

UJI KEMAMPUAN BAKTERI TERMOFIL KOMPOS DALAM MENGURAIKAN *POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)* DAN KOPOLIMERNYA DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMER OVERLAY*

Sri Wahyono

Peneliti di Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

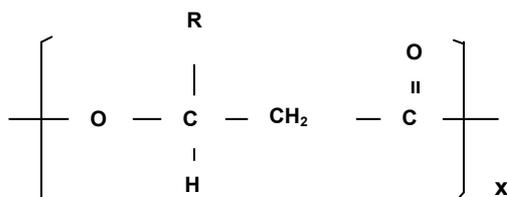
Abstract

The primary aim of this project were to isolate the thermophilic bacteria from compost and to test their capability in degrading of Poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer (P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), P(HB-co-12%HV)) using of polymer overlay methode. Testing of their capability was done in pH 8,0 and temperature of 55°C and 60°C. Fifteen isolates of thermophilic bacteria have been isolated and can be classified into 4 groups based on the profile of their growth rate, clear zone formation, and capability of PHB degradation. In the incubation of 55°C, degradation rate of Poly(3-hydroxybutyrate) was generally slower than their copolymer.

Kata kunci : PHB, kopolimer, bakteri termofil, *polymer overlay*, kompos

1. PENDAHULUAN

Poly(3-hydroxybutyrate) atau PHB adalah salah satu contoh dari *Polyhydroxyalkanoates* (PHA) yang paling populer, suatu biopoliester termoplastik yang diproduksi oleh mikroba. PHB memiliki sifat-sifat yang hampir sama dengan *polyethylene* plastik dalam hal titik lebur, kekuatan tensil, dan daya serap terhadap air. Struktur PHB dapat dilihat pada Gambar 1. PHB merupakan salah satu biopolimer yang dapat direkomendasikan sebagai pengganti plastik konvensional karena kesamaan sifat-sifatnya dan potensinya yang mudah terurai secara alami⁽²⁾. Dalam skala yang besar, PHB telah diproduksi oleh Zeneca Bio Product dengan nama dagang "Biopol". Produk tersebut adalah kopolimer dari *3-hydroxybutyrate* (HB) dan *3-hydroxyvalerate* (HV) dengan rasio yang bervariasi⁽³⁾.



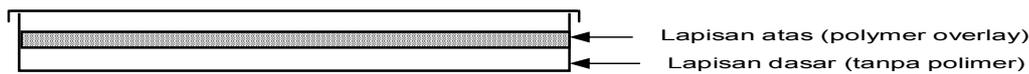
R = *methyl 3-hydroxybutyrate* (3HB)
R = *ethyl 3-hydroxyvalerate* (3HV)

Gambar 1. Struktur kimia PHB⁽¹⁾

Laju penguraian plastik bidegradable di alam didasarkan pada laju penguraiannya dalam tumpukan limbah padat yang sedang dikomposkan. Pengkomposan adalah proses penguraian materi organik menjadi produk kompos oleh mikroba secara aerobik dalam kondisi yang terkendali⁽⁴⁾. Pada tahap awal proses pengkomposan, temperatur akan naik mencapai sekitar 70°C. Pada tahap ini mikroba yang dominan hidup adalah bakteri termofil, kelompok bakteri yang hidup di atas suhu 45 °C.

Menurut literatur, di dalam fasilitas pengkomposan, kombinasi antara temperatur tinggi dan pembalikan kompos telah meningkatkan kecepatan penguraian material yang tersusun dari P(HB-co-HV), dengan kehilangan berat 80% selama 25 minggu⁽¹⁾. Sementara itu Voghtmann, *et.al.* (1995)⁽⁵⁾ telah meneliti bahwa "Biopol" dapat terurai sempurna dalam kondisi optimal pengkomposan selama 10 minggu.

Para peneliti seperti Chowdhury (1963)⁽⁶⁾, Delafield, *et al* (1965)⁽⁷⁾, Tanio, *et.al.* (1982)⁽⁸⁾ dan Mergaert, *et.al.* (1993)⁽⁹⁾ telah mencoba mengisolasi ratusan jenis bakteri pengurai PHB. Isolat tersebut sebagian besar berasal dari tanah sehingga informasi tentang karakteristik bakteri termofil kompos dalam menguraikan PHB belum banyak diketahui.



Gambar 2. Diagram teknik polymer overlay plate

Bakteri termofil kompos dapat diisolasi dari tumpukan sampah yang sedang dikomposkan pada fase aktif pengkomposan. Biasanya sebelum diisolasi, sampel bakteri ditumbuhkan dalam media pengaya cair yang menggunakan PHB sebagai sumber karbon⁽⁸⁾. Sampel kemudian dimasukkan dalam media tersebut dan diinkubasi dalam temperatur tertentu secara aerobik sampai media menjadi bening yang menandakan adanya penguraian PHB. Penguraian PHB terjadi karena di dalamnya tumbuh bakteri yang secara spesifik dapat menguraikan PHB. Sampel tersebut kemudian diencerkan dan diinokulasikan ke agar yang mengandung PHB dalam cawan petri dengan menggunakan teknik *polymer overlay*.

Yang dimaksud teknik *polymer overlay* yaitu teknik menumbuhkan bakteri dalam cawan petri yang berisi dua lapisan media padat. Lapisan atas media tersebut mengandung PHB sebagai satu-satunya sumber karbon. Sedangkan pada lapisan dasar mengandung nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri, tetapi tanpa sumber karbon⁽¹⁰⁾.

Koloni bakteri yang tumbuh dan menunjukkan adanya zona terang disekitar koloninya kemudian disubkultur dengan teknik yang sama sampai didapatkan kultur murni. Mikroorganisme mensekresikan enzim depolimerase yang dapat menghidrolisis polimer secara ekstraseluler menjadi produk yang larut dalam air sehingga tercipta zona terang disekitar koloni.

Selanjutnya, uji kemampuan bakteri dalam menguraikan PHB juga dapat dilakukan dengan teknik yang sama. Kultur murni bakteri yang berhasil diisolasi diinokulasikan ke *polymer overlay*. Laju pembentukan zona terang di sekitar koloni bakteri dapat mengindikasikan tingkat kemampuan bakteri dalam menguraikan PHB⁽¹¹⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri termofil kompos yang dapat menguraikan PHB dan melakukan uji kemampuannya dalam menguraikan PHB dan kopolimernya dengan metode *polymer overlay*.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

a. *Poly (3-hydroxybutyrate)* dan kopolimernya

Polyhydroxyalkanoates yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Poly(3-hydroxybutyrate)* atau PHB beserta tiga macam kopolimernya: *Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-5%hydroxyvalerate)* atau P(HB-co-5%HV), *Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-8%hydroxyvalerate)* atau P(HB-co-8%HV), and *Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-12%hydroxyvalerate)* atau P(HB-co-12%HV).

Serbuk PHB diperoleh dari *Aldrich Chemical Company, Inc.* dengan karakteristik sebagai berikut. Berat molekulnya adalah 8.0×10^5 g/mol (menurut produsernya), $2,5 \times 10^5$ g/mol (menurut pengukuran viscositas intrinsik), dan $8,7 \times 10^5$ g/mol (sesuai pengukuran *light scattering*). Ukuran partikelnya adalah 1 μ m (menurut *scanning electron microscopy*), sedangkan area permukaannya adalah 4.6 m²/g (menurut absorpsi nitrogen) dan 4.8 m²/g (menurut perhitungan ukuran partikel) (Augusta, *et.al.* 1993).

P(HB-co-5%HV) berasal dari Aldrich Lot DR. 01214 MF, P(HB-co-8%HV) dari Aldrich Lot MQ 19102 DF, and P(HB-co-12%HV) dari Aldrich PQ 09717 BF secara berurutan masing-masing mengandung 5%, 8%, and 12% *polyhydroxyvalerate*.

b. Sampel Kompos

Penelitian ini menggunakan sampel kompos sebagai sumber bakteri termofil. Sampel kompos didapatkan dari fasilitas pengkomposan *Lucas Heights*, Negara Bagian New South Wales, Australia. Bahan baku kompos yang digunakan oleh fasilitas tersebut berasal dari limbah padat organik seperti sampah daun, rumput-rumputan, dan sebagainya. Sistem pengkomposan yang dilakukan adalah dengan metode *open windrow*. Sampel kompos diambil pada kedalaman tumpukan kompos 0,5 meter yang memiliki temperatur 50°C sampai 60°C.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Thermus Media D (TMD) yang telah dimodifikasi. Sumber karbon (ekstrak ragi dan pepton) di dalam media TMD diganti dengan PHB dan kopolimernya (P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), dan P(HB-co-12%HV)) sebagai satu-satunya sumber karbon. Larutan garamnya tidak diubah. Keasaman media (pH 8,0) dijaga dengan menggunakan sistem bufer 0,2 M K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 .

2.2 Peralatan

Untuk menginkubasi bakteri termofil digunakan inkubator *Gallenkamp Incubator Plus Series*. Alat-alat lain yang dipakai adalah *Centrifuge* (model J-21B), timbangan analitik (Sartorius), pH meter digital, *Vortexer*, *Waterbath*, *Autoclave*, *Sonifier Cell Desruptor* (B-36), dsb.

2.3 Metode Penelitian

a. Preparasi Media TMD

Dalam pembuatan media TMD digunakan air *reverse osmosis* (RO) dan disterilisasi pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit dengan menggunakan *autoclave*. Media TMD dibuat dari tiga larutan. Larutan pertama mengandung *Nitriloacetic acid*, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, KNO_3 , $NaNO_3$, dan $NaHPO_4$. Larutan kedua mengandung $FeCl_3$, sedangkan larutan ketiga mengandung H_2SO_4 , $MnSO_4$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, H_3BO_4 , $CuSO_4$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ dan $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Untuk membuat 1 L media TMD diperlukan 100 mL larutan pertama, 10 mL larutan kedua, dan 10 mL larutan ketiga. Sumber karbon media ini digantikan dengan PHB. Keasaman media dijaga pada pH 8,0 dengan menggunakan sistem bufer 0,2 M K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 . Bufer dan larutan media disterilisasi secara terpisah.

Media TMD digunakan sebagai media pengkayaan bakteri dan sebagai media yang digunakan dalam *polymer overlay plate*. Sumber karbon (ekstrak ragi dan pepton) di dalam media TMD diganti dengan PHB atau kopolimernya (P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), dan P(HB-co-12%HV)) sebagai satu-satunya sumber karbon. Dalam media pengkayaan bakteri, media TMD tidak dipadatkan, akan tetapi dalam *polymer overlay plate* media dipadatkan dengan agar.

Dalam pembuatan *polymer overlay plate*, lapisan dasar media dalam cawan petri tidak ditambahkan senyawa yang berfungsi sebagai sumber karbon. Sebaliknya pada media yang berada di lapisan atasnya ditambahkan PHB atau kopolimernya sebagai satu-satunya sumber karbon. Dalam proses isolasi dan purifikasi bakteri digunakan *polymer overlay* yang mengandung PHB sedangkan dalam uji penguraian selain digunakan PHB juga digunakan kopolimer PHB seperti P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), atau P(HB-co-12%HV) sebagai satu-satunya sumber karbon.

b. Preparasi Sampel Kompos

Sebelum digunakan sebagai inokulan, sampel kompos (yang diambil pada fase termofil) disaring dengan ayakan yang berukuran 250 μm sieve.

c. Pengkayaan Bakteri

Sebanyak 6 *baffled flask* berukuran 250 ml diisi dengan media TMD cair (pH 8,0) masing-masing sebanyak 50 mL. Kedalam masing-masing *flask* ditambahkan serbuk PHB (sebagai satu-satunya sumber karbon) yang telah disonikasi sebanyak 0,2 gram. Selain itu, kedalam keenam *flask* tersebut juga ditambahkan 0,25 gram kompos sebagai inokulum. Seluruh *flask* kemudian diinkubasi di dalam *waterbath* goyang dengan temperatur $55^\circ C$ selama 10 hari. Sejumlah sampel diambil setiap dua hari untuk diisolasi mikrobanya.

d. Isolasi dan Purifikasi Bakteri Termofil

Sebanyak 0.1 mL sampel pengkayaan bakteri dari hari ke-2, 4, 6, 8, and 10 secara aseptik diinokulasikan ke dalam *polymer overlay plate* yang mengandung PHB (pH 8.0). Kemudian sampel-sampel tersebut diinkubasi pada suhu $55^\circ C$ dalam kondisi aerobik. Koloni bakteri yang tumbuh dan menunjuk adanya zona terang disekitar koloninya kemudian dimurnikan dengan serangkaian subkultur. Bakteri yang dapat menguraikan PHB diidentifikasi berdasarkan pembentukan zona terang disekitar koloninya.

e. Uji Penguraian Polimer PHA

Kultur murni bakteri yang terisolasi kemudian diuji kemampuannya dalam menguraikan PHB dan kopolimernya yakni P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), dan P(HB-

co-12%HV) menggunakan metode *polymer overlay*. *Polymer overlay* yang telah disiapkan diinokulasi dengan kultur bakteri yang berumur 48 jam dengan menggunakan jarum ditengah-tengah cawan petri. Hal itu dikerjakan berdasarkan metode *plate puncture technique*⁽¹⁰⁾.

Lapisan dasar dan atas media memiliki pH 8.0 dijaga dengan menggunakan 0.2 M *potassium phosphate buffer*. Lapisan dasar media tidak mengandung sumber karbon. Sedangkan lapisan atasnya mengandung 0.20-0.25% w/v PHB, P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), atau P(HB-co-12%HV) sebagai satu-satunya sumber karbon. Setiap cawan diinokulasi dengan kultur bakteri pada bagian tengahnya dan kemudian diinkubasi pada suhu 55° dan 60°C. Diameter koloni dan zona terang diukur sampai milimeter terdekat setiap harinya. Tingkat penguraian diekspresikan sebagai berkurangnya berat polimer terhadap waktu dan dihitung berdasarkan rumus berikut ini⁽¹²⁾:

Polimer terurai = (area zona terang x berat total polymer lapisan atas)/area total cawan petri

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji Performansi Teknik *Polymer Overlay*

Sebelum melakukan penelitian biodegradasi PHB dan kopolimernya, metode *polymer overlay* terlebih dahulu diuji performansinya ketika diekspos dalam suhu tinggi. Dalam uji tersebut, lapisan dasar maupun lapisan atasnya dipadatkan dengan agar-agar dengan konsentrasi 1,5%, 2,0% dan 2,5% w/v.

Polymer overlay yang dipadatkan dengan 1,5% dan 2,0% w/v agar-agar umumnya mencair ketika diinkubasikan pada suhu 55°C and 60°C selama 24 jam. Sedangkan *polymer overlay* yang dipadatkan dengan 2,5% w/v agar-agar tetap padat dan tidak meleleh ketika diinkubasi pada suhu 55°C and 60°C.

Pada tahap awal, kondensasi dalam media relatif kecil, pada tahap selanjutnya kondensasi tersebut menghilang. Tidak terlihat indikasi adanya perubahan warna dan transparansi lapisan atas yang mengandung PHB atau kopolimernya. Dengan demikian metode *polymer overlay plate* yang dipadatkan dengan 2,5% agar-agar memiliki performansi yang baik untuk digunakan lebih lanjut dalam penelitian ini.

Jackson (1998)⁽¹³⁾ juga melaporkan bahwa *polymer overlay plate* masih memiliki performansi yang baik ketika diekspos pada temperatur 55°C dan pH 8.5 dengan menggunakan bahan pematat 1.1% phytoigel dan 0.1% kalsium klorida. Efek pengeringan pada inkubasi suhu tinggi dapat dihindari dengan melapisinya dengan *selotype*.

3.2 Uji Penguraian dengan Metode *Polymer Overlay*

Sampel pengkayaan bakteri yang telah diinkubasi selama 2, 4, 6, 8, dan 10 hari telah digunakan sebagai sumber bakteri termofilik penpenguraian PHB. Sampel tersebut diinokulasikan ke dalam *polymer overlay* yang berisi media TMD yang mengandung PHB dan kemudian diinkubasi pada suhu 55°C.

Koloni bakteri yang tumbuh dan memiliki kemampuan membuat zona terang telah berhasil diisolasi dari sampel hari 2, 8, dan 10. Tiga isolat (d2-A, d2-B, and d2-C) diisolasi dari sampel hari kedua, lima isolat (d8-AI yellow, d8-AII yellow, d8-AII cream, d8-BI, dan d8-BII) dari hari kedelapan dan tujuh isolat (d10-AI, d10-AII, d10-BI, d10-BII, d10-BI10⁴, d10-BII10⁴, d10-B10⁵) dari hari kesepuluh. Bakteri penpenguraian PHB dari sampel hari keempat dan keenam tidak berhasil diisolasi ketika disubkultur.

Isolat d2-A, d2-B dan d2-C membentuk zona terang setelah 2 hari masa inkubasi, sementara yang lainnya membentuk zona terang segera setelah dia tumbuh. Keberadaan karbon, seperti *hydroxybutyric acid* (HBA), mungkin merepresi sekeresi enzim depolimerase isolat d2-A, d2-B and d2-C. Telah diketahui bahwa isolat-isolat tersebut berasal dari sampel hari kedua dimana HBA mungkin masih berada dalam konsentrasi yang relatif tinggi. Adanya karbon bebas pada saat itu mungkin mengakibatkan tidak terstimulasinya isolat untuk mensekresikan depolimerase. Di lain pihak, isolat dari sampel hari kedelapan dan sepuluh telah teradaptasi untuk mensekresikan depolimerasi karena karbon bebas telah habis terpakai sehingga depolimerase terekspresikan⁽¹⁰⁾.

Kelima belas kultur murni isolat bakteri termofil penguraian PHB kemudian dikultur dan diuji kemampuannya dalam menguraikan PHB dan kopolimernya dengan menggunakan metode *polymer overlay* pada suhu 55°C dan 60°C. Cara pengujian yang digunakan yaitu teknik *plate puncture* semi kuantitatif seperti yang dilakukan oleh Augusta *et.al.* (1993)⁽¹⁰⁾.

Pertumbuhan isolat pada suhu inkubasi

55°C secara umum baik. Zona terang isolat d2-A, d2-B, and d2-C muncul setelah 48 atau 72 jam masa inkubasi, sedangkan yang lainnya muncul segera setelah inokulasi. Pembentukan zona terang secara umum meningkat secara eksponensial setelah 96 jam masa inkubasi. Hampir semua isolat masih memperlihatkan pembentukan zona terang walaupun mereka telah memasuki laju pertumbuhan stasioner. Isolat d2-A, d2-B, dan d2-C mungkin memakai HBA sebagai sumber karbon dari medium pada masa-masa awal inkubasi dan ketika HBA berkurang, ekspresi enzim depolimerase teraktivasi. HBA adalah karbon organik sederhana yang dapat secara langsung dikonsumsi oleh bakteri. Keberadaan HBA mungkin disebabkan oleh penguraian hidrolitik PHB pada saat sterilisasi⁽¹⁰⁾.

Sejalan dengan penggunaan HBA, bakteri yang diuji mungkin mensekresikan enzim depolimerase dan kemudian terjadi pembentukan zona terang. Terbentuknya zona terang mengindikasikan adanya penguraian polimer PHB atau kopolimernya. Zona terang terjadi karena adanya pemotongan rantai polimer yang tak larut oleh enzim depolimerase di sekitar koloni menjadi molekul yang larut dalam air⁽¹⁰⁾.

Jumlah PHB yang terurai oleh bakteri termofil setelah 9 hari masa inkubasi pada suhu 55°C dapat dilihat pada Tabel 1. Secara umum, penguraian PHB lebih rendah daripada penguraian kopolimernya. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Doi, *et.al.* (1990)⁽¹⁴⁾ dengan penguraian oleh *A. faecalis*.

Laju pembentukan zona terang atau laju penguraian PHB adalah fungsi dari empat faktor seperti laju pertumbuhan bakteri, sekresi enzim, aktivitas enzim, dan difusi enzim ke media agar⁽¹³⁾. Sifat fisika kimia polimer juga mempengaruhi proses penguraian, seperti komposisi monomer, kristalinitas, dan strukturnya^(15,16). Konsentrasi agar-agar juga diduga dapat membatasi proses penguraian ketika jumlahnya lebih dari 3% w/v⁽¹⁰⁾.

Sementara itu, pertumbuhan isolat yang diinkubasi pada suhu 60°C tidak terlihat baik. Setelah masa inkubasi 64 jam, seluruh isolat yang diuji umumnya tidak menunjukkan adanya pertumbuhan. Pembentukan zona terang juga berhenti setelah 96 sampai 144 jam masa inkubasi. Area koloni umumnya lebih kecil dari 1 mm². Pertumbuhan isolat yang terhambat pada suhu 60°C mungkin disebabkan karena kultur tersebut belum teradaptasi dalam suhu tersebut. Kultur

tersebut sebelumnya diadaptasikan dalam suhu 55°C.



Gambar 3. Formasi zona terang mengelilingi koloni yang tumbuh dalam media TMD yang mengandung PHB dan kopolimernya

Selama inkubasi pada suhu 55°C dan 60°C, media pada cawan petri yang tidak diinokulasi tidak memperlihatkan perubahan. Hal ini mengindikasikan bahwa penguraian hidrolitik tidak berlangsung baik. Formasi zona terang dapat dilihat pada Gambar 3.

3.4 Pengelompokan Bakteri Termofil Pengurai PHB dan Kopolimernya

Seperti telah disebutkan di atas, kelima belas bakteri termofil telah dikultur dan diuji kemampuannya dalam menguraikan PHB dan kopolimernya dengan menggunakan metode *polymer overlay*. Berdasarkan pada pola pertumbuhan, pembentukan zona terang, dan penguraian polimer pada suhu inkubasi 55°C, isolat-isolat tersebut untuk sementara dapat dikelompokkan menjadi empat grup.

Grup I

Grup I terdiri atas isolat: d8-AI yellow, d8-AII yellow, d8-AII cream, d8-BI, and d8-BII. Pertumbuhan isolat-isolat tersebut pada media yang mengandung PHB dan kopolimernya meningkat secara signifikan selama masa inkubasi 4 hari ditunjukkan dengan meningkatnya pembentukan zona terang. Namun setelah itu, laju pertumbuhannya menurun dan pada saat setelah masa inkubasi 7 sampai 9 hari pertumbuhannya mencapai masa stasioner. Menurunnya laju pertumbuhan mungkin disebabkan oleh keterbatasan kandungan nutrisi di medium. Dibandingkan dengan grup yang lain, pertumbuhan isolat grup I relatif lebih tinggi.

Isolat grup I memperlihatkan meningkatnya pembentukan zona terang dalam 10 hari masa inkubasi. Meskipun pertumbuhan mereka telah mencapai fase stasioner setelah hari ketujuh atau kesembilan, pembentukan zona terang masih terus meningkat. Hal ini mengindikasikan bahwa koloni isolat masih aktif mensekresikan enzim depolimerase. Rentang pembentukan zona terang secara umum lebih tinggi dari grup lainnya. Pola penguraian polimer dapat dilihat pada gambar di Lampiran 1.

Grup II

Grup II meliputi isolat: d10-AI, d10-AII, d10-BI, and d10-BII⁵. Pertumbuhan isolat grup ini secara signifikan meningkat dalam masa 3 hari inkubasi dan kemudian secara gradual menurun. Setelah masa inkubasi 7 atau 8 hari, mereka mencapai fase stasioner pertumbuhan. Pola pertumbuhannya sama dengan grup I, tetapi laju pertumbuhannya sekitar sepuluh kali lebih lambat.

Pola penguraian polimer grup II dapat dilihat pada gambar di Lampiran 2. Pola tersebut sama dengan pola pembentukan zona terang karena pola penguraian polimernya adalah fungsi dari pembentukan zona terang.

Grup III

Grup III meliputi isolat: d10-BII, d10-BII⁴ and d10-BII⁴. Pertumbuhan dan pembentukan zona terang anggota grup III memiliki pola yang mirip. Isolat-isolat tersebut mungkin merupakan satu spesies.

Pembentukan zona terang secara eksponensial meningkat selama masa inkubasi bahkan pada saat fase stasioner yang umumnya dimulai setelah hari kelima. Dibandingkan dengan grup II, koloni dan pembentukan zona terang grup III secara umum lebih lambat. Pola penguraian polimer grup III dapat dilihat pada gambar di Lampiran 3.

Grup IV

Grup IV meliputi isolat: d2-A, d2-B, and d2-C. Grup ini memperlihatkan pola pertumbuhan, pembentukan zona terang, dan penguraian polimer yang berbeda dengan grup lainnya. Sebagai contoh pertumbuhan koloni dan pembentukan zona terang isolat tersebut ketika ditumbuhkan dalam medium yang mengandung PHB memperlihatkan perbedaan yang kecil, dengan pembentukan

zona terang yang sama dengan ukuran koloni. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut mungkin hanya mensekresikan sejumlah kecil depolimerase selama pertumbuhannya. Terlihat jelas, ketika isolat yang sama ditumbuhkan dalam media TMD yang mengandung kopolimer PHB, perbedaan pertumbuhan dan pembentukan zona terang dapat dilihat secara nyata.

Pola pertumbuhan isolat grup IV relatif sama ketika ditumbuhkan di dalam media yang mengandung kopolimer PHB, meskipun demikian pembentukan zona terangnya bervariasi. Hal itu mengindikasikan bahwa kapabilitas masing-masing isolat dalam memproduksi depolimerase sedikit berbeda. Dibandingkan dengan grup yang lain, pembentukan zona terang atau laju penguraian grup ini umumnya lebih rendah dari grup III, II dan I. Pola penguraian polimernya dapat dilihat pada gambar di lampiran 4.

Berdasarkan karakter dari masing-masing grup tersebut, kemungkinan besar bakteri yang berhasil diisolasi tersebut berasal dari lebih dari satu spesies. Identifikasi dan karakterisasi isolat bakteri perlu dilanjutkan dalam penelitian ini.

Wahyono (2002)⁽¹⁷⁾ telah meneliti populasi bakteri yang berasal dari kompos yang adaptif terhadap PHB berdasarkan homologi gen 16S rRNA. Bakteri-bakteri yang berhasil diisolasi antara lain *Xanthomonas cynarae* (homologi 96%), *Xilella fastidiosa* (homologi 96%), *Xilella campestris* (homologi 95%), Dehydrobiotic acid degrading bacteria (homologi 98%), *Leptothrix* sp. MBIC 3364 (homologi 95%) dan *Rubrivivax gelatinosus* (homologi 95%).

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Metode *polymer overlay* dan *plate puncture* yang dipakai oleh Augusta *et.al.* (1983) dapat dimodifikasi untuk pendeteksian, pengisolasian dan pengidentifikasian bakteri termofil yang dapat menguraikan PHB dan kopolimernya (P(HB-co-5%HV), P(HB-co-8%HV), P(HB-co-12%HV)) dalam kondisi basa (pH 8.0) dan temperatur tinggi (55°C and 60°C). Metode tersebut dapat pula diadaptasikan untuk memonitor secara semikuantitatif aktivitas enzim depolimerase dan menginvestigasi faktor-faktor lain yang mempengaruhi laju penguraian polimer.

Table 1. Performansi isolat setelah 9 hari masa inkubasi, ditumbuhkan dalam media TMD (modifikasi) yang mengandung PHB dan kopolimernya pada pH 8,0 dan suhu inkubasi 55°C.

Isolat	Luas Koloni (mm ²)				Luas Zona Terang (mm ²)				Biopenguraian (mg)			
	PHB	P(HB-co-5%HV)	P(HB-co-8%HV)	P(HB-co-12%HV)	PHB	P(HB-co-5%HV)	P(HB-co-8%HV)	P(HB-co-12%HV)	PHB	P(H-co5%HV)	P(HB-co-8%HV)	P(HB-co-12%HV)
Grup I												
d8-AI yellow	284	177	416	95	963	1195	1663	1195	6.33	7.35	11.0	7.91
d8-AII yellow	201	201	177	154	1076	1321	1321	1135	7.07	8.12	8.74	8.20
d8-AIII cream	154	154	78	176	856	1076	1257	805	5.66	6.61	8.32	5.82
d8-BI	347	95	255	1453	1135	963	1521	1453	7.48	6.36	10.10	9.62
d8-BII	347	201	573	177	1257	856	1663	1257	7.09	5.66	11.00	8.32
Grup II												
d10-AI	20	13	20	13	573	856	908	1018	3.77	5.66	6.01	6.74
d10-AII	39	13	20	64	661	755	908	963	4.35	4.99	6.01	6.37
d10-BI	27	20	20	29	573	755	963	707	3.79	4.64	6.37	5.11
d10-B10 ⁵	79	-	95	50	707	-	1076	963	4.65	-	7.12	6.96
Grup III												
d10-BII	13	13	28	13	491	616	707	661	3.23	3.79	4.68	4.78
d10-BI10 ⁴	20	20	20	13	573	616	707	755	3.77	4.07	4.68	5.00
d10-BII10 ⁴	13	27	20	13	491	616	707	755	3.23	3.79	4.68	5.46
Grup IV												
d2-A	50	113	113	113	133	573	453	416	0.88	3.52	2.99	3.00
d2-B	39	79	95	113	95	805	755	531	0.63	4.95	5.00	3.84
d2-C	64	113	113	79	177	963	755	707	1.17	5.92	5.00	5.11

Lima belas isolat bakteri termofil pengurai PHB telah diisolasi dari sampel kompos. Bakteri-bakteri tersebut untuk sementara dapat digolongkan menjadi 4 grup sesuai dengan profil laju pertumbuhan, pembentukan zona terang, dan kapabilitasnya dalam menpenguraian PHA. Anggota dari grup I adalah d8-AI yellow, d8-AII yellow, d8-AII cream, d8-BI, dan d8-BII isolat. Anggota grup II adalah d10-AI, d10-AII, d10-BI, dan d10-B10⁵ isolat. Anggota dari grup III adalah d10-BII, d10-BI10⁴ dan d10-BII10⁴. Sedangkan anggota dari grup IV adalah d2-A, d2-B, dan d2-C isolat.

Dalam inkubasi pada suhu 55°C, laju penguraian PHB secara umum lebih rendah dari laju penguraian kopolimernya. Laju penguraian kopolimer bervariasi tergantung dari isolat yang diuji. Laju penguraian PHB dan kopolimernya merupakan fungsi dari empat faktor, seperti laju pertumbuhan bakteri, sekresi enzim, aktivitas enzim dan difusi enzim ke dalam media agar. Sifat-sifat fisika-kimia polimer juga mempengaruhi biodegradabilitasnya, seperti komposisi monomerik, kristalinitas, dan strukturnya.

Sementara itu pertumbuhan isolat pada inkubasi suhu 60°C tidak baik. Setelah 4 atau 6 hari masa inkubasi, pertumbuhan dan pembentukan zona terang berhenti. Hal ini mungkin disebabkan karena isolat-isolat tersebut tidak teradaptasikan pada temperatur tersebut. Profil laju pertumbuhan, pembentukan zona terang, dan kapabilitasnya dalam menpenguraian PHA sulit diprediksikan.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, serangkaian penelitian lanjutan masih perlu dilakukan. Bakteri termofilik pengurai PHB yang telah terisolasi masih perlu diidentifikasi sehingga dapat diketahui jenis spesiesnya.

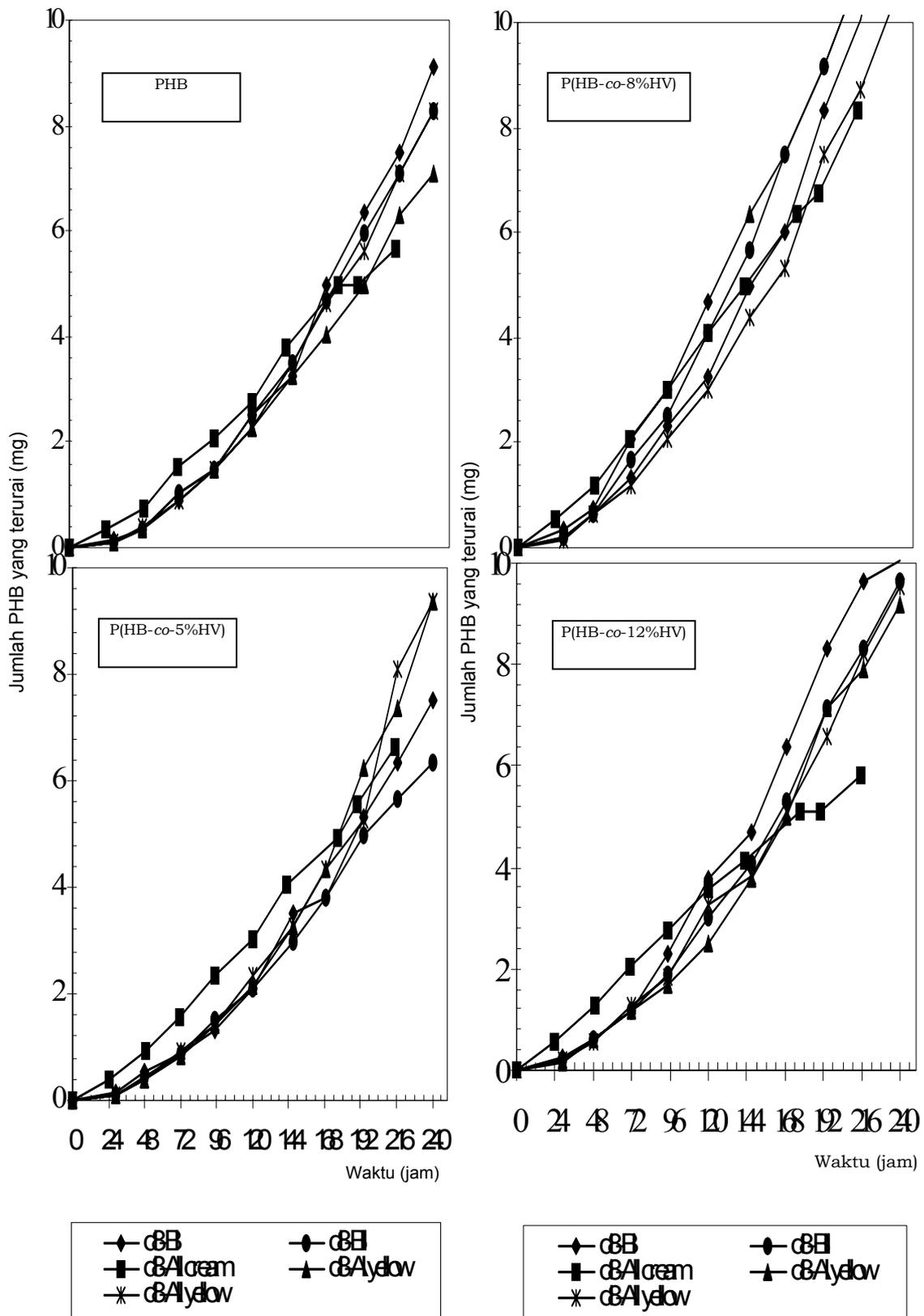
Karakterisasi enzim depolimerase yang disekresikan juga diperlukan dalam rangka untuk menentukan kondisi optimum aktivitas enzim dan kinetiknya.

Sementara itu, kemampuan isolat bakteri termofil dalam menpenguraian PHA_{MCL}, seperti *polyhydroxyoktanoat*, masih harus dilakukan dalam upaya mendapatkan informasi tentang sekresi enzim PHA depolimerase yang lainnya.

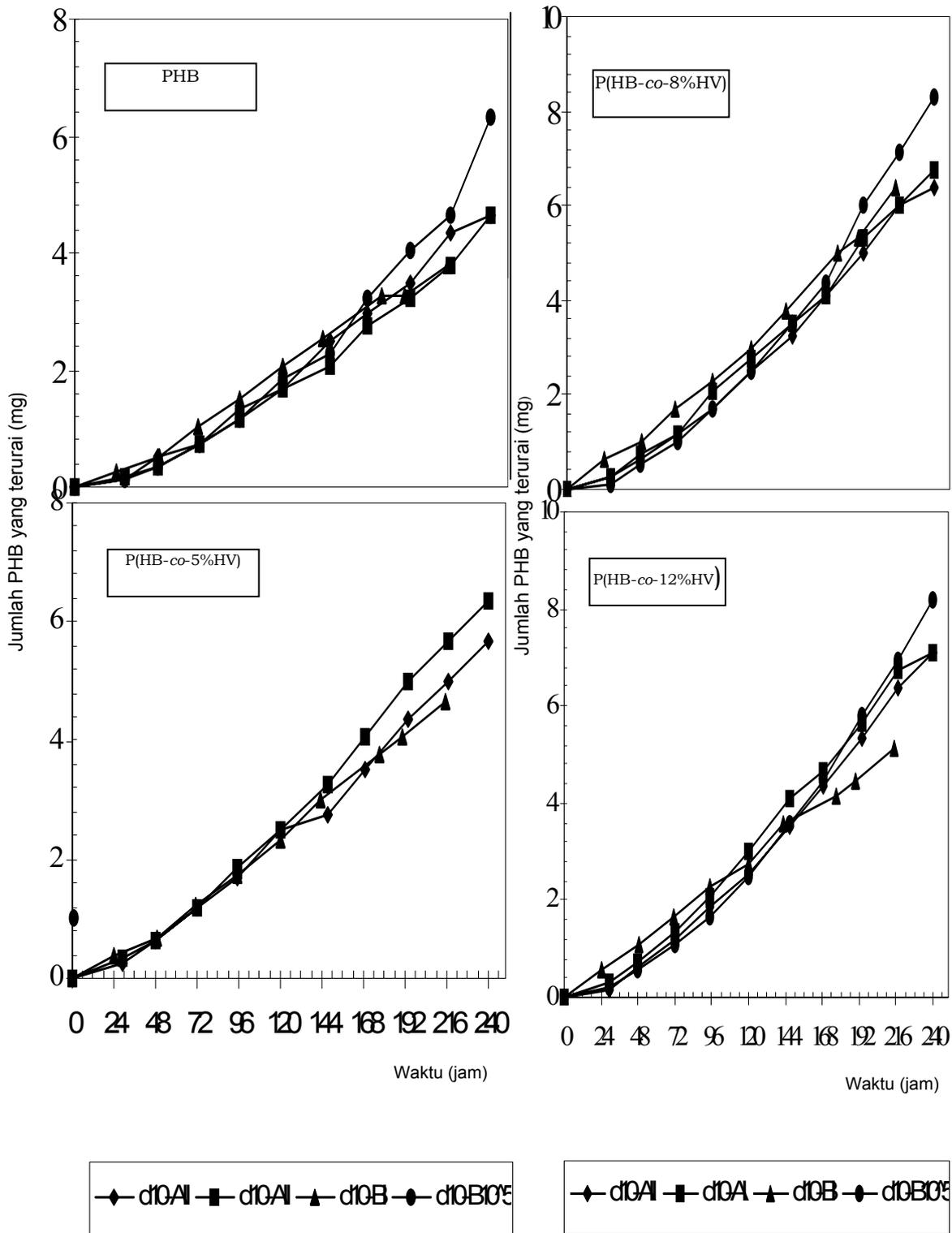
DAFTAR PUSTAKA

1. Poirier, Y., Nawrath, C., dan Somerville, C., (1995), Production polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plants, *Bio/Technology*, 13:142-150
2. Lee, S.Y., (1996), Plastics bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate producing in bacteria. *TIBTECH*, 14: 431-458.
3. Brandl, H., Aeberli, B., Bachoven, R., Schwegler, I., Muller, H.M., Burger, M.H., Hoffman, T., Lengweiler, U.D., dan Seebach, D., 1995. Biodegradation of cyclic and substituted linier oligomers of poly(3-hydroxybutyrate), *Can. J. Microbiol.*, 41(Suppl.1):180-186
4. Golueke, C.G., (1977), Biological reclamation of solid wastes, Rodale Press, Emmaus, USA
5. Voghtmann, H. (1995). The influence of biodegradable plastics on the quality of biogenics waste compost, In *Composting biodegradable plastics*, *Biocycle* November:80
6. Chowdhury, A.A., (1963), Poly-□-hydroxybuttersaure abbaunde Bacterien und exoenzyme, *Arch. Mikrobiol.* 90: 1455-1466
7. Delafied, F.P., Doudoroff, M., Palleoni, N.J., Lusti, C.J., and Contopoulos, R., 1965, Decomposition of poly-□-hydroxybutyrate by Pseudomonads. *J. Bacteriol.* 90(5): 1455-1466
8. Tanio, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Kaiho, T., and Masamune, S., (1982), An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *Eur. J. Biochem.*, 124:71-77
9. Mergaert, J., Wouters, A., Anderson, C., and Swings, J., (1995). In situ degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in natural waters, *Can. J. Microbiol.*, 41(suppl.1):154-159
10. Augusta, J., Muller, R.J., dan Widdecke, H., (1993), A rapid evaluation plate test for the biodegradability of plastics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:673-678.
11. Muller, R.J., Augusta, J., Walter, T., and Widdecke, H., (1994), The development and modification of some special test methods and the progress in standardisation of test methods in Germany, In *Biodegradable Plastics and polymers, studies in polymer science 12*, Doi, Y., and Fukada, K. (ed). Elsevier.

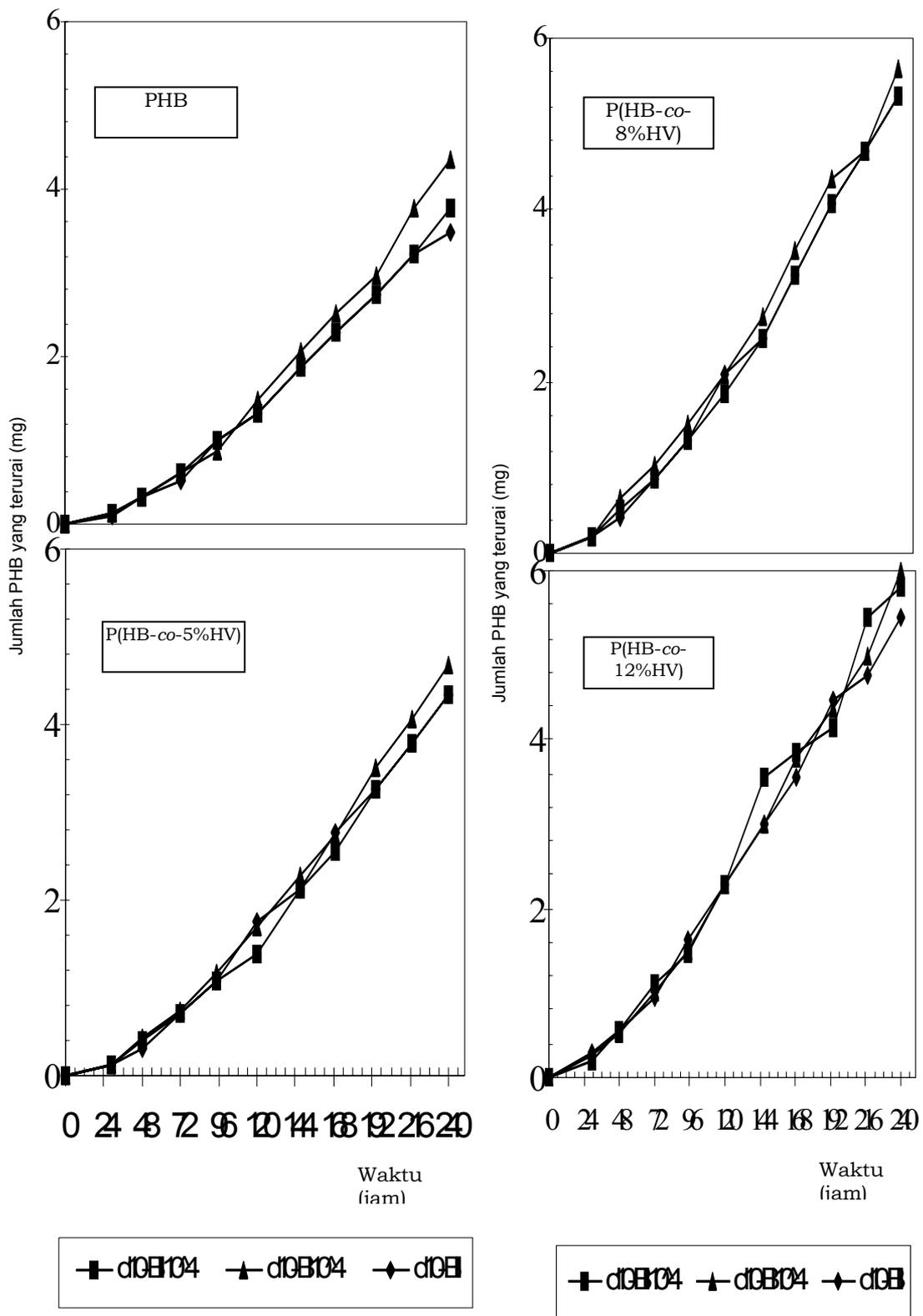
- Amsterdam pp. 120-135.
12. Foster, L.J.R., Zervas, S.J., Lenz, R.W., and Fuller, R.C., (1995), The biodegradation of poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs, with long alkyl substituents by *Pseudomonas maculicola*, *Biodegradation*, 6:67-73
 13. Jackson, F.S., (1998), Can bacteria from extreme environments degrades polyhydroxyalkanoates? Thesis Honours, Biotechnology Department, UNSW
 14. Doi, Y., (1990), Microbial polyester. Elsevier. Amsterdam, pp. 120-135
 15. Jendrossek, D., Schirmer, A., dan Schlegel, H.G., (1996), Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids, *App. Microbiol. Biotechnol.* 46:451-463
 16. Yamada, K., Mukai, K., and Doi, Y., (1993), Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas pickettii*, *Int. J. Macromol.*, 15: 215-220
 17. Wahyono, S., (2002). Degradasi Poly(3-Hydroxybutyrate) Oleh Bakteri Termofil Kompos, *Jurnal Teknologi Lingkungan*.



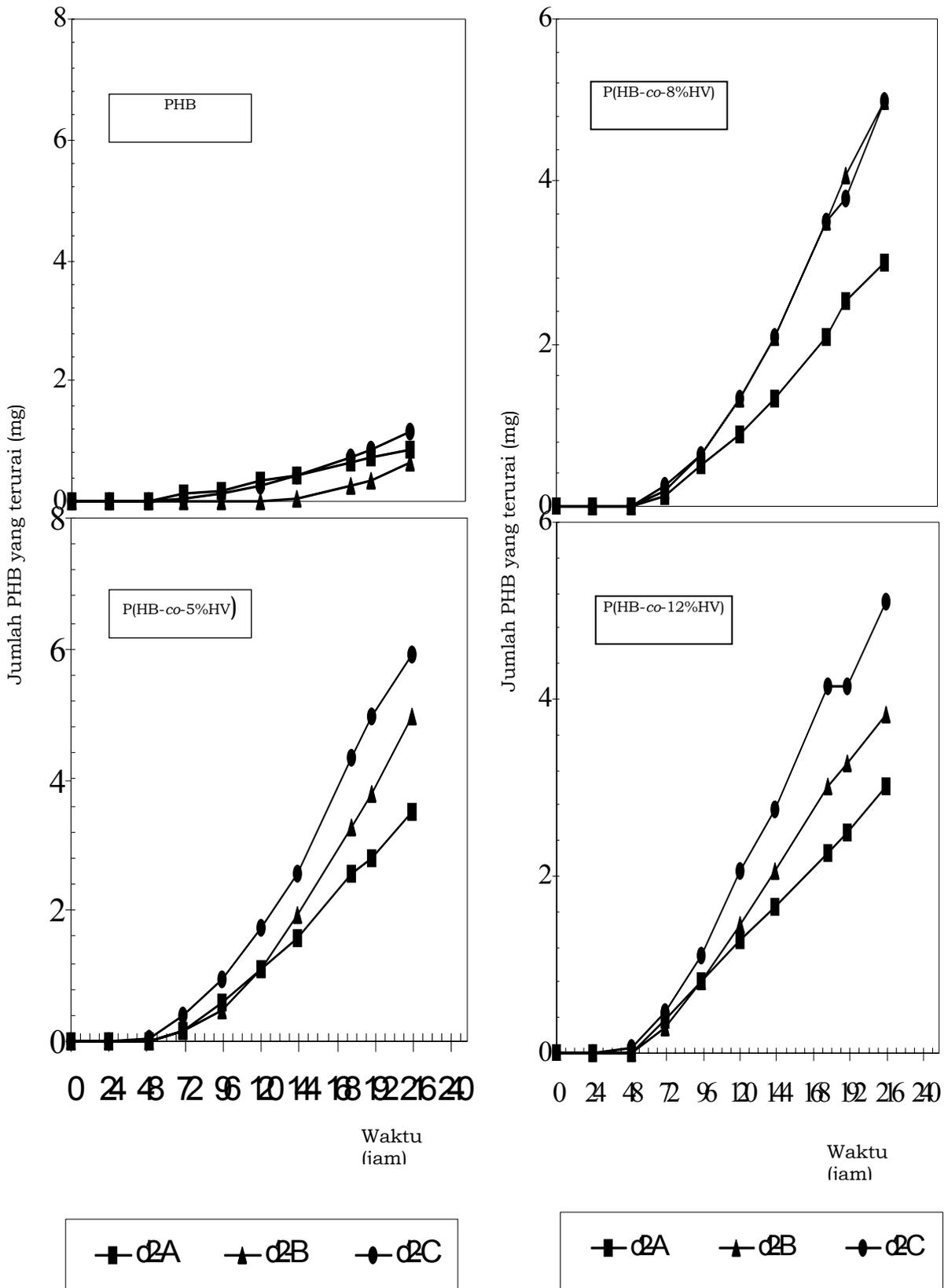
Lampiran 1. Profil penguraian PHB dan kopolimernya oleh Group I dalam media TMD (pH 8.0) diinkubasikan pada suhu 55°C.



Lampiran 2. Profil penguraian PHB dan kopolimernya oleh Group II dalam media TMD (pH 8.0) diinkubasikan pada suhu 55°C.



Lampiran 3. Profil penguraian PHB dan kopolimernya oleh Group III dalam media TMD (pH = 8.0) diinkubasikan pada suhu 55°C.



Lampiran 4. Profil penguraian PHB dan kopolimerinya oleh Group I dalam media TMD (pH 8.0) diinkubasikan pada suhu 55°C.