

## PENGARUH KONSENTRASI MEDIA SOYBEAN DAN 20 JENIS L- ASAM AMINO PADA PRODUKSI ANTI JAMUR, ITURIN A

Yuliar

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI  
Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46, Cibinong, Bogor

### Abstract

*Influence of soybean meal concentration and 20 kinds of L-amino acids in iturin A production. The use of chemical pesticides has caused serious environmental problems and thus the demand for safer pesticides is increasing. One alternative is microbial pesticides that suppress fungal and bacterial of plant pathogens. Bacillus subtilis has been known as producer of lipopeptide antibiotics, like iturin A, plipastatin and surfactin. In this study, iturin A as an antifungal of plant pathogens was produced on varieties of soybean meal concentration; i.e. 8%, 10%, 12%, and 15% using B.subtilis RB14-CS.*

*The result indicates that 8% soybean meal concentration produced the highest of iturin A production ( 2469 mg L<sup>-1</sup>) compared to the others. Beside the effect of nitrogen source ( soybean), the influence of 20 kinds of L-amino acids on an enhancement of iturin A productivity were observed. The examined L-amino acids were L-ala, L-arg, L-asn, L-asp, L-cys, L-glu, L-gln, L-gly, L-his, L-ile, L-leu, L-lys, L-met, L-pro, L-phe, L-ser, L-thr, L-tyr, L-trp and L-val. The results show that no one of them could improve the iturin A productivity on soybean meal medium.*

**Key words;** *B.subtilis RB14-CS, 20 kinds of L-amino acids, soybean meal*

### 1. PENDAHULUAN

*Bacillus subtilis* adalah penghasil 3 jenis senyawa antibiotik yang berbentuk siklik lipopeptida yaitu; Iturin<sup>1)</sup>, *Fengycins*<sup>2)</sup>, atau *Plipastatins*<sup>3)</sup>, dan *Surfaktin*<sup>4)</sup>. Iturin terdiri dari C14 atau C15  $\beta$ -amino acid yang mengandung suatu makrosiklik heptapeptida dengan D dan L  $\alpha$ -amino acids<sup>1)</sup>. *Surfaktin* adalah siklik polipeptida yang mengandung gugus hidroksikarbonik dengan aktivitas permukaan yang kuat. Kelompok *Fengycin* dan *Plipastatin* adalah *siklik lipopetida* yang terdiri dari 10 L- dan D-  $\alpha$ -amino acids<sup>2)</sup>.

Antibiotik adalah produk komersial mikroba yang sangat potensial, oleh karena itu masalah produksinya mendapat banyak perhatian, baik dikalangan para

peneliti maupun bagi industri farmasi dan pertanian. Produksi antibiotik dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen, fosfat, dan kondisi fermentasi, seperti pH, aerasi dan agitasi. Misalnya untuk produksi simosiklin yang tertinggi dicapai pada medium sintetik dengan gliserol sebagai sumber karbon dan lisin sebagai sumber nitrogen<sup>5)</sup>. Biasanya produksi antibiotik pada medium sintetik adalah lebih rendah dibanding produksi pada medium kompleks.

Penambahan minyak kedele dapat meningkatkan produksi *chepalospirin* dengan menggunakan jamur *Acremonium chrysogenum*, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap morfologi jamurnya<sup>6)</sup>.

Sumber nitrogen berperan penting dalam produksi antibiotik. Produksi surfaktin di dalam "batch culture" sangat dipengaruhi oleh kondisi metabolisme nitrogen<sup>7)</sup>. Pada produksi iturin A dengan menggunakan *Bacillus subtilis* strain RB14-CS, tepung kedele (buangan dari industri minyak kedele) merupakan sumber nitrogen yang terbaik dan menghasilkan iturin A dengan konsentrasi yang tertinggi dari semua produksi iturin A yang pernah dilaporkan sebelumnya<sup>8)</sup>. Karena tingginya produksi iturin A pada medium kedele ini, maka perlu diteliti lebih lanjut konsentrasi tepung kedele yang optimum dalam menghasilkan iturin A. Selain itu dalam penelitian ini juga diamati pengaruh penambahan 20 jenis L-asam amino dalam produksi iturin A dengan menggunakan medium kedele. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh berbagai konsentrasi medium kedele dan penambahan 20 jenis L-asam amino dalam produksi anti jamur patogen tanaman, iturin A.

## 2. METODOLOGI

### 2.1. Mikroorganisme

*Bacillus subtilis* strain RB-14 CS adalah bakteri produser iturin A.

### 2.2. Media Kedele

Tepung kedele dengan berat sesuai perlakuan (3,2 gram=8%, 4 gram= 10%, 5 gram= 12%, 6 gram= 15%) yang berasal dari buangan industri minyak kedele "Honen Corporation, Tokyo" dilarutkan dengan 23 mL akuadest di dalam Erlenmeyer flask (ukuran 200 mL). Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf (121°C selama 20 menit). Setelah sterilisasi, ditambahkan secara aseptik senyawa-senyawa berikut; 6,7% maltose,  $K_2HPO_4$  0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, 25 ppm  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 22 ppm  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ , and 184 ppm  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .

### 2.3. Prekultivasi

Lima milliliter LB media steril di dalam test tube diinokulasi dengan 10  $\mu$ L RB14-CS,

sebelumnya 5  $\mu$ L streptomycin (20 mg L-1) di tambahkan ke dalam *test tube*. Setelah itu diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 37°C, 124 spm (*shake per minutes*) selama 16 jam.

## 2.4. Kultivasi

### a. Pada Media Kedele

Empat puluh mililiter media kedele steril (dengan konsentrasi sesuai perlakuan) diinokulasi dengan 400 $\mu$ L prakultivasi RB14-CS, kemudian diinkubasi selama tujuh hari pada shaker inkubator 30°C, 120 spm. Parameter yang diamati adalah produksi iturin A, pH, dan jumlah sel RB14-CS.

### b. Pada Media Kedele Yang Dimodifikasi Dengan 20 Jenis Asam Amino

Media kedele dengan konsentrasi 8% ditambah dengan 0.8% masing-masing L-asam amino berikut; L-ala, L-arg, L-asn, L-asp, L-cys, L-glu, L-gln, L-gly, L-his, L-ile, L-leu, L-lys, L-met, L-pro, L-phe, L-ser, L-thr, L-tyr, L-trp, dan L-val. Setelah itu diinokulasi dengan 400 $\mu$ L prakultivasi RB14-CS, kemudian diinkubasi selama tujuh hari pada shaker inkubator 30°C, 120 spm. Parameter yang diamati adalah produksi iturin A, pH dan jumlah sel RB14-CS. Ekstraksi dan pengukuran konsentrasi iturin A. Seratus  $\mu$ L kultivasi ditransfer ke dalam *Eppendorf* ukuran satu mL, kemudian dilarutkan dengan 900  $\mu$ L *buffer* ( $CH_3CN$ : 10mM  $CH_3COONH_4$  (35:65) (v/v)). Setelah itu di putar selama 30 menit pada temperatur ruang, kemudian disentrifus (15,000 x g selama 10 menit, pada temperatur 4°C). Selanjutnya supernatan difilter dengan 0,20  $\mu$ m PTFE (*polytetrafluoroethylene*) membran filter (Advantec 020). Dua puluh  $\mu$ L hasil filtrasi ini diinjeksikan ke HPLC. Kondisi HPLC yang dipakai untuk analisis iturin A adalah sebagai berikut; fase mobil, asetonitril : 10mM  $CH_3COONH_4$  = 35:65 (v/v). Kolom ODS (*chromolith performance* RP-18C  $\Delta$ 100-4.6, Merck KG9A), column temperatur kolom 30°C, aliran kecepatan 2mL/menit.

## 2.5. Pengukuran pH

Fluktuasi pH pada media kultivasi untuk produksi iturin A diukur dengan pH meter.

## 2.6. Jumlah Sel RB14-CS

Jumlah sel RB14-CS pada media kultivasi diamati setelah diinokulas ke media LB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam sampai dengan dua hari.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

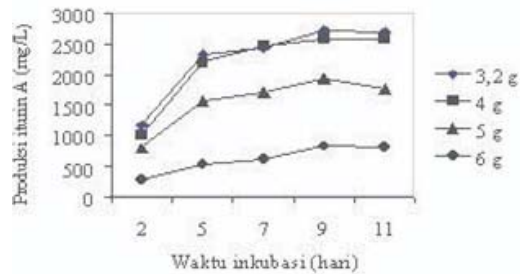
### 3.1. Hasil

Pengaruh berbagai konsentrasi kedele sebagai sumber nitrogen pada produksi iturin A. Gambar 1 menunjukkan produksi iturin A pada media kedele pada berbagai konsentrasi (8%, 10%, 12%, dan 15%). Konsentrasi tepung kedele yang paling efektif dalam menghasilkan iturin A adalah 8% dengan jumlah produksinya 2469 mgL<sup>-1</sup>, sedangkan dengan menggunakan tepung kedele 10% produksi iturin sedikit lebih rendah. Konsentrasi tepung kedele yang lebih tinggi dari 8% dapat menurunkan produksi iturin A. Pada konsentrasi tepung kedele 12%, produksi iturin A turun sebesar 31% (1709 mg L<sup>-1</sup>), dan dengan konsentrasi kedele 15% produksi iturin A turun 75% (627,51 mg L<sup>-1</sup>) dibandingkan dengan jumlah produksi iturin A pada konsentrasi kedele 8%.

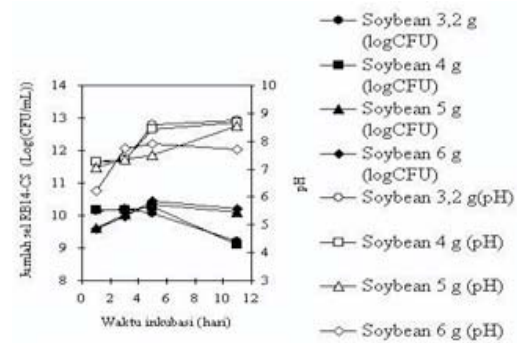
Gambar 2 menunjukkan variasi pH, dan jumlah sel RB14-CS dalam produksi iturin A pada berbagai konsentrasi kedele. Nilai pH terendah didapatkan pada konsentrasi kedele 15% (pemakaian 6 gram kedele). Jumlah sel RB14-CS bervariasi dari 1010 CFU mL<sup>-1</sup> sampai 109 CFU mL<sup>-1</sup>.

Pengaruh 20 jenis L-asam amino pada produksi iturin A dengan menggunakan kedele 8% sebagai sumber nitrogen. Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa dari 20 jenis L-asam amino yang diuji, tidak satu pun dapat meningkatkan produksi iturin A pada media soybean. Seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 4, penambahan L-asam amino

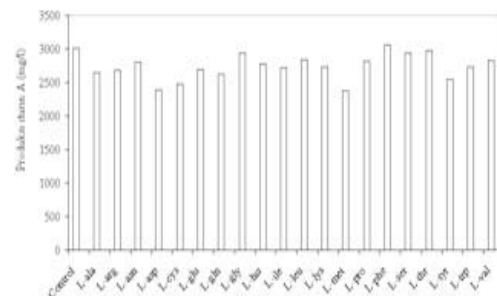
hanya merubah proporsi peak-peak dari iturin A (peak 1-peak 5), seperti penambahan L-leu menghasilkan proporsi peak 3 (iso-C15-β-amino acid) terbesar.



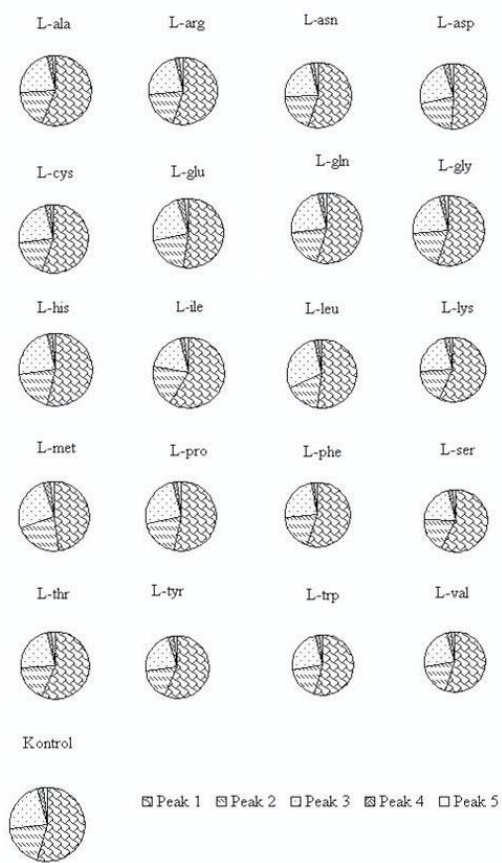
Gambar 1. Pengaruh konsentrasi tepung kedele pada produksi iturin A.



Gambar 2. Jumlah Sel RB 14-CS dan fluktuasi pH pada produksi iturin A dengan berbagai konsentrasi media kedele Penambahan L-asam amino



Gambar 3. Pengaruh 20 jenis L-asam amino pada produksi iturin A



Gambar 4. Pengaruh 20 jenis L-asam amino terhadap proporsi peak iturin A

### 3.2. Pembahasan

Menurunnya produksi iturin A, pada konsentrasi kedele yang lebih besar dari 8% (Gambar 1), mungkin oleh karena ketidak seimbangannya ratio antara sumber nitrogen dan sumber karbon yang dibutuhkan oleh strain RB14-CS untuk pertumbuhan dan untuk memproduksi iturin A. Tingginya konsentrasi tepung kedele (12 dan 15%), menyebabkan konsentrasi media semakin pekat sehingga dapat menghambat lancarnya adsorpsi nutrisi bagi strain RB14-CS dan berkurangnya oksigen terlarut dalam medium produksi tersebut.

Oksigen terlarut adalah parameter yang sangat penting untuk produksi metabolisme

sekunder pada *Streptosporangium*, produksi metabolisme sekundernya meningkat 10 x lipat dengan pengoptimuman kondisi oksigen terlarut<sup>9</sup>). Jumlah sel RB14-CS (Gambar 2) menurun pada waktu naiknya produksi iturinA, pola pertumbuhan seperti ini adalah sama dengan pola pertumbuhan mikroba penghasil antibiotik lainnya.

Produksi antibiotik itu meningkat pada waktu mikroba memasuki fase eksponensial akhir sampai fase stasioner akhir<sup>10</sup>). Sebaliknya pH media produksi (Gambar 2) berbanding lurus dengan produksi iturin A, pH tertinggi didapatkan pada produksi iturin A tertinggi dan nilai pH terendah didapatkan pada tingkat produksi yang terendah.

Penambahan 20 jenis L-asam amino yang diuji, tidak satu pun dapat meningkatkan produksi iturin A pada media soybean (Gambar 3). Penambahan L-asam amino hanya merubah proporsi peak-peak dari iturin A (peak 1-peak 5) (Gambar 4), Pada analisis HPLC, iturin A ditunjukkan oleh 5 peak, peak 1 sampai dengan peak 5, secara berurutan adalah mengandung senyawa berikut; n-C14- $\beta$ -amino acid, anteiso-C15- $\beta$ -asam amino, iso-C15-- $\beta$ -asam amino, iso-C16- $\beta$ -asam amino, dan n-C16- $\beta$ -asam amino. Penambahan L-leu menghasilkan proporsi peak 3 (iso-C15-- $\beta$ -asam amino).

Leusin meningkatkan produksi iso-C15- $\beta$ -asam amino dan iso-C15 asam lemak dari iturin A<sup>11</sup>). Leusin meningkatkan iso asam lemak ganjil dan iso  $\beta$ - asam amino ganjil sebanyak 55%<sup>12</sup>).

### 4. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan berikut:

1. Konsentrasi kedele yang paling efektif untuk produksi iturin A dengan menggunakan *Bacillus subtilis* RB14-CS adalah 8%, sedangkan konsentrasi kedele 12% dan 15 % menurunkan produksi iturin A, masing-masing sekitar 31% dan 75%.

2. Penambahan 0,8% L-asam amino berikut; L-ala, L-arg, L-asn, L-asp, L-cys, L-glu, L-gln, L-gly, L-his, L-ile, L-leu, L-lys, L-met, L-pro, L-phe, L-ser, L-thr, L-tyr, L-trp, dan L-val tidak dapat meningkatkan produksi iturin A, tetapi berpengaruh terhadap proporsi dari ke lima peak iturin A.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B.C., and Lederer, E., 1978. *Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from Bacillus subtilis*. *Biochem* 17:3992-3996.
2. Vanittakom, N., and Loeffler, W., 1986. *Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by Bacillus subtilis F-29-3*. *J. Antibiot.* 39 (7):888-90.
3. Nishikaori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., and Umezawa, H., 1986. *Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by Bacillus cereus BMG302-fF67.III*. Structural elucidation of plipastatins *J. Antibiot.* 39:757-761.
4. Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G., 1968. *Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by Bacillus subtilis: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation*. *Biochem Biophys. Res. Commun* 31:488-494.
5. Theobald, U., Schimana, J., and Fiedler, H. 2000. *Microbial growth and production kinetics of Streptomyces antibioticus Tu 6040*. *Antonie van leeuwenhoek*, 78: 307-313
6. Sandor, E., Szentirmae, A., Paul, G.C., Thomas, C.R., Pocsi, L. and Karaffa, L., 2001. *Analysis of the relationship between growth, cephalosporin C production and fragmentation in Acremonium chrysogenum*. *Can. J. Microbol* 47:801-806.
7. Davis, D.A., Lyn, H.C., and Varley. 1999. *The production of surfactin in batch culture by Bacillus subtilis ATCC 21332 is strongly influenced by the condition of nitrogen metabolism*. *Enzyme Microbial Technol* 25:322-329.
8. Yuliar. 2002. *Study on medium compositions to enhance iturin A productivity by Bacillus subtilis RB14-CS*. (Master thesis). Tokyo. Tokyo Institute of Technology.
9. Pfefferle, C., Theobald, U., Fiedler, H-P., 2000. *Improved secondary metabolite production in the genus Streptosporangium by optimization of the fermentation conditions*. *J. Biotech* 80:135-142.
10. Martin, J.F., and Demain, A.L., 1980. *Control of antibiotics biosynthesis*. *Microbiol. Rev* 44, 230-251 (1980).
11. Hourdou, M.L., Besson, F., and Michel, G., 1988. *Studies on the biosynthesis of  $\beta$ -amino acids, the lipid moiety of iturin A, in Bacillus subtilis*. *J. Antibiot* 41: 297-211.
12. Besson, F., and Hourdou, M.L., 1987. *Effect of  $\beta$ - amino acids on the biosynthesis of amino acids constituents of bacillomycin F*. *J. Antibiot* 40:221-223.



**JHI**<sup>TM</sup>  
Jurnal Hidrosfir Indonesia

## **JURNALHIDROSFIR INDONESIA**

ISSN :1907-1043 Akreditasi : 118/Akred-LIPI/P2MBI/06/2008

Alamat Redaksi : Gedung II Lantai 20 BPPT Jl. M.H. Thamrin No.8 Jakarta 10340

Telp. 021-316 9755, 316 9737; Fax. 021-316 9760

e-mail : [jurhidros@scientist.com](mailto:jurhidros@scientist.com), [arif74@webmail.bppt.go.id](mailto:arif74@webmail.bppt.go.id)

### Undangan Menulis

**JHI**, Jurnal Ilmiah Terakreditasi terbit 3X setahun memberi kesempatan bagi Anda untuk mempublikasikan temuan dan pemikiran yang berkaitan tentang penguasaan IPTEK bidang kebumian.



Informasi  
Pendaftaran  
dan Penerimaan  
Makalah:

**Arif Dwi Santoso**  
Gedung II Lantai 19  
Telp. 316 9737  
[arif74@webmail.  
bppt.go.id](mailto:arif74@webmail.bppt.go.id)