

PRODUKSI BIOPLASTIK DARI PATI SAGU OLEH BAKTERI AMILOLITIK LOKAL MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN BERBEDA

PRODUCTION OF BIOPLASTIC FROM SAGO STARCH BY A LOCAL AMYLOLYTIC BACTERIA USING DIFFERENT NITROGEN SOURCE

Nur Arfa Yanti ¹, Nurhayani H. Muhiddin²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo, Kendari,

²Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kampus Hijau Bumi Tridharma,
Andunonohu, 93232
arfayanti73@yahoo.com

ABSTRACT

Bioplastic Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) is synthesized by bacteria and could potentially be used as a substitute for synthetic plastic. The utilization of sago starch as the cheapest carbon source, may help to reduce the cost of bioplastic PHB production. The effect of using different Nitrogen source on the PHB production from sago starch by a local amilolytic bacteria of Bacillus megaterium PSA10 was examined in this study. Nitrogen source were used in this study namely peptone, yeast extract, protease peptone, (NH₄)₂SO₄ and NH₄NO₃. PHB content was determined using spectrophotometric method. The highest of PHB production and growth B.megaterium PSA10 from sago starch were obtained with using (NH₄)₂SO₄ as N source, i.e. 50,55 % (per g cell dry matter) and 1,82 g/L cell dry, respectively. The concentration of (NH₄)₂SO₄ as much as 1 g/L (0,1%) which produce the highest bioplastic PHB with PHB content 51,32 %. Therefore, the use of (NH₄)₂SO₄ as Nitrogen source as much as 0,1 % is very well for PHB production from sago starch by a local amylolytic bacteria.

Keywords: Bioplastic, PHB, sago starch, Nitrogen source, amylolytic bacteria

ABSTRAK

Poli-β-hidroksibutirat (PHB) merupakan bioplastik yang disintesis oleh bakteri dan berpotensi digunakan sebagai pengganti plastik sintetik. Penggunaan pati sago sebagai sumber karbon murah dapat membantu menurunkan biaya produksi bioplastik PHB. Pengaruh sumber nitrogen yang berbeda pada produksi bioplastik PHB dari pati sago oleh bakteri amilolitik lokal, Bacillus megaterium PSA10 dikaji dalam penelitian ini. Sumber Nitrogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah pepton, yeast ekstrak, protease pepton, (NH₄)₂SO₄ dan NH₄NO₃. Kadar PHB dideterminasi menggunakan metode spektrofotometri. Produksi PHB dari pati sago dan pertumbuhan B. megaterium PSA10 tertinggi diperoleh dengan menggunakan (NH₄)₂SO₄ sebagai sumber N yaitu berturut-turut 50,55 % (g PHB/g berat kering sel) dan 1,82 g berat kering sel/L. Konsentrasi (NH₄)₂SO₄ sebanyak 1 g/L (0,1%) mampu menghasilkan bioplastik PHB yang tertinggi dengan kadar PHB 51,32 %. Dengan demikian, penggunaan (NH₄)₂SO₄ sebagai sumber nitrogen sebanyak 0,1 % sangat baik untuk memproduksi PHB dari pati sago oleh bakteri amilolitik lokal.

Kata kunci: Bioplastik, PHB, pati sago, sumber Nitrogen, bakteri amilolitik

1. PENDAHULUAN

Penggunaan plastik sintetik yang sulit didegradasi secara alami menimbulkan permasalahan di lingkungan yang semakin sulit diatasi. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengatasi pencemaran yang ditimbulkan oleh plastik sintetik, salah satunya mencari bahan baku plastik yang mudah didegradasi. Poli- β -hidroksibutirat (PHB) merupakan salah satu bahan baku plastik yang mudah didegradasi dan dapat digunakan sebagai pengganti plastik sintetik.

PHB merupakan polimer yang disintesis oleh mikroorganisme secara intraseluler dan memiliki sifat mirip dengan polietilen namun mudah didegradasi secara alami [1]. Pemanfaatan PHB sebagai bahan baku plastik sangat potensial untuk menggantikan plastik sintetik. Bioplastik PHB yang telah diproduksi pada skala industri masih menggunakan glukosa sebagai sumber karbonnya [2], sehingga harga PHB di pasaran masih tinggi dan tidak dapat bersaing dengan plastik sintetik. Hal ini menjadi kendala pengembangan PHB sebagai bahan baku plastik.

Penggunaan sumber karbon yang lebih murah dibandingkan glukosa untuk memproduksi PHB menjadi solusi yang tepat untuk pengembangan bioplastik PHB. Salah satu sumber karbon yang telah diteliti dan dapat dikembangkan untuk produksi PHB adalah pati sagu [3,4,5]. *Bacillus megaterium* PSA10 merupakan bakteri amilolitik lokal berasal dari Sulawesi Tenggara yang mampu memproduksi bioplastik PHB dari pati sagu [3], sehingga berpotensi digunakan untuk pengembangan bahan baku plastik yang lebih murah. Kemampuan *B.megaterium* PSA10 memproduksi PHB dari pati sagu masih perlu ditingkatkan dengan mengkaji komposisi nutrisi yang tepat.

Nitrogen merupakan salah satu nutrisi penting yang dibutuhkan oleh bakteri untuk memproduksi PHB, walaupun dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan karbon. Sumber nitrogen yang berbeda dapat mempengaruhi produksi PHB oleh bakteri tertentu. Beberapa jenis bakteri membutuhkan sumber N kompleks seperti pepton, ekstrak yeast, ekstrak daging dan protease pepton untuk memproduksi PHB [6,7,8] dan ada beberapa jenis bakteri yang membutuhkan sumber N anorganik untuk memproduksi PHB [9;10]. Oleh karena itu, pada penelitian ini dikaji kemampuan bakteri amilolitik lokal, *B. megaterium* PSA10 dalam memproduksi bioplastik PHB dari substrat pati sagu menggunakan sumber Nitrogen yang berbeda.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *Bacillus megaterium* PSA10 [3]. Sumber C yang digunakan untuk produksi PHB adalah pati sagu dan sumber

N adalah pepton (oxoid), protease pepton (oxoid), ekstrak yeast (merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 . Bahan kimia yang digunakan meliputi seperangkat bahan untuk ekstraksi PHB yang meliputi dietil eter, aseton, etanol, sodium hipoklorit, asam sulfat pekat dan bahan kimia untuk media produksi yaitu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, *Ferrous Amonium Citrate*, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *laminar air-flow*, autoklaf, spektrofotometer UV, inkubator *shaker*, sentrifuse, oven dan *water bath*.

2.2. Produksi PHB

Produksi PHB dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri *B.megaterium* PSA10 sebanyak 5 % (v/v) pada medium minimal pati sagu [3] dengan sumber N berbeda, yaitu pepton, protease pepton, ekstrak yeast, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 . sebanyak 0,1 % (b/v). Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu 30°C selama 72 jam [3]. Sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi kultur cair pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit.

2.3. Ekstraksi dan Analisis Kuantitatif PHB

PHB diekstraksi dari massa sel (pelet) yang dipecah menggunakan larutan sodium hipoklorit 5% selama 24 jam. Ekstraksi PHB dilakukan menggunakan metode *acetone*-dietil eter [3]. Polimer PHB yang diperoleh ditambahkan dengan asam sulfat pekat selanjutnya dipanaskan selama 10 menit pada suhu 100°C dalam *waterbath*. Kadar PHB ditentukan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dengan pelarut asam sulfat pekat.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Deskripsi Bakteri Amilolitik lokal, *Bacillus megaterium* PSA10

Bacillus megaterium PSA10 merupakan strain bakteri yang diisolasi dari lokasi pengolahan sagu di Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara [3]. *B. megaterium* PSA10 adalah anggota genus *Bacillus* dengan morfologi sel berbentuk basil (batang) dan bersifat Gram positif [3]. Strain bakteri ini memiliki aktivitas amilolitik sehingga mampu menghidrolisis pati sagu menjadi glukosa dan selanjutnya glukosa dikonversi menjadi PHB [4]. Aktivitas amilolitik yang dimiliki oleh *B.megaterium* PSA10, menyebabkan strain bakteri ini mampu memproduksi PHB secara langsung dari pati sagu [4]. Kemampuan *B. megaterium* PSA10 memproduksi PHB secara langsung dari pati sagu merupakan suatu keunggulan karena tidak membutuhkan perlakuan pendahuluan substrat pati sagu

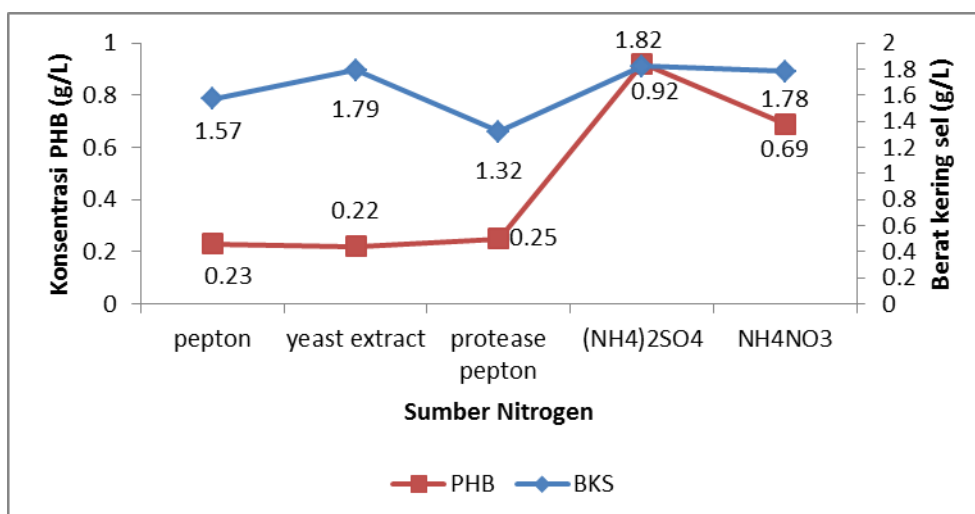
menjadi hidrolisat pati sagu menggunakan enzim, seperti yang dilakukan oleh Syamsu *et al.* [5] sehingga lebih efisien dari segi waktu dan biaya.

Sumber Nitrogen merupakan nutrisi yang cukup penting untuk dikaji dalam produksi PHB, selain sumber karbon. Sumber dan konsentrasi nitrogen dalam media, dapat mempengaruhi produksi PHB oleh bakteri. Sumber N berbeda yang digunakan oleh *B.megaterium* PSA10, menunjukkan produksi PHB yang berbeda pula.

3.2. Pertumbuhan dan Produksi PHB oleh *B. megaterium* PSA10 Menggunakan sumber Nitrogen berbeda

PHB disintesis oleh bakteri pada kondisi substrat dengan sumber C berlebih sedangkan N dan P terbatas [11]. Walaupun demikian, nitrogen merupakan nutrisi penting yang dibutuhkan oleh bakteri untuk pertumbuhan dan memproduksi PHB [8]. Annuar *et al.* [8] dan Wei *et al.* [12] juga menyatakan bahwa penambahan sumber N yang berbeda dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi PHB bakteri. Penggunaan sumber N yang tepat pada media produksi, dapat meningkatkan kadar PHB yang diproduksi oleh PHB [6,7,8]. Oleh karena itu, optimasi sumber N pada media produksi PHB untuk isolat bakteri *indigenus* dengan substrat baru seperti pati sagu penting dilakukan untuk mengetahui sumber N yang tepat.

Pertumbuhan dan konsentrasi PHB yang diakumulasi oleh *B.megaterium* PSA10 dari substrat pati sagu menggunakan berbagai sumber N ditampilkan pada Gambar 1. Sumber N yang digunakan meliputi sumber N organik kompleks dan sumber N anorganik. Pertumbuhan *B.megaterium* PSA10 diukur berdasarkan berat kering sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sumber N berpengaruh pada pertumbuhan dan produksi PHB *B.megaterium* PSA10.

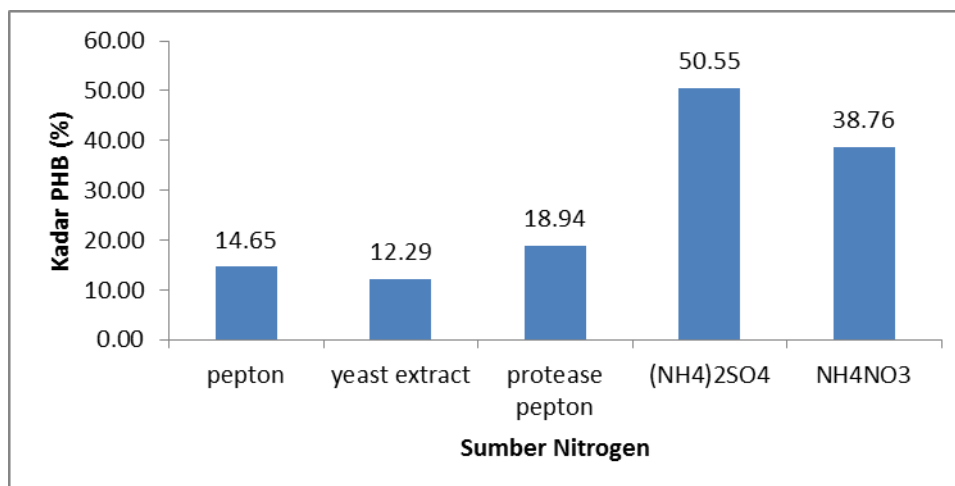


Gambar 1. Grafik pertumbuhan dan akumulasi PHB pada *B. megaterium* PSA10 pada berbagai sumber Nitrogen setelah 72 jam.

Pertumbuhan *B.megaterium* PSA10 pada sumber N organik kompleks seperti pepton, ekstrak yeast dan protease pepton lebih tinggi dibandingkan konsentrasi PHB yang diakumulasi, sedangkan pada sumber N anorganik yaitu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan NH_4NO_3 pertumbuhannya seiring dengan konsentrasi PHB yang diakumulasi di dalam selnya (Gambar 1). Hasil ini mengindikasikan bahwa N organik lebih mendukung pertumbuhan sel *B.megaterium* PSA10 dibandingkan sintesis PHB, sedangkan Nitrogen anorganik mendukung pertumbuhan dan sintesis PHB. Hal ini mungkin disebabkan karena N anorganik lebih mudah larut dibandingkan N organik sehingga lebih tersedia untuk digunakan oleh bakteri tersebut. Tepe *et al.* [16] menyatakan bahwa N anorganik lebih tersedia untuk digunakan oleh mikroorganisme dibandingkan N organik karena lebih mudah larut. Lee [2] juga menyatakan bahwa sumber N dalam bentuk garam ammonium lebih banyak digunakan untuk mensintesis PHB menggunakan berbagai macam sumber karbon oleh mikroorganisme..

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada sumber N organik, pertumbuhan *B.megaterium* PSA10 paling tinggi diperoleh pada media yang mengandung ekstrak yeast (berat kering sel 1,79 g/L) selanjutnya pada pepton (1,57 g/L) sedangkan pada sumber N protease pepton pertumbuhannya yang terendah (1,32 g/L) (Gambar 1). Namun sebaliknya, PHB yang diakumulasi paling tinggi diperoleh pada sumber N protease pepton (0,25 g/L) selanjutnya pada pepton (0,23 g/L) dan paling rendah diperoleh pada ekstrak yeast (0,22 g/L). Hal ini mungkin disebabkan karena kadar N yang cukup tinggi pada ekstrak yeast yaitu 0,31 g N/g ekstrak yeast [8] sedangkan kadar N pepton dan protease pepton yang rendah yaitu berturut-turut 0,12 g N/g pepton dan 0,11 g N/g protease pepton [8] sehingga pertumbuhan *B.megaterium* PSA10 pada ekstrak yeast lebih tinggi dibandingkan pada pepton dan protease pepton sedangkan akumulasi PHBnya paling rendah dibandingkan kedua sumber N organik tersebut. Hasil ini mengindikasikan bahwa kadar N yang tinggi pada substrat lebih mendukung pertumbuhan dibandingkan sintesis PHB. Hasil penelitian ini didukung oleh Byrom [11] yang menyatakan bahwa pada media yang mengandung nitrogen cukup tinggi, mikroorganisme akan menggunakan sumber C untuk pertumbuhannya dibandingkan untuk sintesis PHB. PHB disintesis oleh mikroorganisme pada kondisi substrat tidak seimbang, yaitu kadar C tinggi sedangkan kadar N dan P terbatas sehingga karbon yang berlebih akan dikonversi menjadi polimer PHB sebagai cadangan makanan. [11].

Produksi PHB oleh *B.megaterium* PSA10 yang ditampilkan pada Gambar 2 merupakan kemampuan bakteri tersebut menghasilkan bioplastik PHB dari substrat pati sagu menggunakan berbagai macam sumber N. Produksi PHB dinyatakan berdasarkan persentase PHB per berat kering sel.

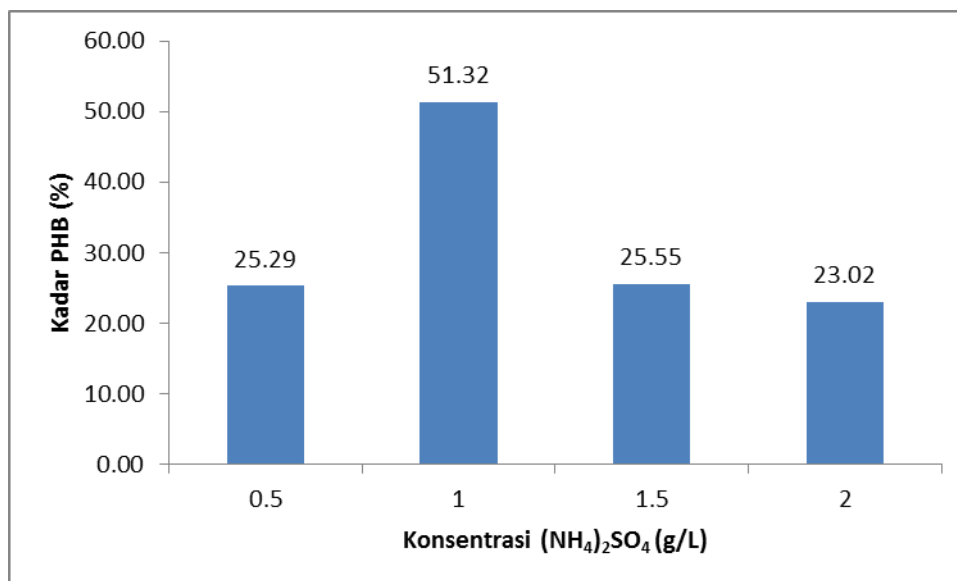


Gambar 2. Histogram produksi PHB *B.megaterium* PSA10 pada berbagai macam sumber Nitrogen setelah 72 jam

Produksi PHB tertinggi diperoleh dari media yang menggunakan sumber Nitrogen (NH₄)₂SO₄ yaitu 50,55 % (g PHB/g berat kering sel) sedangkan yang terendah diperoleh dari sumber N ekstrak yeast yaitu 11,83%. Gambar 2 juga menunjukkan bahwa *B.megaterium* PSA10 mampu memproduksi PHB lebih tinggi pada sumber N anorganik dibandingkan sumber N organik (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa *B.megaterium* PSA10 lebih efisien menggunakan sumber N anorganik untuk produksi PHB dibandingkan sumber N organik. Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kebanyakan bakteri penghasil PHB menggunakan sumber N anorganik yaitu (NH₄)₂SO₄ untuk produksi PHB seperti *Cupriavidus necator* NRRL 14690 [13], *Alcaligenes latus* ATCC 29713 [9], *B. mycoides* RLJB-017 [14], *Rhodobacter sphaeroides* ES-16 [10], *Pseudomonas pseudoflava* ATCC 33668, *P.cepacia* ATCC 17759 dan *Micrococcus halodenitrificans* NRC 14024 [15].

3.2. Optimasi konsentrasi (NH₄)₂SO₄ untuk Produksi PHB oleh *B.megaterium* PSA10 dari substrat pati sagu

Berdasarkan hasil optimasi sumber Nitrogen pada produksi PHB oleh *B.megaterium* PSA10 dari substrat pati sagu, diperoleh sumber N terbaik untuk produksi PHB adalah (NH₄)₂SO₄, maka selanjutnya dilakukan optimasi konsentrasi (NH₄)₂SO₄ agar diketahui konsentrasi yang tepat untuk produksi PHB. Hasil optimasi konsentrasi (NH₄)₂SO₄ ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Optimasi konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada produksi PHB oleh *B.megaterium* PSA10 dari substrat pati sagu

Gambar 3 menunjukkan bahwa konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang optimum untuk produksi PHB oleh bakteri amilolitik lokal *B.megaterium* PSA10 adalah 1 g/L (0,1%). Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang lebih dari 1 g/L menurunkan kemampuan bakteri tersebut memproduksi PHB. Hasil ini mengindikasikan bahwa *B.megaterium* PSA10 membutuhkan kadar nitrogen terbatas untuk memproduksi PHB dari pati sagu. Hasil penelitian sebelumnya [17] diperoleh informasi bahwa konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang lebih dari 1 g/L akan digunakan oleh *B.megaterium* PSA10 untuk pertumbuhan sel dibandingkan untuk mensintesis PHB. Hal ini didukung oleh Byrom [11] yang menyatakan bahwa pada media produksi PHB yang mengandung nitrogen dengan konsentrasi tinggi, maka sumber karbon yang terdapat pada media tersebut akan digunakan untuk pertumbuhan bakteri dibandingkan untuk sintesis PHB.

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh informasi bahwa sumber nitrogen dan konsentrasi N sangat berpengaruh dalam produksi PHB oleh *B.megaterium* PSA10. Sumber N yang terbaik digunakan untuk memproduksi PHB dari pati sagu adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan konsentrasi 1 g/L (0,1 %).

4. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditjen Dikti yang telah menyediakan dana untuk pelaksanaan program penelitian hibah Fundamental tahun 2015.

5. PUSTAKA

- [1] Chen, Guo-Qiang. 2003. Microbial Production of Bioplastics-Polyhydroxyalkanoate. *International Conference on Bio-Based Polymers*. Riken Institute Tokyo, Japan.
- [2] Lee, S.Y. 1996. Plastic Bacteria? Progress and Prospect for Polyhydroxyalkanoate Production in Bacteria. *Tibtech* **14** : 431-438.
- [3] Yanti, N.A., Sembiring, L. & Margino, S. 2009. Production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from sago starch by the native isolate *Bacillus megaterium* PSA10. *Indonesian Journal of Biotechnology* **14** (1) : 1111-1116.
- [4] Yanti, N.A., Sembiring, L., Margino, S. & Muhiddin, N.H. 2013. A Study on Production of Poly- β -Hydroxybutyrate Bioplastic From Sago Starch by Indigenous Amyolytic Bacteria. *Indonesian Journal of Biotechnology* **18** (2) : 144-150.
- [5] Syamsu, K., Fauzi. A.M, Hartoto, L., Suryani, A. & Atifah, N. 2006. Utilization of Hydrolyzed Sago Starch as Main Substrate for the Production of Bioplastic Poly Hydroxy Butyrate (PHB) By *Ralstonia eutropha* on Fed Batch Cultivation System. *Proceedings The Era of Bioscience Challenge and Hope*. The Fifth Regional IMT-GT Uninet Conference & International Seminar 2006. Faculty of Agriculture Universitas Sumatera Utara, Medan, 22 -23 June 2006.
- [6] Yuksekdog, Z.N., Aslim, B., Beyatli, Y. & Mercan, N. 2004. Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Incubation Times on Poly-Beta-hydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology* **3** (1) : 63-66.
- [7] Page, W.J. 1992. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiology Reviews* **103** : 149-158.
- [8] Annuar, M.S.M., Irene, K.P.T. & Ramachandran, K.B. 2008. Evaluation of nitrogen sources for growth and production of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) from palm kernel oil by *Pseudomonas putida* PGA1. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **16** (1) : 11-15
- [9] El-Sayed, A. A, Abdelhady, H. M., Abdel Hafez, A.M. & Khodair, T.A. 2009. Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies. *Journal of Applied Sciences Research* **5** (5): 556-564
- [10] Sangkharak, K. & Prasertsan, P. 2008. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electronic Journal of Biotechnology* **11** (3) : 1-11.
- [11] Byrom, D. 1987. Polymer Synthesis by Micoorganisms : Technology and Economics. *Tibtech* **5** : 246 – 250.

- [12] Wei, YH., Chen, WC., Huang, CK., Wu, HS., Sun, YM., Lo, CW. & Janarthanan, OM. 2011. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* **12** : 254-265
- [13] Patwardhan, P.R. & Srivastava, A.K. 2004. Model-based fed-batch cultivation of *Ralstonia eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal* **20** : 21-26
- [14] Borah, B., Thakur, P.S. & Nigam, J.N. 2002. The Influence of Nutritional and Environmental Conditions on the Accumulation of Poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology.* **92** : 776-783
- [15] Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P. & Ramsay, J.A. 1990. Production of Poly-(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (7) : 2093-2098.
- [16] Tepe, Y., Naz, M. & Turkmen, M. 2006. Utilization of Different Nitrogen Sources by Culture of *Scenedesmus acuminatus*. *Turkish journal of fisheries and Aquatic science* **6** : 123-127.
- [17] Yanti, N.A., Margino, S. & Sembiring, L. 2010. Optimasi Produksi Poli- β -hidroksibutirat (PHB) oleh *Bacillus* sp. PSA10. *Biota* **15** (3) : 331-339.