

Penapisan bakteri penghasil bioplastik polihidroksi alkanooat dari tanah tempat pembuangan sampah dan limbah cair pabrik kelapa sawit

Screening of bioplastics polyhydroxy alkanooic producing bacteria from landfill and palm oil mill effluents

Irma KRESNAWATY^{*)}, Haryo Tejo PRAKOSO, Deden Dewantara ERIS & Agustin Sri MULYATNI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128, Indonesia

Diterima tanggal 6 Maret 2014/disetujui tanggal 12 Juni 2014

Abstract

Plastic wastes have become a serious problem of the world because of unbiodegradable property. There are many solutions to this problem and one of them is by replacing conventional plastic base material with the biodegradable materials. Bioplastic material that is quite important for industries and recently being developed by scientists is Polyhydroxyalkanoate (PHA). It is a natural polyester which can be produced by several microorganisms, like bacteria and algae. Bacterial isolations from landfills waste and palm oil mill effluents were conducted on this research. Preliminary screenings of PHA-producing-bacteria were examined qualitatively using 0.05% Nile Red dye. The selection results showed that among 32 bacterial isolates, 10 of them could accumulate PHA which could be detected qualitatively through its fluorescence in UV ray at λ 235 nm. TH-D092 and LC-S05 isolates originated respectively from landfill and palm oil mill effluent had ability to accumulate PHA respectively 6.67 and 9.44% dried cell weight. Identification of the microbe concluded that TH-D092 was *Pseudomonas aeruginosa*, whilst LC-S05 and LC-D02 isolates was *Bacillus subtilis*.

[Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, plastic waste, waste treatment].

Abstrak

Limbah plastik menjadi masalah serius yang dihadapi dunia karena sulit didegradasi mikroba. Salah satu solusi masalah adalah dengan mengganti bahan dasar plastik konvensional dengan plastik *biodegradable* (bioplastik). Bahan bioplastik yang cukup penting bagi industri dan saat ini terus dikembangkan oleh peneliti adalah Polihidroksialkanooat (PHA). PHA merupakan poliester alami yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme, seperti bakteri dan alga. Pada penelitian dilakukan isolasi bakteri dari tanah tempat pembuangan sampah (TPS) dan limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS). Penapisan awal bakteri penghasil PHA dilakukan secara kualitatif menggunakan pewarna Nile Red 0.05%. Hasil penapisan menunjukkan diantara ke-32 isolat bakteri diperoleh 10 isolat mampu mengakumulasi PHA secara kualitatif, yaitu isolat yang mampu menimbulkan pendaran floresen pada sinar UV pada λ 235 nm. Isolat TH-D092 dari tanah tempat pembuangan sampah dan isolat LC-S05 dari limbah cair pabrik kelapa sawit memiliki kemampuan mengakumulasi PHA berturut-turut 6,67 dan 9,44% dari berat sel kering. Hasil identifikasi spesies

*) Penulis korespondensi: irma.kresnawaty@yahoo.com

bakteri menunjukkan bahwa isolat TH-D09 termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, LC-S05 dan LC-D02 termasuk *Bacillus subtilis*.

[Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* limbah plastik, penganan limbah]

Pendahuluan

Perkembangan industri plastik mempunyai peranan yang sangat penting dalam memenuhi kebutuhan manusia. Semakin meningkatnya kebutuhan akan plastik mendorong industri untuk memproduksi plastik yang lebih banyak. Meskipun demikian, limbah plastik yang diproduksi dari minyak bumi tidak mudah didegradasi oleh mikroorganisme sehingga berpeluang mengendap lama di tanah. Limbah plastik baru dapat terurai di alam dalam waktu 500 - 1.000 tahun, sehingga jika terakumulasi di tanah akan merusak lingkungan, menghambat peresapan air, menyebabkan banjir, dan merusak kesuburan tanah. Salah satu solusi pemecahan masalah ini adalah dengan mengganti bahan dasar plastik konvensional tersebut menjadi bahan yang mudah diuraikan oleh mikroorganisme, yang disebut dengan plastik *biodegradable* (bioplastik).

Keuntungan dari bioplastik, yaitu mengurangi limbah plastik yang semakin lama jumlahnya semakin banyak. Bioplastik dirancang untuk memudahkan proses degradasi terhadap reaksi enzimatik mikroorganisme seperti bakteri dan jamur (Avella, 2009). Bahan bioplastik yang cukup penting dan masih terus diteliti serta dikembangkan sampai saat ini adalah Polihidroksialkanooat (PHA). Menurut Van Wegen *et al.* (1998), PHA memiliki kekuatan dan kekerasan yang baik, resisten terhadap kelembaban dan memiliki permeabilitas O₂ sangat rendah. Karena karakteristik unggul tersebut, PHA merupakan bahan campuran paling banyak digunakan sebagai biopolimer dalam membuat plastik (Wu *et al.*, 2000). PHA diproduksi secara intraseluler oleh beberapa jenis bakteri sebagai cadangan karbon dalam kondisi karbon berlebih dengan nutrient (nitrogen dan fosfor) yang terbatas (Potter *et al.*, 2004). Sampai saat ini, setidaknya terdapat 28 jalur biosintesis PHA yang sudah di pelajari (Chen, 2009). Bakteri yang diketahui dapat

memproduksi PHA diantaranya adalah *Ralstonia eutropha* (Sudesh et al, 2000), *Rhizobium* (Cicer) sp. (Chohan & Copeland, 1998), dan *Pseudomonas mendocina* (Zheng et al, 2005).

Faktor pembatas yang kerap dijumpai dalam memproduksi PHA dari bakteri adalah ongkos produksi yang mahal, hampir lima kali lipat ongkos produksi plastik secara konvensional (Kim, 2000). Mahalnya ongkos produksi terkait erat dengan penggunaan sumber karbon. Untuk itu, sumber karbon alternatif dengan harga relatif murah mutlak diperlukan. Salah satu sumber karbon alternatif yang tersedia banyak di Indonesia adalah limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS), mengingat Indonesia adalah produsen minyak sawit nomor satu di dunia (Lubis, 2008).

LCPKS merupakan limbah yang berasal dari proses ekstraksi minyak tandan buah segar pada pabrik kelapa sawit. Limbah ini mempunyai kadar BOD tinggi (sekitar 20.000 ppm) dan kadar nitrogen rendah (kurang dari 200 ppm dalam bentuk nitrogen amoniak dan kurang dari 500 ppm dalam bentuk total nitrogen). Sehingga LCPKS merupakan substrat yang tepat untuk produksi PHA.

Isolasi bakteri untuk kegiatan penapisan dapat dilakukan dengan mengambil contoh dari tempat pembuangan sampah akhir. Tempat pembuangan limbah rumah tangga dan industri kecil merupakan tempat konsorsium bakteri karena merupakan tempat penimbunan bermacam-macam sampah, seperti makanan yang membusuk dan limbah rumah tangga yang kaya akan karbon (Zusfahair, 2008). Hal tersebut menjadikan TPA sebagai tempat yang tepat untuk mendapatkan isolat bakteri mampu menghasilkan PHA. Isolasi juga akan dilakukan pada LCPKS untuk mendapatkan bakteri *indigenous* yang berpotensi menghasilkan PHA

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan penelitian adalah limbah cair kelapa sawit yang diperoleh dari pabrik kelapa sawit di Palembang, tanah di sekitar pembuangan sampah, NaCl, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), glukosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, asam sitrat, NaOCl, buffer fosfat, dietil eter, dan H_2SO_4 .

Isolasi bakteri

Sebanyak 10 g contoh tanah di sekitar pembuangan sampah disuspensikan ke dalam 90 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0.85%) steril, lalu diinkubasi pada *shaker* selama satu jam pada suhu 30 °C dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian dilakukan seri pengenceran dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0.85%) hingga tingkat pengenceran 10^{-9} . Lima pengenceran terakhir diambil 100 μL untuk diinokulasikan secara *spread plate* pada medium NA dan diinkubasi pada suhu 37 °C 72 jam. Koloni bakteri

yang tumbuh diisolasi lalu diinokulasi pada medium NA baru dengan *streak kuadran* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pemurnian isolat bakteri yang ditumbuhkan pada medium padat NA miring (*agar slant*) dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam sebagai stok kultur. Sebanyak 2,5% (v/v) LCPKS dicampurkan dengan palm olein 1% (b/v) pada medium NB, kemudian disterilisasi. Campuran tersebut digoyang pada kecepatan 200 rpm pada suhu 30 °C selama empat minggu. Sebanyak satu loop koloni digores kuadran pada media NA. Isolat yang tumbuh pada agar kemudian dimurnikan.

Penapisan isolat bakteri yang memproduksi PHA

Penapisan bakteri yang memproduksi PHA dilakukan menggunakan medium *plate assays* (Spiekerman et al, 1999). Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan medium *assay plate* adalah glukosa 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, KH_2PO_4 13,3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 g, asam sitrat 1,7 g, larutan *trace element* 10 mL, agar 15 g dan *Nile Red* 0,05% 5 mL dalam aseton. Setelah diinkubasi selama 24 jam cawan media diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang λ 235 nm. Determinasi akumulasi PHA secara kualitatif dilakukan dengan pewarnaan *Nile red* yang memberikan hasil pendaran pada koloni bakteri yang meng-akumulasi PHA (Chaudhry et al., 2010; Porwal et al., 2008; Spiekermann et al., 1999).

Produksi PHA

Sebanyak 10 mL isolat dipre-kulturkan pada 100 mL NB dan diinkubasi di *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian, sebanyak 5 mL inokulum ditumbuhkan pada 100 mL medium minimal (Ramsay et al., 1992) dengan sumber karbon 1% (b/v) dan digoyang di *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 72 jam pada suhu 30 °C

Kuantifikasi PHA

Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 72 jam, disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dibuang dan pelet yang terbentuk disuspensikan dalam 5 mL akuades. Sebanyak 1 mL suspensi sel dianalisis kadar PHA dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dan 1 mL suspensi sel diambil untuk mengukur berat kering massa sel.

Kemudian ke dalam suspensi sel ditambahkan 3 mL bufer fosfat pH 7,0 dan 1 mL NaOCl 5 %, dan diinkubasi pada suhu 25°C dengan kecepatan 180 rpm selama 24 jam. Sisa pelet dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 4.000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian disentrifugasi kembali sebanyak tiga kali pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit dengan pelarut masing-masing, yaitu: 5 mL akuades, 3 mL aseton dan 3 mL eter. Supernatan dibuang dan

pelet dicuci secara perlahan dengan 3 mL dietil eter dan didiamkan selama lima menit, kemudian eter dibuang. Setelah pelet kering ditambahkan 3 mL H₂SO₄ pekat, dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100 °C selama 10 menit. Kadar PHA dideterminasi menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dengan pelarut H₂SO₄ pekat.

Identifikasi bakteri penghasil PHA

Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Institut Pertanian Bogor menggunakan API-kit test berdasarkan karakterisasi reaksi biokimia mikroba.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri

Sebanyak 63 koloni bakteri telah berhasil diisolasi dari tanah tempat pembuangan sampah dan limbah cair pabrik kelapa sawit (Tabel 1). Pengambilan sampel dari tempat yang berbeda diharapkan dapat memberikan variasi mikroorganisme penghasil bioplastik. Sebanyak 32 isolat bakteri yang dianggap mewakili koloni diseleksi kembali untuk mengetahui kemampuannya dalam mengakumulasi PHA dengan pewarna *Nile Red*.

Penapisan isolat yang memproduksi PHA

Hasil penapisan menunjukkan di antara 63 isolat bakteri terdapat 10 isolat mampu mengakumulasi PHA secara kualitatif, yaitu kemampuan menghasilkan warna orange yang berpendar. Isolat bakteri tersebut terdiri dari lima isolat berasal dari tanah tempat pembuangan sampah dan lima isolat berasal dari limbah cair pabrik kelapa sawit (Tabel 2).

Analisis Kuantitatif PHA

Sebanyak 10 isolat bakteri positif menghasilkan PHA diinokulasikan di medium minimal. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan PHA secara kuantitatif dapat dilihat berdasarkan produksi PHA pada medium Ramsay (Ramsay *et al.*, 1992). Medium sintetik ini diperkaya dengan glukosa sebagai sumber karbon bagi isolat bakteri yang diinokulasikan di dalamnya, sehingga bakteri tersebut dapat membentuk cadangan karbon berupa granula.

Pertumbuhan mikroba biasanya dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa sel atau jumlah sel. Pertumbuhan mikroorganisme dilakukan dengan metode pengukuran bobot sel kering. Inokulum media yang sudah diinkubasi selama 72 jam disentrifugasi empat kali dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi pertama bertujuan untuk memisahkan biomassa dengan fase cair. Endapan yang diperoleh pada sentrifugasi tahap pertama disuspensikan ke dalam aquades kemudian diambil untuk pengukuran berat kering massa sel.

Selama masa inkubasi terjadi peningkatan berat kering massa sel semua isolat bakteri (Tabel 3). Peningkatan berat kering massa sel yang ditunjukkan oleh ke-10 isolat tersebut berkisar antara 6%-50%. Adanya peningkatan berat kering massa sel setelah inkubasi selama 72 jam menunjukkan bahwa terjadi pertumbuhan sel bakteri. Bakteri mampu memanfaatkan nutrisi yang tersedia dan ketika kondisi stres berlangsung bakteri “dipaksa” untuk mempertahankan hidup dengan menghasilkan sel baru yang bertambah seiring dengan pertambahan waktu inkubasi (sesuai fase pertumbuhan bakteri) (Kang *et al.*, 2008).

Suspensi sel yang berasal dari inokulum bakteri diuraikan dengan NaOH 0,2 N untuk mengisolasi PHA. Pada proses penguraian menggunakan NaOH, biomassa non-PHA yang umumnya bersifat polar akan larut dalam NaOH, sementara PHA tidak larut sehingga dapat dipisahkan (Lee, 1996). Selama penguraian akan terjadi proses pemecahan sel oleh NaOH dan pelarutan komponen non-PHA. Sentrifugasi kedua dilakukan untuk memisahkan endapan (PHA) dan cairan (larutan NaOH dan biomassa non-PHA). Endapan hasil sentrifugasi kedua yang berisi PHA, dibilas dengan aquades kemudian dilakukan sentrifugasi tahap ketiga. Pencucian ini dimaksudkan untuk memperoleh biomassa yang lebih bersih sehingga nantinya dapat meningkatkan kemurnian PHA yang dihasilkan. Endapan hasil sentrifugasi ketiga ditambahkan aseton kemudian disentrifugasi tahap keempat. Penambahan aseton pada PHA yang diperoleh akan melarutkan pengotor yang mungkin masih terkandung dalam PHA, seperti lemak dan pigmen yang berasal dari biomassa sel. PHA yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan asam sulfat untuk mengetahui jumlah dan kadar PHA.

Jumlah PHA dalam medium yang diproduksi oleh ke-10 isolat bakteri terpilih dihitung berdasarkan penentuan absorbansi sebelum dan setelah inkubasi (Tabel 3) selama 72 jam dengan panjang gelombang 235 nm. Peningkatan jumlah PHA terbesar berturut-turut ditunjukkan oleh isolat TH-D092 dan isolat LC-S05 (Tabel 3). Isolat tersebut mengalami perubahan yang ditandai dengan meningkatnya jumlah PHA dalam medium minimal setelah inkubasi selama 72 jam. Selain pertambahan berat kering massa sel pertumbuhan sel bakteri juga menentukan peningkatan jumlah PHA yang diakumulasi oleh bakteri. Ini menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam mengubah glukosa menjadi PHA sebagai cadangan makanan bagi bakteri tersebut. Pembentukan PHA akan meningkat setelah nutrisi nitrogen dan oksigen telah habis, sedangkan proses akumulasi sumber karbon berhenti pada saat glukosa (sumber karbon) berada dalam jumlah terbatas dan saat kumpulan granula di dalam sel semakin rapat sehingga jalan masuk pada permukaan sel menjadi terbatas (Jurasek & Marchessault, 2004).

Analisis kadar PHA juga dihitung berdasarkan kondisi sebelum dan setelah inkubasi selama 72 jam.

Tabel 1. Deskripsi morfologi koloni hasil isolasi mikroba tanah TPA dan LCPKS.

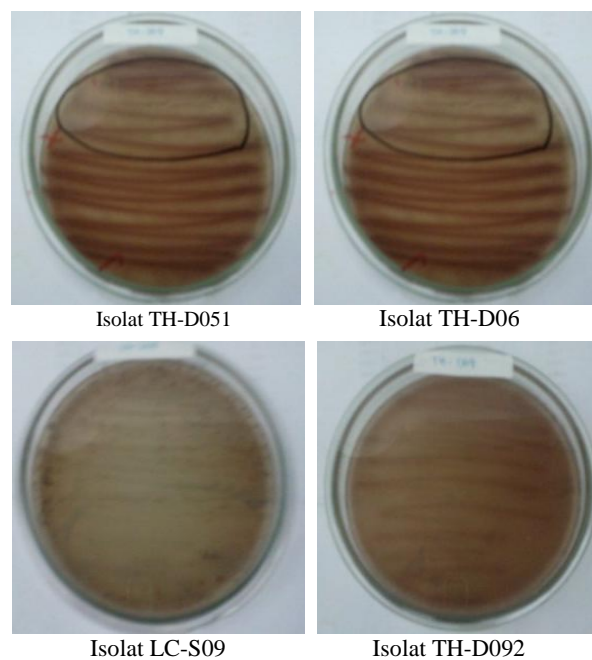
Table 1. Morphological description of landfill and POME microbial.

No	Kode Isolat <i>Isolate code</i>	Bentuk koloni <i>Form of colony</i>	Tepian <i>Margin</i>	Permukaan <i>Surface</i>	Elevasi <i>Elevation</i>	Warna <i>Colour</i>
1	LC-S01	Bundar	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Putih
2	LC-S021	Tidak teratur	Berombak	Halus	Menonjol	Putih
3	LC-S022	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Konveks</i>	Krem
4	LC-S03	Tidak teratur	Berombak	Serbuk	<i>Datar</i>	Krem
5	LC-S04	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cembung</i>	Putih
6	LC-S051	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Krem
7	LC-S052	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Cembung</i>	Putih
8	LC-S06	Tidak teratur	Berombak	Halus	Menonjol	Kuning
9	LC-S07	Berfilamen	Berfilamen	Kasar	<i>Umbonate</i>	Putih
10	LC-S08	-	-	-	-	-
11	LC-S091	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Berserbuk	<i>Datar</i>	Krem
12	LC-S092	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Menonjol</i>	Kuning
13	LC-D01	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Berserbuk	<i>Datar</i>	Krem
14	LC-D02	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Berserbuk	<i>Datar</i>	Putih
15	LC-D03	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Berserbuk	Menonjol	Putih
16	LC-D041	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Kasar	Menonjol	Kuning
17	LC-D042	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Kasar	Menonjol	Kuning
18	LC-D05	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Kasar	<i>Cembung</i>	Hitam
19	LC-D06	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Kasar	Menonjol	Krem
20	LC-D071	Tidak teratur	<i>Berombak</i>	Kasar	<i>Datar</i>	Kuning
21	LC-D072	<i>Punctiform</i>	<i>Berombak</i>	Halus	Menonjol	Putih
22	LC-D073	-	-	-	-	-
23	LC-D08	Bundar	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cembung</i>	Hitam
24	LC-D091	Tidak teratur	Berombak	Halus	Menonjol	Kuning
25	LC-D092	Tidak teratur	<i>Entire</i>	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
26	TH-S011	Tidak teratur	Berombak	Kasar	Menonjol	Putih
27	TH-S012	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Krem
28	TH-S021	Tidak teratur	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Krem
29	TH-S022	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Krem
30	TH-S031	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
31	TH-S032	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Krem
32	TH-S033	Berfilamen	<i>Filiform</i>	Berkilau	Halus	Kuning
33	TH-S04	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cembung</i>	Putih
34	TH-S05	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Krem
35	TH-S06	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Krem
36	TH-S071	<i>Rhizzoid</i>	Berombak	Halus	Menonjol	Kuning
37	TH-S072	Tidak teratur	Berombak	Halus	Menonjol	Putih
38	TH-S081	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Krem
39	TH-S082	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Putih
40	TH-S091	<i>Rhizzoid</i>	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Kuning
41	TH-S092	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
42	TH-S093	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
43	TH-D01	Tidak teratur	<i>Entire</i>	Berserbuk	<i>Datar</i>	Kuning
44	TH-D021	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
45	TH-D022	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Krem
46	TH-D023	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Umbonate</i>	Kuning
47	TH-D031	Reguler	<i>Entire</i>	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
48	TH-D032	Reguler	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
49	TH-D033	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
50	TH-D034	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	Menonjol	Kuning
51	TH-D041	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Putih
52	TH-D042	Reguler	<i>Entire</i>	Halus	<i>Umbonate</i>	Putih
53	TH-D043	Reguler	<i>Entire</i>	Halus	<i>Umbonate</i>	Kuning
54	TH-D044	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
55	TH-D051	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
56	TH-D052	Tidak teratur	Berombak	Kasar	<i>Datar</i>	Kuning
57	TH-D061	Tidak teratur	Berombak	Halus	<i>Datar</i>	Krem
58	TH-D062	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning
59	TH-D063	Bundar	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Putih
60	TH-D07	Tidak teratur	Berombak	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
61	TH-D081	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Berkilau	Menonjol	Kuning
62	TH-D091	Tidak teratur	<i>Entire</i>	Berkilau	<i>Datar</i>	Putih
63	TH-D092	<i>Punctiform</i>	<i>Entire</i>	Halus	Menonjol	Kuning

Tabel 2. Hasil seleksi bakteri berdasarkan akumulasi PHA secara kualitatif.

Table 2. Results of selection based on the bacteria's PHA accumulation.

No	Sumber Isolat <i>Isolates source</i>	Kode Isolat <i>Isolates codes</i>	Akumulasi PHA <i>PHA accumulation</i>	No	Sumber Isolat <i>Isolates source</i>	Kode Isolat <i>Isolates codes</i>	Akumulasi PHA <i>PHA accumulation</i>
1	TTPS	TH-S05	-	17	TTPS	TH-D092	+
2	TTPS	TH-S06	-	18	LCPKS	LC-S02	-
3	TTPS	TH-S071	-	19	LCPKS	LC-S05	+
4	TTPS	TH-S072	-	20	LCPKS	LC-S052	-
5	TTPS	TH-S081	-	21	LCPKS	LC-S06	-
6	TTPS	TH-S082	-	22	LCPKS	LC-S07	-
7	TTPS	TH-S091	-	23	LCPKS	LC-S091	-
8	TTPS	TH-S092	-	24	LCPKS	LC-S092	+
9	TTPS	TH-S093	-	25	LCPKS	LC-D02	-
10	TTPS	TH-D051	+	26	LCPKS	LC-D05	-
11	TTPS	TH-D052	+	27	LCPKS	LC-D06	+
12	TTPS	TH-D061	+	28	LCPKS	LC-D071	+
13	TTPS	TH-D062	-	29	LCPKS	LC-D072	+
14	TTPS	TH-D07	+	30	LCPKS	LC-D073	+
15	TTPS	TH-D08	-	31	LCPKS	LC-D091	-
16	TTPS	TH-D091	-	32	LCPKS	LC-D092	-



Gambar 1. Koloni bakteri yang positif mengakumulasi PHA pada media Plate Assay.

Figure 1. Bacterial colony that positively accumulate PHA in plate assay media.

Sama seperti perbandingan jumlah PHA dalam medium minimal, pada analisis kadar PHA juga terjadi peningkatan setelah inkubasi selama 72 jam (Tabel 3). Terdapat dua isolat bakteri yang memiliki kadar PHA tinggi dibandingkan isolat lainnya, yaitu isolat TH-D092 sebelum inkubasi mampu mengakumulasi sebesar 0,77%, dan setelah inkubasi bertambah menjadi 6,67%, serta isolat LC-S05 sebelum inkubasi mampu mengakumulasi sebesar 1,67%, setelah inkubasi bertambah menjadi 9,44%. Peningkatan kadar PHA berturut-turut ditunjukkan oleh isolat TH-D092 dan isolat LC-S05. Sumber karbon yang digunakan pada saat inkubasi memiliki

pengaruh terhadap produksi PHA, seperti pati sagu yang mengandung karbon (57,72%), molases mengandung karbon (37%) dan limbah cair pabrik kelapa sawit mengandung karbon (34,4%). Penelitian Haedar *et al.* (2012) kadar yang diproduksi oleh tiga isolat setelah 72 jam inkubasi berkisar antara 5,65%-14,79% per berat kering massa sel dengan glukosa sebagai sumber karbon, adapun penelitian Sangkharak dan Prasertsan (2012) kadar PHA yang diproduksi oleh 50 isolat setelah 96 jam inkubasi berkisar antara 10,00%-68,80% per berat kering massa sel dengan sumber karbon digunakan air limbah perkotaan, limbah cair pabrik kelapa sawit, gliserol dan molases,

Tabel 3. Produksi PHA sebelum dan setelah inkubasi 72 jam.

Table 3. PHA production before and after 72 hours incubation

No	Kode Isolat <i>Isolates codes</i>	Sebelum inkubasi <i>Before incubation</i>		Setelah inkubasi 72 jam <i>After incubation</i>		Kenaikan Kadar PHA (kali) <i>Increase of PHA content (times)</i>
		Jumlah PHA <i>PHA amount</i> (g/L)	Kadar PHA <i>PHA content</i> (%)	Jumlah PHA <i>PHA amount</i> (g/L)	Kadar PHA <i>PHA content</i> (%)	
1	TH-D051	0,002	1,11	0,003	1,58	0,5
2	TH-D052	0,002	0,77	0,014	4	6
3	TH-D06	0,001	0,83	0,009	5,63	8
4	TH-D07	0,004	2,35	0,007	3,5	0,75
5	TH-D092	0,001	0,77	0,012	6,67	11
6	LC-S05	0,002	1,67	0,017	9,44	7,5
7	LC-D06	0,002	1,43	0,004	1,9	1
8	LC-D071	0,001	0,45	0,006	2,31	5
9	LC-D072	0,005	2,27	0,006	2,31	0,2
10	LC-D073	0,001	0,56	0,008	3,64	

Keterangan (Notes): % Kadar = jumlah PHA/ berat kering massa sel

Tabel 4. Hasil identifikasi bakteri penghasil PHA.

Table 4. Identification results of PHA producing bacteria.

No.	Kode isolate <i>Isolates codes</i>	Hasil identifikasi <i>Identification results</i>
1.	TH-DO92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2.	LC-D06	<i>Bacillus subtilis</i>
3.	LC-S05	<i>Bacillus subtilis</i>

sedangkan penelitian Yanti *et al.* (2009) kadar PHA yang dihasilkan oleh 50 isolat terpilih setelah 72 jam inkubasi berkisar antara 0,23%-52,28% per berat kering massa sel dimana dalam produksinya menggunakan pati sagu sebagai sumber karbon. Kadar PHA yang diproduksi oleh ke-10 isolat terpilih sebelum inkubasi selama 72 jam berkisar antara 0,45%-2,35% per berat kering massa sel sedangkan setelah inkubasi selama 72 jam berkisar antara 1,58%-9,44% per berat kering massa sel.

Identifikasi bakteri penghasil PHA

Identifikasi spesies mikroba potensial penghasil PHA merupakan hal yang penting karena setiap bakteri memiliki jalur biosintesis yang spesifik dan memerlukan kondisi optimum tertentu. Hasil identifikasi spesies menggunakan API-kit test menunjukkan bahwa isolat TH-DO92 merupakan *Pseudomonas aeruginosa*, sementara isolat LC-SO5 dan LC-DO6 adalah *Bacillus subtilis* (Tabel 4). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan mikroba kosmopolitan yang juga ditemukan di tanah. Seperti halnya mikroba penghasil PHA, spesies *Pseudomonas* menggunakan PHA sebagai sumber karbon dan energi untuk bertahan hidup. Produksi PHA pada spesies *P. aeruginosa* sangat dipengaruhi oleh oksigen dan defisiensi oksigen akan menurunkan produksi PHA. Selain itu sesuai dengan pembagian kelompok spesies penghasil PHA (Wang & Lee, 1997), genus *Pseudomonas* dikelompokkan dalam kelompok I (bersama *Ralstonia eutropha* dan *Methylotrophs*), yaitu kelompok yang membutuhkan keterbatasan unsur nutrisi esensial seperti (N, P, S, Mg, Ca, Fe, dll)

dan jumlah karbon yang melimpah untuk menghasilkan PHA yang efisien.

Ohimain *et al.* (2012) melaporkan adanya spesies *Bacillus* sp. pada LCPKS. *Bacillus subtilis* dapat tumbuh di rentang suhu mesofilik dengan suhu optimal 25-35°C. *Bacillus subtilis* bisa beradaptasi pada lingkungan stres dan kondisi kekurangan nutrisi dengan melibatkan strategi untuk bertahan hidup pada kondisi yang ekstrim. Salah satu strateginya adalah pembentukan *stress-resistant endospore* yang diperoleh dengan mensintesis PHA. Menurut Thirumala *et al.* (2010) genus *Bacillus* merupakan kandidat potensial karena merupakan bakteri gram positif, sehingga kontaminasi lipopolisakarida (dari membran bakteri gram negatif) dapat diminimalkan.

Kesimpulan

Terdapat 10 isolat bakteri yang memberikan reaksi positif terhadap pewarnaan dengan Nile red, yaitu isolat TH-D051, TH-D052, TH-D06, TH-D07, dan TH-D092 dari tanah Tempat Pembuangan Sampah. Isolat LC-S05, LC-D06, LC-D071, LC-D072, dan LC-D073 dari limbah cair pabrik kelapa sawit. Isolat TH-D092 dan isolat LC-S05 menunjukkan kemampuan mengakumulasi PHA berturut-turut sebanyak 6,67% dan 9,44%. Hasil identifikasi spesies bakteri menunjukkan bahwa isolat TH-DO92 *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan isolat LC-SO5 dan LC-DO6 merupakan *Bacillus subtilis*.

Daftar Pustaka

- Avella M (2009). Eco-challenges of bio-based polymer composites. *Materials* 2, 911-925.
- Chaudry WN, N Jamil, I Ali, MH Ayaz & S Hasnain (2010). Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *App Microbiol* 7p.
- Chen GQ (2009). A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev* 38, 2434-2446.

- Chohan SN & L Copeland (1998). Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium* (Cicer) sp. strain CC 1192. *Appl Environ Microbiol* 64, 2859–2863.
- Haedar N, Fahrudin, Zenta & N Nurlaela (2012). Produksi poli β -hidroksibutirat (PHB) pada isolate bakteri dari molasses dan tanah pabrik gula. *Tesis* Makasar, Fakultas MIPA, Universitas Hasanudin.
- Jurasek L & RH Marchessault (2004) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cell : A Computer simulation.
- Kim BS (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* 27, 774-777.
- Lee SY (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioengin* 49, 114.
- Lubis AU (2008). *Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) di Indonesia*. Edisi 2. Medan, Pusat Penelitian Perkebunan Marihat. 348p.
- Ohimain EI, C Daokoru-Olukole, C Sylvester, Izah, A Rita AC Eke & J Okonkwo (2012). Microbiology of palm oil mill effluents. *Microbiol Biotech Res* 2 (6), 852-857.
- Porwal S, T Kumar, S Lal, A Rani, S Kumar, S Cheema, HJ Purohit, R Sharma, SKS Patel & VC Kalia (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresour Technol* 99, 5444-5451.
- Pötter M, H Müller, F Reinecke, R Wiczorek, F Fricke, B Bowien, B Friedrich & A Steinbüchel (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol* 150, 2301-2311.
- Ramsay BA, J Ramsay, E Berger, C Chavarie & G Barunegg (1992). Separation of poly-beta-hydroxyalkanoic acid from microbial biomass. *United States Patent* 5.110.980.
- Sangkharak K & P Praserstan (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol* 58, 173-182.
- Spiekermann P, BHM Rehm, R Kalscheuer, D Baumeister & A Steinbüchel (1999). A sensitive, viable colony staining method using Nile Red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171, 73-80.
- Sudesh K, H Abe & Y Doi (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25, 1503–1555.
- Thirumala M, SV Reddy & K Mahmood (2010). Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 271–278.
- Van Wegen RJ, Y Ling & APJ Middleberg (1998). Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: An economic analysis. *Trans Chem* 76(A), 417-426.
- Wang F & SY Lee (1997). Poly (3-hydroxybutyrate)s production with high polymer content by fed-batch culture of *alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environment Microbiol* 63, 3703-3706.
- Wu Q, SQ Sun, PHF Yu, AXZ Chen & GQ Chen (2000). Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates. *Acta Polym Sin* 6, 751–756.
- Yanti NA, L Sembiring & S Margino (2009). Optimasi produksi poli- β -hidroksibutirat (PHB) oleh *Bacillus* sp., PSA 10. *Biota* 15(3), 95-99.
- Zheng LZ, Z Li, HL Tian, M Li & GQ Chen (2005). Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. *FEMS Microbiol Lett* 252, 299–307.
- Zusfahair (2008). Isolasi, pemurnian dan karakterisasi lipase hasil skrining dari tanah tempat pembuangan akhir (TPA) Gunung Tugel Banyumas. *J Natur Ind* 12(2)