

**BIOSINTESIS BIOSURFAKTAN OLEH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MENGUNAKAN LIMBAH CAIR INDUSTRI TAPIOKA SEBAGAI MEDIA
(BIOSYNTHESIS OF BIOSURFACTANT BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
USING CASSAVA FLOUR INDUSTRIAL WASTEWATER AS MEDIA)**

Venty Suryanti^{*}, Sri Hastuti, Desi Suci Handayani, Windrawati

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta, Jawa Tengah 57126, Telp. (0271) 663375

*email: venty_s@yahoo.com

Received 21 October 2013, Accepted 23 January 2014, Published 04 March 2014

ABSTRAK

Telah dilakukan biosintesis biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan media limbah cair industri tapioka (*manipueira*). Penggunaan campuran media *nutrient broth* dan *manipueira* tanpa sentrigusi (NBM) dengan lama fermentasi 4 hari merupakan kondisi optimum untuk sintesis biosurfaktan. Analisa spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR menunjukkan bahwa biosurfaktan merupakan rhamnolipida yang mempunyai gugus hidroksi, ester, karboksilat dan rantai alifatik. Biosurfaktan mempunyai nilai konsentrasi kritis misel (KKM) 576 mg/L dengan tegangan muka 0,045 N/m. Biosurfaktan ini dapat menurunkan tegangan muka dan membentuk emulsi dengan beberapa senyawa hidrokarbon yaitu benzena, toluen, premium dan minyak sawit. Biosurfaktan mempunyai sistem emulsi w/o.

Kata Kunci : biosintesis, biosurfaktan, limbah cair industri tapioka, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Biosynthesis of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* have been prepared using cassava flour industrial wastewater (*manipueira*) as medium. The optimum condition of the biosurfactans biosynthesis was obtained using media containing nutrient broth and *manipueira* without centrifugation (NBM) with 4 days fermentation. UV-Vis and FT-IR spectra indicated that the biosurfactant was a rhamnolipid containing hydroxyl, ester, carbocyclic and aliphatic carbon chain functional groups. Biosurfactant exhibited critical micelle concentration (CMC) value of 576 mg/L and surface tension value of 0.045 N/m. The biosurfactant was able to decrease the interface tension and form emulsion with benzene, toluene, gasoline and palm oil. This biosurfactant showed w/o emulsion system.

Keywords : biosynthesis, biosurfactant, *manipueira*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Surfaktan banyak digunakan sebagai zat pengemulsi (*emulsifier*), *wetting agent* dan *detergent* dalam dunia industri. Ada dua jenis surfaktan yaitu surfaktan sintetis dan biosurfaktan. Surfaktan sintetis sebagian besar dibuat dari petroleum dan memiliki sifat tidak dapat terurai secara biologis (*biodegradable*) sehingga menyebabkan masalah bagi lingkungan. Biosurfaktan dibuat dari bahan organik melalui proses biotransformasi oleh mikroorganisme dan memiliki sifat *biodegradable* sehingga ramah bagi lingkungan (Ghazali *and* Ahmad, 1997; Kosaric, 2001). Biosurfaktan masih kurang diminati dibandingkan surfaktan sintetis karena pembuatan biosurfaktan memerlukan biaya yang tinggi.

Beberapa penelitian telah dilakukan dalam pembuatan biosurfaktan dengan memanfaatkan limbah sebagai substrat dengan tujuan untuk menurunkan biaya produksi biosurfaktan (Nitschke, 2004). Assadi *et al.* (1998) menggunakan *molasses* sebagai media fermentasi dalam produksi biosurfaktan oleh *P. aeruginosa*. Haba *and* Espuny (1999) menggunakan limbah minyak goreng sebagai media fermentasi dalam produksi biosurfaktan oleh *P. aeruginosa*.

Salah satu agroindustri yang berkembang di Indonesia adalah industri tapioka yang mengolah ketela pohon menjadi tepung tapioka. Perlu dilakukan penanganan limbah tapioka yang tepat, sehingga selain dapat meminimalisasi dampak buruk terhadap lingkungan juga dapat menghasilkan produk yang lebih bermanfaat (Adewoye *and* Fawale, 2005). Limbah cair industri tapioka (*manipueira*) mengandung bahan-bahan organik yang cukup tinggi antara lain karbohidrat, amonia dan beberapa bahan organik lain dalam jumlah yang lebih kecil seperti nitrit, nitrat, sianida, fosfat dan beberapa logam yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri, seperti besi, tembaga, mangan dan seng oleh karena itu dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk pertumbuhan bakteri (Imam, 2006). Nitschke *et al.* (2004) telah berhasil memanfaatkan *manipueira* sebagai substrat dalam pembuatan biosurfaktan oleh *Bacillus sp* menghasilkan rhamnolipida.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat digunakan dalam pembuatan biosurfaktan. Patel *and* Desai (1997) telah menggunakan *P. aeruginosa* menggunakan limbah tetes tebu (*molasses*) sebagai sumber karbon menghasilkan biosurfaktan jenis rhamnolipida. Anna *et al.* (2002) mensintesis rhamnolipida secara biotransformasi menggunakan substrat gliserol, n-heksadekana, minyak parafin, dan *babassu oil* oleh *P. aeruginosa*. Rhamnolipida juga telah disintesis oleh mikroorganisme

P. aeruginosa menggunakan sumber karbon premium, minyak paraffin, gliserol dan *whey* oleh Rashedi *et al.* (2005).

Pada penelitian ini dilakukan biosintesis biosurfaktan dengan memanfaatkan *manipueira* sebagai media oleh *P. aeruginosa* sehingga dapat menghasilkan produk yang lebih bermanfaat dan juga dapat meminimalisasi dampak negatif limbah terhadap lingkungan.

METODE PENELITIAN

Limbah cair industri tapioka yang digunakan berasal dari PT. Bumi Karya di Kecamatan Selogiri, Kabupaten Wonogiri. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah *nutrient agar*, *nutrient broth*, NaCl, HCl, NaOH, kloroform, metanol, rhamnosa, orsinol, H₂SO₄, inokulum *P. aeruginosa* FNCC 063 yang diperoleh dari PAU UGM, minyak sawit, toluen, benzene and premium.

Alat-alat yang digunakan adalah autoclave (Ogawa Seiki Co, LTD.), sentrifuge (Sorvall Super T21), vortex Mixer (Gemmy Industrial, Corp.), neraca analitis (Mettler Toledo AT400), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-160 1PC), rotary evaporator (Bibby RE100), konduktivimeter (CE Jenway 4071), seperangkat alat metode kenaikan kapiler, seperangkat alat pengukuran indeks emulsi dan shaker (IKA Labortechnik).

Penelitian ini dilakukan di Sub Lab. Biologi Lab Pusat MIPA UNS sedangkan identifikasi spektra FT-IR dilakukan di Lab Kimia FMIPA UGM Yogyakarta.

Optimasi kondisi sintesis biosurfaktan dilakukan dengan variasi komposisi media fermentasi, yaitu: (1) *manipuera* tanpa sentrifugasi (M), (2) *nutrient broth* dan *manipuera* tanpa sentrifugasi (NBM), (3) *manipuera* dengan sentrifugasi (MS) dan (4) *nutrient broth* dan *manipuera* dengan sentrifugasi (NBMS), sedangkan media (5) *nutrient broth* (NB) digunakan sebagai kontrol. *Nutrient broth* yang digunakan adalah 8 g/L. Semua media mengandung 5 g/L NaCl. Fermentasi dilakukan selama 12 hari pada suhu kamar dengan kecepatan aerasi 100 rpm.

Parameter optimasi kondisi meliputi:

1. Kepadatan sel (*Optical density*)

Kepadatan sel ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 365 nm menggunakan spektroskopi UV-Vis.

2. E-24 (indeks emulsi)

E-24 ditentukan dengan mencampur media fermentasi dengan minyak sawit/senyawa hidrokarbon dengan perbandingan volume 1:1. Larutan tersebut kemudian

divortex selama 1 menit dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian tinggi emulsi yang terjadi dan tinggi total larutan diukur.

3. Tegangan muka

Tegangan muka ditentukan dengan metode kenaikan pipa kapiler, yaitu dengan menambahkan minyak sawit dalam media fermentasi dengan perbandingan 1:1, kemudian divortex selama satu menit dan diukur kenaikan kapilernya

Biosurfaktan hasil biotransformasi bersifat ekstraseluler, yaitu biosurfaktan tidak terdapat dalam sel bakteri yang digunakan melainkan diekskresikan ke luar sel (Ghazali and Ahmad, 1997), sehingga biosurfaktan hasil produksi terakumulasi pada media fermentasi.

Recovery biosurfaktan dilakukan dengan ekstraksi media fermentasi menggunakan pelarut kloroform dan metanol (2:1). Identifikasi biosurfaktan berdasarkan spektra UV-Vis dan FT-IR sedangkan karakterisasi biosurfaktan meliputi penentuan konsentrasi kritik misel (KKM) dan sistem emulsi. Penentuan KKM dan sistem emulsi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. KKM

KKM ditentukan dengan pengukuran tegangan muka terhadap biosurfaktan dengan variasi konsentrasi dalam pelarut air. Grafik tegangan muka *vs* akar konsentrasi biosurfaktan dibuat untuk mengetahui perubahan tegangan muka yang mendadak yang merupakan harga KKM.

2. Sistem emulsi

Biosurfaktan ditambahkan pada campuran 1 mL minyak sawit dan 1 mL air kemudian divortex hingga bercampur dan kemudian diukur konduktivitasnya. Garam NaCl sebanyak 1, 2, 3 dan 4 % (b/b) ditambahkan ke dalam emulsi dan kemudian diukur konduktivitasnya.

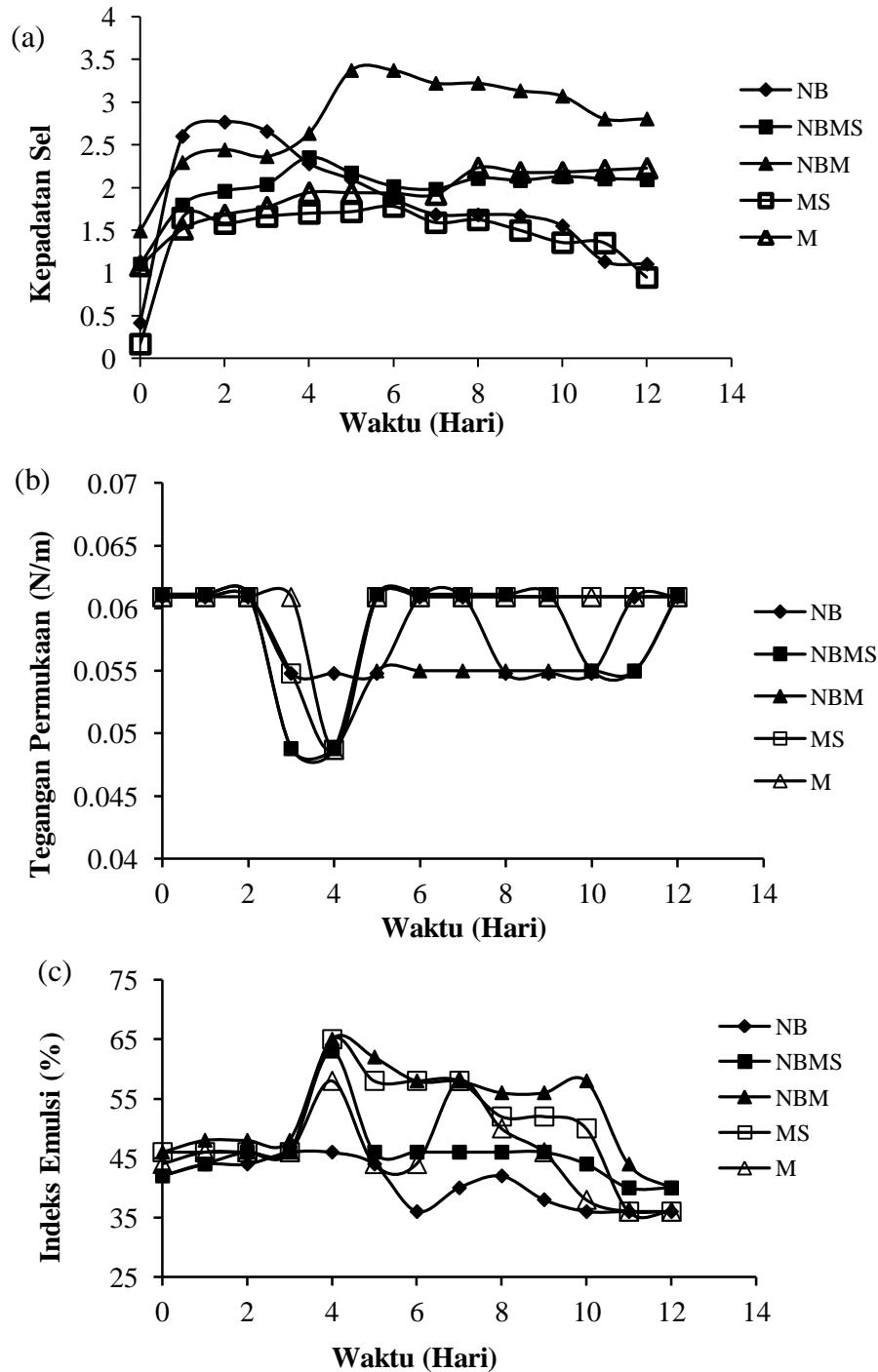
Uji aktivitas sebagai zat pengemulsi terhadap beberapa jenis hidrokarbon meliputi tegangan antar muka, E-24 dan stabilitas emulsi.

PEMBAHASAN

Penentuan kondisi optimum dalam biosintesis biosurfaktan

Variasi perlakuan awal media adalah dilakukan atau tidaknya pemisahan *amilopektin* (pati tak larut) dengan cara men-sentrifugasi *manipueira* yang telah dipanaskan terlebih dahulu, sehingga yang tersisa dalam media adalah *amilosa* (pati terlarut). Hal ini akan berpengaruh pada komposisi *manipueira* sehingga mempengaruhi

kandungan nutrisi dalam media fermentasi. Selain itu, dilakukan juga variasi komposisi, yaitu dengan atau tanpa penambahan *nutrient broth*.



Gambar 1. Pertumbuhan *P. aeruginosa* pada berbagai media: (a) Kepadatan sel, (b) Tegangan permukaan, dan (c) Indeks emulsi.

Kondisi optimum ditunjukkan dengan kepadatan sel, penurunan tegangan muka dan indek emulsi yang paling besar yang disajikan dalam Gambar 1. Uji statistik Duncan menunjukkan bahwa media NBM merupakan media fermentasi yang paling baik dengan lama fermentasi 4 hari. Media NBM yang merupakan campuran dari *nutrient broth* dan

manipueira mempunyai kandungan nutrisi yang relatif lebih banyak dan komplit untuk pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* untuk menghasilkan biosurfaktan.

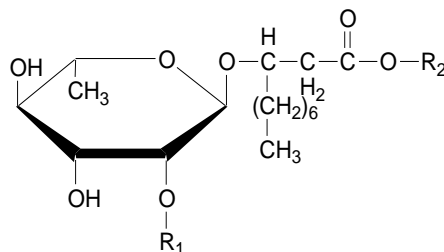
Identifikasi biosurfaktan

a. Identifikasi rhamnolipid

Rhamnosa dan biosurfaktan mempunyai serapan maksimum yang sama yaitu pada panjang gelombang 422 nm. Panjang gelombang maksimum rhamnosa yang diperoleh mendekati panjang gelombang maksimum rhamnosa yang diperoleh Tahzibi dan Assadi (2004) yaitu pada 421 nm. Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa biosurfaktan mengandung gugus rhamnosa. Se jauh ini dari penelitian biotransformasi yang telah dilakukan, biosurfaktan yang mengandung rhamnosa adalah rhamnolipida (Noordman and Janssen, 2002), sehingga biosurfaktan hasil biotransformasi kemungkinan adalah biosurfaktan jenis rhamnolipida.

b. Identifikasi gugus-gugus fungsi

Identifikasi dengan FT-IR menunjukkan bahwa biosurfaktan mengandung gugus-gugus yang terdapat pada senyawa rhamnolipida. Biosurfaktan mempunyai serapan yang kuat pada 3402 cm^{-1} yang merupakan serapan OH, yang kemungkinan adalah gugus OH pada rhamnopiranosil. Biosurfaktan juga mempunyai rantai panjang alifatik yang ditunjukkan dengan munculnya serapan khas C-H hidrokarbon pada 2927 dan 2854 cm^{-1} , yang didukung dengan munculnya serapan gugus C-H metil pada 1458 cm^{-1} dan gugus C-H metilen pada 1377 cm^{-1} .



1. $R_1 = L\text{-}\alpha\text{-rhamnopyranosil-}$,
 $R_2 = \beta\text{-asam hidroksidekanoat}$
2. $R_1 = H$, $R_2 = \beta\text{-asam hidroksidekanoat}$
3. $R_1 = L\text{-}\alpha\text{-rhamnopyranosil-}$, $R_2 = H$
4. $R_1 = H$, $R_2 = H$

Gambar 2. Struktur rhamnolipida

Serapan gugus karbonil ($C=O$) pada 1654 cm^{-1} menunjukkan bahwa biosurfaktan merupakan senyawa karboksilat yang didukung dengan munculnya serapan C-O karboksilat pada 1253 cm^{-1} . Serapan gugus karbonil tersebut juga menunjukkan adanya

gugus ester, yang didukung dengan munculnya serapan pada 1056 cm^{-1} yang merupakan serapan gugus C-O ester. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan R₂ pada struktur rhamnolipida adalah asam β -hidroksidekanoat, sehingga biosurfaktan yang diperoleh kemungkinan adalah rhamnolipida jenis 1 atau 2 (Gambar 2).

3. Karakterisasi Biosurfaktan

a. KKM

Nilai KKM yang diperoleh adalah sebesar 576 mg/L dengan tegangan muka sebesar 0,045 N/m. Nilai ini mendekati nilai yang diperoleh Tahzibi *and* Assadi (2004) yang menunjukkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* dapat mempunyai tegangan permukaan sebesar 0,03-0,06 N/m dengan nilai KKM sebesar 500-1000 m/L.

b. Sistem Emulsi

Sistem emulsi biosurfaktan ditentukan dengan pengukuran nilai daya hantar listrik (DHL) emulsi yang dibuat antara air, minyak sawit dan biosurfaktan sebelum dan sesudah penambahan zat elektrolit NaCl (Lestari, 2003).

Sebagai kontrol, air mengalami kenaikan DHL setelah penambahan NaCl dan terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi NaCl. Sedangkan untuk minyak sawit, nilai DHL adalah nol baik sebelum maupun setelah penambahan NaCl karena NaCl tidak dapat larut dalam minyak sawit. Untuk sistem emulsi tanpa penambahan biosurfaktan juga menunjukkan nilai DHL nol baik sebelum maupun setelah penambahan NaCl, yang berarti nilai DHL tetap, begitu juga untuk sistem emulsi dengan penambahan biosurfaktan hal ini dimungkinkan minyak sawit sebagai fasa pendispersi, dimana fasa pendispersi inilah yang nantinya akan berinteraksi dengan NaCl. Karena NaCl tidak larut dalam minyak sawit, maka tidak ada kenaikan nilai DHL setelah penambahan NaCl. Hal ini menunjukkan bahwa sistem emulsi yang terbentuk adalah air dalam minyak (w/o), dimana gugus hidrofiliknya mengarah ke dalam dan berinteraksi dengan air yang merupakan fase terdispersi sedangkan gugus hidrofobiknya mengarah ke luar karena fase pendispersinya adalah minyak.

Untuk mengetahui sistem emulsi, biosurfaktan juga dibandingkan dengan surfaktan komersial yaitu Triton X-100 (o/w) dan Span-60 (w/o). Emulsi yang diperoleh diuji dengan cara yang berbeda untuk o/w dan w/o. Pada w/o diteteskan minyak kemudian air, pada saat ditetesi minyak tidak berubah sedangkan saat ditetesi air berubah. Pada sistem emulsi o/w dilakukan uji dengan meneteskan air kemudian minyak. Saat ditetesi air tidak

berubah sedangkan saat ditetesi dengan minyak terjadi perubahan. Dalam uji ini didapatkan bahwa biosurfaktan memiliki perubahan yang sama dengan Span-60, sehingga didapatkan bahwa sistem emulsi dari biosurfaktan adalah w/o seperti pada Span-60.

c. Uji aktivitas sebagai zat pengemulsi terhadap beberapa jenis hidrokarbon

Biosurfaktan mempunyai kemampuan menurunkan tegangan antarmuka air dan beberapa senyawa hidrokarbon, yaitu benzen, toluen, premium dan minyak sawit sebesar antara 10-51 %. Penurunan tegangan antarmuka tertinggi diperoleh pada emulsi air dan minyak sawit, yaitu sebesar 51 %.

d. E-24 dan Kestabilan Emulsi

Penambahan biosurfaktan menunjukkan adanya indeks emulsi yang relatif besar untuk minyak sawit (sebesar 50 %), premium (sebesar 45 %), toluen (42 %) dan benzena (sebesar 32 %). Emulsi premium mampu bertahan (stabil) hingga 30 hari, minyak sawit hingga 22 hari sedangkan untuk toluen dan benzena masing-masing bertahan hingga 14 dan 5 hari.

KESIMPULAN

1. *Manipuera* dapat digunakan sebagai media dalam sintesis biosurfaktan dengan kondisi optimum media NBM (*nutrient broth* dan *manipuera* tanpa sentrifugasi) dengan lama fermentasi 4 hari.
2. Biosurfaktan yang diperoleh merupakan suatu rhamnolipida yang mempunyai gugus hidroksi, ester, karboksilat, metil dan metilen.
3. Biosurfaktan mempunyai nilai KKM sebesar 576 mg/L dengan tegangan muka sebesar 0,045 N/m serta mempunyai sistem emulsi minyak dalam air (w/o).
4. Biosurfaktan mempunyai kemampuan menurunkan tegangan antarmuka emulsi benzen, toluen, premium atau minyak sawit sebesar antara 10-51 %. Emulsi minyak sawit mempunyai indeks emulsi terbesar yaitu sebesar 50 %, sedangkan kestabilan emulsi hingga 30 hari diperoleh pada emulsi minyak premium.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dinas Pendidikan dan Kebudayaan Propinsi Jawa Tengah melalui Program Fasilitasi Penelitian Terapan tahun 2005 yang telah memberikan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adewoye, S.O., and Fawale, O.O., 2005, *Toxicity of Cassava Wastewater to African Catfish*, Faculty of Science, Addis Abba, Ethiopia.
- Anna, L.M.S., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira, N., and Freire, D.M.G., 2002, Production of Biosurfactants from *P. aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 19, pp. 159-166.
- Assadi, M.M., Rashedi, H., Bonakdarpour, B., Jashmide, E., and Levin, M., 1998, *Biosurfactant Production by P. aeruginosa*, Biotechnology Center, Iranian.
- Ghazali, R., and Ahmad, S., 1997, Biosurfactants : A Review. *Palm Oil Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, pp. 34-35.
- Haba, E., and Espuny, M.J., 2000, Screening and Production of Rhamnolipids by *P. aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils, *Spain of Journal Applied Microbiology*, vol. 88, pp. 379-387.
- Imam, A., 2006, *Produksi Hidrosilat Pati dan Serat Pangan dari Singkong dengan Hidrolisis Asam Klorida*, Departemen Industri Pertanian.
- Kosaric, N., 2001, Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation, *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 39, pp. 295-296.
- Lestari, A., 2003, *Identifikasi Senyawa Fosfolipida pada Soya Lesitin Komersial dan Soya Lesitin Hasil Isolasi dari Santan Kelapa*, Skripsi, Jurusan Kimia, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Nitschke, M., 2004, Selection of Microorganism for Biosurfactant Production using Agroindustrial Wastes, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 35, pp. 81-85.
- Noordman, W.H., and Janssen, D.B., 2002, Rhamnolipid Stimulates Uptake of Hydrophobic Compounds by *P. aeruginosa*, *Applied and Environmental Biology*, vol. 68, pp. 4502-4508.
- Patel, R.M., and Desai A.J., 1997, Biosurfactant Production by *P. aeruginosa* GS3 from Molasses, *Letter in Applied Microbiology*, vol 25, pp. 91-94.
- Rashedi, H., Jamshidi, E., Assadi, M.M. and Bonakdarpour, B., 2005, Isolation and Production of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Iranian Southern Wells Oil, *Int. J. Environ. Sci. Tech*, vol.2, pp. 121-127.
- Tahzibi, A.K. and Assadi, M.M., 2004, Improved Production of Rhamnolipids by a *P. aeruginosa* Mutant, *Iranian Biomedical Journal*, vol. 8, pp. 23-31.