

Kinetika Pertumbuhan dan Analisis Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy Bakteri Penghasil Pigmen *Serratia marcescens* dan *Rhodococcus* sp.

Growth Kinetics and Analysis of Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy of Pigment Producing Bacteria *Serratia marcescens* and *Rhodococcus* sp.

Endang Kusdiyantini

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275
Corresponding Author ; ekusdiyantini@gmail.com

Abstract

Serratia marcescens and *Rhodococcus* sp. are two pigment-producing bacteria that have the potential to be used in industry. Pigment production is closely related to bacterial growth. This study examined the growth and specific growth rate (u_{maks}) as well as functional group analysis using FTIR from the bacteria *S. marcescens* and *Rhodococcus* sp. isolated from the Gedong Songo hot spring, Bandungan Semarang. The results showed that the maximum growth of *S. marcescens* and *Rhodococcus* sp. of 0.044 g/L and 0.0038 g/L were achieved at the same hour, namely 48 hours of incubation time. The specific growth rate (u_{maks}) of *S. marcescens* was 0.11(1/hour) and *Rhodococcus* sp. of 0.15 (1/hour). FTIR analysis of these two bacteria showed absorption at N-H, C-H, O-H and C=O, so that the pigment compounds belonged to the alkaloid group.

Key words: u_{maks} , FTIR, *Serratia marcescens*, *Rhodococcus* sp

Abstrak

Serratia marcescens dan *Rhodococcus* sp. merupakan dua bakteri penghasil pigmen yang mempunyai potensi digunakan pada industri. Produksi pigmen sangat terkait dengan pertumbuhan bakteri. Penelitian ini mengkaji pertumbuhan dan laju pertumbuhan spesifik (u_{maks}) serta analisis gugus fungsi menggunakan FTIR dari bakteri *S. marcescens* dan *Rhodococcus* sp. hasil isolasi dari sumber air panas Gedong Songo, Bandungan Semarang. Hasil menunjukkan bahwa maksimum pertumbuhan *S. marcescens* dan *Rhodococcus* sp. sebesar 0,044 g/L dan 0,0038 g/L dicapai pada jam sama yaitu 48 jam waktu inkubasi. Laju pertumbuhan spesifik (u_{maks}) *S. marcescens* sebesar 0,11(1/jam) dan *Rhodococcus* sp. sebesar 0,15 (1/jam). Analisis FTIR kedua bakteri ini menunjukkan serapan pada N-H, C-H, O-H dan C=O, sehingga senyawa pigmen tersebut termasuk golongan alkaloid.

Kata kunci : u_{maks} , FTIR, *Serratia marcescens*, *Rhodococcus* sp

PENDAHULUAN

Pigmen merupakan senyawa penting dalam dunia industri, terutama industri pangan, kosmetik dan kesehatan. Senyawa ini dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan dan mikroba. *Serratia marcescens* dan *Rhodococcus* sp. adalah dua bakteri yang mempunyai kemampuan dalam menghasilkan pigmen. Dua bakteri ini diisolasi dari sumber air panas Gedong Songo Bandungan Semarang. Pigmen yang dihasilkan merupakan pigmen intraselular, berada didalam selnya, oleh karena itu optimum pertumbuhan sel menjadi hal yang sangat penting. Pertumbuhan bakteri dapat dibagi dalam empat fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Fase eksponensial merupakan fase pertumbuhan yang paling cepat

dan fase ini bisa diekspresikan dalam persamaan sebagai berikut:

$$u = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{(t_2 - t_1)}$$

Dimana u =laju kecepatan pertumbuhan bakteri spesifik, X_1 dan X_2 adalah konsentrasi biomasa, sedangkan t_2-t_1 adalah interval waktu yang digunakan untuk pengukuran biomasa (Muloiwa et al., 2020). Kinetika pertumbuhan menggambarkan bagaimana proses pertumbuhan mikroba selama fermentasi berlangsung dan menerangkan hubungan antara laju kecepatan pertumbuhan spesifik dengan substrat yg digunakan. Pengamatan pertumbuhan mikroba

sangat penting untuk mempelajari kinetika pertumbuhan, biomasa dan produksi metabolit. Kinetika pertumbuhan digunakan mampu menduga pembentukan produk skala industri. Banyak penelitian tentang kinetika pertumbuhan terhadap bakteri (Subathra *et al.*, 2014; Auta *et al.*, 2018).

Selama pertumbuhan berlangsung, bakteri akan menghasilkan metabolit primer dan sekunder, seperti bakteri *Serratia marcescens* dan *Rhodococcus* sp. dapat menghasilkan pigmen sebagai hasil metabolit sekunder. (Haddad *et al.*, 2017; Cappelletti *et al.*, 2020). *Serratia marcescens* merupakan bakteri Gram negatif yang menghasilkan pigmen jenis prodigiosin (Haddix and Shanks, 2018;). Bakteri ini juga mempunyai sifat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (Valentina *et al.*, 2019). Selain menghasilkan pigmen, genus *Rhodococcus* merupakan bakteri yang mampu mendegradasi senyawa organik dan resisten terhadap kondisi stres (Cappelletti *et al.*, 2020).

Identifikasi suatu senyawa yang belum diketahui jenisnya, termasuk pigmen dapat menggunakan berbagai macam cara antara lain Thin Layer Chromatography (TLC), UV-Vis Spectrophotometric, Mass Spectrometry (GS/MS). (Nadaf *et al.* 2016) Fourier Transform Infra Red (FTIR) juga bisa digunakan untuk identifikasi suatu senyawa berdasarkan bilangan gelombang senyawa murni gugus fungsionalnya. Spectroscopy merupakan alat yang penting untuk mengenali senyawa organik maupun anorganik.

Penelitian ini bertujuan untuk menghitung laju pertumbuhan spesifik (u), laju pembentukan pigmen dan menganalisis gugus fungsi pigmen yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* dan *Rhodococcus* sp. menggunakan metode FTIR. Bakteri ini hasil isolasi dari sumber air panas, Gedong Songo Bandungan Semarang.

BAHAN DAN METODE

Bahan: *Serratia marcescens* dan *Rhodococcus* sp. merupakan koleksi laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi FSM UNDIP, Nutrient Broth, metanol.

Metode

Pembuatan starter

Pembuatan starter sebagai berikut; bakteri *S. marcescens* dan *Rhodococcus* sp. diinokulasikan dengan jarum ose bulat, sebanyak 1 ose ke dalam media NB dalam volume 25 ml. Setelah itu diinkubasikan pada rotary 16 shaker selama ± 12 jam, kecepatan 80 rpm pada suhu 28°C sampai

jumlah sel 10^7 CFU/ml yang diukur dengan densitas optik mencapai 1.0 pada panjang gelombang 600 nm.

Pertumbuhan bakteri *S. marcescens* dan *Rhodococcus* sp.

Starter yang telah dipersiapkan diambil sebanyak 5% (v/v) dan dimasukkan kedalam 100 ml medium NB, dengan ulangan 3 kali. Selanjutnya diinkubasi pada rotary shaker selama 96 jam kecepatan 80 rpm pada suhu 28°C. Setiap 6 jam sekali dilakukan pengambilan sampel untuk diukur berat kering selnya.

Pengukuran Berat Kering Sel

Sampel diambil sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam ependorf kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan sel dipisahkan, kemudian sel dikeringkan menggunakan oven selama 15 jam pada suhu 80 C. Tabung berisi sel diletakkan pada desikator untuk memastikan supernatan tidak ada yang tersisa. Sel yang telah kering ditimbang sampai berat konstan. Berat kering sel diperoleh dari selisih ependorf yang berisi sel dengan ependorf kosong (Li and Mira de Ordura, 2010) dengan modifikasi metode. Laju pertumbuhan spesifik bakteri dilakukan dengan menggunakan rumus: $u = \frac{dX}{dt} \times \frac{1}{X}$, dimana u = laju pertumbuhan spesifik (1/jam), X adalah konsentrasi/berat kering biomasa (g/l), t adalah interval waktu (menit, jam).

Analisis FTIR

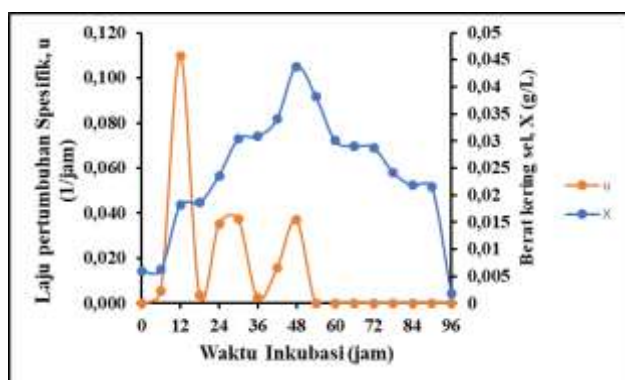
Kultur disentrifugasi, kemudian sel (pellet) ditambahkan metanol 95%, dan dihomogenkan dengan divorteks. Campuran ini kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm, 28°C, selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan kertas Whatman ukuran 0,2 μ m. Filtrat dievaporasi menggunakan rotary evaporator dengan 5,0 ml kloroform. Hasil evaporasi kemudian ditaruh pada cawan petri untuk dikeringkan dalam oven. Pigmen yang dihasilkan ini dianalisis menggunakan Fourier Transform Infra Red (FTIR).

HASIL DAN PEMBAHASAN

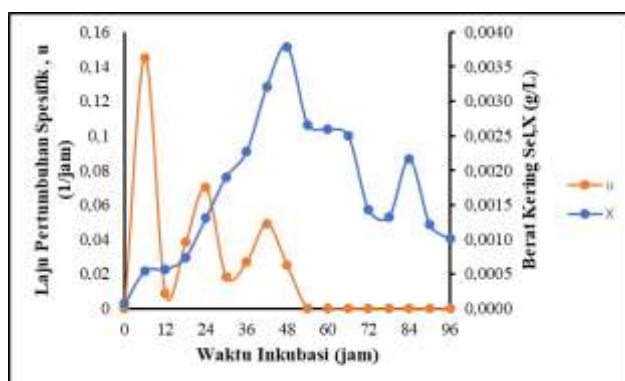
Laju Pertumbuhan Spesifik

Laju pertumbuhan spesifik mikroba adalah parameter penting yang menunjukkan dinamika pertumbuhan selama fermentasi berlangsung. Selama pertumbuhan batch laju pertumbuhan berubah terus menerus dari zero sampai mencapai nilai maksimum.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan maksimum *S. marcescens* sebesar 0,044 g/L pada jam 48 jam (Gambar 1), sedangkan pertumbuhan *Rhodococcus* sp. sebesar 0,0038 g/L pada jam yang sama dengan *S. marcescens* (48 jam) (Gambar 2). Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) untuk *Serratia marcescens* sebesar 0,11 (1/jam) dicapai pada jam ke 12 (Gambar 1), sedangkan μ_{maks} untuk *Rhodococcus* sp. Sebesar 0,15 (1/jam) dicapai pada jam ke 6 (Gambar 2). Laju pertumbuhan spesifik menunjukkan hubungan dengan konsumsi substrat yang digunakan. Maksimum laju pertumbuhan spesifik yang dicapai pada awal-awal pertumbuhan tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan kedua bakteri sangat pesat diawal dan kemudian mengalami penurunan seiring dengan menurunnya berat kering selnya (pertumbuhan).



Gambar 1. Pertumbuhan dan laju pertumbuhan spesifik *Serratia marcescens*



Gambar 2. Pertumbuhan dan Laju pertumbuhan spesifik *Rhodococcus* sp.

Nilai μ_{maks} sangat tergantung pada mikroorganismenya, kondisi kimia dan fisiknya selama proses pertumbuhan. Penurunan μ_{maks} dikarenakan adanya penurunan konsentrasi substrat/media. Hubungan substrat dan laju

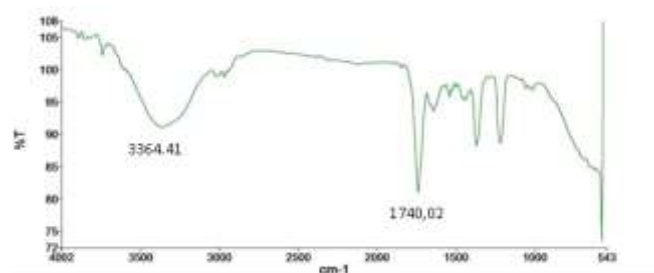
pertumbuhan spesifik dapat digambarkan sebagai persamaan Monod (1949).

$$\mu = \frac{\mu_{maks} S}{K_s + S}$$

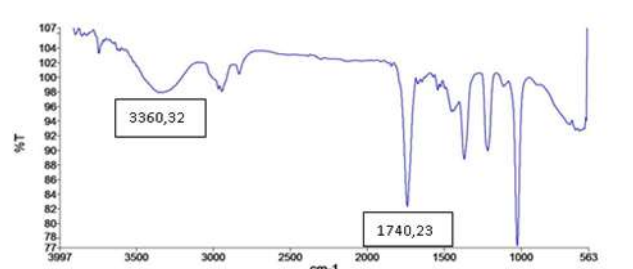
dimana, μ =laju pertumbuhan spesifik, S = konsentrasi substrat yang tersisa, K_s =konstanta kebutuhan substrat pada saat half rate.

Hasil Analisis FTIR

Pigmen sebagai senyawa organik, apabila dikenai sinar infra merah akan mempunyai frekuensi tertentu yaitu bilangan gelombang antara 500-4.000 cm^{-1} . Hasil FTIR senyawa yang ada di pigmen *Serratia marcescens* ditunjukkan pada Gambar 3, sedangkan Gambar 4 menunjukkan FTIR pigmen dari *Rhodococcus* sp.



Gambar 3. Profil FTIR senyawa pada pigmen *Serratia marcescens*



Gambar 4. Profil FTIR senyawa pada pigmen *Rhodococcus* sp.

Puncak spesifik yang dilihat antara bilangan gelombang 500-3500, dari gambar terlihat dua puncak yang spesifik yaitu pada bilangan gelombang (sumbu X) sebesar 1740,02 cm^{-1} dan 3364,41 cm^{-1} . Menurut Nandiyanto dkk., 2019, spektrum infra-red dapat dibagi dalam tiga rentang wilayah bilangan gelombang yaitu spektrum infra-merah jauh (far-IR): <400 cm^{-1} , spektrum infra-merah tengah (mid-IR): 400-4.000 cm^{-1} dan spektrum infra-merah dekat (near-IR): 4.000-1.300 cm^{-1} . Spektrum infra-merah tengah dibagi kedalam empat wilayah, yaitu 4.000 ke 2.500, 2.500 ke

2.000, 2.000 ke 1.500 dan 1.500 ke 400. Rentang wilayah 4.000 ke 2.500 menunjukkan puncak penyerapan oleh N-H, C-H dan O-H, sehingga pigmen *S. marcescens* mempunyai serapan yang kuat dan lebar pada 3.364,41 cm^{-1} merupakan regangan N-H, C-H dan O-H. Sedangkan serapan sebesar 1740,02 cm^{-1} menunjukkan regangan untuk senyawa dengan gugus fungsional karbonil (C=O). Menurut Mathlom *et al.* 2018 serapan pigmen *Serratia* G10 pada 3435,22 cm^{-1} yang menunjukkan gugus N-H yang merupakan gugus dalam struktur prodigiosin. Demikian juga penelitian Zhao *et al.* 2021 menunjukkan bahwa *Serratia* memiliki kuat dan lebar serapan pada 3.325 cm^{-1} (regangan N-H), 2.941 cm^{-1} (C-H dan C=O peregangan). Lazovi *et al.*, 2017 menunjukkan bahwa prodigiosin memiliki serapan serupa dalam CHCl_3 pada 1.660 cm^{-1} dan 1.602 cm^{-1} . Selain itu, gugus N-H dan cincin fenil terlihat jelas di wilayah sidik jari, yang ditandai dengan intensitas lemah pada 1 cm^{-1} (aromatik C=O). Lebih-lebih lagi, serapan pada 1.022 cm^{-1} dan 1.114 cm^{-1} menunjukkan C-N tikungan (amina) dan peregangan C-O (karboksilat), sedangkan 846 cm^{-1} dan 737 cm^{-1} menunjukkan lengkungan cincin fenil C-H, dan serapan pada 1.461 cm^{-1} menunjukkan adanya pembengkokan C-H.

Demikian juga hasil FTIR pigmen bakteri *Rhodococcus* sp. (Gambar 4) yang menunjukkan serapan pada 3360,32 cm^{-1} dan 1740,23 cm^{-1} . Serapan ini mempunyai kesamaan terhadap serapan pada *S. marcescens*, sehingga gugus fungsi yang dimiliki pigmen *Rhodococcus* ini adalah N-H, C-H, O-H dan C=O.

KESIMPULAN.

Berdasarkan hasil uji FTIR pigmen maka senyawa yang terkandung dalam pigmen *S. marcescens* dan *Rhodococcus* sp. termasuk golongan alkaloid.

UCAPAN TERIMA KASIH.

Penelitian ini didukung dengan dana PNPB grant-program Professorship Universitas Diponegoro, No 278-27/UN7.5.1/PG/2017.

DAFTAR PUSTAKA

Auta H.S., C.U. Emenike, B. Jayanthi, S.H. Fauziah. 2018. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier. vol.127: 15-21.

- Cappelletti M., A. Presentato, E. Piacenza, A. Furrinceli, R.J. Turner, D. Zannoni. 2020. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:8567–8594.
- Haddad M.S., S. Aghaei and M. Zargar. 2017. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Carotenoid Pigment Produced by Native *Rhodococcus* spp. Isolated from Soil. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 7(1): 809-815.
- Haddix P.L. and R. M. Q. Shanks. 2018. Prodigiosin pigment of *Serratia marcescens* is associated with increased biomass production. *Arch Microbiol.* 2018 September ; 200(7): 989–999. doi:10.1007/s00203-018-1508-0.
- Lazović, S., Leskovic, A., Petrovic, S., Senerovic, L., Krivokapic, N., Biological effects of bacterial pigment undecylprodigiosin on human blood cells treated with atmospheric gas plasma in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(1), 55-62.
- Li E. and R. Mira de Ordura. 2010. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology* 50: 283–288.
- Malthom G.S., N.H. Hayder and M.S. Mahmood. 2018. Synergistic effect of biosurfactant and prodigiosin produced by *Serratia marcescens* as antimicrobial agent. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 6(2): 1601-1615.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3 (1), 371–394
- Muloiwa M., S. Nyende-Byakikab, M. Dinka. 2020. Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering* 33:141–150.
- Nadaf N.H., Pore T.S., Khanolkar A.B. 2016. Production, purification, identification of prodigiosin from *Serratia* sp. And its antimicrobial activity. *Life Science Informatics Publications. RJBPCS* 1(6) Page No.327.
- Nandiyanto A.B.D. Oktiani R. dan Ragadhita R. 2019. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Journal of Science & Technology*, Volume 4 Issue 1: 97-118.

Subathra D.C., S. Alam, S.K. Nag, N.S. Jemimah, V. Mohanasrinivasan, B. Vaishnavi. 2014. Studies on growth kinetics of *Serratia marcescens* VITSD2 and optimization of fermentation conditions for serratiopeptidase production. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 13(2):88-92.

Valentina P-C, P-H Alejandra, C-C Daniel, O-E Victor Manuel. 2019. Antibacterial pigment

production by *Serratia marcescens* using different casein types obtained from milk. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XXI No. 1 Enero - Junio 2019, 82– 90.

Zhao Y, Q Cheng, Z. Shen, B. Fan, Y. Xu, Y. Chao, F. Peng, J. Chao and B. Xue. 2021. Structure of prodigiosin from *Serratia marcescens* NJZT-1 and its cytotoxicity on TSC2-null cells.