

KARAKTERISTIK BIODEGRADASI ALKIL SULFONAT LINEAR OLEH *Pseudomonas aeruginosa*

I Made Sudiana

Research Center for Biology, The Indonesian Institute of Sciences
Jl. Juanda 18 Bogor 16122, Indonesia, Telp. 0251-324006, Fax. 0251-325854
E-mail: sudianai@yahoo.com

ABSTRACT

Detergent contained of Linear Alkyl Sulfonate (LAS) is toxic material to human, animal and microorganism. Strain S1 isolated from detergent contaminated soil was able to grow in media with LAS as a sole carbon source. LAS degradation took place under aerobic condition, with μ_{max} of 0.31-h^{-1} , $K_s = 7.75\text{ mg/L}$, $V_{max} = 1.04\text{ mg/L}\cdot\text{hour}^{-1}$ and $K_m = 8.119\text{ mg/L}$. Analyses of 16s rDNA revealed that S1 is belonging to *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Detergent, Linear Alkyl Sulfonate (LAS) and *Pseudomonas aeruginosa*

PENGANTAR

Penggunaan detergen untuk keperluan rumah tangga dan industri terus meningkat. Jenis surfaktan yang paling banyak digunakan dalam detergen adalah tipe anionik dalam bentuk sulfat (SO_4^{2-}) dan sulfonat (SO_3^-). Berdasarkan rumus struktur kimianya, detergen golongan sulfonat dibedakan menjadi dua jenis (Grayson, 1983), yaitu jenis rantai bercabang sebagai contoh Alkil Benzene Sulfonat (ABS), dan jenis rantai lurus Linear Alkil Sulfonat (LAS). Kedua kelompok senyawa tersebut di lingkungan terus meningkat (Kirk dan Othmer, 1979), sejalan dengan penggunaan detergen yang makin meningkat (Beaubian dan Jollicouer, 1984). Efek samping dari keberadaan LAS dan ABS adalah tercemarnya lingkungan yang dapat mengakibatkan kerusakan komponen ekosistem (Bitton, 1983), dan mikroba (Metelev *et al.*, 1983; Niven *et al.*, 1988), terutama yang berperan pada proses degradasi senyawa organik pada unit pengolahan limbah (Jackson dan Brown, 1970). Banyak mikroba dilaporkan mampu mendegradasi detergen (ABS dan LAS). Akan tetapi ABS lebih sulit diuraikan dibandingkan dengan LAS (Longman and Frederick, 1987). Banyak penelitian difokuskan kepada peran komunitas mikroba di dalam unit pengolahan limbah merombak senyawa detergen (Gledhil, 1974; Dunn dan Bull, 1982; Technolobagus, 1990). Unit pengolahan limbah merupakan sistem yang efektif dan terkontrol untuk mengendalikan kualitas kimia dan biologi air buangan yang memasuki ekosistem perairan (Anderson *et al.*, 1982). Untuk dapat membuat kajian unit pengolah limbah yang efektif dan efisien dalam merombak detergen maka diperlukan informasi mengenai karakteristik dan kinetika pertumbuhan jasad renik yang mampu melakukan degradasi detergen (Technolobagus, 1990). Penelitian ini bertujuan

mendapatkan jasad renik yang mampu mendegradasi LAS serta mengetahui kinetika degradasi dan pertumbuhan sel dalam sistem terkontrol.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sumber mikroba

Sumber mikroba yang digunakan adalah lumpur aktif dari unit pengolahan limbah Industri dan limbah domestik di Surabaya dan Tangerang, dan tanah yang dicemari oleh detergen.

Isolasi mikroba pendegradasi LAS

Sampel lumpur aktif dan limbah domestik diatas diaklimatisasi pada *Sequential Batch Reactor* (SBR). Aerasi diberikan dengan mengalirkan udara dengan pompa udara yang pada *out-let*nya difilter dengan menggunakan filter steril ukuran 0,20 mm. Aklimasi dilakukan selama 1 minggu. Aerasi ini ditujukan untuk meningkatkan populasi jasad renik yang bersifat aerobik. Kemudian sebanyak 100 ml kultur mikroba campuran yang teraklimatisasi selama 1 minggu, dipindahkan ke masing-masing labu Erlenmeyer (volume 250 ml). Konsentrasi LAS di dalam kultur dibuat menjadi 2, 10, 20, 50, dan 100 mg/L. Kemudian pertumbuhan mikroba pada masing-masing kultur diamati dengan cara mengambil satu tetes biakan dan dibuat preparat kering dengan pengecatan Gram. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Setelah 5 hari dilakukan isolasi bakteri yang tumbuh dengan menggunakan medium $\frac{1}{4}$ NA dengan penambahan LAS sesuai dengan asal dari kultur tersebut. Bakteri yang tumbuh paling cepat pada media yang mengandung LAS tertinggi selanjutnya di sub-kultur pada media $\frac{1}{4}$ NA dengan

penambahan 20 ppm deterjen. Penambahan deterjen dimaksudkan untuk menjaga kemampuan bakteri dalam degradasi LAS.

Seleksi dan identifikasi mikroba pendegradasi LAS

Seleksi pertumbuhan bakteri pengurai deterjen dilakukan pada medium cair dengan kandungan LAS 20 mg/L. Biak yang tumbuh paling cepat yang dicirikan oleh kenaikan turbiditas yang paling cepat dipilih untuk diuji lebih lanjut. Identifikasi mikroba dilakukan dengan menganalisis 16S rDNA (Malloy *et al.*, 1994; Nakase *et al.*, 1994).

Propagasi biakan untuk uji degradasi

Bakteri yang mampu tumbuh pada media LAS kemudian dimurnikan dan dilakukan identifikasi 16s rDNA. Biakan yang telah murni kemudian ditumbuhkan pada media NB untuk mendapatkan biomassa yang cukup untuk pengujian degradasi LAS, yaitu dengan menginokulasi biakan murni dari biak yang ditumbuhkan pada media ¼ NA dengan 20 ppm LAS ke dalam 500 ml medium NB dengan kadar LAS 20 mg/L, inkubasi dilakukan pada shaker (125 rpm) pada suhu 30° C, selama 48 jam. Hasil penelitian pendahuluan diketahui LAS sebanyak 20 mg/L akan habis dalam waktu 24 jam (data tidak diperlihatkan). Biomassa bakteri dipisahkan dari kultur (difraksinasi) dengan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 6000 rpm, suhu 10° C. Pellet bakteri digunakan untuk uji selanjutnya. Untuk menjaga terjadinya kontaminasi semua peralatan disterilisasi, dan penimbangan pellet dilakukan di dalam *clean bench*.

Kinetika pertumbuhan bakteri, dan biodegradasi LAS

Biomassa sel bakteri yang diperoleh dari fraksinasi berupa pellet ditimbang masing-masing 0,5 g dan diinokulasikan ke dalam media uji 200 ml dengan variasi konsentrasi LAS 1, 3, 5, 10, 20, 40 dan 50mg/L. Satu media tanpa penambahan biomassa sel disiapkan sebagai kontrol pada penentuan pertumbuhan. Media tersebut diinkubasi dengan penggojokan pada suhu 30°C. Pengukuran konsentrasi LAS, jumlah biomassa, dan pH dilakukan pada setiap interval waktu 3 jam selama 40 jam. Pengukuran jumlah biomassa dilakukan dengan mengukur tingkat turbiditasnya masing-masing media contoh dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Untuk keperluan analisis dibuat kurva standar hubungan antara

optical density (OD) dengan jumlah bakteri yang diketahui dalam suspensi sel atau berat kering (*Mixed Liquor Suspended Solid*) yang ditentukan mengikuti APHA, 1992.

Degradasi LAS

Pengukuran sisa LAS dalam kultur pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan metoda zat aktif biru metilena (MBAS) (Bailey, 1989). Larutan contoh sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung uji 10 ml, kemudian ditambahkan satu tetes NaOH 1 N, dikocok, diuji dengan indikator fenoltalein sehingga larutan berwarna merah muda tepat hilang. Selanjutnya ditambahkan 1 ml CHCl₃, 2,5 ml birumetilina, dan dikocok kuat selama 30 detik untuk ekstraksi. Tutup tabung uji sesekali dibuka selama ekstraksi. Setelah ekstraksi selesai, tabung uji dibiarkan sampai terjadi fase air dan kloroform. Fase air (lapisan atas) dipindahkan ke dalam botol uji yang baru menggunakan pipet tetes secara hati-hati untuk diekstrak kembali sebanyak lima kali dengan penambahan 1 ml CHCl₃ setiap kalinya. Fase organik (lapisan bawah) merupakan ekstrak kloroform. Semua ekstrak kloroform digabungkan ke dalam satu tabung uji, ditambahkan 3 ml larutan pencuci, dan dikocok kuat selama 30 detik. Tutup botol sesekali dibuka selama pencucian. Setelah pencucian selesai, tabung uji tersebut dibiarkan sampai terjadi pemisahan fase. Fase air (bagian atas) dibuang dengan menggunakan pipet tetes secara hati-hati dan ekstrak kloroform (bagian bawah) ditera dengan kloroform. Serapan masing-masing contoh diukur pada panjang gelombang maksimum 652 nm. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter pada setiap interval waktu.

HASIL

Absorpsi LAS oleh kultur campuran

Komunitas mikroba dalam lumpur aktif dan tanah tercemar aktif mendegradasi LAS (Tabel 1). Metoda MBAS cukup sensitive untuk mengukur LAS di dalam larutan terbukti dari rendahnya deviasi antara konsentrasi LAS perhitungan teoritis dengan hasil pengukuran. Absorpsi LAS ke dalam sel mikroba dipengaruhi oleh konsentrasi substrat sejenis di dalam sel, temperatur, pH, potensial redoks, keberadaan senyawa kompetitor, senyawa toksik seperti logam berat yaitu golongan halogen (Anderson *et al.*, 1982; Beaubien dan Jollicauer, 1984), keberadaan enzim pendegradasi, populasi komunitas mikroba yang berperan aktif dalam degradasi LAS (Ritz *et al.*, 1993).

Tabel 1. Pengukuran konsentrasi LAS hasil metabolisme komunitas mikroba

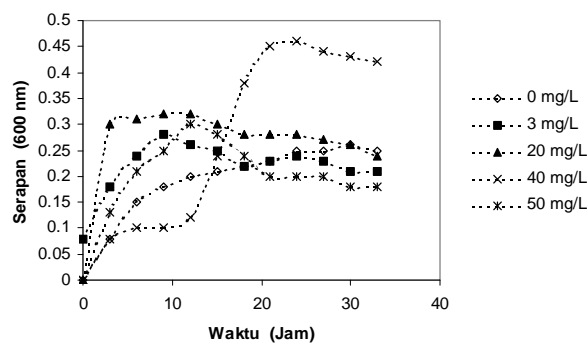
No.	Konsentrasi LAS teori di dalam kultur	Waktu (Jam)	Konsentrasi LAS hasil analisis didalam kultur
1	2 mg/L	0	2.1 mg/L
		24	0 mg/L
2	5 mg/L	0	5,9 mg/L
		24	0 mg/L
3	10 mg/L	0	11.3 mg/L
		24	0 mg/L
4	20 mg/L	0	20.4 mg/L
		24	0 mg/L

Jasad renik pendegradasi LAS

Didapat 20 isolat yang mampu tumbuh pada medium isolasi. Dua puluh isolat tersebut selanjutnya dilakukan seleksi secara kuantitatif dengan menghitung kecepatan pertumbuhan pada medium seleksi yang mengandung 20 mg/L LAS. Biak yang menunjukkan pertumbuhan tercepat, selanjutnya di sub-kultur untuk dilanjutkan uji penentuan kinetika pertumbuhan, dan kinetika degradasi LAS. Isolat yang mempunyai kecepatan pertumbuhan tertinggi adalah isolat S1. Hasil analisis 16s rDNA dari isolat S1 menunjukkan bahwa biak tersebut mempunyai kedekatan 98% dengan *Pseudomonas aeruginosa*.

Kinetika pertumbuhan Isolat S1 pada media LAS

S1 mampu tumbuh pada LAS sampai 50 mg/L (Gambar 1), pada konsentrasi LAS 100 mg/L, pertumbuhannya sangat terhambat (data tidak diperlihatkan)

**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan strain S1

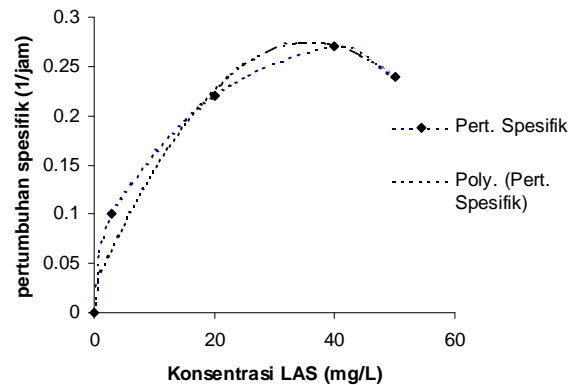
Pertumbuhan spesifik (m)

Absorpsi LAS, yang mempunyai bobot molekul sekitar 249 g/mol, ke dalam sel, seperti ditunjukkan oleh nilai K_s , kemungkinan menyebabkan meningkatnya konsentrasi LAS di dalam sel. Peningkatan ini memacu sintesis energi produksi sel metabolit yang digunakan untuk metabolisme dan pertumbuhan sel sampai batas maksimum (m_{maks}).

Besarnya K_s dan m_{maks} isolat S1 pada media LAS (Tabel 2), adalah hasil perhitungan hubungan antara konsentrasi substrat dan pertumbuhan spesifik (m) seperti terlihat pada Gambar 2.

Tabel 2. Kinetika pertumbuhan Strain 1 pada medium LAS

No.	Parameter kinetika pertumbuhan	Substrat LAS
1	μ_{maks} (Jam ⁻¹)	0.31
2	K_s (mgL ⁻¹)	7.75

**Gambar 2.** Kurva ketergantungan laju pertumbuhan spesifik (m)

Peningkatan konsentrasi LAS yang melampaui kapasitas kemampuan sel (lisosom) akan menyebabkan terganggunya metabolisme sel. Hal tersebut akan menyebabkan menurunnya degradasi LAS dan bahkan dapat menyebabkan kematian sel.

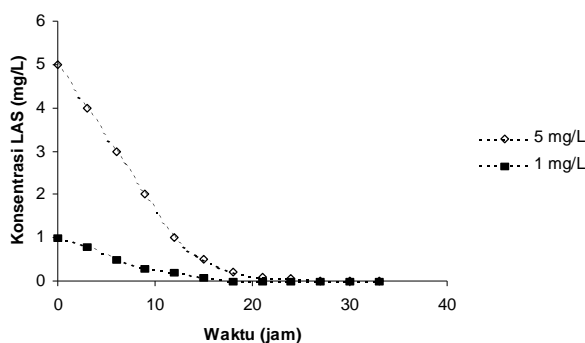
Penentuan K_m dan V_{max}

Pengukuran konsentrasi LAS pada berbagai interval waktu akan menghasilkan kurva hubungan antara konsentrasi LAS dengan waktu, yang selanjutnya digunakan untuk menentukan orde reaksi. Ciri reaksi orde satu adalah plot antara \ln (LAS) terhadap waktu akan menghasilkan garis lurus dan *slopenya* merupakan konstanta (k). Kecepatan reaksi ditentukan dengan menggunakan persamaan 1.

$$V = \frac{-d[LAS]}{dt} = k[LAS] \quad (1)$$

dengan: V adalah kecepatan biodegradasi, $[LAS]$ konsentrasi LAS, dan k adalah konstanta kecepatan.

Persamaan 1 menunjukkan bahwa kecepatan reaksi orde satu berbanding lurus dengan konsentrasi LAS.

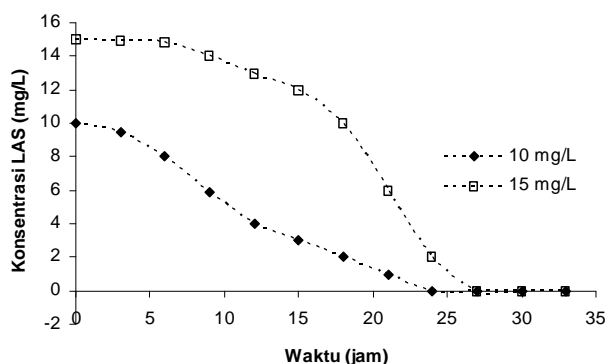


Gambar 4. Kurva biodegradasi LAS pada konsentrasi 1 dan 5 mg/L mengikuti orde satu

Degradasi LAS pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 5 mg/L mengikuti orde nol. Seperti ditunjukkan oleh plot antara konsentrasi LAS terhadap waktu, menghasilkan garis lurus dan *slopenya* merupakan konstanta dan sekaligus nilai kecepatannya. Kecepatan reaksi ditentukan dengan menggunakan persamaan 2.

$$V = \frac{-d[\text{LAS}]}{dt} = k \quad (2)$$

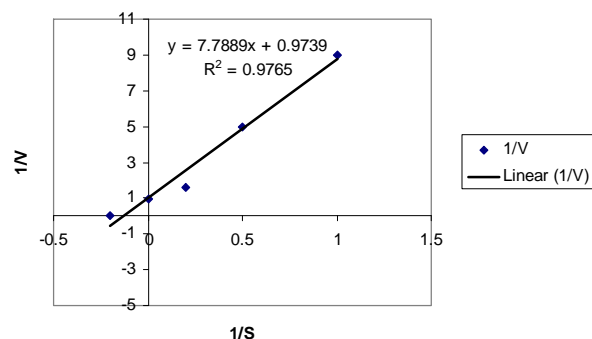
dengan: V adalah kecepatan biodegradasi, $[\text{LAS}]$ konsentrasi LAS, dan k adalah konstanta kecepatan.



Gambar 5. Kurva biodegradasi LAS pada konsentrasi 10 dan 15 mg/L mengikuti orde nol

Kecepatan biodegradasi ditentukan pada berbagai konsentrasi LAS, yang diukur pada suhu 30°C, kecepatan penggojokan 130 rpm dengan pH awal 4. Kecepatan degradasi maksimum LAS oleh biak S1 adalah 1.04 mgL⁻¹ Jam⁻¹. Kecepatan degradasi rendah pada saat konsentrasi LAS rendah seperti ditunjukkan pada saat konsentrasi 1 dan 5 mg/L. Kecepatan degradasi meningkat pada saat konsentrasi LAS ditingkatkan. Pengaturan kecepatan reaksi enzim di dalam sel sebagian disebabkan oleh perubahan

konsentrasi substrat di dalam sel. Pada saat konsentrasi LAS maksimum di dalam sel, yaitu sekitar 10-15 mg/L, pada kondisi ini reaksi biodegradasi mengikuti orde nol (Gambar 5).



Gambar 6. Kurva Lineweaver-Burk merupakan transformasi persamaan Michaelis-Menten pada penentuan V_{maks} dan K_m

Kecepatan maksimum V_{maks} ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk atau pemetaan kelipatan ganda (Gambar 6). Konstanta orde pertama biodegradasi LAS cukup tinggi, dengan afinitas substrat yang juga tinggi (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa LAS dapat dengan mudah diabsorpsi ke dalam sel dan kemudian didegradasi menjadi monomer yang dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk pembentukan metabolit sel dan biomassa sel.

Tabel 3. Nilai parameter kinetika biodegradasi LAS oleh S1.

No.	Parameter kinetika	Nilai
1.	V_{maks} (mgL ⁻¹)	1.04
2.	K_m (mg.L ⁻¹)	8.19
3.	k_1 (Jam ⁻¹)	0.12

PEMBAHASAN

LAS merupakan salah satu komponen detergen yang keberadaannya di dalam ekosistem dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan ekosistem. Pada organisme tingkat tinggi, degradasi LAS melibatkan beberapa enzim yang terdapat pada lisosom. Proses degradasi melibatkan beta-oksidasi rantai hidrokarbon paling ujung, yang akan menghasilkan asam karboksilat. Hasil antara proses degradasi tersebut dapat berupa alkohol dan aldehida. Kedua senyawa tersebut merupakan metabolit yang tidak mudah larut (Bailey, 1989). Proses degradasi selanjutnya melibatkan oksidasi oleh molekul oksigen yang diaktifkan oleh enzim sitokrom 450 dengan Fe sebagai kofaktor (Parker, 1993). Residu asam sulfonat selanjutnya dihidrolisis oleh bakteri akuatik. Proses oksidasi dan hidrolisis juga melibatkan lisosom yang memiliki berbagai

jenis enzim penghidrolisis dan pengoksidasi. Hasil degradasi selanjutnya dikeluarkan dari sel melalui lisosom yang bergerak menuju dinding plasmolema, yang selanjutnya vesikula akan bersatu dengan plasmolema. Proses selanjutnya metabolit hasil degradasi dikeluarkan dari sel (Davis *et al.*, 1990). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* S1 yang diisolasi dari campuran lumpur aktif dan tanah tercemar detergen mampu melakukan degradasi LAS seperti ditunjukkan oleh meningkatnya biomassa sel dan menurunnya konsentrasi LAS di dalam kultur. Bakteri tanah juga dilaporkan mampu mendegradasi LAS.

Pseudomonas aeruginosa S1 mampu tumbuh dengan cepat pada media LAS. Ada hubungan antara pertumbuhan spesifik (μ) dengan konsentrasi substrat. μ yang diukur pada suhu 30° C dan pH awal 4, menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, μ juga rendah. Peningkatan konsentrasi substrat meningkatkan μ . Hal tersebut menunjukkan bahwa LAS dapat diubah menjadi biomassa, atau S1 menggunakan LAS sebagai sumber karbon utama. Dengan kecepatan pembelahan sel pada konsentrasi LAS 20 mg/L adalah 4.82 jam, dengan μ sekitar 0,21 jam⁻¹. Kecepatan absorpsi substrat berpengaruh terhadap μ . Salah satu faktor penentu kecepatan absorpsi substrat adalah berat molekul senyawa yang diserap. Bobot molekul LAS sekitar 249 g/mol. Berat tersebut lebih rendah dari berat molekul senyawa yang dapat diserap oleh dinding sel yaitu sekitar 600 g/mol. Melihat parameter kinetika degradasi dan pertumbuhan S1, bakteri tersebut dapat digunakan untuk inokulan pengolahan limbah detergen dengan LAS sebagai beban organik utama. Kemampuan isolat 1 tumbuh pada pH 4 menguntungkan, karena apabila pH limbah turun menjadi asam, isolat tersebut masih mampu tumbuh dan aktif merombak LAS secara efisien. Karena kemampuannya tumbuh pada suasana asam maka *Pseudomonas aeruginosa* S1 potensial dapat digunakan pada UPL yang mempunyai influen LAS sebagai beban organik utama. Keberadaan bakteri tersebut di perairan dapat membantu degradasi LAS secara alami.

KEPUSTAKAAN

- Anderson GK, Donnelly T, and MCKeown KJ, 1982. Identification and control of inhibition in the anaerobic treatment of industrial wastewater. *Process. Biochem.*, 17 (7-8): 28.
- APHA, 1992. Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, 18th Ed., American Public Health Association, Washington DC.
- Bailey RA, 1989. *Chemistry of The Environment*, Academic Press, New York.
- Beaubian A, and Jollicouer C, 1984. A flow microcolorimetry investigation, in toxicity screening procedure using bacterial system. Liu D & BJ Dutka (eds). *The toxicity of various heavy metal salts, alcohol and surfactants to microorganism in a biodegradation processes*. Marcel Dekker New York. h. 261.
- Davis BD, Dubelco R, and Ginsberg HS, 1990. *Microbiology*, 4th Ed. Philadelphia.
- Dunn GM, and Bull AT, 1982. Bioaccumulation of copper by a defined community of activated sludge bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 : 30.
- Gledhil WE, 1974. Linear Alkylbenzene Sulfonate: Biodegradation and Interaction. *Appl. Microbiol.* 17: 265-293.
- Grayson M, 1983. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 3rd. Wiley-Interscience, New York.
- Jackson S, and Brown VM, 1970. Effect of toxic wastes on treatment processes and watercourse. *Water Pollut. Contr.* 99: 292.
- Kirk RE, and Othmer D, 1979. *Encyclopedia of chemical technology*. Vol. 3. The Interscience Encyclopedia, New York.
- Longman L, and Frederick G, 1987. *The analyses of detergent and detergent product*. John Wiley and Sons, New York.
- Malloy SR, Cronan JE, and Freifelder D, 1994. *Microbial genetic 2nd*. Jones and Barlett Publishers. Boston, London.
- Metelev VV, Kanaev AI and Dzasokokhova NG, 1983. *Water Toxicology*. A Merind, New Delhi.
- Nakase T, Matofumi S, Masako T, Makiko H, Takushi H & Sakuzo F, 1994. A taxonomic study on cellulolytic yeasts and yeast-like microorganisms isolated in Japan I. Ascomycetous yeasts genera *Candida* and *Williopsis*, and a yeast-like genus *Prototheca*. *J. Gen. Appl. Microbiol* 40: 519-531.
- Niven GW, Rowell KNW, Foster CA & Steward WPD, 1988. The effect of detergent on aminoacids liberation by the N₂-fixing Cyanobacterium, *Anabaena variabilis* and 6-Fluorotryptophan-resistant mutant strains. *J.Gen. Microbiol.* 134: 689-695.
- Parker SP, 1993. McGraw-Hill Encyclopedia of Chemistry. 2nd edition, McGraw-Hill, New York.
- Ritz HL, Evans BLB, Bruce RD, Fletcher ER, Fischer GL & Sarlo K, 1993. Respiratory and immunological responses of Guinea Pig to enzyme containing detegent: A comparisson of intra-trachea and inhalation modes of expose. *Fundamen. App. Toxicol.* 21: 31-37.
- Technobagug G, 1990. Wastewater Engineering Treatment, Disposal, Resuse. McGraw-Hill, New York.

Editor: **Rosmanida**

Reviewer: **Dr. Ni matuzahroh**