

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Surfaktan merupakan kelompok bahan aktif yang dipakai dalam sabun dan deterjen. Surfaktan diketahui memiliki kemampuan untuk memisahkan bahan berminyak dari media tertentu karena dapat meningkatkan kelarutan dalam air dari *Non-Aqueous Phase Liquids* (NAPLS) dengan mengurangi tegangan permukaan air atau minyak (Yin *et al.*, 2009). Peningkatan penggunaan surfaktan pada berbagai bidang untuk aplikasi industri, pertanian, makanan, kosmetik, dan farmasi yang tidak diimbangi dengan jumlah ketersediaan industri surfaktan di Indonesia telah menjadi permasalahan baru. Berdasarkan data dari Pusat Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Indonesia membutuhkan surfaktan sekitar 95.000 ton per tahun sementara kapasitas produksi dalam negeri hanya sekitar 55.000 ton per tahun sehingga sebanyak 44.500 ton surfaktan masih diimpor yang disintesis dari Petroleum dan bahan kimia lainnya (Makkar and Rockne, 2003; Furi dan Coniwanti, 2012). Bahan-bahan tersebut memiliki sifat tidak ramah lingkungan dan toksik sehingga dapat menyebabkan pencemaran lingkungan karena sulit didegradasi oleh mikroorganisme (Makkar dan Rockne, 2003; Fakruddin, 2012). Oleh sebab itu, diperlukan surfaktan yang ramah lingkungan, seperti biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroorganisme.

Biosurfaktan dapat diaplikasikan pada berbagai bidang, seperti bidang pertanian, industri, makanan, farmasi, kosmetik, perminyakan, bahkan dapat bertindak sebagai agen biokontrol vektor *Aedes aegypti* dan agen biologis untuk remediasi di lokasi yang tercemar minyak dan logam berat (Qiao and Shao, 2010; Nwaguma *et al.*, 2016; Gomaa and El-Meihy, 2019; Pele *et al.*, 2019). Biosurfaktan memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan surfaktan kimia, seperti toksisitas yang lebih rendah, biodegradabilitas yang lebih tinggi, tidak mencemari lingkungan, selektivitas yang lebih besar dan lebih spesifik (Chaves dan Guimarães, 2018; De Almeida *et al.*, 2016; Montiel *et al.*, 2009). Selain itu, biosurfaktan bersifat stabil dan efisien dalam kondisi suhu, pH, dan salinitas ekstrim yang biasa ditemui di industri perminyakan (Silva *et al.*, 2014). Biosurfaktan secara efektif juga dapat mereduksi tegangan permukaan (ST) dan tegangan antarmuka (IT), serta sebagai agen pembusa dan pengemulsi yang sangat baik yang banyak digunakan di banyak sektor industri (Jacques, 2011; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011; Mulligan *et al.*, 2014). Tidak hanya itu, biosurfaktan juga dapat diproduksi dari bahan baku yang sangat murah dan tersedia dalam jumlah banyak. Sumber karbon dapat berasal dari hidrokarbon, karbohidrat atau lipid, yang dapat digunakan secara terpisah atau dalam kombinasi satu sama lain (Kosaric, 2001).

Kelas utama biosurfaktan adalah glikolipid, fosfolipid, biosurfaktan polimer, dan lipopeptida. Salah satu genus mikroba yang dapat menghasilkan biosurfaktan adalah Genus *Bacillus*. *Bacillus* diketahui berkemampuan dalam mensintesis biosurfaktan jenis lipopeptida, seperti surfaktin, iturin, dan fengisin

(Mongkolthanaruk, 2012). Surfaktin terdiri dari 7 asam amino (L -leusin, D -leusin, L -asam aspartat, L -valine, D -leusin, L -leusin, dan L -asam glutamat) yang terikat pada gugus karboksil dan hidroksil pada atom karbon asam lemak nomor 12-16. Surfaktin disintesis melalui mekanisme kompleks yang dikatalisis oleh Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS), yang dikodekan oleh operon *srfA*. Surfaktin memiliki aktivitas biosurfaktan yang kuat dan dapat berperan sebagai agen biolarvasida dalam pengendalian larva *Aedes aegypti*. Surfaktin termasuk salah satu dari tiga lipopeptida yang paling penting dan terdeteksi di sekitar rhizosfer (Henry *et al.*, 2011; Kinsella *et al.*, 2009; Nihorimbere *et al.*, 2012). Selain itu, surfaktin berkemampuan untuk menekan pertumbuhan patogen tanaman (Cawoy *et al.*, 2014) melalui penghambatan pertumbuhan bakteri dengan pemecahan membran atau disintegrasi melalui interaksi fisikokimia (Deleu *et al.*, 2013), dan menekan jamur patogen dengan mendorong kolonisasi bakteri yang bersifat menguntungkan (Jia *et al.*, 2015), serta memicu resistensi sistemik (Cawoy *et al.*, 2014; Jourdan *et al.*, 2009; Ongena *et al.*, 2008). Proses mekanisme biosurfaktan sebagai agen anti bakteri diawali dengan kerusakan dinding sel strain bakteri, sehingga dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel. Proses tersebut menyebabkan keluarnya komponen-komponen penting intraseluler, seperti gula pereduksi dan makromolekul termasuk protein, asam nukleat ke luar sel bakteri. Hal ini dapat mengakibatkan perubahan struktur membran, merusak metabolisme sel yang akhirnya menyebabkan kematian pada sel bakteri (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa biosurfaktan dapat diproduksi dari substrat tak larut air, seperti senyawa hidrokarbon minyak tanah, bensin, n-hexadecana dan substrat larut air, seperti gliserol glukosa, fruktosa, atau alternatif lain, seperti molase. Pada penelitian ini akan digunakan substrat jenis glukosa, gliserol, dan molase. Menurut Muthusamy *et al.*, (2008), penggunaan substrat yang murah dan mudah diperoleh sangatlah penting dikarenakan substrat memakan 10-30% dari total harga produksi pada proses bioteknologi.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian pengembangan bioinsektisida maupun biolarvasida lokal sebagai pengendalian hayati vektor dan penyakit tanaman. Hasil isolasi dan karakterisasi *Bacillus* sp. dari endapan tempat perindukan *Aedes aegypti* di Surabaya telah dilakukan oleh Salamun *et al* (2020) diperoleh 16 isolat yang berpotensi tinggi dalam membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III dan salah satunya yaitu isolat *Bacillus* sp. ES4.3. Isolat *Bacillus* sp. ES4.3 memiliki kemampuan dalam membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III dengan mortalitas larva sebesar 96.67%.

Salamun *et al* (2020) mengemukakan bahwa isolat *Bacillus* sp. ES4.3 diketahui memiliki indeks kesamaan dengan *Bacillus sphaericus* yaitu 76.12% melalui penghitungan koefisien sebanding (Ss) dari data karakter makroskopis, mikroskopis, dan fisiologis isolat *Bacillus* sp. ES4.3. Namun, masih terdapat metode identifikasi ke tingkat strain yang secara luas telah digunakan dan lebih akurat, yaitu identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Oleh karena itu, untuk mengonfirmasi nama spesies dari isolat *Bacillus* sp. ES4.3, pada penelitian ini diperlukan teknik analisis secara molekuler dengan identifikasi

sekuens gen 16S rRNA. Gen penyandi 16S rRNA dipergunakan sebagai penanda molekuler dikarenakan bersifat universal dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme prokariotik (Pangastuti, 2006) dan merupakan penanda yang sangat lestari dengan tingkat mutasi yang lambat dan konstan sehingga dapat dipergunakan untuk mengukur jarak taksonomi antara spesies berdasarkan perbedaan urutan DNA (Amann, 1995).

Hasil studi sebelumnya menunjukkan adanya inklusi parasporal yang diduga merupakan penyebab kematian dari larva *Ae. aegypti*, namun ternyata kemungkinan besar ada aktivitas biosurfaktan yang juga ikut mempengaruhi. Penurunan tegangan permukaan pada aktivitas biosurfaktan dapat menyebabkan penurunan kadar oksigen dalam fase zat tersebut. Larva dan pupa nyamuk membutuhkan oksigen untuk proses respirasi. Karena penurunan tegangan permukaan air akibat aktivitas biosurfaktan, larva dan kepompong tidak mampu mendapatkan oksigen, sehingga spirakel larva terus terbuka dan menyebabkan kematian (Piper and Maxwell, 1971). Biosurfaktan jenis surfaktin yang diproduksi oleh *B. subtilis* telah dilaporkan sebagai agen pengendali hayati yang efisien dan menyebabkan hemolisis terhadap *Ae. aegypti* (Mahdalena dan Ni'mah, 2019; Ghribi *et al.*, 2012; Revathi *et al.*, 2013).

Deteksi awal yang dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan biosurfaktan dapat dilakukan melalui uji pendahuluan aktivitas biosurfaktan yang bersifat kualitatif berupa uji aktivitas hemolitik dan bersifat kuantitatif berupa analisis tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi (Płaza, 2014). Kemudian, pada proses produksi biosurfaktan dilakukan dengan menggunakan beberapa

substrat untuk mengetahui kemampuan optimal *Bacillus* sp. ES4.3 dalam menghasilkan biosurfaktan. Selain itu, untuk mengetahui keberadaan gen yang terlibat dalam sintesis biosurfaktan dapat dilakukan dengan deteksi gen biosintesis surfaktin menggunakan metode amplifikasi PCR yang melibatkan primer spesifik gen biosintesis surfaktin (Mulligan *et al.*, 2014). Pada isolat *Bacillus* sp. ES4.3 belum pernah diteliti mengenai keberadaan gen biosintesis surfaktin dan kemampuan isolat tersebut dalam produksi biosurfaktan dengan beberapa jenis substrat, sehingga diperlukan kajian mengenai hal tersebut. Dengan berhasilnya kajian ini, maka akan diperoleh gen biosintesis surfaktin yang dapat berperan sebagai agen biolarvasida vektor *Ae. aegypti* dan agen biokontrol hama tanaman.

Berdasarkan pada latar belakang yang telah dijelaskan, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui nama spesies isolat *Bacillus* sp. ES4.3 dengan 16S rRNA dan kekerabatan filogenetiknya terhadap *Bacillus* jenis lain, mengetahui gen biosintesis surfaktin, uji pendahuluan aktivitas biosurfaktan, dan produksi biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus* sp. ES4.3 yang telah diisolasi dari endapan tempat perindukan *Ae. aegypti* di Surabaya, Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dituliskan rumusan masalah sebagai berikut.

- 1.2.1 Apa nama spesies dari isolat *Bacillus* sp. ES4.3 berdasarkan analisis 16S rRNA?

- 1.2.2 Bagaimana kekerabatan filogenetik *Bacillus* sp. ES4.3 dengan *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus pumilus*?
- 1.2.3 Apakah isolat *Bacillus* sp. ES4.3 dapat menghasilkan biosurfaktan jika dilakukan pengamatan melalui aktivitas hemolitik, analisis tegangan permukaan, dan aktivitas emulsifikasi?
- 1.2.4 Bagaimana perbedaan hasil produksi biosurfaktan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 ketika ditumbuhkan pada substrat glukosa, gliserol, dan molase?
- 1.2.5 Apakah isolat *Bacillus* sp. ES4.3 memiliki gen *srf* yang bertanggung jawab dalam biosintesis surfaktan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1.3.1 Mengetahui nama spesies dari isolat *Bacillus* sp. ES4.3 berdasarkan analisis 16S rRNA.
- 1.3.2 Mengetahui kekerabatan filogenetik *Bacillus* sp. ES4.3 dengan *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus pumilus*.
- 1.3.3 Mengetahui kemampuan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 dapat menghasilkan biosurfaktan jika dilakukan pengamatan melalui aktivitas hemolitik, analisis tegangan permukaan, dan aktivitas emulsifikasi.
- 1.3.4 Mengetahui perbedaan hasil produksi biosurfaktan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 ketika ditumbuhkan pada substrat glukosa, gliserol, dan molase.

- 1.3.5 Menganalisis keberadaan gen *srf* yang bertanggung jawab dalam biosintesis surfaktin pada isolat *Bacillus* sp. ES4.3.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat ilmiah

Manfaat ilmiah dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1.4.1.1 Memberikan informasi nama spesies dari isolat *Bacillus* sp. ES4.3 berdasarkan analisis 16S rRNA.
- 1.4.1.2 Memberikan informasi mengenai kekerabatan filogenetik *Bacillus* sp. ES4.3 dengan *Bacillus* jenis lainnya.
- 1.4.1.3 Memberikan informasi kemampuan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 dalam menghasilkan biosurfaktan.
- 1.4.1.4 Memberikan informasi mengenai hasil produksi biosurfaktan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 ketika ditumbuhkan pada substrat glukosa, gliserol, dan molase.
- 1.4.1.5 Memberikan informasi mengenai perbedaan hasil produksi biosurfaktan isolat *Bacillus* sp. ES4.3 ketika ditumbuhkan pada substrat glukosa, gliserol, dan molase.
- 1.4.1.6 Memberikan informasi keberadaan gen *srf* yang bertanggung jawab dalam biosintesis surfaktin pada isolat *Bacillus* sp. ES4.3.

1.4.2 Manfaat aplikatif

Manfaat aplikatif dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1.4.2.1 Memberikan acuan untuk pemanfaatan biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus* sp. ES4.3 pada berbagai bidang di antaranya sebagai agen biolarvasida dan penghasil senyawa antimikroba untuk menekan pertumbuhan patogen pada tanaman (bioinsektisida).
- 1.4.2.2 Memberikan acuan untuk menciptakan senyawa biolarvasida dan antimikroba untuk menekan pertumbuhan patogen pada tanaman (bioinsektisida) dari isolat *Bacillus* sp. ES4.3 yang aman dan ramah lingkungan bagi masyarakat.
- 1.4.2.3 Memberikan acuan untuk penelitian lebih lanjut dalam mendapatkan sebuah formula senyawa biolarvasida dan antimikroba untuk menekan pertumbuhan patogen pada tanaman (bioinsektisida) yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus* sp. ES4.3 sehingga dapat diproduksi dan dipergunakan oleh masyarakat.