

UJI PRODUKSI BIOSURFAKTAN OLEH *Pseudomonas* sp. PADA SUBSTRAT YANG BERBEDA

Fatimah

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga Surabaya
Jl. Mulyorejo, Kampus C, 60115. Telp. 031-5936501. e-mail: mazikabf@yahoo.com

ABSTRACT

*Biosurfactant, microbial metabolite whose properties like surfactant, was suggested to replace chemically synthesized surfactant for take in hand environmental pollution by petroleum hydrocarbon. This work was done to examine potency of *Pseudomonas* sp. isolated from Tanjung Perak Harbor to produce biosurfactant. Also, to know the effect of different substrates (glucose + yeast extract, lubricating oil and hexadecane) toward biosurfactant production. *Pseudomonas* sp. grown in mineral synthetic water and biosurfactant production was measured on stationary phase. Biosurfactant production based on emulsification activity and surface tension reduction of supernatant (using Du Nouy tensiometer). Solar, lubricating oil, and hexadecane were used to examine emulsification activity. Results indicated that *Pseudomonas* sp. have a potency to produce biosurfactant. Surface tension of supernatant decreased up to 20 dyne/cm, when grown on hexadecane substrate. Hexadecane is the best growing substrate for biosurfactant production than others.*

Key words: biosurfactant, *Pseudomonas* sp., emulsification activity, surface tension

PENGANTAR

Pencemaran lingkungan oleh senyawa hidrokarbon minyak terus mengalami peningkatan dan telah menimbulkan dampak yang berarti bagi kesehatan organisme hidup (Atlas, 1991). Bioremediasi merupakan salah satu upaya untuk mengurangi bahan pencemar dengan bantuan organisme. Biodegradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme (bakteri dan jamur) telah diketahui sebagai mekanisme utama dalam proses eliminasi senyawa hidrokarbon di laut (Ni'matuzahroh, 1999). Salah satu faktor yang sering membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon adalah sifat kelarutannya yang rendah (Francy *et al.*, 1991), sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme. Upaya yang umum dilakukan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon adalah dengan pemberian surfaktan sintetis. Penggunaan surfaktan ini menimbulkan masalah bagi organisme hidup karena bersifat toksik, *non-degradable* serta dapat menghambat proses degradasi oleh mikroorganisme (Laha and Luthy, 1992 dalam Willumsen dan Karlson, 1997).

Alternatif lain untuk meningkatkan biodegradasi hidrokarbon adalah penggunaan biosurfaktan. Penggunaan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini mempunyai keuntungan lebih dibanding penggunaan surfaktan sintetis, karena sifatnya yang tidak toksik dan lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme (Richana *et al.*, 1998).

Biosurfaktan merupakan komponen mikroorganisme yang terdiri atas molekul hidrofobik dan hidrofilik, yang mampu mengikat molekul hidrokarbon tidak larut air

dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Selain itu biosurfaktan secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon sehingga mudah untuk didegradasi (Koch, *et al.*, 1991).

Penelitian mengenai bakteri penghasil biosurfaktan telah banyak dilakukan, baik dengan menumbuhkan pada substrat larut air maupun tidak larut. Carillo *et al.* (1996) menyatakan bahwa mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan ketika ditumbuhkan pada substrat yang tidak larut (seperti hidrokarbon, minyak, dan lilin) atau pada substrat yang larut (karbohidrat). Miguez dan Ingram (1986) menunjukkan adanya produksi biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* ketika ditumbuhkan dalam substrat yang berbeda, yaitu glukosa dan heksadekan. Namun produksi biosurfaktan pada substrat heksadekan menunjukkan aktivitas emulsifikasi yang lebih baik serta penurunan tegangan permukaan kultur secara signifikan.

Dalam upaya mengoptimalkan bioremediasi lingkungan perairan di Indonesia, pencarian strain lokal yang mempunyai kapasitas tinggi dalam mendegradasi senyawa pencemar dan menghasilkan biosurfaktan sangat diharapkan. Ni'matuzahroh (1999) telah berhasil mengisolasi bakteri pengurai hidrokarbon dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Hasil uji awal pendugaan produksi biosurfaktan dengan menggunakan media agar darah (uji hemolisis) diperoleh beberapa strain bakteri yang diduga berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan. Di antara isolat-isolat tersebut, *Pseudomonas* sp. menunjukkan kemampuan hemolisis tipe β . Adanya zona terang pada uji hemolisis merupakan indikasi awal bahwa bakteri tersebut berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan. Oleh sebab

itu, penelitian ini diarahkan untuk menguji potensi strain bakteri *Pseudomonas* sp. dalam memproduksi biosurfaktan serta untuk mengetahui pengaruh jenis substrat terhadap produksi biosurfaktan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas* sp. yang merupakan koleksi Laboratorium Biologi Mikrobiologi FMIPA Unair.

Media dan Kondisi Pertumbuhan

Medium pertumbuhan yang digunakan ada 3 macam berupa medium dasar air laut sintetis dengan substrat 20 g/l glukosa dan 0,5 g/l ekstrak *yeast* (medium I), 20 g/l heksadekan (medium II), dan 20 g/l pelumas (medium III).

Komposisi air laut sintetis (Gilewicz *et al.*, 1997) adalah NaCl (11,7 g/l), NH₄Cl (3,00 g/l), KCl (0,75 g/l), Tris (4,00 g/l), MgSO₄ (7,85 g/l), CaCl₂ (1,47 g/l), FeSO₄ (0,10 mM), dan K₂HPO₄ (0,33 mM). pH medium dibuat 7,00. Inokulum yang digunakan adalah bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan dalam medium *Nutrien Broth* (NB) dan diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 90 rpm/menit selama 24 jam pada suhu 30 °C. Selanjutnya dilakukan penanaman bakteri dari kultur NB ke dalam prekulturan bakteri.

Prekultur Bakteri

Prekultur dibuat dalam Erlenmeyer berukuran 100 ml yang berisi 25 ml medium pertumbuhan. *Pseudomonas* sp. ditumbuhkan masing-masing ke dalam medium I, medium II dan medium III yang telah disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 30 °C.

Kultur Bakteri

Komposisi medium kultur sama dengan medium prekulturan, namun dibuat dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisi 150 ml medium pertumbuhan. Prekultur dimasukkan ke dalam kultur bakteri sebanyak 2% dari volume kultur ($Optical\ Density/OD = 0,5$ dengan $\lambda = 610\text{ nm}$), selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 30 °C, sehingga didapatkan kurva pertumbuhan. Produksi biosurfaktan diukur pada fase stasioner. Kultur dibuat duplo, satu Erlenmeyer untuk uji produksi biosurfaktan, sedang lainnya untuk pembuatan kurva pertumbuhan bakteri.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Untuk mendapatkan fase stasioner, dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) pada kultur dengan substrat hidrokarbon (heksadekan dan pelumas) dan metode kerapatan optik (*Optical Density/OD*) pada kultur dengan substrat glukosa. TPC dilakukan setiap dua hari sekali dan dinyatakan sebagai hasil logaritmik dari jumlah sel/ml kultur, sedangkan pengukuran OD dilakukan setiap dua jam sekali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri.

Uji Produksi Biosurfaktan

Kultur bakteri yang telah mencapai fase stasioner disentrifugasi dengan kecepatan 3333 rpm selama 33 menit sehingga diperoleh supernatan yang terpisah dari sel bakteri. Selanjutnya biosurfaktan dalam supernatan diuji aktivitas emulsifikasi dan tegangan permukaannya.

Pengukuran aktivitas emulsifikasi

Aktivitas emulsifikasi diukur dengan menggunakan metode Johnsons *et al.* (1992), 4,5 ml supernatan ditambah dengan 0,5 ml hidrokarbon uji (pelumas, solar atau heksadekan). Setelah divorteks selama 1 menit, campuran tersebut diukur kestabilan emulsinya dengan mengukur nilai OD campuran setelah inkubasi selama 2 jam, pada panjang gelombang 610 nm. Kontrol terdiri dari air mineral sintetis dan hidrokarbon uji. Aktivitas emulsifikasi dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan.

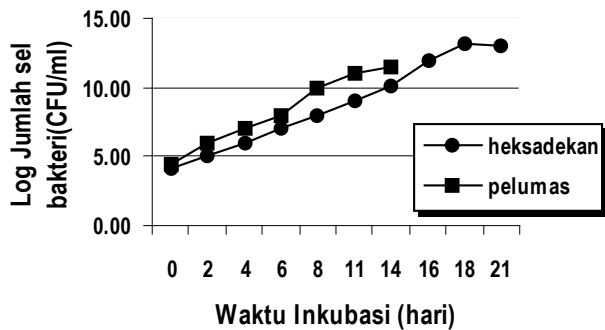
Pengukuran tegangan permukaan

Nilai tegangan permukaan supernatan kultur bakteri diukur menggunakan alat tensiometer Du Nouy. Duapuluh mililiter supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang dibersihkan dari lemak dengan menggunakan asam bikromat, selanjutnya dilakukan pengukuran tegangan permukaan supernatan. Penurunan nilai tegangan permukaan sebesar lebih dari 10 dyne/cm menunjukkan bahwa bakteri tersebut berpotensi menghasilkan biosurfaktan (Francy, *et al.*, 1991). Nilai tegangan permukaan dilaporkan sebagai hasil rata-rata dari 5 ulangan.

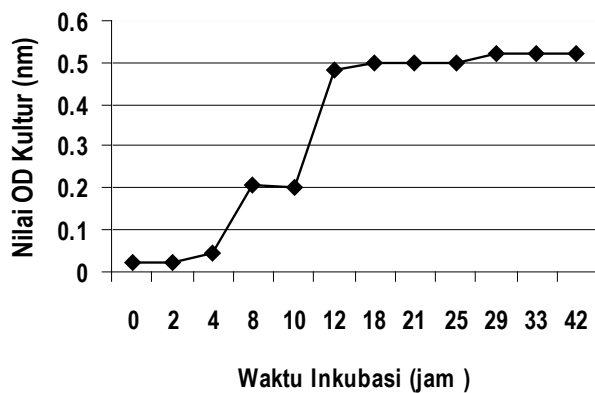
HASIL

Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. pada tiga jenis substrat berbeda (glukosa, pelumas, dan heksadekan) ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk menentukan fase stasioner dari kultur bakteri di mana biosurfaktan dihasilkan. Pemilihan fase tersebut didasarkan pada banyaknya penelitian yang mengamati

adanya produksi biosurfaktan pada fase stasioner (Miguez dan Ingram, 1986; Koch *et al.*, 1991; Desai dan Desai, 1993). Pada substrat glukosa fase stasioner dicapai setelah kultur berumur 18 jam sedangkan pada substrat hidrokarbon fase stasioner dicapai pada umur kultur 21 hari.



Gambar 1. Grafik pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dengan substrat hidrokarbon



Gambar 2. Grafik pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dengan substrat glukosa

Hasil sentrifugasi kultur setelah mencapai fase stasioner diperoleh supernatan, yang selanjutnya digunakan untuk menguji kemampuan *Pseudomonas* sp. dalam memproduksi biosurfaktan. Hasil uji aktivitas emulsifikasi dari supernatan ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai aktivitas emulsifikasi supernatan kultur bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada 3 substrat berbeda terhadap tiga minyak uji (Nilai OD)

Substrat	Minyak uji		
	Solar	Pelumas	Heksadekan
Glukosa + eks. yeast	0,026	0,031	0,007
Pelumas	0,014	0,000	0,000
Heksadekan	0,012	0,017	0,009

Berdasarkan Tabel 1, diketahui terdapat aktivitas emulsifikasi pada kultur dengan substrat glukosa dan heksadekan. Sementara kultur dengan substrat pelumas hanya menunjukkan aktivitas emulsifikasi pada minyak uji solar. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Pseudomonas* sp. lebih banyak mengemulsi minyak uji solar dibanding minyak uji yang lainnya. Hasil uji tegangan permukaan supernatan kultur disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Nilai tegangan permukaan supernatan kultur *Pseudomonas* sp. pada tiga substrat berbeda

Substrat	Tegangan permukaan (dyne/cm)	Penurunan tegangan permukaan dibanding kontrol (dyne/cm)
Glukosa + eks yeast	59,82	12,18
Pelumas	63,05	08,95
Heksadekan	52,00	20,00
Kontrol	72,00	00,00

Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai tegangan permukaan supernatan ketiga kultur. Turunnya nilai tegangan permukaan supernatan dievaluasi untuk mengetahui potensi bakteri dalam menghasilkan biosurfaktan. Nilai tegangan permukaan terendah dicapai pada kultur dengan substrat heksadekan (52 dyne/cm), dengan penurunan sebesar 20 dyne/cm dibanding kontrol. Menurut Francy *et al.* (1991) penurunan nilai tegangan permukaan sebesar > 10 dyne/cm merupakan indikasi bakteri tersebut berpotensi menghasilkan biosurfaktan.

PEMBAHASAN

Kemampuan bakteri untuk menggunakan karbon dari substrat pertumbuhannya akan menentukan pengubahan karbon tersebut dalam bentuk biosurfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri bisa saja berbeda kualitas maupun kuantitasnya ketika ditumbuhkan pada substrat yang berbeda, sehingga memberikan aktivitas emulsifikasi yang berlainan, serta perbedaan kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan kultur (Desai dan Desai, 1993). *Pseudomonas* sp. ketika ditumbuhkan pada media air laut sintetis dengan komposisi media dan konsentrasi bakteri yang sama, menghasilkan pengaruh yang berbeda karena adanya perbedaan substrat (sumber karbon). Hal ini menyebabkan biosurfaktan yang dihasilkan menunjukkan aktivitas yang berbeda pula.

Hasil uji aktivitas emulsifikasi menunjukkan bahwa dalam substrat glukosa dan heksadekan, *Pseudomonas* sp. memiliki aktivitas yang lemah. Sementara itu dalam substrat pelumas tidak menunjukkan aktivitas emulsifikasi yang

berarti. Pada uji tegangan permukaan juga menunjukkan kecenderungan yang sama. Penurunan tegangan permukaan terjadi pada kultur dengan substrat glukosa dan heksadekan, sementara substrat pelumas tidak. Dari uji tersebut dapat dinyatakan bahwa ketika ditumbuhkan dalam substrat glukosa dan heksadekan, *Pseudomonas* sp. menghasilkan biosurfaktan yang bersifat aktif permukaan. Cooper *et al.*, (1986 dalam Willumsen and Karlson, 1997) membagi biosurfaktan menjadi dua kelompok yaitu surfaktan dengan berat molekul rendah (seperti glikolipid, soforolipid, trehalosalipid, asam lemak dan fosfolipid) yang terdiri dari molekul hidrofobik dan hidrofilik. Kelompok ini bersifat aktif permukaan, ditandai dengan adanya penurunan tegangan permukaan medium cair. Kelompok kedua adalah polimer dengan berat molekul besar, yang dikenal dengan *bioemulsifier* polisakarida amfipatik. Dalam medium cair, *bioemulsifier* ini memengaruhi pembentukan emulsi serta kestabilannya dan tidak selalu menunjukkan penurunan tegangan permukaan medium.

Biosurfaktan meningkatkan ketersediaan substrat tidak larut melalui beberapa mekanisme. Dengan adanya biosurfaktan, substrat yang berupa cairan akan teremulsi dibentuk menjadi misel-misel, dan menyebarkan ke permukaan sel bakteri. Substrat yang padat dipecah oleh biosurfaktan, sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel. Terdapat tiga cara transpor hidrokarbon ke dalam sel mikroba secara umum yaitu pertama interaksi sel dengan hidrokarbon terlarut dalam fase air. Pada kasus ini umumnya rata-rata kelarutan hidrokarbon oleh proses fisika sangat rendah sehingga tidak dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Kedua, kontak langsung (perlekatan) sel dengan permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar daripada sel mikroba. Pada kasus yang kedua ini sel mikroba melekat pada permukaan tetesan hidrokarbon yang lebih besar dari pada sel, dan pengambilan substrat dilakukan dengan difusi atau transpor aktif. Ketersediaan substrat untuk penempelan sel merupakan faktor yang membatasi pengambilan substrat. Kontak langsung antara hidrokarbon dengan sel menunjukkan adanya mekanisme yang penting dalam pengambilan substrat. Ketiga, interaksi sel dengan tetesan hidrokarbon yang teremulsi atau tersolubilisasi oleh bakteri. Pada kasus ini sel mikroba berinteraksi dengan partikel hidrokarbon yang lebih kecil daripada sel. Cara yang ketiga ini merupakan kebalikan dari kasus yang kedua. Dengan berkurangnya partikel substrat, maka daerah antar permukaan antara hidrokarbon dengan air akan bertambah, sehingga dapat meningkatkan pengambilan substrat oleh mikroba (Goswami dan Singh, 1990).

Pseudomonas sp. ketika ditumbuhkan dalam substrat pelumas menghasilkan biosurfaktan yang melekat pada

membran sel. Biosurfaktan tidak diekskresikan ke dalam medium sehingga aktivitas emulsifikasi supernatannya jauh lebih rendah dibanding supernatan dengan substrat glukosa dan heksadekan. Dalam hal ini *Pseudomonas* sp. mengembangkan mekanisme perlekatan terhadap substrat pelumas. Hasil uji Aktivitas emulsifikasi (Tabel 1) menunjukkan bahwa besarnya kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsi hidrokarbon bergantung pada jenis biosurfaktan dan minyak uji yang digunakan. Biosurfaktan yang dihasilkan dalam kultur dengan substrat glukosa mempunyai aktivitas emulsifikasi yang lebih baik dibanding yang lain.

Miguez dan Ingram (1986) telah menumbuhkan *P. aeruginosa* pada substrat glukosa dan heksadekan. Pertumbuhan *P. aeruginosa* pada substrat heksadekan menyebabkan selnya bersifat lebih hidrofob. Hidrofobisitas sel ini menyebabkan sel tersebut menunjukkan aktivitas emulsifikasi lebih baik dan mampu menurunkan tegangan permukaan supernatan kultur secara signifikan dibanding sel yang ditumbuhkan pada substrat glukosa. Neufeld *et al.*, (1983 dalam Francy *et al.*, 1991) menegaskan bahwa pengaruh senyawa hidrokarbon pada komponen permukaan sel yang hidrofob dapat menyebabkan sel tersebut kehilangan integritas struktural selnya dan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium.

Kemampuan bakteri dalam memproduksi biosurfaktan berkaitan dengan keberadaan enzim regulatori yang berperan dalam sintesis biosurfaktan (Desai dan Desai, 1993). Mulligan *et al.* (1989) menunjukkan bahwa produksi surfaktin (jenis biosurfaktan) oleh *Bacillus subtilis* dipengaruhi oleh gen regulatori *com A*, *com P* dan *Spo OK*. Selain itu Nakano dan Zuber (1990) telah mengisolasi mutan *B. subtilis* dan menunjukkan bahwa dibutuhkan tiga lokus kromosom untuk mensintesis biosurfaktan (surfaktin).

Dari hasil uji potensi *Pseudomonas* sp. dalam memproduksi biosurfaktan dengan menggunakan tiga substrat yang berbeda, dapat disimpulkan bahwa *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri penghasil biosurfaktan, dan jenis substrat mempengaruhi aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan.

KEPUSTAKAAN

- Atlas RM, 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spil. *J Chem Tech Biotechnol* 52: 149–156.
- Carillo GG, Mardaraz C, Pitta –Alfarez, Guiliettu AM, 1996. Isolation and Selection of Biosurfactant Producing Bacteria. *Word J Microbiol and Biotechnol*. 12: 82–84.

- Desai JD and Desai AJ, 1993. Production of Biosurfactants. In: *Biosurfactant: Production, Properties, Application*. N. Kosaric (ed), Marcel Dekker Inc., New York, 66–97.
- Francy DS, Thomas JM, Raymond RL and Ward CH, 1991. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol* 8: 234–246.
- Gilewicz M, Ni'matuzahroh, Nadalig T, Budzinski H, Doumenq P, Michotey V and Bertrand JC, 1997. Isolation and Characterization of Marine Bacterium Capable of Utilizing 2-methyl phenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 528–533.
- Goswami P and Singh HD, 1990. The Effect of Immobilization on Rhamnolipid Production by *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Bacteriol*. University of Plymouth.
- Johnsons V, Sigh M, Saini VS, Andikari DK, Sista V and Yadav NK, 1992. Bioemulsifer Production Using Non Aseptic Fermentation of Mixed Cultures. *J Biotechnol and Bioeng* 44: 661–666.
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A and Reiser J, 1991. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutans. *J bacteriol*. 173(13), United State of America.
- Miguez CB and Ingram JM, 1986. *Can J Microbiol* 32: 248–252.
- Mulligan CN, Chow TYK, and Gibbs BF, 1989. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 486.
- Nakano MM and Zuber P, 1990. *CRC Crit Rev Biotechnol* 10: 223.
- Ni'matuzahroh, 1999. Pencarian Strain Bakteri Hidrokarbonoklastik di Kawasan Perairan Pantai Surabaya. *Laporan Penelitian*. Lembaga Penelitian UNAIR. Surabaya.
- Richana N, Helena YM, Ani S, Tun Tedja I, 1998. Produksi Biosurfaktan Lipopeptida oleh Isolat Bakteri Indigenous. *Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan: Peranan Mikrobiologi Dalam Agroindustri Untuk Menunjang Ketahanan Pangan Nasional*: 191–198.
- Willumsen PA, and Karlson U, 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH Contaminated Soils, for Production of Biosurfactans dan Bioemulsifiers. *Biodegradation* 7: 415–423.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**