

## Pemanfaatan Limbah Jagung Sebagai Substrat Dalam Menghasilkan Poli-B-Hidroksi Butirat (Phb) Oleh Isolat Bakteri Asal Pabrik Gula Arasoe Bone

NUR HAEDAR<sup>2</sup>, SRI NUR RAHMI<sup>1</sup>, ASADI ABDULLAH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90915

<sup>2</sup>Dosen Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90915

Email: [srinurrahmi@gmail.com](mailto:srinurrahmi@gmail.com)

### ABSTRAK

The research about Waste of Corn as Substrate In Produce Poly- $\beta$ -Hydroxy Butyrate (PHB) by Bacterial Isolates Origin Sugar Factory Arasoe Bone. The research purpose to determine the ability of bacterial isolates from sugar mills Arasoe Bone is BA9 and MA4 and nitrogen concentration optimal for producing the PHB. With usewaste of corn as a source of carbon with a concentration 1%, 2%, 3% and as control positive glucose 1%, as well as use of ammonium sulfate as nitrogen source at a concentration of 0.05%, 0.1% and 0.15%. Total Analysis of PHB done with use UV-VIS spectrophotometer and a wavelength of 235 nm and using analysis a regression equation. The result of this study that use of corn as a source of carbon waste can produce PHB either by BA9 and MA4 isolates though still lower than glucose as the carbon source. The concentration of nitrogen source (ammonium sulfate), which accumulate PHB optimal concentration of ammonium sulfate that is at 0.1%.

Keywords: Poly- $\beta$ -hydroxy butyrate (PHB), Bacterial Isolates, Waste Corn, incubation time, the waste sugar factory

### PENDAHULUAN

Plastik merupakan salah satu bahan yang paling umum digunakan di masyarakat. Hal ini terjadi karena plastik memiliki beberapa keunggulan yaitu ringan, kuat dan mudah dibentuk, anti karat dan tahan terhadap bahan kimia, mempunyai sifat isolasi listrik yang tinggi, dapat dibuat berwarna maupun transparan dan biaya proses yang lebih murah (Mujiarto, 2005). Disamping keunggulan tersebut, polimer plastik juga mempunyai berbagai kelemahan, yaitu plastik yang berasal dari minyak bumi jumlahnya semakin terbatas dan sifatnya yang tidak mudah didegradasi meskipun telah ditimbun puluhan tahun, akibatnya terjadi penumpukan limbah plastik yang menjadi penyebab pencemaran lingkungan (Setiani *et al.*, 2013).

Salah satu cara yang dikembangkan untuk mengatasi masalah sampah plastik

adalah penggunaan bioplastik. Bioplastik merupakan plastik yang dapat diuraikan kembali oleh mikroorganisme secara alami sehingga ramah terhadap lingkungan. Bioplastik tersebut dapat dibuat dari bahan-bahan organik antara lain selulosa, kolagen, pati, kasein, protein, atau lipid (Nurseha, 2012).

Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB) merupakan salah satu jenis biopolimer yang dapat digunakan untuk membuat bioplastik. Pemanfaatan PHB sebagai bahan bioplastik dapat mengurangi masalah lingkungan yang disebabkan oleh limbah plastik sintesis. Bioplastik dari PHB lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme (*biodegradable*) dan sumber daya untuk memproduksi PHB bersifat terbarukan. Poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB) dihasilkan oleh bakteri secara intraseluler yang berfungsi sebagai sumber karbon dan cadangan

energi. PHB ini diakumulasi oleh mikroorganisme apabila kondisi pertumbuhannya kurang baik yaitu pada saat nitrogen, pospat, sulfur, magnesium dan oksigen terbatas (Kim *et al.*, 1994).

Produksi PHB saat ini semakin berkembang luas karena kebutuhan plastik yang ramah lingkungan semakin meningkat. Namun, pemakaian PHB sebagai material pengganti plastik konvensional mengalami kendala karena biaya produksi yang cukup tinggi, terutama biaya untuk memenuhi kebutuhan substrat dan biaya pemurnian PHB. Untuk menekan biaya substrat dilakukan upaya pemanfaatan substrat yang terbuang, yaitu bahan-bahan organik yang terdapat dalam limbah industri. Senyawa organik dalam limbah tersebut dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk membentuk PHB (Rahayu, 2007).

Salah satu limbah industri yang dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi PHB adalah limbah pabrik pakan ternak jagung karena masih mengandung polisakarida cukup tinggi. Menurut Paes (2006) memiliki kandungan polisakarida yang tinggi yang terdiri dari hemiselulosa 67% dan selulosa 23%, serta mengandung lignin 0,1%. Pemanfaatan limbah jagung ini merupakan suatu alternatif dalam memproduksi PHB, mengingat limbah tersebut mengandung sumber karbon yang berpotensi menghasilkan kopolimer PHB.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai "Pemanfaatan Limbah Jagung sebagai Substrat dalam Menghasilkan Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB) oleh Isolat Bakteri Asal Pabrik Gula Arasoe Bone".

## METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah erlemeyer (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), tabung cuvet (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), corong (Pyrex), sendok tanduk, rak tabung, ose, bunsen, pipet tetes, spoit, saringan,

blender, sentrifugasi (Hettich Universal), oven (Heraeus), otoklaf (All American), neraca analitik (Precisa 180 A), inkubator (Mettmert), enkas, *hot plate* (Cole Parmer Instrumen Company), *shaker* (Health Shaker Rotator), spektrofotometer UV (Spectonic 20 Milton Roy Company).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri MA4 dan isolat BA9 (isolat bakteri dari limbah pabrik gula Arasoe Bone koleksi laboratorium mikrobiologi), limbah jagung *Zeamays Linneus*, medium *Nutrient Agar* (NA) (MERCK) (1 L akuades, 5 g bactopecton, 5 g ekstrak ragi dan 18 g bacto agar), medium *Nutrient Broth* (NB) (MERCK) (1 L akuades, 5 g bactopecton dan 5 g ekstrak ragi), medium produksi PHB (1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 60 mg *Ferrous Ammonium Citrate*, 10 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml *trace element*, 10 g glukosa dan 1 L akuades), *Sodium Hypochlorite*, aseton, dietil eter,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, spritus, akuades steril, kapas, alkohol, kain kasa, aluminium foil dan masker.

**Sterilisasi Alat dan Medium.** Alat yang terbuat dari gelas atau kaca disterilkan dengan menggunakan oven dengan suhu  $180^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Sedangkan alat-alat yang terbuat dari logam misalnya ose dicuci dengan alkohol 70% kemudian dipijarkan di atas api bunsen sampai membara. Sterilisasi medium dengan menggunakan uap panas bertekanan dengan menggunakan otoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

**Pembuatan Medium *Nutrient Agar* (NA).** Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium NA sintetik adalah 20 ml akuades. Medium NA ditimbang sebanyak 0,46 g dan glukosa sebanyak 0,4 g kemudian dilarutkan dalam akuades kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Selanjutnya disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

**Pembuatan Medium Nutrient Broth (NB).** Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium NB sintetik adalah 100 ml akuades. Medium NB ditimbang sebanyak 0,4 g dan glukosa 0,5g kemudian dilarutkan dalam akuades kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Selanjutnya disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

**Pembuatan Medium Minimal Ramsay (Ramsay *et al.*, 1992).** Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium Minimal Ramsay adalah 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 60 mg *Ferrous Ammonium Citrate*, 10 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml *trace element*, sumber karbon yang berbeda (10 g glukosa) dan 1 L akuades. Semua bahan dicampurkan ke dalam akuades lalu dilarutkan dengan pemanasan. Lalu medium tersebut disterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

**Peremajaan Kultur.** Isolat bakteri MA4 dan isolat BA9 ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (NA) miring pada 2 tabung reaksi setiap isolat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian sebagian disimpan pada temperatur 4°C sebagai stok kultur dan sebagian lagi digunakan untuk penyiapan inokulum.

**Persiapan Isolat.** Tiap isolat bakteri MA4 dan isolat BA9 yang telah diremajakan di medium NA, diambil sebanyak 1 ose dan disuspensikan ke dalam erlenmeyer berisi 50ml medium NB, lalu diinkubasi selama 24 jam pada inkubator *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar.

**Produksi Poli-β-Hidroksi Butirat (PHB) (Yanti *et al.*, 2009)**

1. Perlakuan konsentrasi limbah jagung sebagai sumber karbon. Fermentasi untuk produksi PHB dilakukan dalam labu erlenmeyer 50 ml steril yang berisi medium minimal Ramsay

dengan penambahan limbah pabrik jagung yang telah dihaluskan dengan variasi konsentrasi masing-masing 1%; 2%; 3% (w/v) dan pada media dengan penambahan glukosa 1%(w/v), sebagai media pertumbuhan yang telah disterilkan sebanyak 50 ml. Fermentasi yang dilakukan menggunakan 5% (v/v) inokulum (2,5ml inokulum dalam 50 ml media) kemudian ditumbuhkan pada 50 ml medium. Selanjutnya diletakkan pada inkubator shaker dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu kamar selama 48, 72, dan 96 jam.

2. Perlakuan konsentrasi Nitrogen. Memilih satu konsentrasi limbah jagung yang memproduksi PHB secara optimal. Kemudian dilakukan lagi fermentasi untuk memproduksi PHB dalam labu erlenmeyer 50 ml steril yang berisi medium minimal Ramsay dengan variasi konsentrasi nitrogen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  masing-masing 0,05%; 0,1%; 0,15% (w/v). Fermentasi yang dilakukan menggunakan 5% (v/v) inokulum (2,5ml inokulum dalam 50 ml media) kemudian ditumbuhkan pada 50 ml medium. Selanjutnya diletakkan pada inkubator shaker dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu kamar selama 24, 48, 72, dan 96 jam.

**Ekstraksi (Yanti *et al.*, 2009).** Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 48, 72 dan 96 jam, kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk disuspensikan dengan 5 ml akuades. Kemudian 1 ml suspensi sel diambil untuk dianalisis kadar PHB dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dan 1 ml suspensi sel diambil untuk mengukur berat kering massa sel.

1. Penentuan Berat Kering Massa Sel  
Aluminium foil dibuat seperti tutup botol, lalu dikeringkan di oven pada

suhu 70°C selama 24 jam. Kemudian, berat kering aluminium foil ditimbang hingga berat konstan, lalu ditambahkan 1 ml suspensi sel. Setelah itu, aluminium foil berisi 1 ml suspensi sel dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 24 jam. Kemudian aluminium foil berisi suspensi sel yang telah dikeringkan ditimbang hingga berat konstan, lalu berat kering massa sel dihitung.

2. Analisis Poli-β-Hidroksi Butirat (PHB). Suspensi sel diambil sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan 3 ml buffer fosfat pH 7,0 dan 1 ml sodium hypochlorite atau NaOCl 5%. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan 180 rpm selama 24 jam. Sisa pelet kemudian dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel ditambahkan 5 ml akuades, lalu disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel ditambahkan 3 ml aseton, lalu disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet dicuci secara perlahan dengan 3 ml dietil eter, didiamkan selama 5 menit, kemudian eter dibuang. Setelah pellet kering ditambahkan 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, lalu dipanaskan dalam *Water Bath* dengan suhu 100°C selama 10 menit. Asam kroaton yang dihasilkan dideterminasi dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebagai blanko. Nilai *Optical Density* (OD) atau nilai absorban yang diperoleh diinterpolasi dengan kurva standar PHB murni. Konsentrasi asam kroaton ditentukan berdasarkan kurva standar yang dibuat.
3. Pembuatan Kurva Standar Poli-β-Hidroksi Butirat (PHB). Senyawa PHB murni dengan variasi konsentrasi 0 µg, 0,4 µg, 0,8 µg, 1,6 µg, 3,2 µg, 4,8 µg dan 6,4 µg masing-masing

dimasukkan ke dalam cuvet berisi 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Cuvet dididihkan di dalam *Water Bath* dengan suhu 100°C selama 10 menit, lalu dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm untuk diukur *Optical Density* (OD) atau absorbannya. Data hasil perhitungan nilai *Optical Density* (OD) dianalisis menggunakan persamaan regresi  $y = 8,1961x + 0,01$  yang diperoleh dari kurva standar PHB menggunakan PHB murni dari hasil penelitian Nur Haedar, *et al.* (2013).

**Analisis Data.** Analisis data konsentrasi PHB diperoleh dari *Optical Density* (OD) atau absorbannya yang dikonversikan ke dalam persamaan regresi dari kurva standar dan data berat kering massa sel yang diperoleh dari berbagai konsentrasi karbon dan nitrogen dianalisis secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

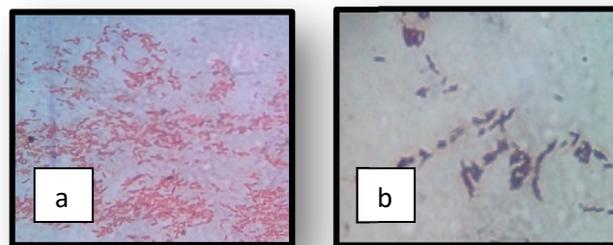
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pemilihan Isolat Bakteri Penghasil Poli-β-Hidroksi Butirat (PHB).** Penelitian ini menggunakan dua isolat bakteri yaitu isolat BA9 dan isolat MA4 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Isolat BA9 diisolasi dari limbah blotong, sedangkan isolat MA4 diisolasi dari limbah molase (limbah tetes tebu), keduanya diisolasi dari limbah Pabrik Gula Arasoe Kab. Bone. Menurut Chandrashekharaiah (2005), koloni bakteri yang mampu menghasilkan PHB setelah pewarnaan koloni dengan reagen *Sudden Black* akan berwarna biru gelap (biru kehitaman), meskipun setelah dicuci dengan alkohol 95%. Hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Nur Haedar, *et al.* (2013) berdasarkan hasil uji kualitatif dan kuantitatif menunjukkan bahwa isolat yang diisolasi dari limbah blotong dan limbah molase dari limbah Pabrik Gula Bone berpotensi

dalam memproduksi PHB karena pada limbah tersebut masih memiliki sumber karbon yang tinggi dan sumber nutrisi lain seperti fosfat dan nitrogen terbatas. Menurut Margino *et al.* (2000) bahwa lingkungan tempat tumbuh bakteri yang kaya akan sumber karbon tetapi mengandung fosfat dan nitrogen yang terbatas akan memicu suatu bakteri membentuk cadangan makanan berupa senyawa PHB. Berdasarkan hasil uji kualitatif, isolat bakteri BA9 dan MA4 dapat mengakumulasi PHB karena pada uji reagen *Sudden Black* hasilnya positif yang ditandai dengan warna granula biru kehitaman. Serta hasil uji kuantitatif menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut mampu mengakumulasi PHB yang

ditandai dengan pertumbuhan yang cukup baik pada media minimal Ramsay.

Pengecatan tertentu dilakukan untuk mengetahui ciri-ciri gram dan ciri-ciri morfologi sel kedua isolat bakteri tersebut. Seperti yang terlihat pada Gambar 5. Isolat bakteri BA9 merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang (basil), sedangkan isolat bakteri MA4 merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang (basil). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Findlay (1983), bahwa bakteri penghasil PHB meliputi bakteri aerob autotrof, bakteri aerob heterotrof, bakteri anaerob fotosintesis, bakteri Gram negatif maupun termasuk bakteri Gram positif

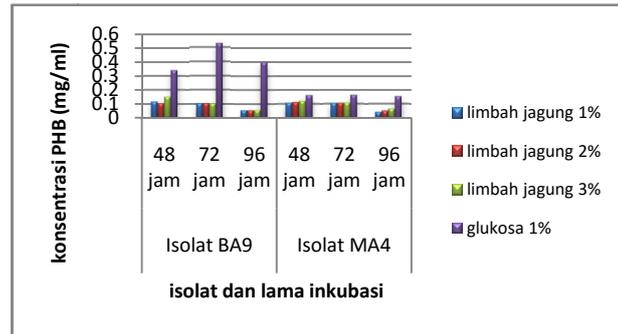


Gambar 5. Hasil pengecatan Gram pada isolat bakteri (a) BA9 dan (b) MA4 (Perbesaran  $10 \times 10$ )

**Kemampuan Isolat Bakteri Mengakumulasi Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB). Perlakuan Konsentrasi Limbah Jagung.** Pada penelitian ini isolat bakteri BA9 dan MA4 diinokulasikan ke dalam media minimal Ramsay yang sumber karbonnya berasal dari limbah pabrik pakan ternak berbahan dasar jagung yang konsentrasinya divariasikan yaitu 1%, 2% dan 3%, serta menggunakan glukosa 1% sebagai kontrol positif. Penggunaan limbah jagung ini sebagai sumber karbon dalam media produksi PHB karena pada limbah jagung masih mengandung karbon yang tinggi. Menurut Paes (2006) limbah jagung memiliki kandungan polisakarida yang tinggi yang terdiri dari hemiselulosa 67% dan selulosa 23%. Pengamatan dilakukan berupa analisis konsentrasi

PHB, berat kering massa sel dan perhitungan kadar PHB.

**Analisis Konsentrasi Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB).** Pada penelitian ini dilakukan analisis konsentrasi PHB dalam medium minimal Ramsay dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi limbah jagung yang optimal dalam mengakumulasi PHB oleh isolat bakteri. Perhitungan konsentrasi PHB diperoleh melalui pengukuran nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus regresi dari kurva standar. Rumus regresi yang digunakan merupakan persamaan regresi dari hasil penelitian Nur Haedar, *et al.* (2013).



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi limbah jagung terhadap konsentrasi PHB

Berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi PHB dengan menggunakan rumus regresi menunjukkan bahwa isolat bakteri BA9 pada perlakuan penambahan limbah jagung 1% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,115 mg/ml, sedangkan pada konsentrasi limbah jagung 2% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 0,104 mg/ml. Dan pada konsentrasi 3% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,149 mg/ml.

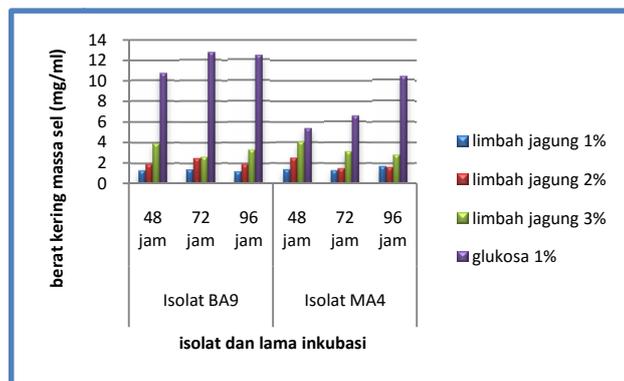
Isolat bakteri MA4 pada penambahan limbah jagung 1% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,105 mg/ml, pada limbah jagung 2% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,11 mg/ml. Dan pada limbah jagung 3% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,118 mg/ml.

Dari data diatas, dapat diketahui bahwa isolat BA9 menghasilkan konsentrasi PHB tertinggi pada perlakuan

limbah jagung 3% dengan lama inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 0,149 mg/ml. Hasil serupa diperlihatkan oleh isolat MA4 menghasilkan konsentrasi PHB tertinggi pada limbah jagung 3% dengan inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 0,118 mg/ml. Jadi, konsentrasi limbah jagung yang optimal dalam mengakumulasi PHB yaitu pada konsentrasi 3%.

Menurut Byrom (1987), Anderson dan Dawes (1990), PHB merupakan polimer yang disintesis oleh bakteri dan diakumulasi secara intraseluler sebagai cadangan energi jika ditumbuhkan pada media dengan sumber karbon berlebih tetapi nutrisi lainnya yaitu nitrogen atau fosfor terbatas.

**Berat kering massa sel dalam medium Ramsay.** Selain perhitungan konsentrasi PHB, juga dilakukan pengukuran berat kering massa sel. Berat kering massa sel ini diukur dengan menggunakan neraca analitik.



Gambar 7. Grafik perbandingan berat kering massa sel bakteri

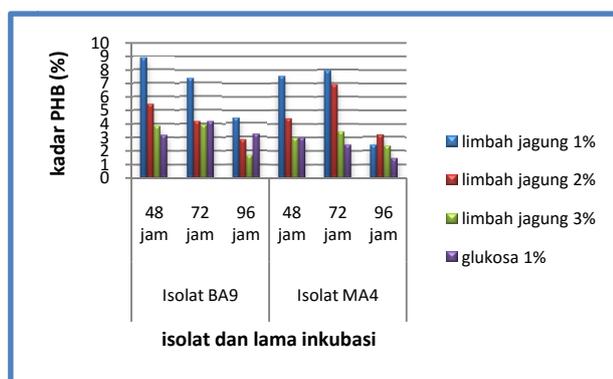
Berdasarkan hasil perhitungan berat kering massa sel, diperoleh data bahwa Isolat bakteri BA9 dengan perlakuan penambahan limbah jagung 1% memiliki berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu sebanyak 1,4 mg/ml, untuk limbah jagung 2% berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu sebanyak 2,5 mg/ml, dan untuk limbah jagung 3% berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 3,9 mg/ml.

Isolat bakteri MA4 pada konsentrasi limbah jagung 1% memiliki berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 96 jam yaitu sebanyak 1,7 mg/ml, pada konsentrasi 2% memiliki berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 2,5 mg/ml. Sedangkan konsentrasi 3% memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 4 mg/ml.

Data tersebut menunjukkan bahwa isolat BA9 yang memiliki berat kering tertinggi yaitu pada penambahan limbah jagung 3% dengan waktu inkubasi 48 jam

sebanyak 3,9 mg/ml, dan isolat MA4 yang memiliki berat kering tertinggi yaitu pada konsentrasi 3% dengan lama inkubasi 48 jam sebanyak 4,0 mg/ml. Hasil ini menunjukkan bahwa berat kering massa sel bakteri semakin bertambah seiring dengan pertambahan konsentrasi limbah jagung yang digunakan tapi dengan masa inkubasi 48 jam. Hasil yang diperoleh sesuai dengan hasil penelitian oleh Mawarsari (1995) dengan memanfaatkan limbah tapioka sebagai substrat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi limbah yang digunakan, berat kering sel semakin meningkat pula.

**Analisis Kadar Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB).** Kadar PHB merupakan perbandingan antara jumlah PHB yang diakumulasi (mg/ml) dengan berat kering massa sel (mg/ml) yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Pada penelitian ini, untuk menghitung kadar PHB maka terlebih dahulu ditentukan konsentrasi PHB yang diperoleh melalui analisis persamaan regresi yang kemudian dibagi dengan berat kering massa sel bakteri.



Gambar 8. Grafik kadar PHB (%) pada berbagai konsentrasi limbah jagung

Kadar PHB memperlihatkan kemampuan isolat bakteri dalam mengakumulasi PHB dalam medium per berat kering massa sel bakteri. Hasil perhitungan kadar PHB menunjukkan bahwa Isolat bakteri BA9 dengan penambahan limbah jagung 1% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 8,846%, pada konsentrasi limbah

jagung 2% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 5,421%. Dan pada konsentrasi limbah jagung 3% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 3,885%.

Isolat bakteri MA4 dengan perlakuan limbah jagung 1% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 7,923%, pada limbah jagung 2% memiliki

kadar PHB tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 6,867%. Dan pada limbah jagung 3% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 3,419%.

Data tersebut menunjukkan bahwasolat BA9 memiliki kadar PHB (%) tertinggi pada penambahan limbah jagung 1% dengan lama inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 8,846%. Dan isolat MA4 menghasilkan kadar PHB (%) tertinggi pada penambahan limbah jagung 1% sebanyak 7,923% dengan lama inkubasi 72 jam. Dari kedua isolat bakteri tersebut, yang memiliki kemampuan lebih baik dalam mangakumulasi PHB adalah isolat bakteri BA9 yang mengakumulasi PHB sebanyak 8,846%. Sedangkan isolat bakteri MA4 mengakumulasi PHB sebanyak 7,923%.

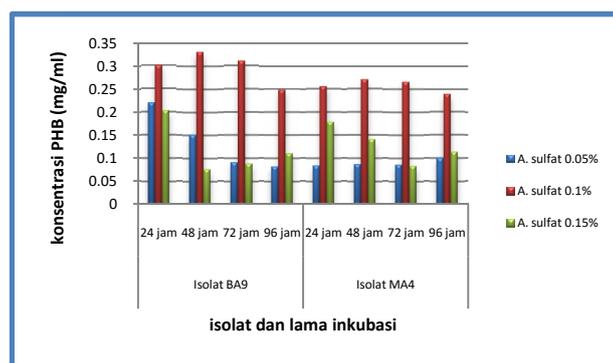
Pada penelitian ini kadar PHB tertinggi dihasilkan oleh isolat BA9 yaitu pada konsentrasi 1% sebanyak 8,846% dengan jumlah PHB yang dihasilkan hanya 0,115 mg/ml dan berat kering sel 1,3 mg/ml. Sedangkan yang memiliki jumlah PHB atau konsentrasi PHB tertinggi yaitu pada konsentrasi limbah jagung 3% sebanyak 0,149 mg/ml dan berat kering sel tertinggi yaitu 3,9 mg/ml menghasilkan kadar PHB hanya 3,821%. Hal ini

menunjukkan bahwa kadar PHB dalam suatu medium oleh bakteri semakin besar apabila mampu menghasilkan jumlah PHB yang besar dengan berat kering sel yang kecil.

Menurut Byrom (1994), konsentasi PHB yang dapat disintesis atau diproduksi memang sangat dipengaruhi oleh jenis bakteri, kondisi lingkungan pertumbuhan dan sistem fermentornya.

**Perlakuan Konsentrasi Nitrogen (Amonium sulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).** Dalam penelitian ini konsentrasi sumber nitrogen divariasikan dengan tujuan mengetahui konsentrasi sumber nitrogen yang optimal dalam mengakumulasi PHB. Sumber nitrogen yang digunakan yaitu amonium sulfat. Menurut Chandrasekaraiah (2005), ammonium sulfat merupakan sumber nitrogen terbaik dalam produksi PHB.

**Analisis Konsentrasi Poli-β-Hidroksi Butirat (PHB).** Analisis konsentrasi PHB dalam medium minimal Ramsay pada berbagai konsentrasi nitrogen (ammonium sulfat) bertujuan untuk mengetahui konsentrasi nitrogen yang optimal dalam mengakumulasi PHB oleh isolat bakteri.



Gambar 9. Grafik konsentrasi PHB pada berbagai konsentrasi ammonium sulfat

Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh bahwa Isolat BA9 dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,05% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 0,219 mg/ml. Konsentrasi ammonium sulfat 0,1%

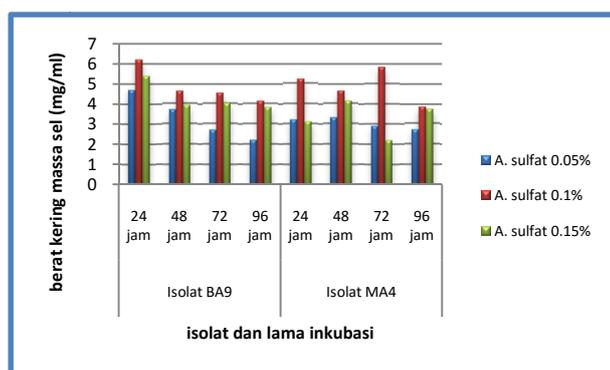
memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,330 mg/ml. Dan konsentrasi ammonium sulfat 0,15% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 0,202 mg/ml.

Isolat MA4 dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,05% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 96 jam yaitu 0,1 mg/ml, untuk konsentrasi ammonium sulfat 0,1% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 0,269 mg/ml. Dan untuk konsentrasi ammonium sulfat 0,15% memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada Inkubasi 24 jam yaitu 0,178 mg/ml.

Data diatas menunjukkan bahwa isolat BA9 memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada penambahan ammonium sulfat 0,1% dan lama inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 0,330 mg/ml. Dan isolat MA4 memiliki konsentrasi PHB tertinggi pada penambahan ammonium sulfat 0,1%

dengan lama inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 0,269 mg/ml. Jadi, kedua isolat tersebut dapat mengakumulasi PHB secara optimal pada media minimal ramsay dengan penambahan ammonium sulfat 0,1%. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Chandrashekharaiyah(2005) bahwa konsentrasi nitrogen yang optimal dalam mengakumulasi PHB yaitu 0,1%.

**Berat Kering Massa Sel.** Inokulum yang telah ditumbuhkan pada medium minimal ramsay dengan sumber nitrogen yang divariasikan (0,05%, 0,1% dan 0,15%) dan diinkubasi pada waktu yang berbeda, selanjutnya dilakukan perhitungan berat kering massa sel.



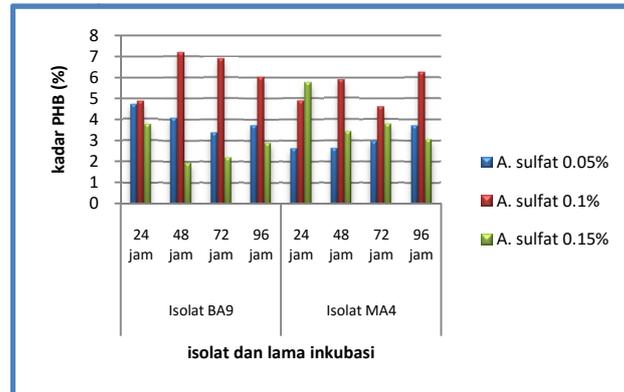
Gambar 10. Grafik perbandingan berat kering massa sel

Pada Grafik menunjukkan bahwa Isolat BA9 dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,05% memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 4,7 mg/ml, pada konsentrasi ammonium sulfat 0,1% memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 6,2 mg/ml, sedangkan pada konsentrasi ammonium sulfat 0,15% memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 5,4 mg/ml.

Isolat MA4 dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,05% memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 3,3 mg/ml, sedangkan konsentrasi ammonium sulfat 0,1% memiliki berat

kering tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 5,8 mg/ml, dan konsentrasi ammonium sulfat 0,15% memiliki berat kering massa sel tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 4,1 mg/ml. Data tersebut menunjukkan bahwa isolat BA9 memiliki berat kering tertinggi pada konsentrasi ammonium sulfat 0,1% dengan lama inkubasi 24 jam yaitu 6,2 mg/ml. Dan isolat MA4 memiliki berat kering tertinggi pada inkubasi 72 jam yaitu 5,8 mg/ml.

**Kadar Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat (PHB).** Kadar PHB ditentukan dengan cara jumlah PHB yang diakumulasi oleh isolat bakteri dibagi dengan berat kering massa sel bakteri.



Gambar 11. Kadar PHB (%) pada berbagai konsentrasi ammonium sulfat

Pada Grafik dapat diketahui bahwa isolat bakteri BA9 dengan penambahan ammonium sulfat 0,05% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 4,66%, sedangkan pada 0,1% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 48 jam yaitu 7,174%, dan konsentrasi 0,15% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 3,741%.

Isolat MA4 dengan penambahan ammonium sulfat 0,05% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 96 jam yaitu 3,704%, sedangkan pada konsentrasi 0,1% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 96 jam yaitu 6,273%. Dan pada konsentrasi 0,15% memiliki kadar PHB tertinggi pada inkubasi 24 jam yaitu 5,742%.

Data tersebut menunjukkan bahwa isolat BA9 memiliki kadar PHB tertinggi pada konsentrasi ammonium sulfat 0,1% dengan lama inkubasi 48 jam yaitu sebanyak 7,174%. Dan isolat MA4 memiliki kadar PHB tertinggi pada konsentrasi limbah jagung 0,1% dengan lama inkubasi 96 jam yaitu sebanyak 6,273%. Hasil analisis kadar PHB ini menunjukkan bahwa isolat BA9 paling efektif menghasilkan PHB yaitu sebanyak 7,174% per berat kering massa selnya, sedangkan isolat MA4 menghasilkan kadar PHB hanya 6,273% per berat kering massa selnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri yang diisolasi dari limbah pabrik gula Arasoe Bone mampu menghasilkan PHB dengan baik. Lingkungan tempat tumbuh bakteri yang kaya akan sumber karbon tetapi mengandung fosfat dan nitrogen yang terbatas akan memicu bakteri membentuk cadangan karbon berupa senyawa PHB (Margino *et al.*, 2000). Namun diantara kedua isolat tersebut, isolat BA9 yang paling efektif dalam menghasilkan PHB dibandingkan isolat MA4. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Nur Haedar *et al.* (2013) dengan menggunakan isolat yang diisolasi dari blotong memiliki kadar PHB tertinggi yaitu sebanyak 67,08%, sedangkan isolat yang diisolasi dari molase hanya memiliki kadar PHB 24,04%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa substrat limbah jagung dapat digunakan sebagai sumber karbon dalam produksi PHB, dan konsentrasi limbah jagung yang optimal dalam produksi PHB yaitu konsentrasi limbah jagung 3%. Namun konsentrasi PHB yang dihasilkan menggunakan substrat limbah jagung lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan glukosa 1% (kontrol positif). Limbah jagung dapat dijadikan sebagai sumber karbon dalam produksi PHB karena mengandung hemiselulosa, selulosa dan lignin. Menurut Obruca

(2015), lignoselulosa dapat dijadikan sebagai substrat dalam menghasilkan PHB. *Burkholderia sacchari* memanfaatkan jerami gandum sebagai sumber karbon dan menghasilkan konsentrasi PHB 105 g/l, *Ralstonia eutropham* menggunakan ampas tebu sebagai sumber karbon dan menghasilkan konsentrasi PHB 6,3 g/l dan *Bacillus firmus* memanfaatkan jerami padi sebagai sumber karbon dan mengakumulasi PHB sebanyak 1,7 g/l.

Selain itu, hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa isolat bakteri dengan penambahan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen dapat menghasilkan PHB secara optimal pada konsentrasi 0,1%. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Chandrashekharaiyah (2005) yang menggunakan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogennya diperoleh bahwa ammonium sulfat merupakan sumber nitrogen terbaik dalam menghasilkan PHB dan konsentrasi ammonium sulfat yang optimal dalam menghasilkan PHB yaitu pada konsentrasi 0,1%.

## KESIMPULAN

1. Penggunaan limbah jagung sebagai sumber karbon dapat menghasilkan PHB baik oleh isolat BA9 dan isolat MA4 sekalipun masih lebih rendah dari glukosa sebagai sumber karbon.
2. Konsentrasi sumber nitrogen (ammonium sulfat) yang optimal dalam mengakumulasi PHB yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 0,1%.

## DAFTAR PUSTAKA

Anderson, A. J., dan E. A. Dawes, 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54(4):450-472.

Byrom, D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms : Technology and

economics. *Trend in Biotechnol.* 5 : 246-250.

- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, In: Mobley DP (ed) plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymers precursors. Hanser. Munich. p. 5-33.
- Chandrashekharaiyah, P.S., 2005. Isolation, Screening and Selection of Efficient Poly  $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB) Synthesizing Bacteria. (Thesis). Department of Agricultural Microbiology College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Findlay, R.H., and D.C. White, 1983. Polimeric  $\beta$ -Hidroksialkanoates From Environmental Samples *Bacillus Megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:71-78.
- Kim B.S., S.C. Lee, S.Y. Lee, H.N. Chang, Y.K. Chang dan S.I. Woo, 1994. Production of poly(3-Hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* 43:892-898.
- Margino, S., E. Martani, Soesanto, A. Yuswanto dan L. Sembiring, 2000. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Plastik Terdegradasi, Poli- $\beta$ -Hidroksibutirat. *Biologi.* 2 (10) : 583-597.
- Mawarsari, R., 1995. Pemanfaatan limbah Tapioka sebagai Substrat Penghasil Bahan Dasar Plastik Terdegradasi [(Poli- $\beta$ -Hidroksi Butirat) PHB]. Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta.
- Mujiarto, I., 2005. Sifat dan Karakteristik Material Plastik dan Bahan Aditif. *Traksi.* Vol 3 (2) : 65.
- Nur Haedar., R. Gobel., M. R. Umar dan Ambeng, 2013. Biologi untuk Kesejahteraan Manusia "Seleksi Bakteri Dari Limbah Dan Tanah Pabrik Gula Arasoe, Kab. Bone Sebagai Penghasil poli- $\beta$ -Hidroksi

- Butirat (Bioplastik)". Prosiding Seminar Nasional Jurusan Biologi FMIPA UNPAD, Bandung.
- Nurseha, D., 2012. Pengaruh Penambahan Plasticizer Sorbitol untuk Pembuatan Bioplastik dari Pati Kulit Singkong. Skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Negeri Sunan Kalijaga, Yogyakarta.
- Obruca, S., P. Benesova, L. Marsalek and I. Marova, 2015. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (2) 135–144.
- Paes, M. C. D., 2006. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do gão de milho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EMBRAPA), Sete Lagoas.
- Rahayu, D., 2007. Produksi Polihidroksialkanoat dari Air Limbah Industri Tapioka dengan Sequencing Batch Reactor. Universitas Padjadjaran, Padjadjaran.
- Ramsay B.A., J. Ramsay, E. Berger, C. Chavarie dan G. Barunegg, 1992. Separation of poly-beta-hydroxy-alkanoic acid from microbial biomass. United States Patent 5.110.980.
- Setiani, W., T. Sudiati, dan L. Rahmidar, 2013. Preparasi dan Karakterisasi *Edible Film* dari Poliblend Pati Sukun-Kitosan. *Valensi* 3 (2) : 100-109.
- Yanti, N.A., , L. Sembiring, dan S. Margino, 2009. Production of Poly-  $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB) from Sago Starch by The Native Isolate *Bacillus megaterium* PSA10. *Indonesian Journal of Biotechnology*, June, 2009.