

Biodegradasi Alkil Benzena Sulfonat oleh *Pseudomonas cepacia*

I Made Sudiana[✉]

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor

ABSTRACT

Alkyl Benzene Sulfonate Biodegradation of *Pseudomonas cepacia*. Alkyl Benzene Sulfonate (ABS), naturally slow biodegradable substances, and toxic to human, animal and microorganisms, is a focus of environmental studies. Microorganisms appeared to play important role on biodegradation of that substances in nature, and wastewater treatment processes. S2 isolated from detergent contaminated soil was able to grow in media with ABS as the sole carbon source. ABS degradation took place under aerobic condition, at pH 4, temperature 30°C with μ_{max} of 0.0591^{-h}, K_s = 3.25 mg/L, V_{max} = 0.16 mg/L.hours⁻¹, and K_m = 14.52 mg/L. Analyses of 16s rDNA revealed that S2 is belonging to *Pseudomonas cepacia*.

Key words: Alkyl Benzene Sulfonate (ABS), *Pseudomonas cepacia*, detergent

PENDAHULUAN

Akibat industrialisasi dan urbanisasi yang meningkat menyebabkan penggunaan detergent untuk keperluan industri dan rumah tangga meningkat (Kirk & Othmer, 1979; Beaubien dan Jollicouer, 1984). Alkil Benzena Sulfonat (ABS), dan Alkil Sulfonat Linear (ALS) merupakan jenis surfaktan anionik yang mengandung sulfonat (SO_3^-) (Grayson, 1983). ALS yang mempunyai struktur bercabang lebih persisten di lingkungan dibandingkan dengan ABS. Pada konsentrasi yang melebihi ambang batas, kedua senyawa tersebut dapat menyebabkan perubahan ekosistem perairan seperti terganggunya populasi mikroba penambat N, mikroba fotosintetik, dan bahkan dapat mempengaruhi kesehatan ternak dan manusia (Bitton,

1983; Metelev *et al.*, 1983; Niven *et al.*, 1988). Penggunaan unit pengolahan limbah makin populer untuk meningkatkan kualitas air bungan (Tchnolobagus, 1990). Disadari bahwa meningkatnya beban senyawa organik yang mengandung detergent yang memasuki UPL dapat menyebabkan menurunnya laju dekomposisi senyawa organik oleh komunitas mikroba lumpur aktif (Jackson & Brown, 1970; Anderson *et al.*, 1982).

Banyak mikroba dilaporkan mampu mendegradasi detergent (ABS dan ALS). Akan tetapi ABS lebih sulit diuraikan dibandingkan dengan ALS (Longman & Frederick, 1987). Banyak penelitian difokuskan kepada peran komunitas mikroba di dalam unit pengolahan limbah merombak senyawa detergent (Gledhil, 1974; Dunn & Bull, 1982; Tchnolobagus, 1990).

✉ Jl. Ir. H. Juanda No. 18 Bogor 16002

E-mail: sudianai@yahoo.com

Sudiana

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 pengolahan limbah yang efektif dan efisien dalam merombak detergen, maka diperlukan informasi mengenai karakteristik dan kinetika pertumbuhan jasad renik yang mampu melakukan degradasi detergen (Tchnolobagus, 1990). Penelitian ini bertujuan mendapatkan jasad renik yang mampu mendegradasi ABS 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 ABS

Sampel dari material tersebut di atas diaklimasi pada *Sequential Batch Reactor* (SBR). Aerasi diberikan dengan mengalirkan udara dengan pompa udara yang pada out-letnya difilter dengan menggunakan filter steril ukuran 0.20 μm . Aklimasi dilakukan selama 1 minggu. Aerasi ini ditujukan untuk meningkatkan populasi jasad renik yang bersifat aerobik. Kemudian sebanyak 100 ml kultur mikroba campuran yang teraklimasi selama 1 minggu, dipindahkan ke masing-masing erlenmeyer (volume 250 ml). Konsentrasi ABS didalam 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 dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Setelah 5 hari dilakukan isolasi bakteri yang tumbuh dengan menggunakan medium $\frac{1}{4}$ NA dengan penambahan ABS sesuai dengan asal dari kultur tersebut. Bakteri yang tumbuh paling cepat pada media yang mengandung ABS tertinggi selanjutnya di sub-kultur pada media $\frac{1}{4}$ NA dengan penambahan 20 ppm detergen. Penambahan detergen dimaksudkan untuk menjaga kemampuan bakteri dalam degradasi ABS.

Seleksi dan identifikasi mikroba pendegradasi ABS

Dari hasil isolasi di atas, dilakukan seleksi pertumbuhan pada medium cair dengan kandungan ABS 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 ABS kemudian dimurnikan dan dilakukan identifikasi 16s rDNA. Biakan yang telah murni kemudian ditumbuhkan pada media NB untuk mendapatkan biomassa yang cukup untuk pengujian degradasi ABS, yaitu dengan menginokulasi biakan murni dari biak yang ditumbuhkan pada media $\frac{1}{4}$ NA dengan 20 ppm ABS ke dalam 500 ml medium NB dengan kadar ABS 20 mg/l, inkubasi dilakukan pada shaker (125 rpm) pada suhu kamar, selama 48 jam. Hasil penelitian pendahuluan diketahui ABS sebanyak 20 mg/l akan habis dalam waktu 24 jam. Biomassa bakteri diunduh (difraksinasi) dengan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 6000 rpm, suhu

10°C. Pelet bakteri digunakan untuk uji selanjutnya.

Kinetika pertumbuhan bakteri, dan biodegradasi ABS

Biomassa sel bakteri yang diperoleh dari fraksionasi berupa pellet ditimbang masing-masing 0,5 g dan diinokulasikan ke dalam media uji 200 ml dengan variasi konsentrasi ABS 0,1; 3,0; 5,0; 15,0; dan 20,0 mg/l. Satu media tanpa penambahan biomassa sel disiapkan sebagai kontrol pada penentuan pertumbuhan. Media tersebut diinkubasi dengan penggojokan pada suhu 30°C. Pengukuran konsentrasi ABS, jumlah biomassa, dan pH dilakukan pada setiap interval waktu 3 jam selama 40 jam. Pengukuran jumlah biomassa dilakukan dengan mengukur tingkat turbiditas 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.

Degradasi ABS Pengukuran sisa ABS 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 fenolftalein sehingga larutan berwarna merah muda tepat hilang. Selanjutnya ditambahkan 1 ml CHCl₃, 2,5 ml biru metilena, dan dikocok kuat selama 30 detik untuk ekstraksi. Tutup tabung uji sesekali dibuka selama ekstraksi. Setelah ekstraksi selesai, tabung uji didiamkan sampai terjadi fase. 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 didiamkan 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 DAN PEMBAHASAN

Absorpsi ABS oleh komunitas kultur campuran

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

Jasad renik pendegradasi ABS

Didapat 20 isolat yang mampu tumbuh pada medium isolasi, dari 20 biak tersebut setelah dilakukan seleksi secara

Tabel 1. Pengukuran konsentrasi ABS akibat aktivitas metabolisme komunitas jasad renik

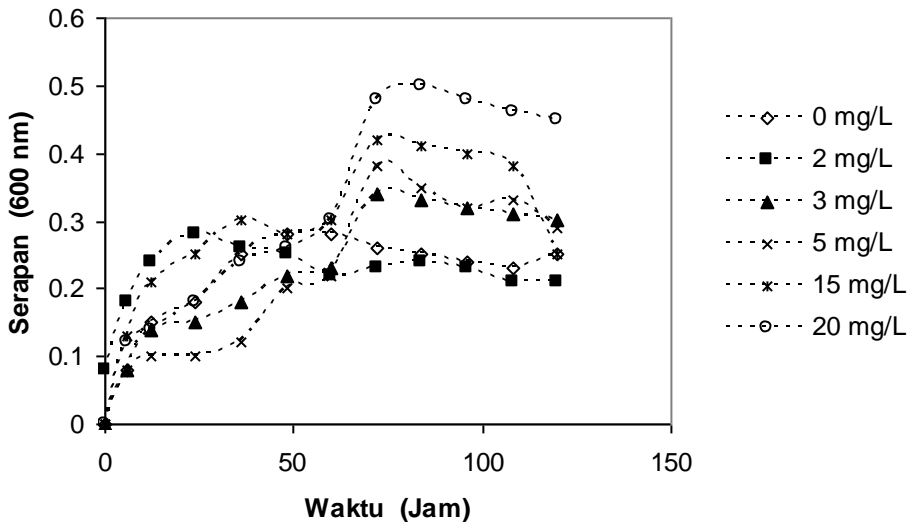
No.	Konsentrasi ABS teori di dalam kultur	Waktu (Jam)	Konsentrasi ABS hasil analisis di dalam kultur
1	1 mg/L	0	1,4 mg/L
		48	0 mg/L
2	3 mg/L	0	3,2 mg/L
		48	0 mg/L
3	5 mg/L	0	5,8 mg/L
		48	0 mg/L
4	15 mg/L	0	17,4 mg/L
		48	5,2 mg/L

secara kuantitatif dengan melihat kecepatan pertumbuhan pada medium seleksi yang mengandung 10 mg/l ABS, di sub-kultur dan dilakukan identifikasi jenis, penentuan kinetika pertumbuhan, dan kinetika degradasi ABS. Biak yang mempunyai kecepatan pertumbuhan tertinggi adalah S2. Hasil analisis 16s rDNA dari biak S2 menunjukkan bahwa

biak tersebut mempunyai kedekatan 97 % dengan *Pseudomonas cepacia*.

Kinetika pertumbuhan S2 pada ABS

Biak S2 mampu tumbuh pada ABS sampai 20 mg/l (Gambar 1), pada konsentrasi ABS 100 mg/l, pertumbuhannya sangat terhambat (data tidak diperlihatkan).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan biak S2

Pertumbuhan spesifik (μ)

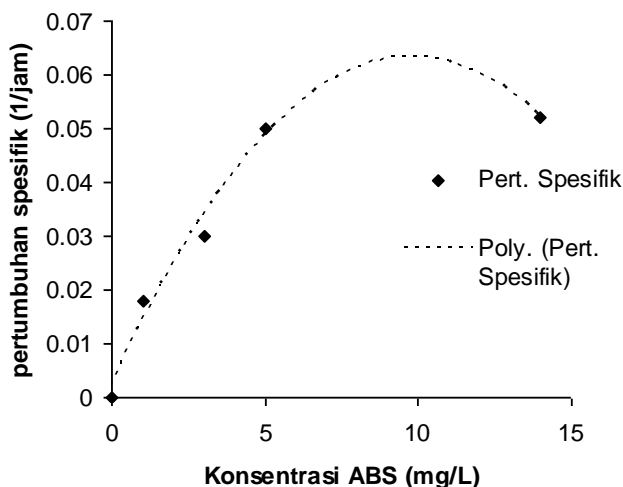
Absorpsi ABS yang mempunyai bobot molekul sekitar 325 g/mol ke dalam sel, seperti ditunjukkan oleh nilai K_s , menyebabkan meningkatnya konsentrasi ABS di dalam sel. Peningkatan ini memacu sintesis energi produksi sel metabolit yang digunakan untuk metabolisme dan pertumbuhan sel sampai batas maksimum (μ_{maks}). Besarnya K_s dan μ_{maks} Biak S2 pada medium ABS (Tabel

2), adalah hasil perhitungan hubungan antara konsentrasi substrat dan pertumbuhan spesifik (μ) seperti terlihat pada Gambar 2.

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

Tabel 2. Kinetika pertumbuhan biak S2 pada medium ABS

No.	Parameter kinetika pertumbuhan	Substrat ABS
1	μ_{maks} (Jam ⁻¹)	0,059
2	K_s (mg/l ⁻¹)	3,25



Gambar 2. Kurva ketergantungan laju pertumbuhan spesifik (μ)

Penentuan K_m dan V_{max}

Pengukuran konsentrasi ABS pada berbagai interval waktu akan menghasilkan kurva hubungan antara konsentrasi ABS dengan waktu, yang selanjutnya digunakan untuk menentukan orde reaksi. Ciri reaksi orde satu adalah

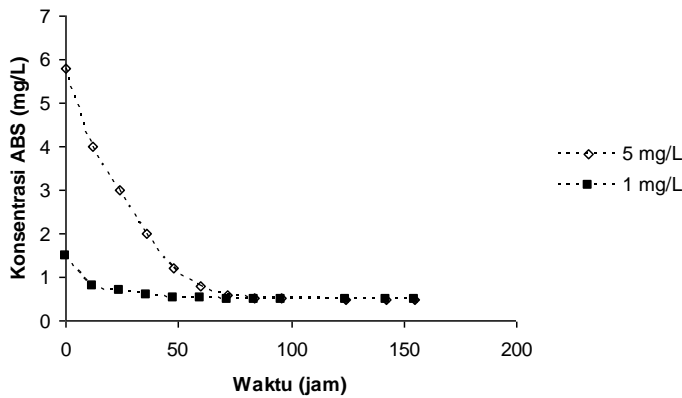
plot antara $\ln(ABS)$ terhadap waktu akan menghasilkan garis lurus dan *slopenya* merupakan konstanta (k). Kecepatan reaksi ditentukan dengan menggunakan persamaan 1.

Sudiana

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

dengan: V adalah kecepatan biodegradasi, [ABS] konsentrasi ABS, dan k adalah konstanta kecepatan

Persamaan 1 menunjukkan bahwa kecepatan reaksi orde satu berbanding lurus dengan konsentrasi ABS. Degradasi ABS pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 5 mg/l mengikuti orde nol.

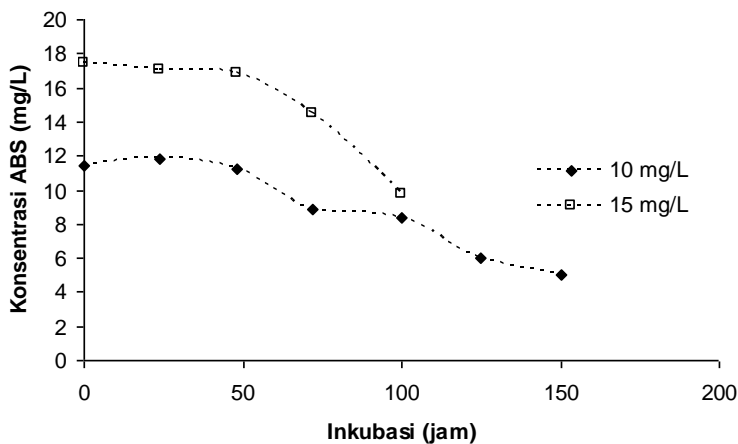


Gambar 3. Kurva biodegradasi ABS pada konsentrasi 1 dan 5 mg/l mengikuti orde satu

Seperti ditunjukkan oleh plot antara konsentrasi ABS terhadap waktu menghasilkan garis lurus, dan *slopenya* merupakan konstanta dan sekaligus nilai kecepatannya. Kecepatan reaksi ditentukan dengan menggunakan persamaan 2:

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

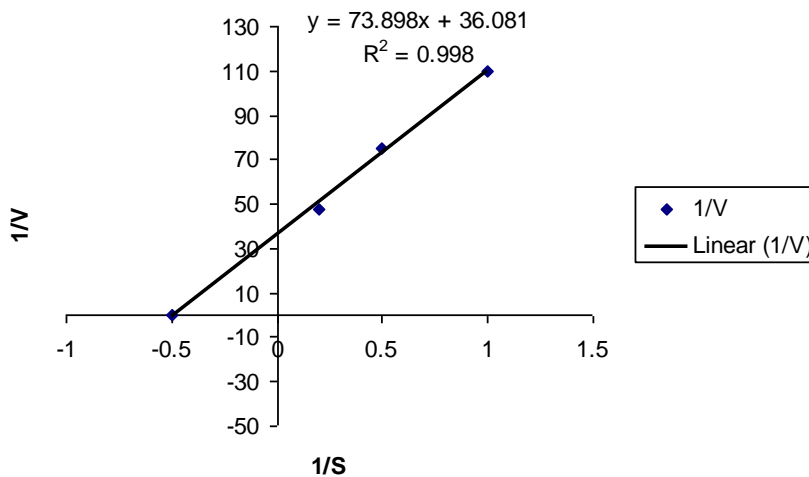
dengan: V adalah kecepatan biodegradasi, [ABS] konsentrasi ABS, dan k adalah konstanta kecepatan.



Gambar 4. Kurva biodegradasi ABS pada konsentrasi 10 dan 15 mg/l mengikuti orde nol

Kecepatan biodegradasi ditentukan pada berbagai konsentrasi ABS, yang diukur pada suhu 30°C, kecepatan penggojokan 130 rpm dengan pH awal 4. Kecepatan degradasi maksimum ABS oleh biak S2 adalah 1,04 mg^l·Jam⁻¹. Kecepatan degradasi rendah pada saat konsentrasi ABS rendah seperti ditunjukkan pada saat konsentrasi 1 mg/l dan 5 mg/l. Kecepatan degradasi

meningkat pada saat konsentrasi ABS ditingkatkan. Pengaturan kecepatan reaksi enzim didalam sel sebagian disebabkan oleh perubahan konsentrasi substrat didalam sel. Pada saat konsentrasi ABS maksimum didalam sel, yaitu sekitar 10-15 mg/l, pada kondisi ini reaksi biodegradasi mengikuti orde nol (Gambar 4).



Gambar 5. 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 5). Konstanta orde pertama biodegradasi ABS cukup tinggi, dengan afinitas substrat yang juga tinggi (Tabel 2). Hal tersebut

menunjukkan bahwa ABS dapat dengan mudah diabsorpsi kedalam sel dan kemudian didegradasi menjadi monomer yang dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk pembentukan metabolit sel dan biomassa sel.

Tabel 2. Nilai parameter kinetika biodegradasi ABS oleh Strain 2

No.	Parameter kinetika	Nilai
1	V_{maks} (mg ^l ·Jam ⁻¹)	0,16
2	K_m (mg·l ⁻¹)	14,52
3	k_1 (Jam ⁻¹)	0,0079

ABS merupakan salah satu komponen detergen yang keberadaannya di dalam ekosistem dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan ekosistem. Degradasi ABS 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 penghidrolis 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 cepacia* S2 yang diisolasi dari campuran lumpur aktif dan tanah tercemar detergen mampu melakukan degradasi ABS seperti ditunjukkan oleh meningkatnya biomassa sel dan menurunnya konsentrasi ABS di dalam kultur. Bakteri tanah juga dilaporkan mampu mendegradasi ABS. S2 mampu tumbuh dengan cepat pada media ABS. 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 ABS dapat diubah menjadi biomassa, atau S2 menggunakan ABS sebagai sumber karbon utama. Kecepatan pembelahan sel pada konsentrasi ABS 5 mg/l adalah 13,53 jam, dengan μ sekitar 0,0512 Jam⁻¹. Kecepatan absorpsi substrat berpengaruh terhadap μ . Salah satu faktor penentu kecepatan absorpsi substrat adalah berat molekul senyawa yang diserap. Bobot molekul ABS sekitar 325 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 sel biak S2, biak tersebut dapat digunakan untuk inokulan pengolahan limbah detergen dengan ABS sebagai beban organik utama. Kemampuan S2 tumbuh pada pH 4 menguntungkan, karena apabila pH limbah turun menjadi asam, biak tersebut masih mampu tumbuh dan aktif merombak ABS secara efisien.

KESIMPULAN

Pseudomonas cepacia S2 mampu menggunakan ABS sebagai sumber karbon utama dan dapat tumbuh pada kondisi asam, sehingga biakan tersebut berpotensi untuk dapat digunakan pada UPL yang mempunyai influen ABS sebagai beban organik utama.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, G.K, T. Donnelly, and K.J. MCKeown. 1982. Identification and control of inhibition in the anaerobic treatment of industrial wastewater. *Process. Biochem.* 17 (7-8): 28.
- Bitton, G. 1983. Bacterial and biochemical test for assessing chemical toxicity in the aquatic environment. *CRC Critt. Rev. Environ. Control*: 13-51.

- Bailey, R. A.. 1989. *Chemistry of The Environment*, Academic Press, New York
- Beaubien, A. & C. Jollicouer. 1984. A flow microcolorimetry investigation, in toxicity screening procedure using bacterial system. Liu, D & B.J.Dutka (eds). The toxicity of various heavy metal salts, alcohol and surfactants to microorganism in a biodegradation processes. Marcel Dekker New York. h. 261.
- Chang, R. 1981. *Physical Chemistry with Apparatus to Biological System*. 2nd edition, McMillan, New York.
- Davis, B.D., R. Dubelco, H.N. and H.S. Ginsberg, 1990. *Microbiology*, 4th Ed. Philadelphia.
- Dunn, G.M, & A.T. Bull. 1982. Bioaccumulation of copper by a defined community of activated sludge bacteria. *Eur. J.Appl. Microbiol. Biotechnoll.* 17 : 30.
- Gledhil, W.E. 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. & V.M. Brown. 1970. Effect of toxic wastes on treatment processes and watercourse. *Water Pollut. Contr.* 99: 292.
- Kirk, R.E & D. Othmer. 1979. *Encyclopedia of chemical technology*. Vol. 3. The Interscience Encyclopedia, New York.
- Longman L, and G Frederick. 1987. *The analyses of detergent and detergent product*. John Wiley and Sons, New York.
- Maloy, S.R., J.E.J Cronan, & D. Freifelder. 1994. *Microbial genetic 2nd*. Jones and Barlett Publishers. Boston, London.
- Metlev, V.V., A.I. Kanaev and N.G. Dzasokkhova. 1983. *Water Toxicology*. A Merind, New Delhi.
- Nakase, T. Matofumi, S. Masako, T. Makiko, H. Takushi, H. & F. Sakuzo. 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, G.W., K.N.W. Rowell, C.A Foster & W.P.D. Steward. 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, S.P. 1993. *McGraw-Hill Encyclopedia of Chemistry*. 2nd edition, McGraw-Hill, New York
- Ritz H.L, B.L.B Evans, R.D Bruce, E.R Fletcher, G.L Fischer & K. Sarlo. 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.
- Tchnolobagus, G. 1990. *Wastewater Enginering Treatment, Disposal, Resuse*. McGraw-Hill, New York.