PENAPISAN MIKROBA PENGURAI SIANIDA DAN PATI UNTUK PENGOLAHAN LIMBAH PABRIK TAPIOKA

(Screening of microbes degrading strach and cyanide for the treatment of waste of tapioca industry)

Abdi Dharma, Marniati Salim, Armaini, Desvi Ariani, Valovi *dan* ***Nofriadi***

Jurusan Farmasi, F M I P A Universitas Andalas.

ABSTRACT

Starch and cyanide degrading microbes have been screened from liquid waste of tapioca industry of PT Incasi Raya, Sawahlunto Sijunjung. Eight bacteria species resistance's to cyanide have been identified their genera and three of them degrade starch. All of eight bacteria lowers inorganic cyanide concentration in water. Starch and cyanide degrading microbe could be applied for the treatment of waste of tapioca industry, and for fermenting starch to produce high-fructose syrup.

PENDAHULUAN

Industri tepung tapioka menggunakan ubi kayu (*Manihot esculenta* Crant) sebagai bahan dasarnya. Hanya sekitar 30% dari bahan baku ini yang akhirnya menjadi produk tepung tapioka, sedangkan sisa yang 70% terbuang sebagai limbah. Komponen pencemar terpenting dari limbah ini adalah sianida yang bersifat racun dan pati. Sianida berasal dari hidrolisa glikosida sianogenat yang terdapat pada ubi kayu, sedangkan pati adalah komponen utama dari ubi kayu.

Glikosida sianogenat yang terdapat pada ubi kayu adalah linamarin [2-[β-D-glikopiranosiloksi] isobutironitril dan metillinamarin. Glikosida ini sangat mudah terhidrolisa memberikan ion sianida bila jaringan ubi kayu dipecah. Hidrolisa dikatalis oleh enzim β-glukosidase dan hidroksinitril lyase, oleh asam atau berlangsung secara spontan (Johne, 1990)

Limbah pabrik tapioka bila tidak diolah sebelum dilepas kelingkungan akan menyebabkan masalah lingkungan seperti bau busuk, eutrofikasi pada perairan, hilangnya hewan air pada peraian serta air tidak bisa digunakan untuk keperluan rumahtangga maupun pertanian. Hal ini disebabkan oleh air sudah tercemar oleh racun sianida, kadar kadar oksigen terlarut menurun, populasi mikroba baik yang nonpatogen maupun yang patogen meningkatnya. Oleh karena itu, air limbah pabrik tapioka ini harus diolah terlebih dahulu sebelum dilepas keperairan bebas.

Untuk pengolahan air limbah pabrik tapioka dapat dilakukan secara biologis, fisik dan, atau kimia. Perpaduan dari ketiga cara tersebut lebih baik dibandingkan dengan hanya menggunakan satu pendekatan saja. Sianida yang bersifat racun dan pati dapat diurai oleh mikroba pengurai sianida dan pati. Selain mikroba, tumbuhan air enceng gondok (*Eichornia crassipes* (Mart.) Solms) juga bisa menyerap sianida dari air dengan baik (Granato, 1993)

Pseudomonas putida yang diisolasi dari limbah industri mampu menggunakan nitrile organic(acetonitrile) dan sianida anorganik (natrium sianida) sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen. Bakterium ini mempunyai enzim nitrile aminohydrolase (EC 3.5.5.1) dan amidase (EC 3.5.1.4), yang mengkatalis transformasi sianida dan nitril menjadi amonia dan CO_2 melalui pembentukan amide sebagai suatu hasil antara (Chapatwala *et al.*,1995; Babu *et al.*, 1992).

Teknologi amobilisasi dari mikroba atau enzim pengurai sianida dikembangkan untuk mengolah limbah yang mengandung sianida. Basheer (1993) mengembangkan reaktor membran enzim cyanidase sedangkan Chapatwala (1993) mengembangkan amobilisasi sel mikroba *Pseudomonas putida* untuk mengolah air limbah bersianida.

Limbah padat pabrik tapioka yang kaya dengan pati berpotensi untuk dimanfaatkan, seperti untuk makanan ternak atau diolah lebih lanjut dengan fermentasi menjadi gula sirup tinggi fruktosa, asam sitrat, asam glukonat serta enzim-enzim seperti enzim amilase, glukosa oksidase yang bernilai ekonomis.

Amilase adalah enzim yang menghidrolisa pati menjadi gula dan berbagai oligosacharida lainnya. Dikenal 3 jenis enzim amilase, yaitu α amilase, β amilase dan glukoamilase. Amilase merupakan suatu enzim penting secara ekonomi untuk berbagai proses industri. Suatu glukoamilase dari *Rhizopus* secara komersial yang dinamai gluczyme digunakan bersama-sama dengan kefir-bakterium dalam pembuatan minuman terfermentasi yang sangat disukai (Tominaga *et al.*, 1996).

Glukoamilase dari *Aspergillus niger* (exo-1,4-alpha-D-glucano-hydrolase, EC 3.2.1.2) berupa suatu glikoprotein, dengan berat molekul 90 kDa dengan SDS-PAGE (Vandersall *et al.*, 1995), sedangkan glukoamilase dari jamur termofilik *Humicola grisea* stabil pada temperatur tinggi (55 °C) dengan BM 74 kDa mengandung 5% karbohidrat (Campos *et al.*,1995). Umumnya glukoamilase merupakan enzim ekstraselular, namun juga ditemukan enzim ini terikat dengan membran, seperti glukoamilase dari *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621 (James *et al.*,1995). Enzim ini mempunyai dua sisi yang berbeda yaitu sisi katalitik dan sisi ikat pati (Le-Gal-Coeffet, 1995).

Mikroba yang dapat mencerna pati dan sianida sangat berpotensi sekali untuk ditemukan didalam limbah pabrik tapioka tersebut. Oleh karena itu dilakukan penapisan bakteri yang hidup pada limbah pabrik tapioka PT. Incasi Raya terhadap kemampuannya beradaptasi dengan lingkungan racun sianida dan aktifitas sebagai pencerna pati.

BAHAN DAN METODA

Penapisan bakteri tahan sianida

Bakteri dari limbah dibiakkan dalam medium KCN-Agar dengan konsentrasi KCN tertinggi 10.000 ppm selama empat hari pada 37 °C. Koloni yang tumbuh pada kondisi ini diisolasi dan ditanam kembali pada medium KCN-Agar tersebut secara berulang untuk meyakinkan bahwa ketahanan bakteri terhadap sianida bersifat permanen. Bakteri yang didapatkan ini adalah bakteri yang tahan terhadap sianida dan dapat hidup pada limbah tapioka yang kandungan sianidanya jauh lebih kecil (1,25 ppm) dengan baik.

Penapisan bakteri penghasil enzim amilase

Bakteri tahan sianida yang telah diisolasi ditanam pada medium yang mengandung pati dan lugol. Lugol didalam pati memberikan warna biru gelap. Pati didalam medium akan menginduksi produksi dan ekskresi enzim amilase kemediumnya. Aktiftitas enzim amilase, yang diekskresikan tersebut dapat diamati melalui daerah bening yang terbentuk disekitar koloni. Daerah bening terbentuk karena pati pada medium telah dihidrolisa dengan katalis enzim amilase menjadi gula dengan molekul mana lugol tidak memberikan warna. Adanya aktifitas enzim amilase ditentukan berdasarkan adanya area bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri.

Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan tiga pendekatan yaitu berdasarkan morfologi, sifat biakan dan sifat biokimia. Bakteri diidentifikasi dari ukuran, bentuk dan dari metabolismenya. Kemampuan untuk memetabolisme senyawa tertentu merupakan ciri khas yang sangat penting dalam identifikasi bakteri. Pengamatan aktifitas metabolisme diuji dengan melihat kemampuannya dalam menguraikan senyawa komplek seperti pati, lemak, protein dan asam nukleat tertentu (Lay, 1994).

Uji biokimia yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri isolat ini adalah 1) fermentasi karbohidrat seperti glukosa, manitol, sukrosa dan laktosa, 2) reaksi pembentukan asam dan gas, 3) Uji metil merah, 4) uji Voges-Proskauer ,5) uji katalase, 6) uji indol, 7) uji hidogen sulfisa (H_2S), 8) uji hidrolisis urea, dan 9) uji penggunaan sitrat.

Identifikasi berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis juga dilakukan. Pengamatan makroskopis yang dilakukan meliputi warna, bentuk, permukaan, pinggiran dan ukuran koloni dan pengamatan mikroskopis yaitu bentuk sel (coccus, basil atau spiral) ukuran sel dan reaksi pewarna Gram.

Uji kemampuan mikroba untuk mengubah sianida

Kemampuan mikroba untuk mengubah sianida diuji dengan cara berikut; masing-masing mikroba yang diuji ditanam didalam 1 ml medium KCN cair (100 ppm KCN), kemudian kadar sianida medium diukur setiap hari selama 4 hari. Kadar sianida dalam medium ditentukan dengan cara berikut; 5 ml medium yang telah diencerkan 50 kali, dicampur dengan 2 ml KOH 0,05%, 2 ml fenolftalin didalam $CuSO_4$ (0,5 ml fenolftalin 1% b/v + 95,5 ml $CuSO_4$ 0,01% b/v). Setelah dibiarkan beberapa menit, larutan diukur serapannya pada 555 nm. Konsentrasi sianida sampel ditentukan dengan menggunakan kurva larutan sianida standar sebagai pembanding.

Pemantauan produksi enzim amilase oleh *Pseudomonas sp.* selama fermentasi

Sebanyak 1,5 ml biakan aktif (biakan berumur 24 jam dalam medium fermentasi) dipindahkan kedalam 100 ml medium fermentasi yang mengandung 1 g pepton, 1 g ekstrak ragi, 0,5 g K_2HPO_4, 0,3 g amilum, dan diinkubasi dengan pengocokan selama 96 jam pada suhu kamar. Aktiftas enzim amilase didalam medium dipantau setiap 12 jam dengan cara berikut. Enzim diekstrak dengan memusingkan campuran fermentasi pada 12.500 rpm, 4 °C, 10 menit, dan supernatan diambil sebagai ekstrak kasar enzim. Aktifitas amilase ditentukan dengan cara berikut; Kedalam 2,5 ml amilum 1%, 0,5 ml bufer asetat 0,2M, pH 4,5, ditambah 0,5 ml ekstrak

enzim. Campuran reaksi di ingkubasi pada 50 °C selama 30 menit. Gula reduksi yang terbentuk sebagai hasil reaksi yang dikatalisa oleh enzim amilase ditentukan secara Nelson-Somogyi. Satu internasional unit aktifitas enzim amilase dinyatakan dengan µmol gula reduksi yang terbentuk permenit.

HASIL DAN DISKUSI

Dari penapisan bakteri tahan sianida pada konsentrasi sianida 8.000 ppm didapatkan delapan spesies bakteri. Tidak ada bakteri yang tumbuh pada medium yang mengandung 9.000 dan 10.000 ppm sianida. Bakteria ini telah diisolasi dan diidentifikasi sampai tingkat genera (Tabel 1). Hasil identifikasi berdasarkan pada pengamatan makroskopis, mikroskopis dan biokimia. Bakteri ini semuanya termasuk Divisi Protophyta, Kelas Schyzomycetes .

Tabel 1. Klasifikasi bakteri Tahan Sianida didalam Limbah Cair Pabrik Tapioka PT. Incasi Raya.

Devisio : Protophyta
Kelas : Schyzomycetes

No	Ordo	Famili	Genus
1	Eubacteria	Bacillaceae	*Bacillus*
2		Lactobacillaceae	*Streptococcus*
3		Enterobacteriaceae	*Citrobacter*
4			*Serretia*
5			*Proteus*
6	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	*Pseudomonas*
7			*Bordotella*
8		Methylomonadaceae	*Methyllococcus*

Semua spesies yang didapat diatas mempunyai kemampuan untuk mengubah sianida. Dari uji kemampuan mengurai sianida didapatkan bahwa *Methyllococcus sp* mempunyai kemampuan merubah sianida terbesar. Sekitar 85% sianida dirubah oleh mikroba ini dalam waktu 4 hari. *Pseudomonas* yang salah satu spesiesnya (*Pseudomonas putida*) dilaporkan mempunyai enzim pengurai sianida, aminohydrolase (EC 3.5.5.1) dan amidase (EC 3.5.1.4), hanya menguraikan sianida sekitar 51% selama 4 hari (Tabel 2). Sekitar 18% sianida berubah setelah 4 hari secara spontan. Penurunan sianida didalam medium berbanding lurus dengan kenaikan jumlah sel masing-masing spesies mikroba (data tidak dimuat).

Tabel 2. Sianida (CN^-) yang diubah setiap hari selama 4 hari oleh bakteri tahan sianida Medium KCN (100 ppm) cair diinokulasi dengan bakteri, kemudian diukur kadar sianida yang tertinggal setelah 1,2,3 dan 4 hari. % sianida yang diubah didapatkan dengan rumus berikut; "$[CN^-_{awal}) - CN^-_{yang\ tinggal}] : [CN^-_{awal}] \times 100\%$ "

Spesies bakteri	Sianida yang diubah setiap hari selama 4 hari (%)			
	Hari ke 1	Hari ke 2	Hari ke 3	Hari ke 4
Bacillus sp	8	25	31	57
Streptococcus sp	25	28	44	65
Citrobacter sp	8	11	16	40
Serretia sp	31	37	45	78
Proteus sp	25	31	37	70
Pseudomonas sp	8	18	28	51
Bordatella sp	11	21	25	46
Methyliococcus sp	34	40	49	85
Kontrol	1	5	11	18

Terhadap masing-masing spesis bakteri tahan sianida tersebut diatas dilakukan uji aktifitas enzim amilase berdasarkan luas daerah bening yang terbentuk disekitar koloni pada medium yang mengandung pati dan lugol. Dari delapan koloni spesies tersebut 3 spesies yaitu *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* dan *Serana sp* memperlihatkan adanya aktifitas enzim amilase yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni yaitu berjari-jari 15, 13 dan 3 cm berturut-turut setelah 3 hari. Bakteri yang memberikan aktifitas enzim amilase terbesar adalah *Pseudomonas sp*. Bakteri *Pseudomonas sp* selanjutnya digunakan untuk fermentasi pati dan aktifitas enzim amilase yang diekskresikan kemedium dipantau setiap hari. Dari data yang didapatkan ternyata bahwa aktifitas enzim amilase tertinggi pada jam ke 24 fermentasi (data tidak dimuat). Setelah itu aktifitas enzim amilase kelihatan menurun, mungkin karena enzim ini mengalami penguraian oleh enzim protease.

KESIMPULAN

Bakteri yang terbaik dalam mencerna sianida dan pati adalah *Pseudomonas sp*. Bakteri ini berpotensi digunakan untuk mengolah limbah industri tapioka secara sendiri adalah. *Pseudomonas sp*. juga berpotensi sebagai sumber enzim amilase untuk industri makanan seperti dalam industri sirup tinggi fruktosa. Namun sebelum bakteri ini digunakan untuk keperluan diatas, perlu diperiksa terlebih dahulu apakah bakteri ini aman untuk kesehatan. Sedangkan bakteri pencerna sianida terbaik adalah

Methylococcus sp., tetapi bakteri ini tidak dapat mencerna pati. *Methylococcus sp.* berpotensi untuk dikembangkan sebagai mikroba pengurai sianida, dan dapat dikembangkan untuk mengolah limbah tapioka bersama-sama dengan *Pseudomonas sp.*

DAFTAR PUSTAKA

Babu, G.R.V., J.H. Wolfram, K.D. Chapatwala, 1992. Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Ind. Microbiol.* 9: 235-238.

Basheer, S., O. M. Kut, J. E. Prenosil, J. R. Bourne. 1993. Development of an enzyme membrane reactor for treatment of cyanide-containing wastewaters from the food industry. *Biotechnol-Bioeng.* 41: 465-473.

Campos, L., C. R. Felix., 1995. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. Appl-environ-microbiol. 61: 2436-2438.

Chapatwala, K. D., G. R. V. Babu, J. H. Wolfram. 1993. Screening of encapsulated microbial cells for the degradation of inorganic cyanides, *J. Ind. Microbiol.* 11: 69-72.

Chapatwala, K.D., G.R.V. Babu, E.R. Armstead, E.M. White, J.H. Wolfram, 1995. A kinetic study on the bioremediation of sodium cyanide and acetonitrile by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 717-726.

James, J. A., B. H. Lee. 1995. Cultural conditions for production of glucoamylase from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621, *J. Appl. Bacteriol.* 79: 499-505.

Johne, S. 1990. Cyanogenic Plants p. 65-93. *In* Rizk, A. M (ed) Poisonous Plant Contamination of Edible Plants. CRC Press Boca Roton.

Lay, B. W., 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*, Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Le-Gal-Coeffet, M.F., A.J. Jacks, K. Sorimachi, M.P. Williamson, G. Williamson, D.B. Archer, 1995. Expression in *Aspergillus niger* of the starch-binding domain of glucoamylase. Comparison with the proteolytically produced starch-binding domain, *Eur.J. Biochem.* 233: 561-567.

Tominaga, M., K. Sato. 1996. Lactic acid fermentation of saccharified solution from rice flour, *J. Food Sci.* 61: 627-631.

Vandersall, A.S., R.G. Cameron, C.J. Nairn-III. G. Yelenosky, R.J. Wodzinski, 1995. Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* (syn. A. ficuum) NRRL 3135.,*Prep. Biochem.*: 29-55.