

PRODUKSI ALGINAT OLEH BAKTERI *Azotobacter vinelandii* DALAM MEDIUM LIMBAH CAIR TAPIOKA

Oleh:

Nurjanah, W. Trilaksani, S. Purwaningsih¹ dan Wahyuliastuti²

PENDAHULUAN

Alginat umumnya diproduksi dari alga coklat dan telah diusahakan secara komersial di beberapa negara subtropis. Jenis alga coklat yang biasa digunakan sebagai bahan baku penghasil alginat adalah: *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea*, *L. japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia masima*, dan *Eisenia bicyclis*. Jenis-jenis alga coklat ini hanya baik hidupnya di perairan subtropis, sedangkan di Indonesia yang beriklim tropis tidak terdapat jenis-jenis tersebut. Alga coklat yang terdapat di Indonesia hanyalah beberapa jenis dari *Sargassum* dan *Turbinaria* (Indriani dan Sumiarsih, 1992). Namun sejauh ini belum ada usaha budidayanya. Sehingga usaha pengolahan alginat dari rumput laut tidak memungkinkan, karena kontinuitas bahan baku tidak terjamin. Sementara itu kebutuhan akan alginat cukup tinggi, bahkan cenderung meningkat terus yang dimanfaatkan dalam industri, khususnya industri tekstil dan industri pangan. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut Indonesia sampai saat ini masih mengimpor dari RRC, Perancis, Jepang, dan Jerman. Jumlah impor alginat pada tahun 1991 adalah 1 721 445 kg d(BPS, 1992).

Dalam rangka mengantisipasi permintaan alginat yang semakin meningkat, perlu dipikirkan upaya untuk mencari alternatif lain dalam menghasilkan alginat. Salah satu alternatif untuk menghasilkan alginat dengan dimanfaatkan mikroorganisme.

Menurut Jarman et al. (1978) bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan beberapa galur baktteri *Azotobacter vinelandii* dapat memproduksi alginat yang mirip dengan alginat yang dihasilkan dari alga.

Produksi alginat dengan menggunakan bakteri memerlukan investasi yang tinggi dalam peralatan maupun bahan kimia serta medium untuk pertumbuhan. Untuk itu perlu dicoba penggunaan medium limbah cair tapioka (LCT) yang banyak terdapat di Bogor dan belum ditangani. Dengan demikian penggunaan limbah cair tapioka diharapkan dapat mengurangi pencemaran lingkungan pada batas-batas tertentu serta dapat meningkatkan nilai tambah dari LCT dalam menghasilkan alginat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari penggunaan LCT sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme dalam menghasilkan alginat serta mengetahui pengaruh penambahan mineral dan waktu inkubasi pada kultur *Azotobacter vinelandii* guna menghasilkan alginat.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Azotobacter vinelandii* yang diperoleh dari laboratorium BCC Balai Penelitian Veteriner Bogor dengan kode ATCC 837 a atau BCC 2026. Bahan untuk medium pertumbuhan yaitu limbah cair tapioka yang diambil dari industri pengolahan tapioka akyat di daerah Ciluar Bogor.

¹ Staff Pengajar Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan IPB

² Alumnus Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan IPB.

Bahan kimia yang digunakan untuk mengekstrak alginat adalah isopropanol, Na₂EDTA dan NaCl. Uji residu gula dengan larutan DNS.

Alat-alat yang digunakan adalah: pengaduk magnetik, pipet, sentrifusi, ose, spektrofotometer, viskometer, oven, inkubator goyang, otoklaf serta alat bantu lainnya.

Metode Penelitian

Bakteri diaktifkan pada medium padat dan cair selama 3 hari pada suhu 34°C. Untuk medium pada ditambahkan bacto agar 1.5%. Komposisi medium untuk pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Medium Dalam Satu Liter Larutan

Komponen	Medium	
	I	II
Sukrosa (g)	20	20
Na ₂ asetat (g)	2	-
K ₂ HPO ₄ (g)	1.20	-
KH ₂ PO ₄ (g)	0.30	-
CaSO ₄ 2 H ₂ O (g)	0.15	-
MgSO ₄ 7H ₂ O (g)	0.10	-
FeSO ₄ 7H ₂ O (mg)	15	-
Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O (mg)	0.70	-
Limbah cair tapioka	-	-
	1000 ml	1000 ml

Keterangan:

I LCT (+) = Limbah Cair Tapioka ditambah mineral

II LCT (-) = Limbah Cair Tapioka tanpa ditambah mineral

1. Propagasi pada berbagai medium yang diinkubasikan pada suhu 34°C, dengan pH 6,5 dan kecepatan goyang 140 rpm. Inkubasi dilakukan dari hari 1, 2, 3, 4, 5, dan 6. Pada kultur cair diadakan pengamatan terhadap viskositas, massa kering sel, konsentrasi alginat dan residu gula.
2. Pengukuran viskositas dilakukan dengan viskometer Brookfield Model MB, menggunakan Spindel No.1 pada kecepatan 60 rpm.
3. Pengukuran massa kering sel (modifikasi Metode Jarman et al, 1979). Kultur cair 25 ml dicampur Na₂EDTA 0,5M sebanyak 0,8 ml, diaduk secara seksama, disentrifusi pada kecepatan 2000 rpm selama 30 menit. Filtrat diambil untuk diukur konsentrasi alginatnya. Endapan dibilas beberapa kali dengan aquadest dan disentrifusi kembali pada 2000 rpm selama 30 menit. Endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 24 jam, kemudian ditimbang sebagai massa kering sel.
4. Pengukuran konsentrasi alginat (modifikasi metode Jarman et al, 1978). Filtrat dari pengukuran massa kering sel diambil sebanyak 50 ml. Filtrat ditambah NaCl 5N sebanyak 1.6 ml dan isopropanol 95% sebanyak 150 ml, diaduk secara seksama selama 10 menit, dan disentrifusi lagi selama 30 menit pada kecepatan 2000 rpm. Isopropanol segar ditambahkan untuk mengendapkan alginat. Alginat yang didapatkan dikeringkan pada suhu 45°C sampai diperoleh berat konstan. Alginat ditimbang dan berat yang didapatkan merupakan alginat kasar.
5. Penentuan residu gula dengan metode DNS (Dinitrosalisilat)

HASIL DAN PEMBAHASAN

LCT yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari industri pengolahan tapioka rakyat di daerah Ciluar, Bogor. Limbah ini berasal dari proses pengendapan tepung tapioka. Kadar mineral LCT yang diuji dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Limbah Cair Tapioka

Komponen	Nilai
Bahan organik total	2514.41 ppm
Total Amonia Nitrogen (NH ₃ -N)	11.89 ppm
Total fosfat	24.02 ppm
Orthofosfat	16.32 ppm
Kalsium (Ca)	18.70 ppm
Magnesium (Mg)	4.64 ppm
Natrium (Na)	2.68 ppm
Besi (Fe)	2.30 ppm
Total Gula	0.11 g/l
pH	3.76

Dari hasil pengujian bakteri diketahui bahwa bakteri *Azotobacter vinelandii* merupakan jenis bakteri gram negatif, bentuk batang (tunggal atau bergerombol menyerupai rantai) serta bersifat motil. Total Plate Count awal adalah 2.2×10^7 /ml.

Viskositas Kultur

Berdasarkan pengujian viskositas kultur pada medium LCT(+) dan LCT(-) diperoleh data yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Viskositas Rata-rata Kultur *A. Vinelandii* dalam medium LCT (+) dan LCT (-)

Viskositas (cps)	Lama inkubasi (hari)					
	1	2	3	4	5	6
LCT (+)	3.80	4.70	4.95	5.10	4.65	4.50
LCT (-)	3.50	3.55	3.65	3.80	3.55	3.45

Dari Tabel 3 terlihat bahwa penggunaan LCT ditambah mineral viskositasnya meningkat dari hari kesatu sampai hari keenam. Sedangkan LCT(-) viskositasnya relatif sama dari hari kesatu sampai hari keenam. Jika dibandingkan nilai viskositas (LCT (+) dengan LCT(-) maka viskositas LCT(+) lebih tinggi. Viskositas maksimum diperoleh pada hari keempat, sama dengan hasil yang dicapai oleh Chen *et al* (1985) pada kondisi inkubasi yang sama dengan menggunakan medium sintesis. Menurut Couperwhite dan Mc.Collum (1975) peningkatan viskositas kultur terjadi bersamaan dengan produksi polisakarida ekstraseluler yang larut dalam air, peningkatan polisakarida ini diduga memegang peranan penting dalam peningkatan viskositas kultur.

Polisakarida ekstraseluler dibedakan dalam dua bentuk yaitu kapsul yang bersatu dengan dinding sel dan lendir yang terkumpul banyak diluar dinding sel dan berdifusi kedalam media kultur. Selama pertumbuhan bakteri, polisakarida ini menambah tekstur gum koloni bakteri menjadi media pada atau menyebabkan peningkatan viskositas pada media cair (Kang dan Kotrel, 1978).

Konsentrasi Alginat

Hasil pengukuran konsentrasi alginat dalam medium LCT(+) dan LCT(-) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Konsentrasi Alginat Rata-rata Kultur Bakteri *A. vinelandii* dalam medium limbah cair tahu.

Konsentrasi alginat (g/l)	Lama inkubasi (hari)					
	1	2	3	4	5	6
LCT (+)	1.71	2.22	4.05	5.73	3.04	2.13
LCT (-)	1.25	3.68	4.52	4.95	3.78	1.51

Konsentrasi alginat kultur *Azotobacter vinelandii* dalam medium LCT(+) dan LCT(-) menunjukkan peningkatan setelah inkubasi 1 hari. Peningkatan tersebut mencapai maksimum pada hari ke-4, yaitu 5.93 g/l untuk LCT(+) dan 4.53 g/l untuk LCT(-). Hasil konsentrasi alginat pada hari ke-4, sama dengan yang dicapai oleh Chen *et al* (1985) yaitu sebesar 5.5 g/l dengan menggunakan medium sintesis pada kondisi inkubasi yang sama.

Peningkatan konsentrasi alginat ini disebabkan karena pada awal pertumbuhan bakteri masih menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungannya, sehingga alginat yang dibentuk juga kecil. Hal ini sesuai dengan pendapat Horan *et al* (1981) yang menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri dalam medium dengan kandungan fosfat terbatas dan sukrosa sebagai satu-satunya sumber karbon, produksi alginat dimulai segera setelah awal pertumbuhan eksponensial.

Untuk mendapatkan konsentrasi alginat yang maksimum diperlukan mineral dalam jumlah optimum seperti yang diusulkan oleh Chen *et al* (1985) ke dalam medium pertumbuhan bakteri. Limbah cair tapioka yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri mengandung komponen mineral seperti yang tercantum pada Tabel 2. Mineral-mineral tersebut terdapat dalam jumlah yang sangat kecil dibandingkan dengan kebutuhan optimum untuk pertumbuhan bakteri *Azotobacter vinelandii*. Kalsium misalnya hanya terdapat pada kadar 0.0000187 gram per liter dibandingkan dengan kalsium yang dibutuhkan untuk mendapatkan pertumbuhan optimum sebesar 0.075 g/l. Mineral-mineral lain seperti Mg, Na, Fe, dan total fosfat berturut-turut terdapat dalam jumlah 0.00000464 g/l, 0.00000268, 0.0000023, 0.000024 g/l. Rendahnya kadar mineral ini menyebabkan perlunya penambahan mineral sampai kadar optimum ke dalam medium pertumbuhan guna mendapatkan hasil alginat yang maksimum.

Menurut Deavin yang dikutip oleh Horan *et al* (1981), produksi alginat dengan menggunakan sukrosa sebagai satu-satunya sumber karbon tergantung pada konsentrasi fosfat inorganik awal. Pada fermentasi kontinyu dengan kondisi oksigen dan fosfat terkontrol, hasil alginat maksimum sebesar 45% dari sukrosa yang digunakan terjadi pada laju respirasi yang rendah. Pada laju respirasi yang lebih tinggi hasil produksi menurun secara drastis, sebab sebagian substrat dioksidasi menjadi karbondioksida. Rendemen alginat dalam biakan "batch" yang umum hanya mencapai 25% dari sukrosa yang digunakan. Chen *et al* (1985) menyatakan, bahwa produksi alginat bakteri berdasarkan jumlah sukrosa yang ditambahkan adalah sebesar 31%, atau lebih tinggi 6% dari yang dilaporkan Deavin. Pada penelitian ini, dari 20% sukrosa yang digunakan dalam satu liter medium LCT(+), maksimum alginat yang dihasilkan adalah sebesar 5.93 g atau kurang lebih 29% dari berat sukrosa yang ditambahkan. Untuk kultur dalam medium LCT(-), maksimum alginat yang dihasilkan sebesar 4.96 g atau kurang lebih 25% dari berat sukrosa yang digunakan.

Berdasarkan pendapat Annison dan Couperwhite (1986), asam polimannuronat dan poliguluronat merupakan komponen utama penyusun alginat bakteri. Annison dan Couperwhite juga meneliti variasi komposisi alginat pada tahap-tahap pertumbuhan yang berbeda dalam kultur "batch". Alginat dengan jumlah guluronat yang lebih besar diisolasi pada tahap awal pertumbuhan, sedangkan alginat dengan kandungan mannuronat lebih tinggi didapatkan pada kultur yang lebih tua.

Massa Kering Sel

Pengukuran massa kering dimaksudkan untuk melihat pertumbuhan bakteri. Hasil Pengukuran massa kering sel bakteri *Azotobacter vinelandii* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Massa Kering sel Rata-rata Kultur *Azotobacter vinelandii* dalam limbah cair tapioka

Masa kering sel g/l	Lama inkubasi (hari)					
	1	2	3	4	5	6
LCT (+)	0.055	0.140	0.220	0.455	0.285	0.145
LCT (-)	0.015	0.045	0.080	0.355	0.265	0.210

Massa kering sel tertinggi diperoleh pada lama inkubasi 4 hari dengan medium LCT(+) yaitu sebesar 0.455 g/l. Menurut Nurjanah (1993), massa kering sel yang terukur adalah massa kering sel bakteri baik yang hidup maupun yang mati, dan tidak menggambarkan massa sel yang terbentuk dan kemudian hilang karena sel melisis. Berdasarkan asumsi tersebut, diharapkan dengan peningkatan massa sel maka jumlah eksopolisakarida (alginat) yang dihasilkan oleh bakteri juga meningkat.

Residu Gula

Pengukuran residu gula bertujuan untuk mengetahui sukrosa sebagai sumber karbon yang dapat diubah oleh bakteri *Azotobacter vinelandii* menjadi alginat. Hasil pengukurannya dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Pengukuran Residu Gula Rata-rata Kultur *Azotobacter vinelandii* Dalam Medium Limbah Cair Tapioka

Konsentrasi alginat (g/l)	Lama inkubasi (hari)					
	1	2	3	4	5	6
LCT (+)	0.5790	0.2085	0.1465	0.0230	0.6345	0.0670
LCT (-)	0.8655	0.5034	0.2185	0.1395	0.3040	0.2285

Dari Tabel 6 terlihat kecenderungan turunnya residu gula pada kultur *Azotobacter vinelandii* dalam medium LCT (+) dan LCT(-) dengan bertambahnya waktu inkubasi. Penurunan residu gula selama inkubasi menunjukkan bahwa sukrosa digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon. Sukrosa akan diubah oleh bakteri menjadi alginat melalui jalur biosintesis yang dikemukakan oleh Pindar dan Bucke yang dikutip oleh Horan *et al* (1981).

Residu gula terendah diperoleh pada medium LCT(+) dengan masa inkubasi selama 4 hari, hal ini sesuai dengan jumlah alginat yang dihasilkan demikian juga dengan massa kering sel.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Limbah cair tapioka (LCT) dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan bakteri *Azotobacter vinelandii*.
2. Konsentrasi alginat terbesar diperoleh dari medium LCT(+) pada inkubasi 4 hari yaitu: 5.73 g/l
3. Residu gula cenderung menurun selama proses inkubasi dan terkecil pada hari ke 4 dari LCT(+) yaitu 0.0230%.
4. Viskositas dan massa kering sel tertinggi juga diperoleh pada medium LCT(+) dengan masa inkubasi 4 hari, sesuai dengan alginat yang dihasilkan.

Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk meneliti mutu alginat yang dihasilkan.
2. Aplikasi alginat yang dihasilkan pada produk perikanan.
3. Mempertahankan kondisi optimum selama masa inkubasi dengan cara kontrol pH dan suhu dalam selang waktu tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Annison, G. dan I Couperwhite. 1986. Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continous culture. Food Hydrocollaids. Volume 1 No. 2.
- BPS. 1992. Statistik Perdagangan Luar Negeri Indonesia. Biro Pusat Statistik. Jakarta.
- Chen, W.P; J.Y. Chen; S.C. Chang dan C.L. Su. 1995. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. Applied and Envir. Mic. Maret.
- Couperwhite, I. dan M.F. Mc Collum. 1975. Polysaccharide production and the possible occurence of GDP-D-Mannose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii*. Antonie van Leeuwenhoek 41.
- Horan, N. J; T.R. Jarman dan E.A. Dawes. 1981. Effect of carbon source and inorganic phosphate concentration of the production of alginic acid by mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved its biosyntehsis. Journal of General Microbiology. 127.
- 1993. Studies on enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grow in continous culture. Jorunal of General Microbiology. 129.
- Indriani, H. dan E. Sumiarsih. 1992. Budidaya Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Jarman, t. R;p L. Deavin; S. Slocombe dan R.C. Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental condition on the rate of exopolysacchrde synthesis in *Azotobacter vinelandii*. Journal of General Microbiology.
- Kang, K.S. dan I.W. Cottrell. 1979. Poly saccharides. Dalam Peppler dan Perlman (eds) Microbial Technology; Microbial Processes. Academic Press, New York.
- Nurjanah. 1993. Telaah Alginat yang Diproduksi oleh *Azotobacter vinelandii*. Thesis. fakultas Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.