

# PRODUKSI ASAM ASETAT OLEH SEL *Acetobacter pasteurianus* INT-7 AMOBIL PADA VARIASI KONSENTRASI ETANOL

*Acetic Acid Production By Acetobacter pasteurianus* INT-7 Immobilized Cells On Various Ethanol Concentration

Sri Luwihana<sup>1</sup>, Endang S. Rahayu<sup>2</sup>, Slamet Sudarmadji<sup>2</sup> dan Kapti Rahayu<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Acetic acid fermentation by Acetobacter pasteurianus* INT-7 immobilized cells with alginate gel on various ethanol concentration was investigated. Immobilized acetic acid bacteria cells were prepared with alginate gel 3% concentration with ratio cell suspension and alginate gel 1:3 (v/v) and conditioning time 24 hours. Fermentation using 10% immobilized cells (beads), medium of fermentation is YEPE (yeast extract pepton ethanol) with three ethanol concentration 5%, 7,5% and 10% respectively. Fermentation is going on shaker incubator with condition 100 rpm, 30 ° C for 10 days. The acetic acid production, pH and cells number were monitored for every day. The immobilized cell fermentation was compared with free cells fermentation.

The yield of free cells fermentation on 5% ethanol concentration is higher (84,6%) than immobilized cells yield (64,25 %), but on 7,5% and 10% ethanol concentration the immobilized cells yield is higher (62,77% and 45,44% respectively) than free cells yield (61,23% and 2,54% respectively). So the acetic acid fermentation using immobilized cells is effective on 7,5% ethanol concentration, while fermentation using free cells is effective on 5% ethanol concentration.

**Keywords:** Asam Asetat, *Acetobacter* – Amobil, Konsentrasi Etanol

## PENDAHULUAN

Asam asetat yang dikenal pula dengan nama vinegar merupakan salah satu asam organik terpenting dalam industri. Beberapa industri yang menggunakan bahan dasar asam asetat antara lain industri kimia seperti cat, serat tekstil, plastik, dan film foto; industri farmasi seperti vitamin, hormon dan antibiotik maupun industri makanan. Pemanfaatan asam asetat untuk kesehatan secara tradisional telah lama dikenal di berbagai negara. Penggunaan asam asetat sebagai agensia pembuatan telur cuka yang berhasiat dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah telah sejak lama dikenal di Cina, sebagai obat untuk artritis, penyakit jantung dan antikanker pada organ dalam di Amerika (Evers and Mason, 2003). Sebagian besar produksi asam asetat menggunakan bahan dasar etanol, sedangkan sumber utama etanol dapat diperoleh dari fermentasi berbagai sari buah seperti apel, jeruk anggur, nenas, malt, bijian, tetes dan whey (Adam, 1997). Produksi asam asetat secara fermentasi jauh lebih aman daripada secara kimia, karena ramah lingkungan (*green technology*) tidak menghasilkan limbah kimia yang membahayakan lingkungan.

Bakteri *Acetobacter pasteurianus* INT-7 merupakan isolat lokal unggul dari nira tebu yang bersifat *acido-ethanol tolerant*, mampu tumbuh pada kadar asetat hingga 9% dan masih bertahan hidup hingga kadar etanol 15%. Isolat tersebut terbukti mampu menghasilkan asam asetat sebesar 62,7 g/L yang jauh lebih tinggi dibandingkan isolat

*A. aceti* JCM 7640 yang menghasilkan asam asetat 52,3 g/L (Soedarini, 1998). Menurut Crueger dan Crueger (1984) beberapa strain *Acetobacter pasteurianus* telah digunakan secara komersial untuk industri vinegar. Penggunaan sel amobil dalam fermentasi asetat telah lama dikenal, diawali dengan sel amobil dengan serutan kayu oleh Schutzenbach (1832) yang ternyata dapat meningkatkan produksi asam asetat (Adam, 1997).

Penggunaan polimer alami alginat sebagai bahan pengamobil ini berdasarkan pertimbangan bahwa alginat memiliki kekuatan gel yang baik, sederhana dalam pelaksanaan amobilisasi, aman untuk makanan dan viabilitas sel tidak terganggu karena tidak memerlukan panas dalam proses amobilisasi (Webb dan Dervakos, 1996). Pembuatan sel amobil menggunakan alginat 3%, perbandingan suspensi sel dengan alginat 1:3 (v/v) serta waktu *conditioning* 1 hari (Luwihana, dkk, 2003) dan langsung digunakan untuk fermentasi oleh karena manik-manik sel amobil yang disimpan 1 bulan pada 4°C mengalami penurunan jumlah sel sebesar 1 *log cycle* (Luwihana, 1998). Pengaruh penggunaan matriks alginat dalam amobilisasi sel terhadap peningkatan produksi fermentasi masih belum diketahui dengan jelas. Demikian juga penggunaan sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 amobil untuk fermentasi asam asetat belum dilakukan sehingga penelitian ini bertujuan mempelajari fermentasi asam asetat menggunakan sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 amobil pada gel alginat dengan variasi kadar etanol.

## BAHAN DAN METODA

### Bahan

Kultur murni *Acetobacter pasteurianus* INT-7 dari FNCC (Food and Nutrition Culture Collection). Na Alginat, 0,2 M CaCl<sub>2</sub>, etanol absolut, glukosa, yeast extract, pepton, agar, CaCO<sub>3</sub>, 0,1 N NaOH dan 0,2 M bufer fosfat pH 7,2.

### Metoda

#### 1. Amobilisasi sel

Pembuatan stater dilakukan dengan menginokulasikan 0,10 ml kultur stok *Acetobacter pasteurianus* INT-7 ke dalam 10 ml media PGY, kemudian diinkubasikan dalam inkubator goyang 100 rpm suhu 30 °C selama 48 jam. Stater yang diperoleh diinokulasikan ke dalam media PGY dengan volume yang lebih besar dengan kondisi inkubasi yang sama untuk menghasilkan sediaan suspensi sel dengan konsentrasi sel 10<sup>7</sup> CFU/ml. Pembuatan sel amobil menggunakan larutan alginat 3%, perbandingan suspensi sel dengan gel alginat 1:3 (v/v) dengan alat tetes seperti alat suntik berdiameter lubang keluar 1 mm, ditampung dengan larutan 0,2 M CaCl<sub>2</sub> yang dilengkapi *magnet stirrer*. Setelah campuran suspensi sel dengan gel alginat habis, pengadukan dilanjutkan 20 menit, manik-manik

<sup>1</sup> Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Wangsa Manggala, Yogyakarta 55753 Fax. (0274) 798213.

<sup>2</sup> Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada – Bulaksumur, Yogyakarta 5581. Telp. (0274) 524517 Fax. (0274) 549650.

amobil disaring dan di cuci dengan akuades steril kemudian manik-manik amobil dimasukkan ke dalam media PGY untuk *conditioning* selama 24 jam.

## 2. Fermentasi asam asetat

Sel amobil yang telah mengalami *conditioning* selama 24 jam di masukkan ke dalam media fermentasi YEPE (yeast extract pepton etanol) dengan komposisi : 1% yeast extract, 2% pepton dengan penambahan masing-masing 5%; 7,5% dan 10% etanol absolut sebagai substrat. Jumlah sel amobil yang dimasukkan sebanyak 10% dari volume media fermentasi, selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator goyang pada 30°C 100 rpm selama 10 hari. Fermentasi asam asetat ini menggunakan erlenmeyer dengan sistem *batch*. Dilakukan pengamatan pH dan jumlah sel dalam manik-manik sel amobil pada hari ke nol, dan setiap hari sampai hari ke 10. Pengamatan produksi asam asetat dan jumlah sel yang lolos ke dalam substrat dilakukan pada hari ke 1 sampai ke 10. Dilakukan juga fermentasi asam asetat menggunakan sel bebas sebagai pembanding.

## 3. Analisa

Pengamatan pH dengan pH meter, perhitungan jumlah sel dalam manik-manik sel amobil dan jumlah sel yang lolos dalam substrat dilakukan dengan metoda TPC (*Total Plate Count*) secara *pour plate* menggunakan media PGY agar yang ditambah CaCO<sub>3</sub> dan 2% etanol. Manik-manik sel amobil dihancurkan lebih dulu menggunakan larutan 0,2 M buffer fosfat pH 7,2. Pengamatan produksi asam asetat dengan cara titrasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengamatan pH

Hasil pengamatan pH selama fermentasi asam asetat menggunakan sel bebas dan sel amobil seperti pada Gambar 1.

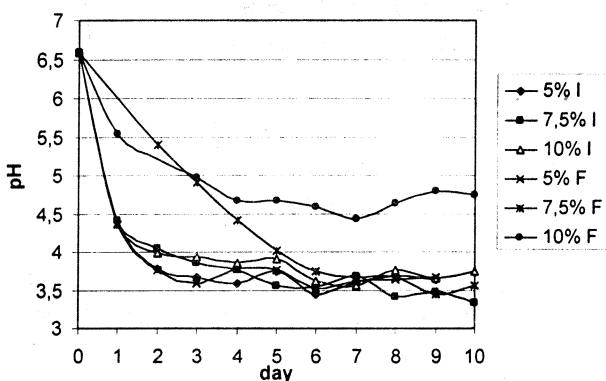


Fig. 1. pH during acetic acid fermentation using free and immobilized cells of *Acetobacter pasteurianus* INT-7 on 5%; 7,5% and 10% ethanol. (I)= immobilized cells, (F)= free cells.

Pada awal fermentasi menggunakan sel bebas dan sel amobil menunjukkan nilai pH yang sama sebesar 6,59 akan tetapi pada fermentasi hari ke-2 penggunaan sel

amobil dengan ketiga konsentrasi etanol menunjukkan penurunan pH yang tajam sampai sekitar 4, demikian juga pada sel bebas dengan konsentrasi etanol 5%. Penurunan pH ini menunjukkan adanya produksi asam asetat yang dihasilkan karena oksidasi etanol menjadi asam asetat oleh aktivitas enzim yang dihasilkan *Acetobacter pasteurianus* INT-7. Fermentasi dengan sel amobil menghasilkan asam asetat yang lebih banyak daripada fermentasi dengan sel bebas sehingga pada fermentasi dengan sel amobil terjadi penurunan pH yang lebih besar daripada fermentasi dengan sel bebas.. Penggunaan sel bebas pada konsentrasi 7,5% dan 10% etanol hanya terjadi penurunan pH sampai 4,5 – 5,5. Dengan demikian pada konsentrasi etanol yang lebih tinggi (7,5% dan 10%) sel bebas akan mengalami penurunan aktivitas karena pengaruh etanol yang bersifat toksis. Penurunan pH berhubungan erat dengan produksi asam asetat seperti pada Gambar 2.

### Produksi asam asetat

Pelaksanaan fermentasi menggunakan sistem *batch*, sehingga produksi asam asetat maupun jumlah sel naik turun, tidak berpola. Gambar 2 menunjukkan bahwa produksi asam asetat pada fermentasi hari ke 2 penggunaan sel amobil pada ketiga konsentrasi etanol ternyata lebih tinggi daripada fermentasi dengan sel bebas. Produksi asam asetat dari sel bebas dan sel amobil menunjukkan pola yang sama yaitu peningkatan yang sangat besar sampai tercapai titik optimum pada hari ke 9 kemudian menurun pada hari ke 10. Penurunan kadar asam asetat yang telah terbentuk kemungkinan adanya oksidasi senyawa ini lebih lanjut menjadi H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub> karena sifat bakteri asam asetat dapat mengoksidasi lanjut asam asetat yang dihasilkannya.

Fermentasi menggunakan sel bebas pada konsentrasi etanol 5% menghasilkan *yield* yang paling besar (84,64%) dibandingkan dengan *yield* pada konsentrasi etanol 7,5% yaitu 61,23% dan *yield* pada konsentrasi etanol 10% yaitu 2,54%.

Fermentasi dengan sel amobil pada konsentrasi etanol 7,5% menghasilkan *yield* paling besar (82,77%) dibandingkan dengan *yield* pada konsentrasi etanol 5% yaitu 69,25% dan *yield* pada konsentrasi etanol 10% yaitu 45,24%.

Pada fermentasi dengan sel bebas, etanol yang bersifat toksis akan menghambat pertumbuhan sel dan viabilitas sel, serta menyebabkan perubahan permeabilitas membran (Krisch dan Szajani, 1997), hal ini terlihat bahwa pada konsentrasi etanol 10% tidak terjadi produksi asam asetat. Pada konsentrasi etanol 10% kemungkinan sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 masih hidup karena sifat sel tersebut yang masih bertahan hidup pada konsentrasi etanol 15% (Soedarini, 1998). Penghambatan pertumbuhan sel karena etanol ini berakibat menurunnya produksi asam asetat. Pada sel amobil, gel alginat merupakan pelindung sel terhadap kontak langsung dengan etanol sehingga fermentasi dengan konsentrasi etanol 7,5 % dan 10% masih berlangsung oksidasi etanol menjadi asam asetat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan sel bebas dalam fermentasi asam asetat lebih efektif pada konsentrasi etanol 5%, sedangkan penggunaan sel amobil akan lebih efektif pada konsentrasi etanol yang lebih tinggi yaitu 7,5%. Amobilisasi terbukti memberikan perlindungan pada sel terhadap lingkungan yang bersifat toksis.

yield 5% I = 69,25%	5% F = 84,64
7,5% I = 82,77%	7,5% F = 61,23
10% I = 54,24	10% F = 2,54%

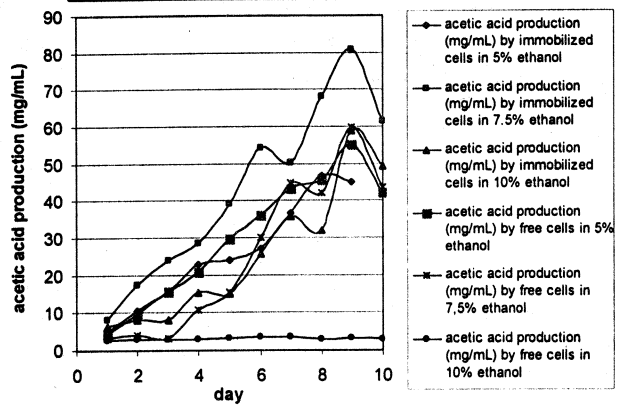


Fig. 2. Acetic acid production (mg/mL) using free and immobilized cells of *Acetobacter pasteurianus* INT-7 on 5%;7,5% and 10% ethanol.

**Jumlah sel**

Hasil pengamatan jumlah sel di dalam manik-manik sel amobil dan sel yang lolos dalam substrat seperti pada Gambar 3. Dalam keadaan amobil, sel *Acetobacter* yang obligat aerob merupakan koloni besar yang menempati lapisan dipermukaan manik-manik sel amobil setebal 150 µm (Wada, dkk., 1980 dan Osuga, dkk., 1984), tumbuh dan memperbanyak diri serta lolos dari matriksnya ke dalam substrat. Bakteri asam asetat juga menggunakan etanol sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan atau memperbanyak sel. Kadar etanol kritis untuk pertumbuhan bakteri asam asetat adalah 0,2% v/v (Crueger dan Crueger, 1989). Proses lolosnya sel dari dalam matrik pengamobil terjadi karena sel yang semakin banyak jumlahnya di dalam manik-manik sehingga tidak ada ruang dalam manik-manik lagi dan sel keluar dari manik-manik. Lolosnya sel juga disebabkan karena daya tampung gel menjerat sel terbatas. Semakin besar kerapatan sel di dalam manik-manik, maka semakin banyak pula jumlah sel yang lolos (Fumi, dkk., 1992; Mori, dkk.,1989). Dengan demikian sel akan lolos dari manik-manik amobil (*beads*).

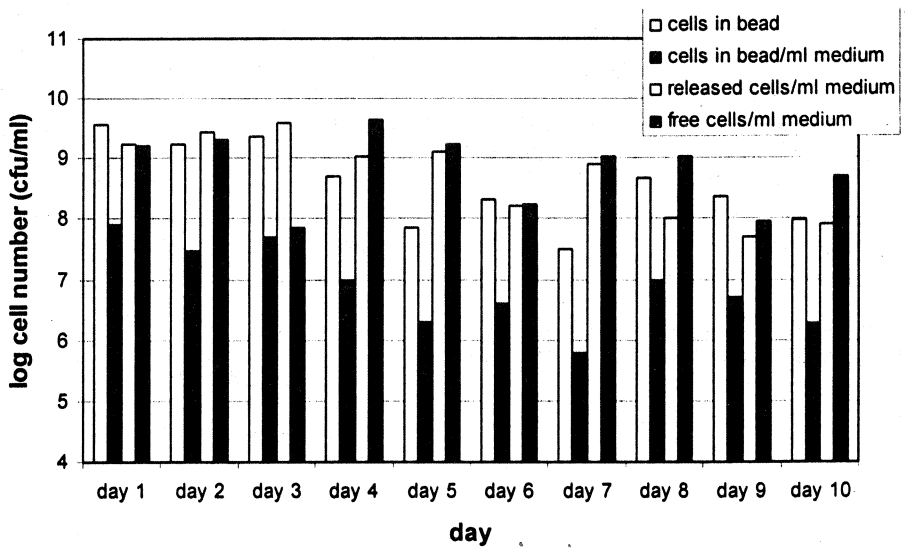


Fig. 3. The cells number (CFU/mL) during acetic acid fermentation using free and immobilized cells of *Acetobacter pasteurianus* INT-7 on 7,5% ethanol.

Suatu fenomena yang perlu mendapat perhatian adalah jumlah sel pada fermentasi hari ke 9. Meskipun jumlah sel yang lolos per mL substrat (pada fermentasi dengan sel amobil) relatif sama dengan jumlah sel bebas per mL substrat (pada fermentasi dengan sel bebas) tetapi jumlah sel dalam manik-manik per mL media jauh lebih kecil, ternyata produksi asam asetat menggunakan sel amobil jauh lebih besar. Fermentasi yang berlangsung pada konsentrasi etanol 7,5% ini menunjukkan bahwa meskipun jumlah sel yang lolos dari manik-manik amobil dan jumlah sel bebas dalam media fermentasi relatif sama jumlahnya tetapi *yield* dari fermentasi dengan sel amobil (82,77%) jauh lebih besar dari pada *yield* dengan sel bebas

(61,23%).Hal ini perlu dipelajari karena kemungkinan aktivitas enzim dalam sel amobil lebih tinggi daripada sel bebas.

**KESIMPULAN**

- 1) Sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 amobil dengan alginat lebih efektif pada konsentrasi etanol yang tinggi (7,5%) dalam fermentasi asam asetat.
- 2) Sel *Acetobacter pasteurianus* INT-7 bebas lebih efektif pada konsentrasi etanol yang rendah (5%) dalam fermentasi asam asetat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M.R. 1997. **Vinegar dalam Microbiology of Fermented Foods**. Vol. I. Edited by Brian J.B. Wood. Elsevier Applied Sciences Published. London.
- Crueger, W and Crueger, A. 1989. **Organic Acids dalam Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology**. Science Tech. Inc. Madison USA. P 134-148.
- Evers, B., and Mason, A. 2003. **Electronic Food Rap**. Vol. 6. No. 32. <http://nutrition.Berkeley.edu/extension/erf/erf6.32.html>.
- Fumi, M.D., Silvia, A., Battistotii, G. and Colagrande, O. 1992. **Living Immobilized Acetobacter in Ca-Alginate in Vinegar Production: Preliminary Study on Optimum Condition for Immobilization**. Biotechnol. Lett. July 1992 Vol. 14. No. 7: 603-608.
- Krisch, J., and Szajani, B. 1997. **Ethanol and Acetic Acid Tolerance in Free and Immobilized Cells Saccharomyces cereviceae and Acetobacter aceti**. Biotechnol. Lettr. Vol. 19. No. 6. June. 1997:525-529.
- Luwihana, S. 1998. **Studi Awal Amobilisasi Sel Bakteri Asam Asetat**. Prosiding Seminar Nasional Pangan '98. Bandung 19-21 Oktober 1998 : 350-353.
- Luwihana, S. Rahayu, E.S., Sudarmadji, S. dan Rahayu, K. 2003. **Optimasi Kondisi Amobilisasi Sel Acetobacter pasteurianus INT-7 dengan gel alginat**. Dipresentasikan pada Seminar Nasional dan Pertemuan Tahunan PATPI tgl 26-28 Juli 2003 di UGM Yogyakarta. PS17: 1380-1386.
- Mori, A., Matsumoto, N, and Imai, C., 1989. **Growth Behavior of Immobilized Acetic Acid Bacteria**. Biotechnol. Lettr. Vol. 11. No. 3:183-188.
- Nanba, A. Tamura, A. Nagai, S. 1984. **Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on Growth of Acetobacter sp.** J. Ferment. Technol. Vol. 62 (6):501-505.
- Osuga, J., Mori, A., and Kato, J. 1984. **Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter aceti Cels Entrapped in a k-Carrageenan Gel**. J. Ferment. Technol. Vol. 63 (1):57-60.
- Saeki, A., Taniguchi, M., Matsushita, K., Toyama, H, Theeragool, G., Lotong, N and Adachi, A. 1996. **Microbial Aspects of Acetat Oxidation by Acetic Acid Bacteria, Unfavorable**. From Internet.
- Soedarini. 1998. **Seleksi dan Identifikasi Bakteri Asam Asetat "Acido-Ethanol Tolerant" untuk Fermentasi Vinegar**. Thesis. Fakultas Pasca Sarjana UGM Yogyakarta.
- Wada, M., Kato, J., and Chibata, I. 1980. **Electron Microscopic Observation on Immobilized Growing Yeast Cells**. J. Ferment. Technol. Vol. 58. No. 4:327-331.
- Webb, C., and Dervakos, G.A. 1996. **Studies in Viable Cell Immobilization**. Academic Press. California.