

Potensi bakteri lumpur minyak sebagai penghasil biosurfaktan dan antimikroba

Potency of oil sludge bacteria as a producer of biosurfactant and antimicrobial agents

MARTHA SARI[✉], FIFI AFIATI, WIEN KUSHARYOTO

Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong-Bogor 16911, Jawa Barat. Tel. +62-21-8754587; Fax. +62-21-8754588; [✉]email: martha.biotek@gmail.com

Manuskrip diterima: 28 November 2014. Revisi disetujui: 13 Januari 2015.

Abstrak. Sari M, Afiati F, Kusharyoto W. 2015. Potensi bakteri lumpur minyak sebagai penghasil biosurfaktan dan antimikroba. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1)*: 85-88. Senyawa glikolipid yang diproduksi oleh bakteri lumpur minyak memiliki potensi sebagai biosurfaktan dan agen antimikrobia. Untuk mengkonfirmasi kemampuan isolat dalam menghasilkan senyawa biosurfaktan, dilakukan uji pendahuluan hemolisis dalam cawan agar darah (*blood agar plate*). Selanjutnya kelima bakteri ditumbuhkan dalam medium YM menggunakan minyak zaitun sebagai stimulan terhadap keluarnya ekstraseluler surfaktan (biosurfaktan). Uji kualitatif senyawa biosurfaktan diobservasi menggunakan kromatografi lapis tipis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi ekstrak bakteri lumpur minyak sebagai penghasil senyawa biosurfaktan dan aktivitas antibakterial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa identitas kimia senyawa bioaktif surfaktan terdeteksi positif dalam bentuk spot kuning di pelat TLC dan menunjukkan reaksi positif dengan pewarna antron. Seluruh ekstrak bakteri lumpur minyak berpotensi sebagai senyawa biosurfaktan dan mampu menekan pertumbuhan mikroba patogen berupa *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: Bakteri lumpur minyak, biosurfaktan, antimikroba.

Abstract. Sari M, Afiati F, Kusharyoto W. 2015. Potential of bacteria isolated from oil sludge as biosurfactant producers and antimicrobial agents. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1)*: 85-88. Glycolipid compounds produced by bacteria isolated from oil sludge have potential as biosurfactant and antimicrobial agents. Hemolysis test in blood agar plate was conducted as a preliminary observation to confirm the ability of the isolates in biosurfactant production. For further examination, five bacterial isolates were cultivated on YM medium using olive oil as a stimulant to release extracellular surfactant (biosurfactant). Qualitative test of biosurfactant production was conducted using thin layer chromatography (TLC). This study aims to screen the potential of bacterial isolates from oil sludge as biosurfactant producers and antibacterial agents. Results from the chemical identity test showed the positive reaction of anthrone reagent (indicated by the yellow spot on the TLC plate). This test revealed the presence of bioactive surfactant compound from the bacterial extracts. All extracts showed potential as biosurfactants producers and inhibited the growth of microbial pathogens such as *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Oil sludge bacteria, biosurfactant, antimicrobial

PENDAHULUAN

Biosurfaktan merupakan salah satu sumber energi alternatif yang disintesis secara ekstraseluler oleh mikroba dengan aktivitas sebagai penurun tegangan permukaan (Takahashi et al. 2011). Berdasarkan struktur, molekul surfaktan mengandung gugus hidrofilik dan hidrofobik, yaitu suatu sifat yang mampu mengkonsentrasikan molekul-molekul interpermukaan yang berbeda derajat polaritasnya, seperti interpermukaan minyak dalam air (Rau et al. 2005). Biosurfaktan dapat dihasilkan oleh mikroorganisme prokariot maupun eukariot. Mikroorganisme penghasil biosurfaktan dari golongan bakteri sangat variatif jenisnya, antara lain *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactobacillus* (Fukuoka et al. 2007).

Surfaktan sintesis kimiawi biasanya diklasifikasikan menurut sifat gugus polarnya, sedangkan surfaktan mikrobial dibedakan berdasarkan sifat struktur kimiawi dan juga spesies mikroba penghasil (Cameotra dan Makkar et al. 2004). Perbedaan sifat-sifat fisika dan kimia molekul biosurfaktan merupakan hal yang mendasar dan penting diketahui guna menentukan potensi aplikasi dari biosurfaktan. Kegunaan potensial senyawa biosurfaktan dibandingkan sintesis surfaktan kimiawi adalah rendah daya toksik, ramah lingkungan, mudah terdegradasi di alam, aktif spesifik dengan selektivitas tinggi (Rodrigues et al. 2006).

Biosurfaktan merupakan struktur biomolekul kompleks terdiri atas tipe glikolipid, lipopeptida, lipoprotein, fosfolipid, dan polimerik surfaktan (Takahashi et al. 2011). Pada umumnya mikrobial surfaktan banyak ditemukan dalam bentuk surfaktan glikolipid. Biosurfaktan glikolipid

merupakan senyawa gula yang berikatan kompleks dengan asam alifatik rantai panjang (asam alifatik hidroksi). Biosurfaktan glikolipid memiliki sifat potensi industri dan aplikasi lingkungan yang baik, seperti sebagai detoksifikasi cemaran logam di aliran sungai, kontrol limbah pembuangan minyak, dan bioremediasi tanah yang terkontaminasi (Mukherjee et al. 2006).

Tujuan penelitian ini adalah menggali potensi ekstrak dari bakteri lumpur terkontaminasi minyak sebagai senyawa penghasil ekstraselular surfaktan dan senyawa aktif antibakteri.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bidang Bioproses Puslit Bioteknologi LIPI. Isolat bakteri yang digunakan adalah lima isolat bakteri hasil isolasi sampel lumpur minyak dan isolat tersimpan di Laboratorium Rekombinan, Protein, Vaksin, dan Sistem Penghantar Terarah. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.

Peremajaan kultur bakteri

Stok kultur bakteri dikultivasi selama 3 hari dalam inkubator bersuhu 25°C dalam medium YM agar, dengan komposisi 8 g/L pepton, 2,5 g/L yeast ekstrak, 1 g/L glukosa, 0,3 g/L MgSO₄ dan 0,3 g/L NaNO₃ (Kalyani et al. 2014). Peremajaan bakteri segar yang sudah tumbuh siap digunakan sebagai stok kultur, disimpan di lemari pendingin suhu 4°C dan diremajakan setiap 2 minggu sekali. Bentuk koloni masing-masing bakteri terobservasi pada mikroskop digital menggunakan pembesaran 400x.

Uji pendahuluan hemolisis

Bakteri berpotensi biosurfaktan selanjutnya dilakukan uji pendahuluan dengan memeriksa kemampuan hemolisis bakteri menggunakan teknik cawan darah agar. Sebanyak 1,5 ml darah segar domba steril dipipet ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 100 ml media mineral-agar kemudian dihomogenkan. Setelah itu, tuang medium darah agar ke cawan petri steril hingga beku dan padat. Strain bakteri potensi biosurfaktan di-strik di atas media darah agar segar. Bakteri yang ditumbuhkan dalam cawan diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, cawan dicek zona hemolisisnya dan perubahan warna yang terbentuk dari aktivitas bakteri uji (Das et al. 2008).

Produksi dan isolasi senyawa biosurfaktan glikolipid

Suspensi bakteri uji diperoleh dari stok slant segar yang berisi medium standar YM, dengan komposisi pepton 8 g/L, yeast ekstrak 2,5 g/L, glukosa 1 g/L, MgSO₄ 0,3 g/L, dan NaNO₃ 0,3 g/L diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya 3 ml suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam 300 ml labu Erlenmeyer mengandung 10 ml minyak zaitun steril sebagai sumber substrat. Kultur bakteri ditumbuhkan secara aerobik selama 4 hari pada suhu 30°C dengan pengocokan konstan. Kultur bakteri setelah difermentasi, dipisahkan antara sel dengan supernatan

dengan cara sentrifugasi 6000 rpm selama 20 menit (Morita et al. 2011).

Isolasi senyawa aktif biosurfaktan dari produk fermentasi dilakukan dengan proses pengendapan dan mengatur pH supernatan (bebas sel) menjadi suasana asam (pH 2,0) menggunakan larutan 2M HCl. Kemudian supernatan pH 2,0 disimpan dalam kondisi dingin 4°C selama semalam. Larutan endapan yang terbentuk (presipitat) selanjutnya disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit. Kemudian, pelet biosurfaktan dilarutkan dengan air destilata dan disesuaikan pH menjadi pH 7,0 menggunakan 2M NaOH. Selanjutnya ekstrak fraksi biosurfaktan dapat digunakan untuk uji aktivitas kimiawi biosurfaktan (Kalyani et al. 2014).

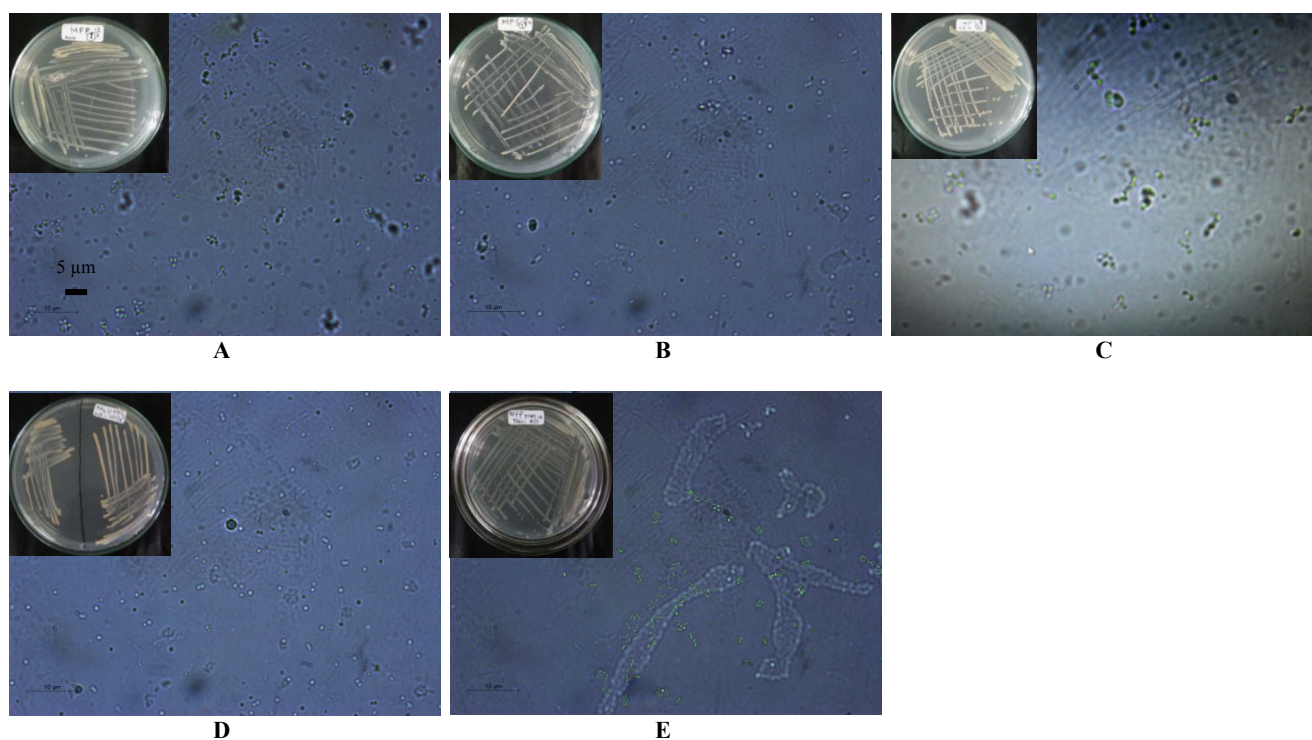
Ekstrak fraksi biosurfaktan dianalisis identitas kimiawinya menggunakan pelat kromatografi lapis tipis (KLT) dalam permukaan silika gel. Pelat KLT dihomogenkan dengan campuran pelarut kloroform, methanol, dan air (65:15:5, v:v:v). Hasil spot yang terbentuk divisualisasikan dengan pewarna antron dibawah sinar UV (254 nm). Pembentukan bercak kuning menunjukkan ekstrak bakteri positif mengandung senyawa glikolipid biosurfaktan (Das et al. 2008).

Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar

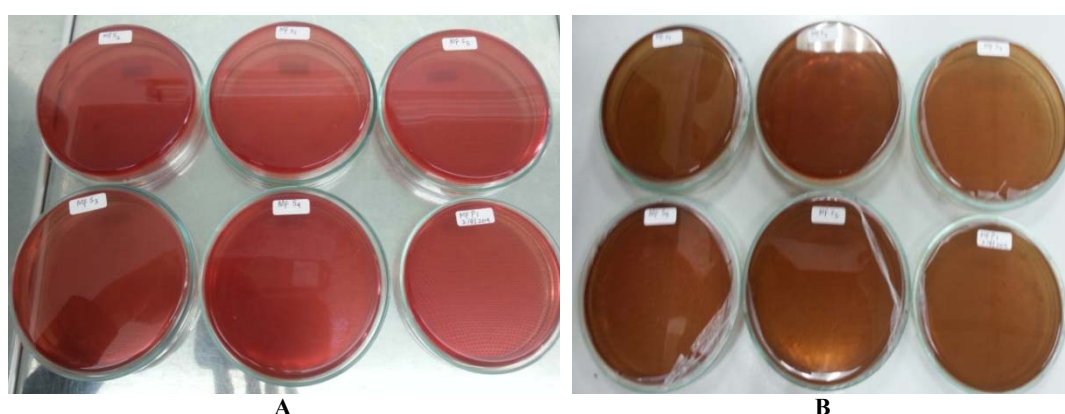
Uji aktivitas antibakteri dilakukan steril dalam media agar terdifusi. Bakteri uji yang digunakan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Suspensi bakteri tertanam dalam medium agar lapisan pertama yang berisi media NA yang lebih pekat dan didiamkan pada suhu kamar hingga memadat. Optikal kekeruhan suspensi bakteri diatur serapan OD mencapai 1,0. Kertas cakram berisi 20 µl ekstrak bakteri (senyawa glikolipid) diletakkan di atas lapisan agar yang telah memadat. Kontrol positif menggunakan kloramfenikol pada konsentrasi 10 µl dan kontrol negatif menggunakan pelarut ekstrak bakteri uji yang diteteskan pada kertas cakram. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, pembentukkan zona hambat disekitar kertas cakram diukur diameternya dengan jangka sorong (Cao et al. 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan lima isolat bakteri penghasil senyawa biosurfaktan ditumbuhkan dalam medium YM antara lain MFS1, MFS2, MFS3, MFS4 dan MFP1. Respon pertumbuhan bakteri telah terbentuk pada hari pertama isolat diinkubasikan. Karakteristik sel dan morfologi bakteri tersaji pada Gambar 1. Sebagian besar warna koloni bakteri yang ditumbuhkan di atas cawan agar medium YM berwarna putih tulang (MFS2, MFS3, MFS4 dan MFP1) dan hanya satu bakteri berwarna kuning cerah (MFS1) pada inkubasi suhu 30°C. Bentuk dan ukuran bakteri sangat bervariasi tetapi umumnya berbentuk basil ukuran pendek. Pemeriksaan karakteristik morfologi strain *Pseudozyma*, sebagai khamir penghasil senyawa biosurfaktan juga dilakukan dalam medium pertumbuhan padat YM dengan variasi koloni berwarna putih dan kuning (Morita et al. 2009).



Gambar 1. Bentuk kelima koloni bakteri penghasil senyawa biosurfaktan (A. MFP1, B. MFS1, C. MFS2, D. MFS3, dan E. MFS4) dalam visual media agar dan mikroskopis menggunakan pembesaran 400X.



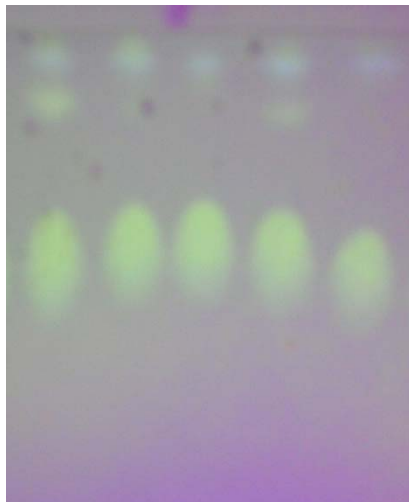
Gambar 2. Aktivitas pertumbuhan bakteri hemolisis yang ditumbuhkan dalam medium sel darah merah, diinkubasi pada suhu 37⁰ C, Sebelum inkubasi (A) dan setelah inkubasi dalam 48 jam (B).

Uji pendahuluan terhadap bakteri potensial penghasil senyawa biosurfaktan dilakukan dengan metode lisis sel darah merah (hemolisis) menggunakan medium spesifik. Prinsip pengujian hemolisis adalah melihat perubahan warna media ketika bakteri ditumbuhkan di atas medium padat darah segar (Das et al. 2008).

Berdasarkan Gambar 2, terlihat bahwa kelima strain bakteri berpotensi sebagai isolat penghasil senyawa biosurfaktan. Munculnya perubahan warna dari merah darah menjadi warna gelap (transparan tidak berwarna) telah tampak disekitar koloni bakteri tumbuh. Hal ini menunjukkan aktivitas bakteri mampu melisis sel-sel darah merah selama 48 jam waktu inkubasi. Metode hemolisis merupakan metode kualitatif menggunakan sel

darah merah sebagai media tumbuh kaya nutrisi bagi mikroba spesifik.

Pembentukan zona hemolisis disebabkan oleh aksi strain bakteri mengeluarkan senyawa aktif glikolipid dalam substrat hidrofilik. Pengujian hemolisis sebagai uji awal telah dilakukan terhadap 200 bakteri laut, sebanyak 40 strain bakteri menunjukkan respon positif membentuk zona transparan di sekitar cawan darah agar dalam 24 jam waktu kultivasi (Maneerat et al. 2007). Batista et al (2006) menyatakan bahwa metode cawan darah agar merupakan metode penapisan awal sehingga perlu didukung pengujian lanjutan seperti pengukuran aktivitas tegangan permukaan dan konfirmasi keberadaan bercak kimia senyawa pada pelat KLT.



Gambar 3. Bercak ekstrak aktif senyawa biosurfaktan dalam pelat KLT dengan sistem pergerakan pelarut (kloroform: methanol: air, 65: 15: 5) dan pewarna spesifik antron.

Tabel 1. Hasil aktifitas zona hambat ekstrak bakteri terhadap bakteri patogen

Pathogen test	Ekstrak	Ekstrak	Ekstrak	Ekstrak	Ekstrak
	MFS1	MFS2	MFS3	MFS4	MFP1
<i>Escherichia coli</i>	++	+++	+	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	++	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+++	+++

Selanjutnya fraksi ekstrak biosurfaktan dikonfirmasi identitas kimiawinya dengan teknik kromatografi lapis tipis. Gambar 3 menunjukkan bahwa adanya bercak berwarna kuning di atas permukaan silika gel setelah disinari cahaya UV 254 nm. Munculnya beberapa bercak pada pelat silika menunjukkan bahwa senyawa yang terbentuk belum dimurnikan (senyawa *crude*). Fraksi ini terdeteksi positif terhadap pewarna antron dan mengindikasikan adanya senyawa glikolipid dalam ekstrak. Penelitian Das et al. 2008 mendeteksi senyawa glikolipid muncul sebagai bercak tunggal setelah proses fraksinasi menggunakan HPLC. Fraksi murni biosurfaktan dari ekstrak bakteri *Bacillus circulans* telah menunjukkan respon positif spot kuning kehijauan dengan pewarna spesifik antron.

Ekstrak-ekstrak biosurfaktan glikolipid selanjutnya dilakukan pengujian aktifitas antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap tiga spesies bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*. Hasil intensitas daya hambat dikelompokkan menurut berikut: (-): tidak terbentuk zona hambat = 0, (+) kurang = < 2 mm, (++) baik = antara 8-10 mm, (+++) sangat baik = antara 10-12 mm. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa bakteri patogen *E.coli* mampu dihambat pertumbuhannya oleh hampir seluruh ekstrak biosurfaktan glikolipid. Ekstrak MFS1, MFS2, MFS3 masing-masing memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen *S. aureus*. Sedangkan ekstrak MFS4 dan MFP1 memberikan respon yang baik terhadap penghambatan *B. subtilis*.

Berdasarkan hasil diketahui bahwa aktivitas antibakteri ekstrak-ekstrak glikolipid yang disintesis oleh bakteri potensial surfaktan memberikan respon spektrum yang luas. Kelima ekstrak tersebut sebagian besar berkemampuan baik dan sangat baik dalam penghambatan terhadap bakteri patogen. Penelitian senyawa rhamnolipid (sejenis biosurfaktan glikolipid yang diproduksi oleh *Bacillus circulans* dilaporkan memiliki aktivasi sebagai senyawa antibakteri gram negatif, seperti *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Proteus mirabilis* (Das et al. 2008).

Kelima bakteri potensial MFS1, MFS2, MFS3, MFS4, dan MFP1 memiliki aktivitas sebagai isolat penghasil senyawa biosurfaktan glikolipid, berdasarkan uji pendahuluan hemolisis dan uji identitas kimiawi pada pelat KLT. Pengujian antibakteri menggunakan metode difusi cakram pada ekstrak-ekstrak glikolipid biosurfaktan mampu menekan keberadaan bakteri-bakteri patogen *E. coli*, *B. subtilis*, dan *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Batista S, Mounteer A, Amorim F. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol* 97: 868-875.
- Cameotra and Makkar. 2006. Recent application of biosurfactant as biological and immunological molecule. *Curr Opin Microbiol* 7: 262-266.
- Cao XH, Liao ZY, Wang CL, Cai P, Yang WY, Lu MF, Huang GW. 2009. Purification and antitumor activity of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus natto* TK-1. *Biotechnol Appl Biochem* 52: 97-106.
- Das P, Mukherjee S, Sen R. 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol* 104: 1675-1684.
- Fukuoka T, Morita T, Konishi M, Imura T, and Kitamoto D. 2007. Characterization of new type of *mannosylerythritol lipids* as biosurfactants produced from soybean oil by a *Basidiomycetous* Yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *J Oleo Sci* 8: 435-442.
- Kalyani ALT, Shireesha NG, Aditya AKG, Sankar G. 2014. Isolation and antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactant from oil contaminated soil sample using humic acid salts vitamin agar. *International Journal of Research in Engineering and Technology*. 3: 357- 364.
- Maneerat S, Phetrong K, Song K. 2007. Isolation of biosurfactant producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Journal Science Technology*. 29: 781-791.
- Morita T, Fukuoka T, Konishi M, Imura T, Yamamoto S, Kitagawa M, Sogabe A, Kitamoto D. 2009. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. *Appl Microbiol Biotechnol J* 83: 1017-1025.
- Morita T, Ogura Y, Takashima M, Hirose N, Fukuoka T, Imura T, Kondo Y, Kitamoto D. 2011. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, *mannosylerythritol lipids*. *J Biosci Bioeng* 112: 137-144.
- Mukherjee AK, Das P and Sen. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnology*. 24: 509-515.
- Rau U, Nguyen LA, Lang S, et al. 2005. Downstream processing of *mannosylerythritol lipids* produced by *Pseudozyma aphidis*. *Journal of Lipid Science Technology*. 107: 373-380.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, and Oliveira R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrobe Chemother* 57: 609-618.
- Takahashi M, morita T, Wada K, Hirose K, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto D. 2011. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicicola* NBRC 10243. *J Oleo Sci* 60: 267-273.