

## Kuliah ke-7 KINETIKA PERTUMBUHAN MIKROBA

Tujuan Instruksional Khusus :

- Mahasiswa mampu menjelaskan kinetika pertumbuhan mikroba

## METODE PENGUKURAN PERTUMBUHAN MIKROBA

- Mengukur banyaknya sel
  - Perhitungan mikroskopis
  - Perhitungan dengan pupukan cawan petri
  - Culture slide
  - Caulter counter
  - Nefolometri
- Mengukur Massa Sel : Metode Langsung
  - Bobot Sel Kering
  - Turbiditas

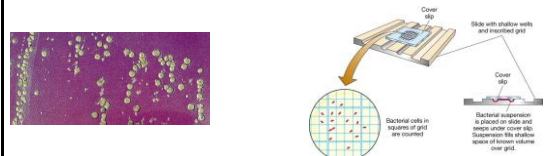
## METODE PENGUKURAN PERTUMBUHAN MIKROBA.....

### 3. Estimasi Massa Sel Metode Tidak Langsung

- Komponen Sel
- Pengambilan Nutrien
- Pembentukan Produk
- Evolusi Panas
- Volume Sel Terkemas
- Viskositas

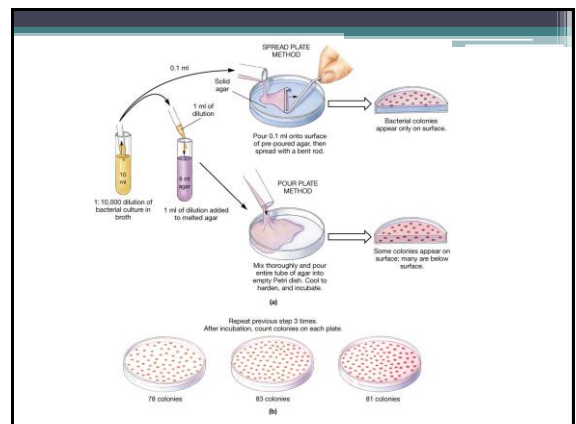
### 1.a. Perhitungan Mikroskopis

- Dengan bantuan :
  - Slide Petroff Housser
  - Hemocytometer
- Sel hidup Vs sel mati dibedakan dengan pewarnaan metilen biru atau tripen biru yang mewarnai sel mati.
- Kelemahan :
  - ukuran bakteri sangat kecil
  - bentuk sel khamir dan kapang bukan sel mandiri (utuh)



### 1.b. Perhitungan dengan Pupuk Cawan Petri

- Inokulasi suspensi mikroba yang diencerkan secara bertingkat
- Disebarkan dengan batang gelas steril pada permukaan
- Inkubasi 24 jam (>) sampai timbul koloni yang terpisah ⇒ CFU (Cel Forming Unit)
- CFU dapat berasal dari :
  - 1 sel
  - miselium
  - pseudomiselium
- Baik untuk bakteri dan khamir, kurang baik untuk kapang
- Pada kondisi tertentu khamir dapat membentuk miselium atau pseudomiselium



### 1.c. Kultur Slide

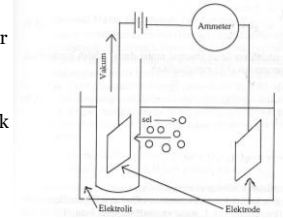
- Modifikasi pupukan cawan petri
- Cara :
  - ✓ Medium agar ditempatkan dalam gelas kecil dan dipasang pada slide mikroskop
  - ✓ Inokulasikan dengan suspensi mikroba
  - ✓ Slide diinkubasi
  - ✓ Setelah tumbuh 2-3 x massa mengganda, dilihat di bawah mikroskop

$$\text{Sel hidup} = \frac{\Sigma \text{mikrokoloni}}{\Sigma \text{koloni} + \Sigma \text{sel yang tidak membelah}}$$

- Kelemahan = cawan petri, tapi lebih cepat karena waktu yang dibutuhkan 3-4 jam saja.

### 1.d. Coulter Counter

- Kultur yang diencerkan ditempatkan pada reservoir cairan yang mengandung elektrolit
- Pipa bagian dalam divakumkan untuk menarik liquid
- Antara 2 elektroda diberi tegangan listrik
- Bila sel melalui lubang-lubang kecil  $\Rightarrow$  terjadi resistensi  $\Rightarrow$  pulsa pada aliran listrik  $\Rightarrow$  dihitung
- Besarnya resistensi  $\sim$  besarnya sel



Gambar 1. Diagram menghitung caulter untuk mengukur jumlah serta distribusi ukuran sel

### 1.e. Nefelometri

- Menghitung jumlah sel atau banyaknya partikel
- Menggunakan suatu sumber cahaya yang diarahkan tegak lurus terhadap tabung foto
- Bila cahaya menembus sampel cair maka tabung foto mengukur cahaya yang disebarakan
- Berguna untuk sampel cair (sel yang dicairkan) atau suspensi partikel.

### 2.a. Bobot Sel Kering

Sampel berupa kultur broth penuh

↓  
Disentrifusi

↓  
Dicuci dengan buffer atau air

↓  
Dikeringkan pada 80°C, 24 jam atau 110°C/8 jam

- Digunakan untuk sel yang ditumbuhkan pada medium bebas solid
- Tidak baik untuk sel yang ditumbuhkan [ada medium yang mengandung CaCO<sub>3</sub>, padatan selulosa molases, cairan corn steep, selulosa, tepung kebele.

### 2.b. Turbiditas

- Densitas optik/ turbiditas kaldu kultur = massa sel
- Turbiditas suspensi sel diukur dengan cahaya pada panjang gelombang 600-700 nm menggunakan spektrofotometer atau dengan colorimeter menggunakan filter merah.
- Rumus :
 
$$A = \log (1/T) = \epsilon C L$$

A = Absorbans                      C = konsentrasi  
T = Transmisi                        L = jarak (cm)  
 $\epsilon$  = koefisien absorpsi molar
- Tidak baik digunakan untuk medium dengan kandungan padatan selain sel
- Medium tidak boleh mengandung komponen lain yang dapat mengabsorpsi cahaya yang digunakan.

### 3. Estimasi Massa Sel

- Stoikiometri pertumbuhan sel dan pembentukan produk :



### 3.a. Komponen Sel

- Komponen sel yang diukur : protein, RNA, DNA
- Proporsinya berubah terhadap waktu  $\Rightarrow$  perlu perhatian dalam menerjemahkan hasil
- Pada fase log  $\Rightarrow$  komponen sel tetap
- Pada awal dan akhir siklus pertumbuhan komposisi sel berubah
- Analisis kadar protein : metode buret, folin, Kjeldhal nitrogen, total analisis asam amino.
- Dapat juga dengan analisis elemental sel (C, H, O dan N).

### 3.b. Pengambilan Nutrien

- Mengukur pengurangan nutrien esensial dari medium  $\Rightarrow$  yang tidak digunakan untuk sintesis produk metabolik
- Zat yang diukur : sumber energi C dan O
- Zat yang tidak dapat diukur : P, S dan Mg

### 3.c. Pembentukan Produk

- Produk yang diukur :  $\text{CO}_2$   $\rightarrow$  dengan analisator gas infra merah
- Produk yang bersifat umum : ion H
- Jika sumber H adalah amonium, maka 1 mol amonium menghasilkan 1 ion H  $\Rightarrow$  dinetralkan agar pH konstan
- Jumlah alkali yang ditambahkan harus  $\approx$  pertumbuhan

### 3.d. Evolusi Panas

- Produk universal pertumbuhan mikroba adalah panas
- Sejalan dengan hukum thermodinamika
- 2 metode pengukuran panas
  - balans energi pada air pendingin
  - teknik kalorimeter dinamik
- Keseimbangan energi pada proses fermentasi :
 
$$Q_{\text{akumulasi}} = Q_{\text{fermentasi}} + Q_{\text{agitasi}} + Q_{\text{evaporasi}} + Q_{\text{sensible}} + Q_{\text{surround}}$$

### 3.e. Volume Sel Terkemas

- Cara : seluruh broth sampel disentrifus pada kondisi putaran (rpm) dan waktu standar di dalam sebuah tabung berskala yang meruncing
- Volume yang diisi oleh padatan = massa sel

### 3.f. Viskositas

- Selama fermentasi terjadi peningkatan viskositas pada pertumbuhan miselia atau polisakarida
- Jika sumber C adalah polimer (pati atau selulosa) maka viskositas broth fermentasi bakterial atau khamir akan menurun  $\Rightarrow \approx$  pertumbuhan dan aktivitas hidrolisis dalam kultur broth.

### Parameter Pertumbuhan

1. Kecepatan pertumbuhan spesifik (Specific Growth Rate) atau waktu penggandaan (Doubling Time)
2. Growth Yield
3. Metabolic Quotient terhadap penggunaan substrat dan pembentukan produk
4. Affinitas substrat
5. Jumlah maksimum biomassa

⇒ Diperoleh dari pengamatan pembiakan biomassa secara batch atau kontiniu

⇒ Batch culture banyak digunakan karena :

- mudah, sederhana, homogen
- dispersi biomassa merata
- tidak ada gradiasi konsentrasi pada medium.

### 1. Kecepatan Pertumbuhan

- Persyaratan pertumbuhan biomassa :
  - a. Inokulum hidup dan aktif
  - b. Sumber Energi
  - c. Nutrisi
  - d. Tidak ada Inhibitor
  - e. Kondisi fisiko-kimia yang cocok

Jika dipenuhi : dalam interval waktu singkat (dt) terjadi kenaikan jumlah biomassa (dx) yang proporsional dengan jumlah biomassa yang ada (x)

$dx = \mu x dt$  .....1) atau  $\frac{dx}{dt} = \mu x$  .....2)

$dx/dt$  = kecepatan pertumbuhan populasi

$\mu$  = kecepatan pertumbuhan spesifik  
= kecepatan pertumbuhan persatuan jumlah biomassa (satuan = 1/t)

$$\mu = \left(\frac{1}{x}\right) \left(\frac{dx}{dt}\right)$$

Jika  $\mu$  konstan, maka integrasi pers (2) :

$$\int_{x_0}^x \left(\frac{1}{x}\right) dx = \int_{t_0}^t \mu dt \Rightarrow \ln x = \ln x_0 + \mu t$$
 .....(3)

- Pers (3) dalam logaritma bilangan pokok 10 dapat ditulis :

$$\log x = \log x_0 + \left(\mu \cdot \frac{t}{2.303}\right)$$
 .....4)

atau

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t$$
 .....5)

atau

$$x = x_0 e^{\mu t}$$
 .....6)

$x_0$  = jumlah biomassa pada  $t = 0$   
 $x$  = jumlah biomassa setelah waktu  $t$

- Pertumbuhan yang mengikuti persamaan di atas ⇒ pertumbuhan logaritmik (eksponensial)

↓

Penentuan kecepatan pertumbuhan dan parameter lain harus pada pengamatan di fase log

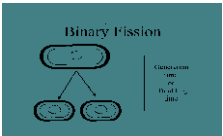
**Growth Curve**

- Hubungan  $\mu$  dengan waktu penggandaan ( $t_d$ ) diperoleh dari Pers (5) dimana  $x = 2x_0$  dan  $t = t_d$ , sehingga :

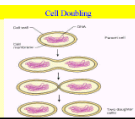
$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t \Rightarrow \ln 2 = \mu t_d \Rightarrow 0.693 = \mu t_d$$

atau  $t_d = \frac{0.693}{\mu}$  .....7)

- Derajat Multiplikasi =  $x/x_0 \Rightarrow$  dari Pers (6) diperoleh :

$$\frac{x}{x_0} = e^{\mu t}$$


- Banyaknya penggandaan dari suatu biomassa (n) :
 
$$\frac{x}{x_o} = 2^n \dots\dots\dots(8)$$
 atau :  $n = 3.32 \log\left(\frac{x}{x_o}\right) \dots\dots\dots(9)$
- Dalam pertumbuhan dengan selang waktu t ⇔ penggandaan biomassa = t/t<sub>d</sub> kali → Pers (8) menjadi :
 
$$x = x_o 2^{t/t_d} \dots\dots\dots(10)$$
 atau
 
$$\log_2 x = \log_2 x_o + \left(\frac{1}{t_d}\right)t \dots\dots\dots(11)$$



- Kecepatan pertumbuhan juga dapat dinyatakan dengan 1/t<sub>d</sub>
- μ lebih baik daripada (1/t<sub>d</sub>) karena kejadiannya sesuai dengan hukum pertumbuhan, dan pada sistem kontiniu μ dapat diterapkan.
- Hukum pertumbuhan logaritmik berlaku pada kondisi lingkungan dan konstituen biomassa yang konstan
- Mikrobia yang memiliki fase pertumbuhan logaritmik : bakteri, khamir, protozoa dan jamur yang ditumbuhkan dalam *homogenous submerged culture*.
- Pertumbuhan jamur benang sering menyimpang dari pertumbuhan logaritmik, karena terbentuknya pellet, sehingga biomassa tidak terdispersi homogen, atau karena suplai O<sub>2</sub> menjadi pembatas.

### 2. Growth Yield

- Defenisi : hasil bagi antara perubahan jumlah biomassa dengan substrat.
- Persamaan :
 
$$Y = \frac{\Delta x}{\Delta s} \dots\dots\dots(12)$$

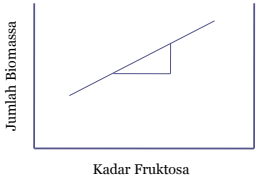
Y = growth yield  
 Δx/ Δs = kenaikan jumlah biomassa sebagai akibat digunakannya substrat sebanyak s.

- Secara umum growth yield dinyatakan dengan limit x/s untuk s mendekati 0, sehingga :
 
$$Y = - \frac{dx}{ds} \dots\dots\dots(13)$$

s = kadar substrat  
 x = kadar biomassa  
 Tanda (-) digunakan karena x dan s berubah dengan arah berlawanan.
- Growth Yield penting untuk menyatakan kebutuhan nutrisi oleh organisme secara kuantitatif
- Peneliti di bidang mikologi cenderung menggunakan istilah (1/Y) yang disebut *koefisien ekonomi*.

- Monod (1869) menyatakan bahwa jika kondisi pembiakan bakteri konstan, maka Y juga konstan ⇔ bila x<sub>o</sub> dan s<sub>o</sub> adalah konsnetrasi awal biomassa dan substrat, serta x dan s adalah konsentrasi pada suatu saat pertumbuhan, maka :
 
$$x - x_o = Y(s - s_o) \dots\dots\dots(14)$$
- Untuk substrat yang membatasi pertumbuhan (*growth limiting substrat*), maka bila jumlah biomassa telah maksimum (X<sub>m</sub>), ini berarti s≈0, sehingga :
 
$$x_m - x_o = Ys_o \dots\dots\dots(15)$$

- Jika diplot hubungan antara x<sub>m</sub> dan s diperoleh slope sebesar Y ⇔ terjadi pada *growth limiting substrate*
- Contoh hubungan antara fruktosa sebagai satu-satunya sumber C dan merupakan *growth limiting substrate* dengan jumlah biomassa bakteri aerob *Pseudomonas sp.*



Gambar . Hubungan antara kadar fruktosa dan jumlah biomassa dari *Pseudomonas sp*

### 3. Metabolic Quotient

- Adalah kecepatan penggunaan substrat dalam pertumbuhan pada waktu tertentu
- Persamaan :

$$\frac{d_s}{d_t} = qx \dots\dots\dots(16)$$

x = jumlah biomassa  
q = metabolic quotient

- Metabolic quotient analog dengan aktivitas enzim  $\Rightarrow$  jika kondisi lingkungan dan konstituen biomassa konstant maka q harus konstan.

- Dari pers (2) dan (13) diperoleh hubungan :

$$\frac{ds}{dt} = \left( \mu \frac{x}{Y} \right) \dots\dots\dots(17)$$

- atau :  $\frac{ds}{dt} = \left( \frac{\mu}{Y} \right) x \dots\dots\dots(18)$

- Dari pers (16) dan (18) :

$$q = \frac{\mu}{Y} \dots\dots\dots(19)$$

- Pers (19) digunakan untuk menghitung kebutuhan substrat untuk setiap kecepatan pertumbuhan spesifik yang berbeda-beda.

### 4. Pengaruh Kadar Substrat Terhadap Kecepatan Pertumbuhan

- Mengikuti konsep kinetika enzim  $\Rightarrow$  hubungan antara kecepatan reaksi dengan kadar substrat ditunjukkan pada pers Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

dimana :

v = kecepatan reaksi enzimatik  
s = kadar substrat  
K<sub>m</sub> = konstanta Michaelis-Menten  
V<sub>max</sub> = kecepatan reaksi maksimum

- Dalam pertumbuhan mikroba v = q, sehingga :

$$q = \frac{q_m \cdot S}{(s + K_s)} \dots\dots\dots(20)$$

K<sub>s</sub> = konstanta saturasi  
q<sub>m</sub> = harga q maksimum bila s = K<sub>s</sub>

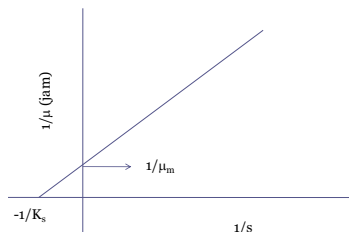
- Substitusi q =  $\mu/Y$  dan q<sub>m</sub> =  $\mu_m/Y$ , maka Pers (20) menjadi :

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{(s + K_s)} \dots\dots\dots(21) \Rightarrow \text{Pers. MONOD}$$

- Harga K<sub>s</sub> berbanding terbalik dengan afinitas mikroba terhadap substrat.
- Kebalikan dari Pers (21) :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{\mu_m} \dots\dots\dots(22)$$

- Jika Pers (22) diplot dalam bentuk grafik diperoleh :



Gambar. Bentuk kebalikan dari Persamaan Monod

- Harga  $K_s$  biasanya sangat rendah, yaitu berkisar antara  $10^{-5}$  untuk ion P, K dan Mg, dan untuk O berkisar antara  $10^{-6} - 10^{-5}$ , sedangkan untuk asam amino dan vitamin lebih rendah lagi.
- Karga  $K_s$  untuk *trace element* tidak ada, dan pengaruh *trace element* terhadap kecepatan pertumbuhan yang mengikuti Pers Monod belum ada.

**5. Pengaruh Zat Penghambat Pertumbuhan**

- Tdd : penghambatan kompetitif dan non kompetitif
- Penghambatan kompetitif : inhibitor berlomba bersama substrat untuk digunakan biomassa
- Penghambatan non kompetitif : inhibitor bereaksi dengan biomassa pada satu sisi yang berbeda dengan sisi yang digunakan untuk reaksi dengan substrat tanpa mempengaruhi afinitas terhadap substrat.

**5.a. Penghambatan Kompetitif**

- Analogi dengan kinetika enzim  $\Rightarrow$  reaksi antara biomassa (x), substrat (s) dan inhibitor (I) :
  - $x + s \rightleftharpoons xs \dots\dots\dots(25)$
  - $x + I \rightleftharpoons xI \dots\dots\dots(26)$
  - $xs \longrightarrow P + x \dots\dots\dots(27)$
- Dari reaksi di atas dapat ditentukan nilai  $K_s$  = konstanta saturasi atau konstanta disosiasi untuk xs
- $K_i$  = konstanta disosiasi untuk xI

- Dengan adanya inhibitor kompetitif, maka kecepatan pertumbuhan (Pers 21) menjadi :

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{s}{s + \alpha K_s} \dots\dots\dots(28)$$

dimana :  $\alpha = 1 + \frac{1}{K_i}$

i = kadar inhibitor

- Dari Pers (28) terlihat bahwa nilai  $K_s$  semakin besar sedangkan  $\mu_m$  tetap.

**5.b. Penghambatan Non Kompetitif**

- Reaksi yang terjadi :
  - $x + s \rightleftharpoons xs \dots\dots\dots(29)$
  - $x + I \rightleftharpoons xI \dots\dots\dots(30)$
  - $xs + I \rightleftharpoons Ixs \dots\dots\dots(31)$
  - $xI + S \rightleftharpoons Ixs \dots\dots\dots(32)$
  - $xs \longrightarrow P + x \dots\dots\dots(33)$

- Kecepatan pertumbuhan menjadi :

$$\mu = \frac{\mu_m}{\alpha} \cdot \frac{s}{s + K_s}$$

- Dari Pers (34) : nilai  $\mu_m$  menjadi  $<$ , sedang  $K_s$  tetap

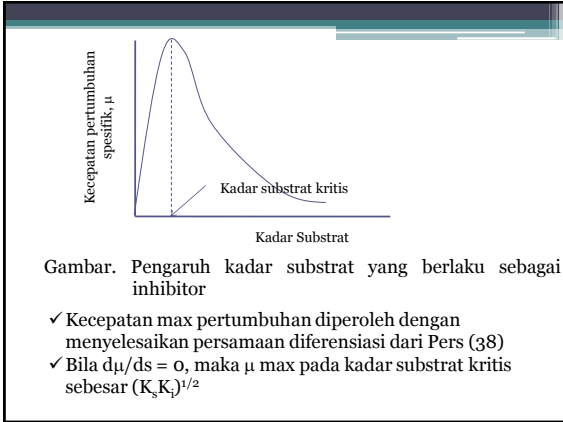
**5.c. Penghambatan oleh Substrat**

- Substrat alkohol, fenol dan hidrokarbon dalam jumlah berlebih dapat menyebabkan penghambatan.

- Reaksi-reaksi :
  - $x + s \rightleftharpoons xs \dots\dots\dots(35)$
  - $xs + s \rightleftharpoons xs_2 \dots\dots\dots(36)$
  - $xs \longrightarrow P + x \dots\dots\dots(37)$

- Pengaruh penghambatan substrat terhadap kecepatan pertumbuhan :

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot s \cdot K_i}{s K_i + K_s K_i + s^2} \dots\dots\dots(38)$$



### 6. Pengaruh Aktifator pada Pertumbuhan

- Aktifator pertumbuhan : suatu senyawa yang tidak digunakan untuk pertumbuhan dan tidak mengalami metabolisme tapi dapat mempengaruhi kecepatan pertumbuhan (menaikkan kecepatan).
- Reaksi-reaksi yang terlibat :
  - $x + s \rightleftharpoons xs \dots\dots\dots(39)$
  - $x + A \rightleftharpoons xA \dots\dots\dots(40)$
  - $xA + s \rightleftharpoons xAs \dots\dots\dots(41)$
  - $xs \longrightarrow P + x \dots\dots\dots(42)$
  - $xAs \longrightarrow P + x \dots\dots\dots(43)$

A = aktifator

- Kecepatan pertumbuhan dengan adanya aktifator :

$$\mu = \beta \mu_m \cdot \frac{s}{s + K_s} \dots\dots\dots(44)$$

dimana :

$$\beta = \frac{\left(1 + \frac{a}{K_a} \cdot \frac{\mu_m'}{\mu_m}\right)}{\left(1 + \frac{a}{K_a}\right)} \dots\dots\dots(45)$$

a = kadar aktifator  
 $K_a$  = konstanta disosiasi untuk XA  
 $\mu_m$  = kec.pertumbuhan spesifik max tanpa aktifator  
 $\mu_m'$  = kec.pertumbuhan spesifik max dengan aktifator

- Dari pers (44) : nilai  $\mu_m$  naik dengan faktor  $\beta$  tanpa mempengaruhi nilai  $K_s$