

Berbagai Cara Hidrolisis Pati untuk Media Pertumbuhan *Bacillus* sp. BMN14 Penghasil Biosurfaktan Lipopeptida

Hydrolysis Methods of Starch for Culture Media of Bacillus sp. BMN14 Producing Biosurfactant Lipopeptide

NUR RICHANA^{1*}, ANI SURYANI², HELENA YUSUF MAKAGIANSAR² & TUN TEDJA IRAWADI²

¹Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²Jurusan Teknologi Industri, Fakultas IPB, Bogor 16002

Enzymatic and acid hydrolysis of starch for culture media of *Bacillus* sp. BMN14 producing lipopeptide biosurfactant were studied using cassava, arrowroot and sago starch. These starch hydrolysates were used as glucose substitute in the culture media of biosurfactant-producing bacteria. Starch hydrolyzed from arrowroot (73.08-83.5%) and cassava (80.0-87.98%) yielded glucose higher than sago (62.5-64.5%). Capability of the bacteria to produce biosurfactant represented as the amount of acid precipitate (0.78 g/l) and surface tension of the broth (33.6 mN/m) in the culture medium contained enzymatic hydrolyzed-starch.

Key words: lipopeptide biosurfactant, starch hydrolyzed, *Bacillus* sp.

Biosurfaktan adalah surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme, bersifat mudah terurai hayati (*biodegradable*) sehingga merupakan produk ramah lingkungan. Selain bersifat mudah terurai, biosurfaktan juga tidak beracun sehingga dapat dimanfaatkan untuk industri makanan dan kosmetik. Biosurfaktan yang sering digunakan untuk deterjen antara lain ialah sofrolipid dan lipopeptida atau disebut surfaktin (Caffrey & Cooper 1994, Yakimov *et al.* 1995).

Produksi biosurfaktan lipopeptida oleh *Bacillus* sp. menggunakan substrat 4% glukosa ditambah mineral dapat menurunkan tegangan permukaan dari 70-74 mN/m menjadi 28 mN/m (Cooper *et al.* 1981, Juwarkar *et al.* 1994). Semakin rendah tegangan permukaan semakin baik kualitas biosurfaktan terutama untuk deterjen. Richana *et al.* (1997) mendapatkan isolat bakteri indigenus Indonesia yaitu *Bacillus* sp. yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan lipopeptida dan dapat menurunkan tegangan permukaan sampai 33.4 mN/m.

Kultivasi mikrob untuk produksi biosurfaktan memerlukan sumber karbon sebagai substrat. Substrat bahan berpati seperti ubi kayu, sagu, dan garut dapat dimanfaatkan untuk sumber karbon dengan cara dihidrolisis dahulu menjadi glukosa. Indonesia kaya akan bahan berpati tersebut. Tahun 1997 Indonesia menghasilkan 15 juta ton pati singkong (Biro Pusat Statistik 1998). Produksi garut diperkirakan akan meningkat pada masa mendatang dengan adanya kebijakan pemerintah tahun 1998 untuk perluasan tanaman garut di bawah tegakan hutan rakyat. Pengolahan bahan berpati yang lebih beragam memungkinkan petani untuk mendapatkan harga yang lebih baik.

Dengan melihat potensi bahan berpati yang melimpah serta kekayaan biodiversitas mikrob di Indonesia maka perlu dilakukan penelitian mengenai pemanfaatan potensi tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kultivasi isolat *Bacillus* sp. BMN14 penghasil biosurfaktan lipopeptida menggunakan substrat hidrolisat bahan berpati.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Enzimatis Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Balitbio) dan di Laboratorium Rekayasa Bioproses PAU-Bioteknologi, IPB, Bogor. Pati ubi kayu diperoleh dari pabrik tapioka 'Setia' Bogor, pati garut diperoleh dari Malang dan sagu aren dari pengrajin kue di Ciampea Bogor.

Proses hidrolisis pati dilakukan dengan dua cara yaitu hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis. Hidrolisis cara asam dilakukan dengan membuat larutan pati 25% ditambah HCl 3% sampai pH mencapai 2.0-2.5, ditutup dengan kapas kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan uji Iod, bila masih coklat diautoklaf kembali selama 15 menit sampai uji Iod berwarna biru. Penambahan dengan NaOH dimaksudkan untuk mengatur pH 4.5-5.0 dan ditambah arang aktif 2% dari bobot cair, kemudian dipanaskan 70°C selama 60 menit, lalu disaring (Norman 1980).

Pembuatan hidrolisat pati ubi kayu, garut, dan sagu secara enzimatis melalui dua tahap liquifikasi dan sakarifikasi. Liquifikasi dilakukan dengan membuat suspensi pati 25% dan pH diatur 6.9 dengan CaCO₃, lalu ditambah *thermamy*, LS (α -amilase dari NUVD) sebanyak 0.6 ml/kg. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 95°C selama satu jam. Selanjutnya dilakukan proses

* Penulis untuk korespondensi, Tel. 62-251-337975, Fax. 62-251-338820, E-mail: borif@indo.net.id

sakrifikasi dengan mengatur pH 4.3 lalu ditambah enzim dekstrozim (glukoamilase dan pululanase) selama tiga hari. Hasil hidrolisis dipekatkan, diukur gula pereduksi dan rendemen.

Gula pereduksi dianalisis dengan pereaksi 3,5 dinitro salicilic acid (DNS) menurut Miller (1959), yaitu gula hasil hidrolisis pati yang telah dipekatkan sebanyak 1.0 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3.0 ml pereaksi DNS, lalu dipanaskan dalam air mendidih selama lima menit. Selanjutnya contoh didinginkan pada suhu kamar, kemudian diukur transmisinya pada panjang gelombang 550 nm. Larutan glukosa digunakan sebagai larutan standar.

Rendemen gula diamati dengan menimbang berat gula (hasil hidrolisis pati yang dipekatkan) dan membandingkan dengan berat pati yang digunakan. Hasil hidrolisis (gula) tersebut kemudian digunakan untuk media kultivasi *Bacillus* sp. BMN14.

Isolat *Bacillus* sp. BMN14 diperoleh dari penelitian sebelumnya (Richana *et al.* 1997). Bakteri ditumbuhkan pada 25 ml media dalam erlenmeyer 100 ml dengan komposisi media NH_4NO_3 (0.05 M), KH_2PO_4 (0.03 M), Na_2HPO_4 (0.04M), MgSO_4 ($8.0 \times 10^{-4}\text{M}$), CaCl_2 ($7 \times 10^{-6}\text{M}$), FeSO_4 ($4.0 \times 10^{-6}\text{M}$), dan Na_2EDTA ($4.0 \times 10^{-6}\text{M}$), dan glukosa 4% (Cooper *et al.* 1981). Perlakuan percobaan ialah mengganti substrat glukosa 4% dengan hidrolisat pati ubi kayu, garut, dan sagu dengan cara asam maupun enzimatis. Kultivasi dilakukan pada suhu 30°C dalam inkubator goyang dengan agitasi 200 rpm selama dua hari.

Pada akhir kultivasi dilakukan pengamatan terhadap jumlah biomassa, tegangan permukaan, dan endapan asam. Konsentrasi biomassa ditentukan dengan cara pengendapan hasil kultivasi menggunakan sentrifugasi berkecepatan 10 000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dikeringkan sampai berat konstan pada suhu 60°C, kemudian ditimbang.

Analisis konsentrasi endapan asam dilakukan dengan menambah HCl pada cairan kultivasi yang telah dipisahkan biomasanya sampai pH 2, kemudian didiamkan semalam pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi 3 000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian dikeringkan pada suhu 60°C sampai berat konstan, lalu ditimbang.

Tegangan permukaan diamati untuk cairan hasil kultivasi. Pengukuran dilakukan menggunakan Tensiometer Du Novy CSC Scienc Co Inc seri 008606 yang dilengkapi dengan ring platina. Tegangan permukaan ditunjukkan pada saat lapisan air di ring platina lepas dari permukaan. Semakin rendah tegangan permukaan biosurfaktan, semakin baik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Isolat *Bacillus* sp. BMN-14. Isolat *Bacillus* sp. BMN-14 mempunyai karakteristik seperti pada Tabel 1. Ditinjau dari biomassa dan sisa glukosa, *Bacillus* sp. BMN-14 sama dengan *B. pumilus* (kontrol) yang berasal dari *Japan Collection of Microorganism* (JCM). Endapan asam yang

Tabel 1. Karakteristik *Bacillus* sp. BMN-14.

Karakteristik	<i>Bacillus</i> sp. BMN-14	<i>Bacillus pumilus</i> (JCM)
pH	6.72	7.02
Biomassa (g/l)	2.248	2.291
Endapan asam (g/l)	0.81	0.86
Tegangan permukaan (mN/m)	34.4	32.8
Sisa glukosa (g/l)	15.26	15.17

* Kultivasi dilakukan pada media Cooper *et al.* (1981).

dihasilkan sedikit lebih rendah dibanding kontrol. Hal ini didukung dengan hasil tegangan permukaan yang lebih tinggi. Hal tersebut berarti kemampuan biosurfaktan *Bacillus* sp. BMN-14 sedikit lebih rendah dibanding *B. pumilus* dari JCM. Tegangan permukaan dari *Bacillus* sp. BMN-14 ini juga masih rendah bila dibanding dengan penelitian sebelumnya. Menurut Juwarkar *et al.* (1994) biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan oleh *B. licheniformis* BS1 dapat menurunkan tegangan permukaan sampai 27 mN/m, sedangkan *B. cereus* dapat mencapai 31 mN/m (Cooper & Goldenberg 1986).

Proses Hidrolisis Pati. Hasil analisis menunjukkan bahwa hidrolisis dengan cara enzimatis pati garut mempunyai rendemen gula paling tinggi, sedangkan hidrolisis tapioka cara asam rendemen gula lebih tinggi. Hal ini diduga berkaitan dengan sifat patinya. Pati garut mempunyai kandungan amilosa paling tinggi (Tabel 2). Pada hidrolisis secara enzimatis terlihat kecenderungan hubungan kandungan amilosa dengan rendemen. Semakin tinggi amilosa semakin tinggi rendemen, diduga karena amilase lebih mudah memutus ikatan hidrogen dari amilosa. Amilosa mempunyai rantai lurus dengan ikatan 1-4 α glikosidik dan amilopektin mempunyai rantai bercabang, ikatan 1,4 α glikosidik dengan cabang ikatan 1,6 α glikosidik. Sifat amilase memecah ikatan 1,4 α glikosidik secara acak dan tidak mampu memecah ikatan 1,6 α glikosidik sehingga enzim ini lebih cepat memecah amilosa. Di pihak lain hidrolisis dengan cara asam menyebabkan pemecahan terjadi pada semua ikatan sehingga kemungkinan tidak dipengaruhi oleh kandungan amilosa dan amilopektin tetapi dipengaruhi oleh kandungan patinya. Oleh karena itu hasil pengamatan pati tapioka yang mungkin mengandung amilopektin lebih tinggi mempunyai rendemen paling tinggi.

Hasil pengamatan gula reduksi dari ketiga macam pati dengan hidrolisis cara enzimatis maupun asam mempunyai gula reduksi yang hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga macam pati tersebut mempunyai kandungan glukosa yang sama

Tabel 2. Rendemen gula (%) dan hasil gula pereduksi (%) dari pati garut, tapioka, dan sagu oleh *Bacillus* sp. BMN-14.

Jenis pati	Amilosa	Rendemen		Gula pereduksi	
		Enzimatis	Asam	Anzimatis	Asam
Garut	34.80 ^a	83.5 ^{ab}	73.08 ^{bc}	86.51 ^a	89.45 ^c
Tapioka	29.86 ^b	80.00 ^{ab}	87.98 ^a	87.02 ^a	87.54 ^b
Sagu	23.94 ^a	62.5 ^{cd}	64.09 ^{cd}	87.66 ^b	87.57 ^b

Angka dengan huruf sama pada lajur yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT.

walaupun rendemen gulanya berbeda. Sebagai contoh rendemen gula pati sagu jauh lebih rendah (62.5 dan 64.09%) dibanding pati garut dan tapioka (Tabel 2), tetapi kandungan glukosa dari gula sagu yang dihasilkan hampir sama (87%).

Produksi Biosurfaktan Lipopeptida. Produksi biosurfaktan lipopeptida oleh *Bacillus* sp. BMN14 digunakan substrat dari hidrolisat tiga sumber karbohidrat yaitu sagu aren, pati ubikayu (tapioka), dan pati garut. Gula cair dari ketiga sumber karbohidrat tersebut mengandung gula pereduksi berkisar 86.51-89.45%. Media dengan substrat glukosa 4% digunakan sebagai kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari keenam perlakuan tersebut ternyata substrat dari hidrolisat tapioka dengan cara enzimatis mempunyai tegangan permukaan (33.6 mN/m) paling rendah hampir sama dengan substrat glukosa (33.5 mN/m). Tetapi endapan asam (0.78 g/l) dan biomassa (1.94 g/l) yang dihasilkan lebih rendah dibanding substrat glukosa yaitu masing-masing 0.85 g/l dan 2.02 g/l (Tabel 3).

Selain tapioka, jenis pati lain yang dapat dipertimbangkan untuk media pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan ini ialah hidrolisat pati sagu secara enzimatis yaitu biomassa 1.96 g/l, endapan asam 0.81 g/l, dan tegangan permukaan 34.6 mN/m (Tabel 3).

Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu tegangan permukaan yang dihasilkan dari isolat yang sama dengan substrat glukosa 4% ialah 34.4 mN/m (Richana *et al.* 1998). Sedangkan Cooper & Goldenberg (1986), menggunakan sukrosa sebagai karbon melaporkan bahwa *B. cereus* dapat menghasilkan biosurfaktan dengan tegangan permukaan mencapai 28 mN/m.

Dari keenam perlakuan macam substrat (sumber karbon) tersebut belum ada yang menyamai glukosa (kontrol). Hal ini

Tabel 3. Produksi biosurfaktan lipopeptida oleh *Bacillus* sp. BMN14 pada substrat glukosa dan hidrolisat pati ubi kayu.

Substrat	Biomassa (g/l)	Endapan asam (g/l)	Tegangan permukaan (mN/m)
Glukosa	2.02 ^a	0.85 ^c	33.5 ^a
Hidrolisat pati tapioka 1	1.94 ^b	0.78 ^b	33.6 ^a
Hidrolisat pati tapioka 2	1.87 ^b	0.68 ^a	35.0 ^b
Hidrolisat pati garut 1	1.78 ^a	0.73 ^b	36.0 ^c
Hidrolisat pati garut 2	1.81 ^a	0.58 ^a	38.0 ^d
Hidrolisat pati sagu 1	1.96 ^c	0.81 ^c	34.6 ^a
Hidrolisat pati sagu 2	2.08 ^d	0.62 ^a	38.0 ^d

1 Hidrolisis cara enzimatis, 2 hidrolisis cara asam, angka dengan huruf sama pada lajur yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT.

kemungkinan karena glukosa lebih mudah dimetabolisir, sehingga memberikan pertumbuhan dan produksi biosurfaktan lipopeptida terbaik. Hasil penelitian Kurniati *et al* (1998) yang menggunakan tiga macam sumber karbon (glukosa, galaktosa dan fruktosa) untuk produksi biosurfaktan lipopeptida maka glukosa merupakan sumber karbon terbaik. Namun demikian hidrolisis enzimatis dari tapioka dan sagu mendekati hasil dari glukosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Biro Pusat Statistik. 1998. Statistik Indonesia. Jakarta: BPS.
- Caffrey, W.C.M. & D.G. Cooper. 1994. Sophorolipids production by *Candida bimbicola* using self-cycling fermentation. *J. Ferment. Biol.* 79:146-151.
- Cooper, D.G. & B.G. Goldenberg. 1986. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:224-229.
- Cooper, D.G., C.R. MacDonald, S.J.B. Duff & N. Kosaric. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:408-412.
- Juwarkar, A., M. Desphande, P. Babu & P. Khanna. 1994. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* strain BS1 and its applications, hlm. 265-269. Di dalam: Int. Symp. Bioproducts Processing. 4-7 Januari 1994.
- Kurniati, T.H., D. Manguwidjaja, A. Suryani & M. Romli. 1998. Kinetika produksi surfaktin oleh *Bacillus subtilis* ATCC 21332 pada tiga macam sumber karbon, hlm. 290-299. Di dalam: *Peranan Mikrobiologi dalam Agroindustri untuk Menunjang Ketahanan Pangan Nasional*. Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan. Lampung 14-15 Desember 1998.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitro salicylic acid reagen for reagen for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* 31:426-428.
- Norman, B.E. 1980. *Enzyme Technology in the Manufacture of Sugar from Cereals*. New York: Academic Press.
- Richana, N., H.Y. Makagiansar, M. Romli, A. Suryani T.T. Irawadi & D. Manguwidjaja. 1997. The isolation of a lipopeptide biosurfactant-producing *Bacillus* sp., hlm. 247-254. Di dalam: *Challenges of Biotechnology in the 21st Century*. Vol. 1. Proc. the Indonesian Biotechnology Conference. June. 17-19. 1997
- Richana, N., H.Y. Makagiansar, M. Romli, A. Suryani & T.T. Irawadi. 1998. Produksi biosurfaktan lipopeptida oleh isolat bakteri indigenous, hlm. 191-199. Di dalam: *Peranan Mikrobiologi dalam Agroindustri untuk Menunjang Ketahanan Pangan Nasional*. Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan. Lampung, 14-15 Desember 1998.
- Sapuan. 1998. Pengembangan Tepung Alternatif dan Potensi Pasarnya. Makalah Semiloka Pengembangan Tanaman Garut, Kerjasama Universitas Brawijaya dengan Kantor Menteri Pangan dan Hortikultura. Malang, 27-28 Agustus 1998.
- Yakimov, M.M., K.M. Timmis, V.Wray & H.L. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptida surfactant produce by thermotolerant and halotolerant subsurface *B. licheniformis* BAS 50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1706-1713.