika tidak dihasilkan buih atau gelembung, maka uji ini dianggap negatif. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

f. Uji Sifat Biokimia

Pada uji reduksi nitrat, masing-masing sebanyak satu ose biakan murni *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam 10 ml medium nitrat cair pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengujian adanya nitrit dilakukan dengan cara menambahkan 1 ml asam sulfanilat (SA) dan 1 ml *naphthyl ethylendiamin* (NED) dan digojog hingga terbentuk warna merah yang menunjukkan adanya nitrit. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

Pada uji peptonisasi, masing-masing sebanyak satu ose biakan murni *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Bromo Cresol Purple Milk* (BCPM) sebanyak 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah itu, diamati dan diperhatikan adanya gumpalan susu atau lapisan-lapisan terbentuk. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

Pada uji pembentukan indol, masing-masing sebanyak satu ose biakan murni *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi *Bromo Cresol Purple Milk* (BCPM) sebanyak 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji adanya pembentukan indol dilakukan dengan cara menambahkan eter ke dalam tabung, kemudian digojog dan dibiarkan hingga terbentuk lapisan. Setelah itu, secara hati-hati reagen Ehrlich ditambahkan melalui dinding tabung dan diamati ada tidaknya cincin indol yang berwarna merah ungu di bawah lapisan eter. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

Pada uji hidrolisis pati, masing-masing biakan murni *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* diinokulasikan secara goresan (*Streak Plate Method*) pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, koloni yang terbentuk pada tiap petridish ditetesi dengan larutan iodin dan warna yang terjadi di sekeliling goresan diperhatikan. Jika berwarna hitam, berarti mikroorganisme uji tidak mampu menghidrolisis pati. Pengambilan gambar menggunakan kamera.

6. Perbanyakan Kultur Murni (Jutono dkk., 1973)

Kultur murni *Penicillium chrysogenum*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* diambil sedikit menggunakan jarum ose, kemudian untuk *Penicillium chrysogenum* digoreskan di atas permukaan medium PDA miring, sedangkan untuk *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* digoreskan di atas permukaan medium NA miring secara aseptis. Setelah itu, untuk *Penicillium chrysogenum* dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama tiga hari, sedangkan untuk *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama satu hari.

7. Pembuatan Starter (Saputra, 2012)

Starter dibuat dengan cara menambahkan 5 % (v/v) atau sebanyak 2,5 ml suspensi spora *Penicillium chrysogenum* ke dalam 50 ml medium produksi, kemudian diinkubasi di dalam *shaker incubator* pada suhu 30 °C selama 24 jam. Suspensi spora dibuat dengan cara menambahkan aquades steril sebanyak 9 ml ke dalam medium PDA miring yang telah diinokulasi dengan *Penicillium chrysogenum*, kemudian digojog menggunakan *vortex* agar tercampur rata.

8. Pembuatan Medium Produksi (Saputra, 2012 dengan modifikasi)

Medium produksi dibuat berdasarkan rancangan percobaan yang ada. Medium produksi dibuat sebanyak 100 ml, yaitu dengan cara mencampurkan 45 ml air lindi dengan 6 ml molase, kemudian campuran tersebut ditambah dengan aquades hingga mencapai volume 100 ml, sehingga didapatkan variasi kadar molase sebesar 6 %. Setelah itu, dilakukan pengaturan pH

medium menjadi 6,5 dengan cara menambahkan larutan HCL 0,1 N atau NaOH 0,1 N pada medium. Medium tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan besar 1 atm selama 15 menit, lalu didinginkan pada suhu kamar (sekitar 27 °C).

9. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Penicillium chrysogenum* (Jutono dkk., 1973)

Sebanyak 10 % (v/v) atau 10 ml starter ditambahkan ke dalam 100 ml medium produksi dengan kadar molase sebesar 6 %, kemudian diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada suhu 30 °C selama 14 hari. Pembuatan kurva pertumbuhan *Penicillium chrysogenum* dilakukan dengan menggunakan parameter biomassa sel yang diukur setiap dua hari sekali menggunakan metode pengukuran berat kering sel dan juga parameter pH.

10. Proses Produksi Penisilin dengan *Penicillium chrysogenum* (Saputra, 2012 dengan modifikasi)

Sebanyak 10 % (v/v) atau 10 ml starter ditambahkan ke dalam medium 100 ml produksi yang sesuai dengan ketentuan pada masing-masing tahapan penelitian, kemudian diinkubasi menggunakan *shaking incubator* pada suhu 30 °C. Pada penelitian, inkubasi dilakukan selama 10 hari. Pengujian sampel dilakukan dengan menggunakan parameter biomassa sel, gula reduksi, kadar N total, pH, dan aktivitas zona hambat penisilin. Pada penelitian ini digunakan kontrol negatif, yaitu beurpa medium produksi yang tidak mengalami perlakuan penambahan inokulum *Penicillium chrysogenum*.

11. Pengukuran Biomassa *Penicillium chrysogenum* (Jutono dkk., 1973)

Biomassa diukur setiap 2 hari sekali selama masa inkubasi pada masing-masing tahap penelitian. Pertama-tama, kertas saring yang telah dikeringkan pada suhu 80 °C selama 24 jam ditimbang. Setelah itu, sampel diambil sebanyak 10 ml, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Setelah disaring, kertas saring dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80 °C selama 24 jam. Selanjutnya, kertas saring yang berisi sel kering ditimbang. Berat kering sel (mg/ml) diperoleh dari berat kertas saring akhir (kertas saring dan sel kering) dikurangi dengan berat kertas saring awal.

12. Pembuatan Kurva Glukosa Standard dan Penentuan Gula Reduksi Sampel dengan Metode Nelson-Somogyi (Sudarmadji dkk., 1989)

a. Penentuan Kurva Glukosa Standar

Larutan glukosa stok (0,1 mg/ml) dibuat dengan cara melarutkan 10 mg glukosa anhidrat ke dalam 100 ml aquades. Setelah itu, larutan tersebut diencerkan hingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, dan 0,1 mg/ml. Tabung reaksi dipersiapkan dan kedalamnya diisi masing-masing dengan 1 ml larutan glukosa standar tersebut. Satu tabung diisi dengan 1 ml aquades steril dengan blanko. Setelah itu, pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan reagen Nelson sebanyak 1 ml dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan hingga suhu tabung mencapai kurang lebih 25 °C atau mendekati suhu ruang, lalu ditambah dengan aquades steril sebanyak 7 ml dan digojog menggunakan *vortex* hingga homogen. *Optical Density* larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda=540$ nm. Nilai faktor pengenceran dan OD yang didapat digunakan untuk menentukan nilai koefisien regresi linier pada persamaan $Y = a + bX$, dengan rumus:

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{(\sum y) - b(\sum x)}{n}$$

Keterangan:

Y = Nilai OD terukur (nm)

X = Konsentrasi gula reduksi mg/ml)

y = Nilai OD

x = Faktor Pengenceran

a dan b = Koefisien yang dicari

b. Penentuan Gula Reduksi Sampel (Sudarmadji dkk., 1989)

Penentuan gula reduksi sampel dilakukan pada awal dan akhir proses produksi, sesuai dengan masa inkubasi pada masing-masing tahap penelitian. Larutan sampel diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam

tabung reaksi. Setelah itu, sebanyak 1 ml reagen Nelson ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan di dalam penangas air selama 20 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin, pada tabung reaksi tersebut ditambahkan 1 ml reagen Arsenomolibdat, kemudian digojog hingga semua endapan Cu_2O larut. Setelah endapan larut, sebanyak 7 ml aquades steril ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan digojog hingga homogen. *Optical Density* (OD) larutan tersebut diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 540$ nm. Kadar gula reduksi (mg/ml) sampel kemudian ditentukan berdasarkan OD larutan sampel dengan persamaan regresi linier kurva larutan glukosa standar. Selisih kadar gula reduksi diperoleh dari nilai kadar gula reduksi awal inkubasi dikurangi dengan nilai kadar gula reduksi akhir inkubasi pada masing-masing sampel.

13. Penentuan Kadar N Total dengan Metode Kjeldahl (Sudarmadji dkk., 1989)

Penentuan kadar N total dilakukan pada medium produksi, yaitu pada awal dan akhir proses produksi, sesuai dengan masa inkubasi pada masing-masing tahap penelitian. Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl dan ditambah dengan 2 g katalisator N ($\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$). Setelah itu, sebanyak 15 ml H_2SO_4 pekat ditambahkan ke dalam sampel dan corong diletakkan di atas labu Kjeldahl, kemudian didestruksi di dalam almari asam hingga sampel berubah menjadi bening. Setelah sampel menjadi bening dan dingin, sampel dimasukkan ke dalam labu destilasi, kemudian ditambah dengan 10 ml aquades dan 5 tetes indikator PP, kemudian digojog hingga homogen. NaOH pelet yang telah dingin dimasukkan secara perlahan-lahan hingga larutan menjadi basa (pH=8-9). Keramik porselin sebanyak 5 potong kecil dimasukkan ke dalam labu destilasi (berfungsi sebagai peredam panas). Hasil dari proses destilasi ditampung ke dalam gelas beker yang telah diisi dengan 10 ml larutan HCL 0,1 N dan 5 tetes indikator MR (*Methyl Red*). Proses destilasi dilakukan hingga gelas beker terisi uap air.

Uap air tersebut dititrasasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga berwarna kuning, kemudian dihitung % Nitrogen sampel dengan rumus:

$$\%N = \frac{(V \text{ NaOH blanko} - V \text{ NaOH sampel})}{V \text{ sampel}} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

Keterangan:

%N = Kadar N total sampel

V NaOH blanko = Volume NaOH yang digunakan untuk titrasi blanko

V NaOH sampel = Volume NaOH yang digunakan untuk titrasi sampel

V sampel = Volume sampel yang digunakan untuk titrasi

N NaOH = Normalitas NaOH

Selisih dari nilai kadar nitrogen total diperoleh dari nilai kadar nitrogen yang diukur pada awal inkubasi dikurangi nilai kadar nitrogen yang diukur pada akhir inkubasi pada masing-masing sampel.

14. Pengukuran pH Sampel (Saputra, 2012)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah distandarisasi menggunakan larutan buffer standar dengan pH 6 dan 7. Alat pH meter dihidupkan dan dibiarkan selama beberapa menit sebelum dipakai. Elektroda pH meter dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tissue. Setelah itu, elektroda pH meter dicelupkan ke dalam larutan sampel hingga menunjukkan nilai yang stabil. Pengukuran pH sampel tersebut pada masa inkubasi hari ke-0 (awal) dan ketika panen (akhir).

15. Uji Aktivitas Penisilin berdasarkan Zona Hambat (Worang, 2001)

a. Pemisahan Biomassa dan Supernatan yang Mengandung Penisilin

Pemisahan biomassa dilakukan dengan penyaringan menggunakan kertas saring dengan diameter 10 cm. Setelah itu, filtrat yang dihasilkan diendapkan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dari tiap perlakuan disimpan secara steril di dalam tabung reaksi dengan tutup berulir. Supernatan tersebut dipergunakan kembali sebagai bahan pada pengujian penisilin yang diproduksi.

b. Pembuatan Biakan Mikroorganisme Uji dengan Metode *Spread Plate*

Mikroorganisme uji, yaitu biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 1

ose secara aseptis, kemudian diinokulasi ke dalam 10 ml medium *Nutrient Broth*, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam pada *shaker incubator*. Suspensi bakteri yang telah dibuat diambil sebanyak 100 µl, kemudian diteteskan di atas permukaan medium NA dalam cawan petri, dan diratakan dengan *trigalski*.

c. Pengujian Aktivitas Penisilin

Pengujian aktivitas penisilin dilakukan pada akhir proses produksi dengan menggunakan metode *Agar Diffusion Technique* menggunakan sumuran. Medium NA dalam cawan petri yang telah diinokulasi secara *spread plate* dengan mikroorganisme uji disiapkan. Setelah itu, sumuran dengan diameter 0,6 cm dibuat dengan cara menusukkan *perforator* ke dalam medium. Setelah sumuran dihasilkan, supernatan diambil sebanyak 30 µl dan dimasukkan ke dalam sumuran tersebut, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah itu, zona hambat yang terbentuk diamati dan dihitung luasnya. Aktivitas penisilin pada sampel ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekitar sumuran yang mencerminkan aktivitas penghambatan. Pengukuran luas zona hambat dihitung menggunakan rumus:

$$L = \pi \left\{ \left(\frac{d2}{2} \right)^2 - \left(\frac{d1}{2} \right)^2 \right\}$$

Keterangan:

L = Luas zona hambat penisilin

$\pi = 3,14$

d1 = Diameter sumuran

d2 = Diameter zona jernih

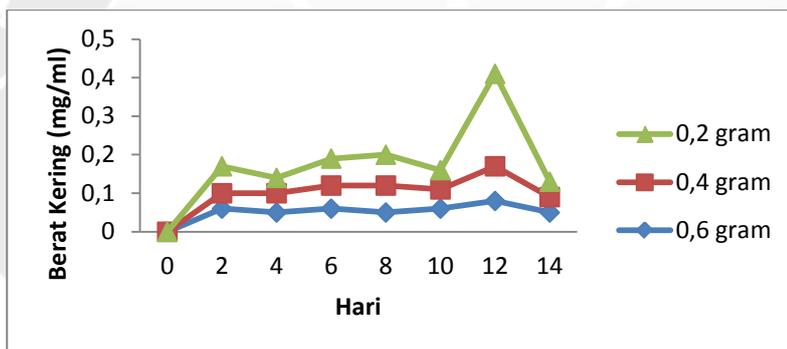
Pada pengujian zona hambat ini digunakan kontrol positif berupa larutan Penisilin V dengan konsentrasi 100 mg/ml, yang dibuat dengan cara menggerus 1 gram tablet Penisilin V hingga halus menggunakan cawan porselin, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml aquades steril. Setelah itu, campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* sebelum diteteskan ke dalam sumuran.

Hasil dan Pembahasan

A. Pola Pertumbuhan *Penicillium chrysogenum*

Pola pertumbuhan *Penicillium chrysogenum* dapat dilihat pada Gambar 1. Pola pertumbuhan *Penicillium chrysogenum* menunjukkan mengalami fase logaritmik dengan kenaikan berat kering pada hari ke-2 hingga hari ke-

4, pada hari ke-4 hingga hari ke-10 mulai terjadi pertumbuhan yang statis, dan pada hari ke-12 hingga hari ke-14 mengalami penaikan berat kering lagi. Hal ini karena terjadinya pertumbuhan *diauxic*, pertumbuhan ini mulai terjadi sekitar 120 jam setelah masa inkubasi (Aziza dan Amrane, 2012). Penurunan berat kering mulai terjadi pada hari ke-14 setelah masa inkubasi yang diperkirakan pada masa ini terjadi fase stasioner atau fase kematian.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Penicillium chrysogenum* yang ditumbuhkan pada medium dengan berbagai variasi kadar fenilalanin.

B. Pengukuran Berat Kering *Penicillium chrysogenum* pada Perlakuan Variasi Kadar Fenilalanin

Berdasarkan Tabel 1, terjadi penurunan pada perlakuan kadar 0,2 gram sebesar 0,022 mg/ml dan perlakuan kontrol sebesar 0,002 mg/ml. Peningkatan berat kering terjadi pada perlakuan kadar 0,4 gram sebesar 0,014 mg/ml dan perlakuan kadar 0,6 gram sebesar 0,002 mg/ml. Penurunan berat kering dapat disebabkan karena sumber karbon yang telah habis digunakan untuk pertumbuhan *Penicillium chrysogenum*, hal ini disebabkan karena molase mengandung sukrosa yang dapat meningkatkan pertumbuhan miselium (Hassani dkk., 2011).

Variasi Kadar Fenilalanin (gram)	Berat Kering (mg/ml)		Rerata
	Hari Ke-0	Hari Ke-10	
0,2	0,072 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a
0,4	0,038 ^a	0,052 ^a	0,05 ^a
0,6	0,056 ^a	0,058 ^a	0,06 ^a
Kontrol	0,066 ^a	0,064 ^a	0,07 ^a
	0,058 ^a	0,056 ^a	

Tabel 1. Berat Kering *Penicillium chrysogenum* (mg/ml) yang Ditumbuhkan pada Medium dengan Variasi Kadar Fenilalanin Selama 10 Hari Inkubasi

Peningkatan dan penurunan berat kering juga disebabkan oleh penambahan fenilalanin sebagai sumber nitrogen. Penambahan fenilalanin dapat meningkatkan berat kering sebanyak 2,5 kali (Veiga dkk., 2011). Ketika pertumbuhan mikroorganisme memasuki fase eksponensial, pertumbuhan akan mengalami penurunan dikarenakan kekurangan nutrient yang dibutuhkan (Geetika, 2008).

C. Pengukuran pH

Pada Tabel 2 ditunjukkan bahwa terjadi kenaikan pH pada perlakuan kadar fenilalanin 0,2 gram sebesar 0,72 dan kenaikan pada pH control sebesar 0,09.

Variasi Kadar Fenilalanin (gram)	Kondisi pH		Rerata
	Hari Ke-0	Hari Ke-10	
0,2	5,66	6,38	6,02
0,4	5,79	5,69	5,74
0,6	5,95	5,81	5,86
Kontrol	5,45	5,54	5,70
	5,71	5,94	

Tabel 2. Kondisi pH Medium pada Produksi Penisilin dengan Variasi Kadar Fenilalanin

Penggunaan nitrat sebagai sumber nitrogen akan menyebabkan dihasilkannya ion OH⁻ yang menyebabkan kenaikan pH, sedangkan dengan terakumulasinya asam-asam organik akan menyebabkan penurunan pada pH (Paramitha, 2012). Asam organik seperti asam laktat dan asam asetat dapat menghambat pertumbuhan jamur dan dapat menyebabkan penurunan pH (Kavanagh, 2011).

D. Konsentrasi Gula Reduksi Medium pada Produksi Penisilin dengan Variasi Kadar Fenilalanin

Berdasarkan Tabel 3, didapatkan konsentrasi gula reduksi paling sedikit yaitu 0,41% dan gula reduksi tertinggi pada perlakuan kadar fenilalanin 0,4 gram sebesar 0,99%.

Variasi Kadar Fenilalanin (gram)	Gula Reduksi (mg/ml)		Rerata
	Hari Ke-0	Hari Ke-10	
0,2	0,75	0,34	0,54
0,4	0,99	0,46	0,72
0,6	0,78	0,47	0,63
Kontrol	0,41	0,38	0,40
	0,73	0,41	

Tabel 3. Konsentrasi Gula Reduksi Medium pada Produksi Penisilin dengan Variasi Kadar Fenilalanin

Penurunan gula reduksi pada perlakuan kadar fenilalanin 0,4 gram sebesar 0,53 mg/ml. Hal ini sesuai dengan hasil biomassa pada Tabel 1 yang menunjukkan biomassa paling tinggi pada perlakuan kadar fenilalanin 0,4 gram. Penggunaan nutrisi secara maksimal untuk proses pertumbuhan dapat meningkatkan konsentrasi biomassa yang tinggi (Rani dkk., 2004).

Penggunaan asam amino memberikan pertumbuhan yang lebih baik dapat dimungkinkan dengan adanya penambahan karbon yang terkandung dalam asam amino (Rayati dkk., 2000). Penggunaan fenilalanin sebagai sumber nitrogen dan molase sebagai sumber karbon dapat meningkatkan hasil biomassa.

E. Kadar Nitrogen Medium pada Produksi Penisilin dengan Variasi Kadar Fenilalanin

Berdasarkan Tabel 4, penurunan kadar nitrogen paling besar terjadi pada perlakuan kadar fenilalanin 0,4 gram yaitu sebesar 10,72% dari 30,78% (awal) menjadi 20,06% (akhir).

Variasi Kadar Fenilalanin (gram)	Kadar Nitrogen (%)		Rerata
	Hari Ke-0	Hari Ke-10	
0,2	22,41	11,70	17,06
0,4	30,78	20,06	25,42
0,6	20,21	10,95	15,58
Kontrol	17,73	12,62	15,18
	22,78	13,83	

Tabel 4. Kadar Nitrogen Medium pada Produksi Penisilin dengan Variasi Kadar Fenilalanin

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ada beda nyata pada kadar nitrogen yang diukur pada hari ke-0 dan hari ke-10, hal ini menandakan bahwa waktu inkubasi memengaruhi kadar nitrogen pada medium produksi.

Penurunan kadar nitrogen menunjukkan bahwa *Penicillium chrysogenum* mampu menggunakan sumber nitrogen dengan baik. Nitrogen sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan dan biosintesis antibiotik *Penicillium chrysogenum* (Sri dkk., 2007). Kapang mampu menggunakan asam amino, amina, dan amida sebagai sumber nitrogen (Kavanagh, 2011). Hal ini juga terlihat pada Tabel 1 yang menunjukkan hasil biomassa pada perlakuan kadar fenilalanin 0,4 gram paling besar, yang berarti *Penicillium chrysogenum* mampu menggunakan fenilalanin sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhannya (Veiga dkk., 2011).

F. Pengujian Aktivitas Penisilin Hasil Produksi terhadap Bakteri Uji

Pengujian aktivitas penisilin hasil produksi terhadap bakteri uji dilakukan berdasarkan zona hambat. Namun, dari hasil penelitian tidak terbentuk zona

hambat ketika penisilin diuji pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Dari hasil ini, penisilin hasil produksi tidak cukup kuat atau tidak dihasilkannya jumlah penisilin yang cukup untuk menghambat bakteri uji.

Penicillium chrysogenum yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung fenilalanin sebagai sumber nitrogen dapat meningkatkan hasil biomassa, tetapi mengurangi hasil penisilin G (Veiga dkk., 2011). Hasil penelitian Veiga dkk (2011) membuktikan bahwa penisilin G yang dihasilkan pada medium yang mengandung fenilalanin hanya sekitar 30 mg.

Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan hipotesis awal yang seharusnya penambahan fenilalanin dapat meningkatkan hasil penisilin. Penyebab tidak terbentuknya zona hambat dimungkinkan karena pengujian aktivitas penisilin dilakukan pada akhir masa inkubasi (hari ke-10) dan dimungkin pada hari ke-10 produksi penisilin telah menurun atau berkurang. Menurut Cruger dan Crueger (1990), produksi penisilin menggunakan *Penicillium chrysogenum* berlangsung sekitar 5-6 hari.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan hasil dari penelitian sebagai berikut : Penambahan fenilalanin menghambat proses produksi penisilin, sehingga penisilin yang dihasilkan tidak mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Saran

(1) Kadar fenilalanin yang digunakan tidak meningkatkan daya hambat penisilin, dikarenakan tidak terbentuknya zona hambat pada bakteri uji yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (2) Penisilin hasil produksi tidak mampu menghambat bakteri uji yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada keluarga tercinta, sahabat serta teman-teman FTb atas bimbingan, dukungan dan bantuannya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

Daftar Pustaka

- Aziza, M dan Amrane, A. 2011. Diauxic Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on Amino Acids and Glucose. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol 20 (2) : 203-210.
- Crueger, W., dan Crueger, A. 1990. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates Inc. Sunderland. Halaman 239-240.
- Demain, A.L. 1959. The Mechanism of Penicillin Biosynthesis. In *Advances in Applied Microbiology* Volume 1 (W. W. Umbreit eds.). Academic Press. New York, London. Halaman 23-24.
- Farooq, U., Anjum, F.M., Zahoor, T., Rahman, S.U., Randhawa, M.A., Ahmed, A. dan Akram, K. 2012. Optimization of Lactic Acid Production from Cheap Raw Material: Sugarcane Molasses. *Pakistan Journal of Botany* 44(1):333-338.
- Gaden, E.L. 1959. Fermentation Process Kinetics. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology* 1(4): 413-429.
- Geetika. 2008. *Biosynthesis of Penicillin G using Phenylacetic acid as a Precursor*. SRM University, Kattankulathur. Halaman 24.
- Jutono, Soedarsono, J., Hartadi, S., Kabirun, S., Suhadi, dan Soesanto. 1973. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Halaman 182-187.
- Kavanagh, K. 2011. *Fungi: Biology and Applications*. Second Edition. A John Wiley & Sons, Ltd. UK. Halaman 11 dan 27.
- Laksmi, B.J. dan Rahayu, W.P. 1995. *Penanganan Limbah Industri Pangan*. Edisi Kedua. Kanisius. Yogyakarta. Halaman 33.
- Paramitha, A. 2012. *Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Aktivitas Anti-Candida albicans dari Aspergillus flavus UICC 360*. Naskah Skripsi S1. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UI. Depok.
- Prescott, S.C. dan Dunn, C.G. 1959. *Industrial Microbiology*. Third Edition. Mgraw-Hill Book Company, Inc. USA. Halaman 762 dan 778.
- Rani, A.S., Jetty, A., dan Ramakrishna, S.V. 2003. Kinetic Studies of Penicillin Production During Batch and Repeated Batch in Fluidized Bed Bioreactor with Agar Immobilized *P.chrysogenum* Cells. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 394-399.
- Rayati, D.J., Aryantha, I.N.P., dan Arbianto, P. 2010. Optimasi Faktor Nutrisi dalam Produksi Spora Jamur Entamopatogenik *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith pada Sistem Fermentasi Dua Tahap. *PROC. ITB* 32(3):85-91.

- Saputra, A. 2012. *Aktivitas Penisilin dari Penicillium chrysogenum pada Substrat Air Lindi dengan Variasi Kadar Molase dan Waktu Inkubasi*. Naskah Skripsi S1. Fakultas Teknobiologi UAJY. Yogyakarta.
- Schlegel, H.G. 1986. *General Microbiology*. Sixth Edition. Cambridge University Press. United Kingdom. Halaman 339.
- Sri, D.G., Udin, L.Z., Ika, G.A., dan Viena S. 2007. *Studi Biosintesis Antibakteri dan Aktivitas Antibiotik Penicillium chrysogenum pada Berbagai Fermentasi*. LIPPI. Jakarta.
- Sudarmadji, S., Haryano, dan Suhadi. 1989. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Veiga, T., Solis-Escalante, D., Romagnoli, G., Pierick, A.T., Hanemaaijer, M., Deshmukh, A., Wahl, A., Pronk, J.T., dan Daran, J.M. 2011. Resolving Phenylalanine Metabolism Sheds Light on Natural Synthesis of Penicillin G in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryotic Cell-American Society for Microbiology* 238-249.
- Worang, R.L. 2001. *Kajian Tentang Fungi Endofit Penghasil Antibiotik yang Diisolasi dari Berbagai Spesies Tumbuhan*. Program Pasca Sarjana, UGM. Yogyakarta. Halaman 19-25.