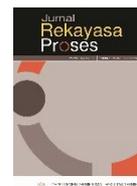




# JURNAL REKAYASA PROSES

Volume 11 No.2, 2017, hal. 101-105

Journal homepage: <http://journal.ugm.ac.id/jrekpros>



## Seleksi Isolat Bakteri Amilolitik dari Rhizosfer *Canna edulis*, *Kerr.* untuk Produksi Poli Hidroksi Alkanoat dari Limbah Cair Tapioka

Nurhayati<sup>1\*</sup>, Ocky Karna Radjasa<sup>2</sup>, dan Irfan Dwidya Prijambada<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto Semarang

<sup>2</sup> Departemen Perikanan dan Kelautan Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto Semarang

<sup>3</sup> Lab. Mikrobiologi Tanah dan Lingkungan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

\*Alamat korespondensi: [nur\\_setyahayati@yahoo.com](mailto:nur_setyahayati@yahoo.com)

(Submisi: 1 November 2017; Revisi: 1 Desember 2017; Penerimaan: 15 Desember 2017)

### ABSTRACT

*Petrochemical-based plastic waste accumulated in landfills have been posing serious threat to the environment as this kind of plastics are non-biodegradable. Replacing petrochemical-based plastics with biodegradable plastics constitutes a challenging solution both in terms of mechanical design of the process and most importantly the availability of powerful local microorganism for the process. Therefore, the current study was searching for appropriate local isolates of microorganisms for poly hydroxyl alkanoate (PHA) production from starch waste, which was considered as one of cheap carbon sources. Waste water of cassava industry is a good resource of such starch waste water. The microbes were isolated from *Canna edulis*, *Kerr.* rhizosphere from Cangkringan. The expected isolates were the bacteria enable the coupling of carbon catabolic pathways with PHA anabolic pathways. It was found that ten isolates were able to use waste water of cassava flour industry as carbon source. The PHA quantitative analysis by spectrophotometer showed that the isolate of *Bacillus* sp. C8 produced the highest PHA of 2.10 g/L. Further FTIR analysis showed specific bands near 1363.67  $\text{cm}^{-1}$ , 1641.42  $\text{cm}^{-1}$ , 2929.87  $\text{cm}^{-1}$ , 3408.22  $\text{cm}^{-1}$  wavelengths which revealed the presence of  $\text{CH}_3$ , ester carbonyl group ( $\text{C}=\text{O}$ ), C-H and terminal OH group of PHA.*

*Keywords : Canna edulis, Kerr. rhizosphere, wastewater cassava industry flour, PHA, bakteri*

### ABSTRAK

Akumulasi sampah plastik berbasis petrokimia di tempat pembuangan sampah mengganggu lingkungan karena plastik sifatnya tidak mudah didegradasi secara biologi dan sangat tahan di lingkungan. Penggantian plastik yang berasal dari bahan petrokimia dengan bahan plastik yang mudah terdegradasi secara biologi merupakan tantangan tersendiri, baik dari sisi perancangan proses maupun ketersediaan mikrobial lokal yang sesuai untuk proses tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk mendapatkan bakteri isolat lokal penghasil PHA yang mampu mengkonsumsi substrat berupa pati. Substrat pati dipilih karena ketersediaan limbah industri tapioka sebagai bahan baku potensial dan murah untuk produksi PHA. Bakteri amilolitik untuk produksi PHA telah berhasil diisolasi dari rhizosfer *Canna edulis*, *Kerr.* di Cangkringan, Sleman, Yogyakarta, Indonesia. Bakteri yang diisolasi merupakan bakteri dengan kemampuan memproduksi PHA dan memiliki kemampuan melakukan rangkaian reaksi pada limbah cair industri tapioka dan rangkaian

reaksi pembentukan PHA. Telah berhasil didapatkan 10 bakteri yang memiliki aktivitas amilolitik dan dapat menghasilkan PHA menggunakan limbah cair industri tapioka. Analisis kuantitatif PHA menggunakan spektrofotometer menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. C8 menghasilkan PHA paling tinggi sebesar 2,10 mg/mL. Analisis hasil metabolisme isolat C8 menggunakan FTIR memperlihatkan puncak spesifik  $1363,67\text{ cm}^{-1}$ ,  $1641,42\text{ cm}^{-1}$ ,  $2929,87\text{ cm}^{-1}$ ,  $3408,22\text{ cm}^{-1}$  adalah verifikasi adanya  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}-\text{H}$  dan  $\text{OH}$  dari PHA.

Kata kunci : *Canna edulis*, Kerr. rhizosfer, limbah cair industri tapioka, PHA, bakteri

## 1. Pendahuluan

Kebanyakan jenis plastik yang banyak digunakan saat ini berbahan dasar senyawa turunan minyak bumi sehingga bersifat sulit terdegradasi oleh mikroorganisme pembusuk di alam. Akibatnya, sampah plastik terakumulasi semakin banyak dengan makin tingginya tingkat penggunaan plastik dalam kehidupan sehari-hari. Untuk mengurangi timbunan sampah plastik, diperlukan bahan plastik pengganti yang ramah lingkungan, yaitu plastik yang dapat diuraikan mikroorganisme pembusuk dalam waktu yang relatif singkat (*biodegradable plastic*). Salah satu jenis plastik ramah lingkungan ini adalah *polyhidroksialkanoate* (PHA).

Molekul polimer PHA adalah biopoliester berupa granula yang dapat diproduksi oleh bakteri tertentu. Kebanyakan substrat yang digunakan bakteri pembentuk plastik ini adalah glukosa. Hal ini akan menjadikan biaya tinggi untuk bahan baku dan mengurangi keekonomian produksi PHA. Oleh karena itu, pengembangan bahan plastik ramah lingkungan di Indonesia sebaiknya dimulai dengan melakukan isolasi bakteri lokal yang mampu menggunakan substrat murah, misalnya limbah dengan kandungan pati, seperti limbah industri tapioka yang jumlahnya sangat banyak di berbagai pelosok Indonesia.

Komponen utama limbah cair tapioka adalah amilum sehingga diperlukan isolat bakteri yang memiliki aktivitas amilolitik sekaligus dapat menghasilkan PHA. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan upaya untuk mencari bakteri amilolitik lokal Indonesia yang memiliki kemampuan menghasilkan PHA (Nurhayati dkk., 2017). Sumber isolat yang digunakan adalah rhizosfer *Canna edulis*, Kerr. dengan pertimbangan kandungan pati dalam umbi

tanaman ini yang cukup tinggi sehingga kemungkinan cukup besar menemukan bakteri amilolitik pada rhizosfer.

Pada penelitian sebelumnya, Nurhayati dkk. (2017) telah menyeleksi isolat-isolat dari rhizosfer *Canna edulis*, Kerr. dengan analisis gen REP-PCR sehingga dihasilkan 10 isolat terbaik. Penelitian ini merupakan tahap lanjutan yang bertujuan untuk menguji aktivitas amilolitik 10 isolat tersebut untuk membandingkan kemampuan isolat dalam menggunakan sumber karbon berupa pati dalam produksi PHA. Aktivitas amilolitik bakteri pada sumber karbon limbah tapioka dapat diukur berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan. Bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan gula pereduksi pada limbah cair tapioka perlu dianalisis lebih lanjut kemampuannya dalam menghasilkan PHA. Berdasarkan kemampuan menghasilkan gula pereduksi maka dapat dipilih bakteri yang memiliki potensi untuk menghasilkan PHA untuk pengembangan bahan plastik ramah lingkungan. Pemilihan bakteri pada tingkat metabolik berdasarkan kemampuan menghasilkan gula pereduksi dan kemampuan menghasilkan PHA merupakan cara efektif untuk menskrining bakteri yang potensial untuk produksi PHA pada skala komersial.

Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh isolat lokal yang mudah diisolasi dari area di Indonesia yang relevan dengan sumber karbon utama yang akan dijadikan substrat. Dengan ketersediaan isolat lokal, maka kendala terbesar produksi bioplastik selama ini, yaitu kebutuhan impor mikroorganisme, bisa diatasi sehingga bisa menurunkan biaya produksi.

## 2. Metode Penelitian

Isolasi bakteri amilolitik penghasil PHA menggunakan sampel tanah dari rhizosfer *Canna edulis*, Kerr. di Cangkringan, Sleman, Yogyakarta. Sampel tanah sebanyak 1g dimasukkan ke dalam larutan garam fisiologis steril NaCl (Merck) 0,05% dalam kondisi steril secara aseptis. Selanjutnya pengenceran seri 10 kali dituang ke dalam medium amilum agar (*Oxoid*). Masing-masing isolat yang telah teridentifikasi dalam penelitian sebelumnya sebagai isolat yang memiliki aktivitas amilolitik ditumbuhkan kembali dalam medium nutrisi agar sampai diperoleh isolate yang betul-betul murni.

Sepuluh isolat murni tersebut (kode isolat C1-C10) selanjutnya diinokulasikan ke dalam medium limbah cair tapioka 100 mL. Inokulasi dilakukan dalam tabung Erlenmeyer 250 mL dengan penggojogan 100 rpm dan pengambilan sampel dilakukan setiap hari. Pengamatan sampel yang meliputi analisis produksi gula pereduksi dan kemampuan menghasilkan PHA oleh sepuluh isolat dilakukan setiap hari selama 3 hari.

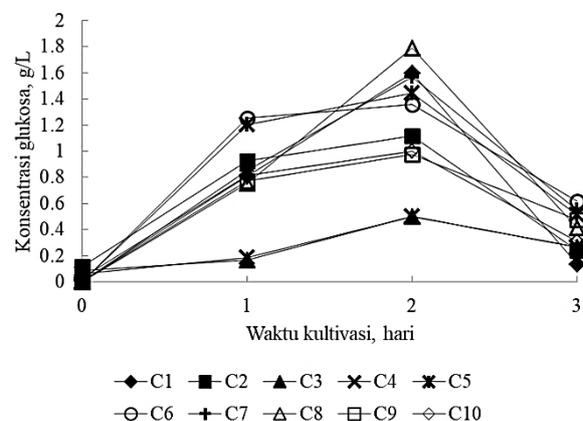
Analisis gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan 1 ml sampel yang ditambahkan dengan 1 ml reagen DNS (Merck, *p.a.*). Campuran dipanaskan sampai mendidih dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 570 nm dan dibandingkan dengan kurva standar glukosa (Baskan *et al.*, 2016).

Pemanenan PHA dilakukan dengan melarutkan pelet sel hasil sentrifugasi menggunakan sonikator (Branson 1510) pada kondisi 22 kHz, 65  $\mu$ A selama 3 menit dengan pengaturan 30 detik pemecahan sel dan 30 detik pendinginan berselang seling. Selanjutnya PHA diekstraksi menggunakan kloroform (Merck, *p.a.*). Kloroform diuapkan pada suhu kamar selama 24 jam sampai didapatkan serbuk PHA yang kering. Analisis kuantitatif PHA dilakukan dengan menambah  $H_2SO_4$  (Merck, *p.a.*) yang menghasilkan asam krotonik. Kandungan asam krotonik diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 235 nm (Putra

dkk., 2007). Sebagai verifikasi tambahan, analisis gugus fungsi PHA juga dilakukan menggunakan FTIR (Vinish *et al.*, 2015).

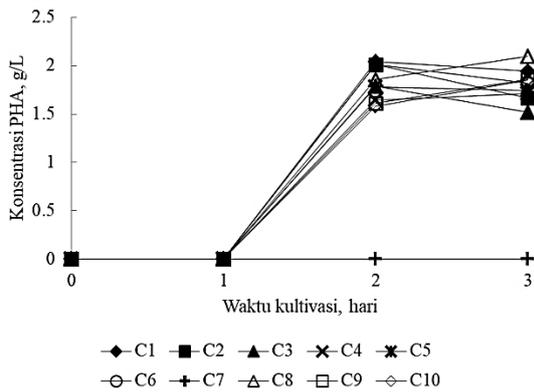
## 3. Hasil dan Pembahasan

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa bakteri hasil isolasi dari rhizosfer *Canna edulis*, Kerr., yaitu strain dengan kode C1-C10, memiliki aktivitas katalitik pada medium limbah cair tapioka. Kemampuan katalitik bakteri hasil isolasi teridentifikasi dari kemampuan isolate untuk menghidrolisis amilum di dalam substrat sebagai sumber karbon utama. Kemampuan bakteri hasil isolasi dalam menghidrolisis limbah cair tapioka dapat dideteksi dari produk gula pereduksi yang dihasilkan. Gambar 1 menunjukkan bahwa seluruh isolat yang digunakan dalam penelitian ini dapat menghasilkan gula pereduksi, yang dalam hal ini adalah glukosa. Konsentrasi glukosa tertinggi dihasilkan oleh isolat C8 yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki aktivitas amilolitik yang relatif paling tinggi dibandingkan sembilan isolat lain yang dipelajari dalam penelitian ini.



**Gambar 1.** Produksi glukosa oleh berbagai isolat pada substrat limbah cair tapioka

Gula pereduksi yang dihasilkan berupa glukosa. Glukosa selanjutnya dimetabolisme lebih lanjut oleh bakteri hasil isolasi menjadi PHA. Produksi PHA oleh sepuluh isolat dalam penelitian ini disajikan dalam Gambar 2.



**Gambar 2.** Produksi PHA (dalam g/L) oleh sepuluh isolat bakteri dari rhizosfer *Canna edulis*

Gambar 2 menunjukkan bahwa seluruh isolat yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki kemampuan menghasilkan glukosa dan sekaligus menghasilkan PHA kecuali isolat C7. Isolat C7 mampu menghasilkan glukosa saja, tetapi tidak berlanjut dengan metabolisme pembentukan PHA.

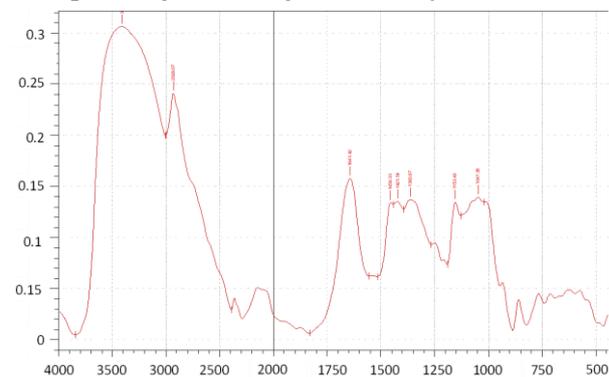
Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa kesepuluh isolat dalam penelitian ini memiliki karakter yang berbeda dalam hal pembentukan glukosa dan PHA. Isolat yang mampu menghasilkan glukosa dalam jumlah cukup banyak, belum tentu memiliki kemampuan yang tinggi pula dalam mengkonversi glukosa tersebut menjadi PHA. Baik karakter memecah amilum menjadi glukosa maupun mengkonversi glukosa menjadi PHA adalah dua karakter yang sama pentingnya dalam proses produksi PHA dari limbah tapioka. Oleh karena itu, dirumuskan parameter produktivitas sebagai acuan pemilihan isolat bakteri yang akan dikembangkan lebih lanjut. Parameter produktivitas dirumuskan secara empiris sebagai hasil kali antara konsentrasi glukosa yang dihasilkan dan konsentrasi PHA yang dihasilkan. Dengan mengacu pada parameter produktivitas ini maka bisa dipilih satu isolat yang relatif paling baik dari kesepuluh isolat yang diteliti.

Tabel 1 menunjukkan nilai parameter produktivitas dari kesepuluh isolat yang dipelajari. Dari nilai-nilai parameter di Tabel 1, dapat disimpulkan bahwa isolat yang memiliki potensi produktivitas terbaik adalah isolat C8.

**Tabel 1.** Komparasi isolat bakteri berdasarkan nilai parameter produktivitas

Isolat	Konsentrasi glukosa (g/L)	Produksi PHA (g/L)	Parameter produktivitas (konsentrasi glukosa) x (produksi PHA)
C1	1,598	1,940	3,101
C2	1,116	1,670	1,864
C3	0,502	1,515	0,760
C4	0,502	1,710	0,858
C5	1,441	1,735	2,500
C6	1,356	1,820	2,4676
C7	1,567	0	0
C8	1,788	2,095	3,266*
C9	0,973	1,860	2,056
C10	0,998	1,845	1,840

Untuk verifikasi lebih lanjut bahwa hasil metabolisme isolat C8 adalah PHA, dilakukan analisis gugus fungsi menggunakan FTIR. Hasil analisis produk PHA dari isolat C8 menggunakan FTIR disajikan dalam Gambar 3 dan komparasi dengan PHA standar (Gatechew dan Woldesenbet, 2016; Giedraityte dan Kalediene, 2016; Diez-pascual dan Diez-vicente, 2014) disajikan pada Tabel 2. Perbandingan dengan standar menunjukkan verifikasi bahwa isolat C8 mampu mengkonversi glukosa menjadi PHA.



**Gambar 3.** Hasil analisis FTIR sampel PHA isolat C8

**Tabel 2.** Gugus fungsi pada PHA hasil isolate C8

Puncak pada sampel	Puncak pada standar	Gugus fungsi
1047,35	1055,01	C-O
1363,67	1379,05	CH <sub>3</sub>
1454,22	1452,35	CH <sub>2</sub>
1641,42	1732,03	C=O
2929,87	2933,68	C-H
3408,22		O-H

#### 4. Kesimpulan

Rhizosfer *Canna edulis* Kerr. mengandung mikroorganisme amilolitik yang potensial untuk produksi PHA dari limbah yang mengandung amilum. Penelitian ini telah menguji 10 strain hasil isolasi dari rhizosfer *Canna edulis* Kerr. untuk menyeleksi isolat yang mampu mengkonversi amilum menjadi PHA. Di antara kesepuluh isolat tersebut, diperoleh satu isolat yang relatif paling baik dalam hal produksi glukosa maupun konversi glukosa menjadi PHA, yaitu isolat C8. Keberhasilan isolasi C8 sebagai isolat lokal Indonesia dapat mendorong produksi PHA karena selama ini kendala pengembangan bioplastik di Indonesia adalah bibit mikroorganisme yang harus impor. Oleh karena itu, disarankan isolat C8 perlu dipelajari lebih lanjut dalam bioreaktor yang lebih besar skalanya, untuk menguji stabilitas isolat ini terhadap kondisi proses yang tidak ideal.

#### Daftar Pustaka

- Baskan K.S., Tutem E., Akyuz E., Ozen S., and Apak R., 2016, Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction, *Tlanta*, 147, 162-168.
- Diez-Pascual N.H., and Diez-Vicente A.L., 2014, Poly(3-hydroxybutyrate)/ZnO bionanocomposites with improved mechanical, barrier and antibacterial properties, *Int. J. Mol.*, 15, 10950-10973.
- Gatechew A., and Woldensenbet F., 2016, Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material, *BMC Res.*, 9, 1-9.
- Giedraitys G. and Kalediene L., 2016. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from thermophilic *geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija* 26(1) 38-45.
- Nurhayati, Prijambada I.D., Radjasa O.K., dan Widada J., 2017, Repetitive element palindromic PCR (Rep-PCR) as a genetic tool to study diversity in amylolytic bacteria, *Advanced Science Letters*, 23, 6458-6461.
- Putra, J.A., Wiratni, Syamsiah S., and Redyowati, S., 2007, Kinetics of lysis and extraction of intracellular PHB by *Cupriavidus necator* (CCUG 52238 T) using differential method by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-chloroform", Seminar Nasional Teknik Kimia UNPAR, April 2007.
- Vinish V., Sangetta S.H., Aravand J., Kanmani P., and Sathiskumar T., 2015, Optimizing the nutrient feeding strategy for PHA production by a novel strain of *Enterobacter* sp., *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 12, 2757-2764.