

Co - culture mikroalga *Chlorella* sp. dan bakteri (penghasil IAA dan pelarut fosfat), prospek industri mikroalga masa depan

Prabaningtyas,S, Witjoro,A, Aridowi, D, Aribah,D, Basithoh, Y.K ; Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No.5 Malang, 651465 Indonesia; Corresponding Author;s Email : sitoresmi.prabaningtyas.fmipa@um.ac.id.

Abstrak

Mikroalga mempunyai banyak potensi yang dapat di kembangkan, misalnya mikroalga sebagai sumber biofuel, sumber pangan, sumber pakan, obat-obatan maupun kosmetik. Produksi biomassa mikroalga perlu ditingkatkan untuk mendapatkan hasil yang lebih banyak. Mikroalga di danau mempunyai keanekaragaman dan kelimpahan yang tinggi. Hal ini terjadi karena kondisi di alam yang mempunyai daya dukung lingkungan yang tinggi, salah satunya karena adanya interaksi antar mikroba di alam. Interaksi ini yang bisa kita terapkan dalam budidaya mikroalga sebagai rekayasa ekologi. Tujuan dari penelitian 1) untuk menguji potensi bakteri penghasil IAA dan bakteri pelarut fosfat 2) untuk menganalisis pengaruh bakteri penghasil IAA, pelarut P terhadap mikroalga dalam co-cultur. Isolat bakteri yang di uji adalah isolate bakteri dari Ranu Grati, Ranu Pane, Ranu Regulo dan Danau Ngebel yang di peroleh dari penelitian tahun sebelumnya. Metode untuk menguji potensi bakteri penghasil IAA menggunakan uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen Salkowski dan untuk menguji potensi bakteri pelarut fosfat seleksi dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pelarut fosfat pada media selektif Pikovskaya. Co-culture dilakukan pada volume 1 L, dengan perbandingan starter : media Walne yaitu 1:4. Hasil penelitian menunjukkan, isolate bakteri penghasil IAA tertinggi adalah isolat PIS dari Ranu Pane dan isolate pelarut fosfat tertinggi adalah isolate GPS dari Ranu Grati. Co-cultur menunjukkan daya dukung lingkungan lebih tinggi, pertumbuhan lebih cepat dan jumlah sel lebih banyak dibandingkan perlakuan tanpa bakteri (control).

Kata Kunci: co - culture, mikroalga, bakteri, IAA, fosfat

1. Pendahuluan

Ekosistem di danau tersusun oleh faktor biotik dan abiotik yang sangat kompleks. Salah satu interaksi terjadi antara bakteri dengan mikroalga. Penelitian terkenal yang telah di lakukan yaitu "kolom Winogradsky", yang diisi dengan lumpur dari dasar danau yang mengandung nutrien organik, CaSO_4 dan di bagian atas di isi dengan air dari danau tersebut. Menunjukkan adanya saling ketergantungan antar mikroba yang ada di dalamnya. Lapisan

paling bawah didominasi oleh bakteri sulfur, kemudian bakteri non sulfur, dan yang paling atas adalah cyanobacteri dan algae[1]. Mikroalga di perairan sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan faktor biotik misalnya bakteri. Mikroalga ini mempunyai potensi sebagai penghasil biofuel.

Biofuel alternatif banyak diteliti sebagai pengganti minyak bumi karena renewable, biodegradable tidak toxic, tidak ada sisa CO₂ dan bebas dari sulfur. Biasanya biofuel diproduksi dari tanaman penghasil minyak dengan metode konvensional. Penggunaan tanaman untuk biofuel membutuhkan lahan yang banyak. Mikroalga sangat baik digunakan sebagai sumber biofuel karena dapat tumbuh 20 kali lebih cepat menghasilkan biomassa dibandingkan tanaman tingkat tinggi. Mikroalga berfotosintesis menggunakan cahaya, air dan CO₂, kemudian mengakumulasi lipid intraseluler sebagai cadangan makanan. Biomassa mikroalga sebanding dengan biofuel yang dihasilkan. Mikroalga mempunyai efisiensi dalam fotosintesis, bisa tumbuh di air tawar /air laut (sesuai spesiesnya). Bisa juga ditumbuhkan di air limbah buangan dari industri makanan dan pertanian.

Mikroalga adalah mikroorganisme yang melimpah di lingkungan air dan selalu berada dengan bakteri. Hubungan antara bakteri dan mikroalga tergantung pada spesies dan kondisi lingkungan. Sebagai contoh adalah penelitian tentang hubungan positif antara bakteri dan *Chlorella* sp.[2]. Penelitian ini membuktikan bahwa *P.diminuate* dan *P.vesicularis* yang diisolasi dari kultur alga dapat mempercepat pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus bicellularis* dan *Chlorella* sp. Penelitian lain adalah mempercepat pertumbuhan *Chlorella ellipsoidea* dengan menambahkan (co-inoculan) bakteri yang di isolasi dari kultur *Chlorella* yang sudah lama. Ditemukan 8 spesies bakteri, dan yang paling efektif adalah *Brevundimonas* sp. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan uji prototipe *co-culture* antara bakteri yang bekerja secara sinergis, untuk mempercepat pertumbuhan mikroalga yang berpotensi sebagai sumber biofuel.

Salah satu cara untuk meningkatkan produksi mikroalga ini adalah dengan cara *co-culture*. *Co-culture* adalah membiakkan 2 mikroba secara bersama. *Co-culture* dapat dilakukan antara bakteri dan mikroalga. Bakteri yang dikultur bersama adalah bakteri yang berpotensi, sesuai dengan tujuan peningkatan hasil mikroalga. Misalnya untuk mendapatkan biomassa mikroalga dengan kandungan protein tinggi, maka dapat dilakukan *co-culture* dengan bakteri pemfiksasi N. Melalui *co-culture* ini, produksi mikroalga dapat ditingkatkan. *Co-culture* dapat meningkatkan kecepatan pertumbuhan, biomassa dan daya dukung lingkungan kultur.

2. Metode Dan Analisis Data

2.1 Uji Potensi bakteri penghasil IAA

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA di uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen Salkowski. Pembuatan reagen

Salkowski yaitu dengan mengambil 1 mL 0.5 M FeCl₃ di tambah 50 mL HClO₄ 50% [v/v], selanjutnya disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya atau ditutup dengan aluminium foil. (FeCl₃ 0.5M = 1.35 g / 10 mL) (HClO₄ 50% = 25 mL HClO₄ + 25 mL Aquades). Isolat yang positif uji kualitatif kemudian dilanjutkan dengan analisis secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Konsentrasi IAA pada analisis dengan metode spektrofotometri berdasarkan nilai absorbansi yang diserap oleh spektrofotometer UV-Visible. Nilai absorbansi yang di hasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi sampel. Kurva standar di buat menggunakan IAA murni. Panjang gelombang yang di gunakan adalah 530 nm berada pada daerah tampak. Panjang gelombang ini dipilih berdasarkan warna yang dihasilkan oleh interaksi antara reagen Salkowski dan IAA (Glickmann dan Dessaux 1995) yang menghasilkan warna merah muda.

2.2 Uji potensi bakteri pelarut fosfat.

Seleksi bakteri pelarut fosfat bertujuan untuk menyeleksi kemampuan isolat bakteri pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat. Seleksi dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri dan jamur pelarut fosfat pada media selektif Pikovskaya, yaitu suatu media tumbuh yang sumber P satu-satunya berasal dari bentuk P tidak larut (AlPO₄). Isolat yang mampu tumbuh pada media tersebut diasumsikan dapat memanfaatkan P dari sumber tidak larut berupa AlPO₄ sehingga dianggap mampu melarutkan P tidak larut. Ginting et al.(2006) menjelaskan bahwa adanya pelarutan P pada media Pikovskaya dicirikan oleh zona bening (halo zone) yang terbentuk di sekitar koloni bakteri atau jamur yang diinokulasikan pada media pikovskaya, sementara mikroorganisme yang lain tidak menunjukkan ciri tersebut. Ginting juga menyebutkan bahwa semakin tinggi rasio zona bening menandakan bahwa semakin tinggi kemampuan mikroba tersebut melarutkan fosfat dari sumber P tidak larut.

2.4 Persiapan kultur mikroalga

Mikroalga yang akan digunakan untuk *co-culture* dibiak ulang pada media kultur cair (Walne media) untuk mendapatkan mikroalga pada fase eksponensial. Mikroalga ini digunakan sebagai starter pada *co-culture*.

2.4 Persiapan kultur bakteri

Bakteri yang akan di *co-culture* dibiakkan pada media nutrient broth 1x24 jam pada suhu 20 °C. Kultur ini digunakan sebagai starter pada *co-culture*.

2.5 *Co-culture* mikroalga dan bakteri

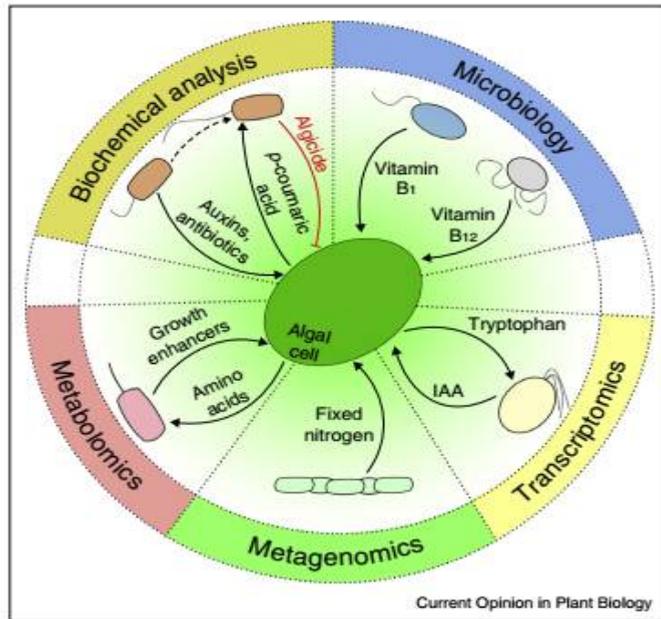
Co-culture adalah campuran kultur mikroalga dan bakteri. Media yang digunakan adalah media untuk mikroalga yaitu media Walne. Kultur dilakukan pada botol dengan volume 1 L dan terdiri dari 800 mL media Walne, 100 mL starter mikroalga dan 100 mL starter bakteri. Kultur dengan sistem *batch* dipertahankan dengan cahaya dan aerasi terus menerus, pada

intensitas $100-200 \mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ dan suhu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ [7, 8]. Pertumbuhan mikroalga diamati setiap minggu dengan cara menghitung jumlah sel mikroalga menggunakan *haemocytometer*. Pertumbuhan sel bakteri diamati setiap minggu dengan mengambil 1 ml biakan (dilakukan pengenceran sampai 10^{-6}) kemudian ditumbuhkan (inkubasi 1x24 jam pada suhu $37 \text{ }^\circ\text{C}$) di media PCA. Membuat kurva pertumbuhan mikroalga dan bakteri selama *co-culture*. Mikroalga pada *co-culture* (akhir fase stasioner) diukur biomassa selnya kemudian dikeringkan dan siap digunakan sesuai tujuan.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil Uji Bakteri penghasil IAA menunjukkan bahwa dari 89 isolat yang ditemukan, 62 isolat adalah penghasil IAA dan bakteri penghasil IAA yang tertinggi adalah isolate PIS dari Ranu Pane. Hasil uji potensi bakteri pelarut fosfat menunjukkan 32 isolate berpotensi melarutkan fosfat dan bakteri pelarut fosfat yang tertinggi adalah isolate GPS dari Ranu Grati.

Bakteri yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga misalnya bakteri pelarut fosfat. Fosfor di perairan dan sedimen berada dalam bentuk senyawa fosfat terlarut dan fosfat partikulat. Fosfat terlarut terdiri dari fosfat organik (gula fosfat, nukleoprotein, fosfoprotein) dan fosfat anorganik (ortofosfat dan polifosfat)[6]. Keberadaan fosfat di perairan akan terurai menjadi senyawa ion dalam bentuk H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , dan PO_4^{3-} , kemudian akan diabsorpsi oleh fitoplankton dan masuk ke dalam rantai makanan[7]. Senyawa fosfor yang terikat di sedimen dapat mengalami dekomposisi dengan bantuan bakteri maupun melalui proses abiotik menghasilkan senyawa fosfat terlarut yang dapat mengalami difusi kembali ke dalam air[8]. Bakteri penghasil IAA mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Beberapa anggota bakteri yang berhubungan dengan alga, khususnya spesies *Sulfitobacter* sp (Rhodobacterales), memiliki efek mutualistik yang spesifik misalnya pada strain *P. multiseri*. Analisis transkripsi mengungkapkan sebuah up-regulation dari gen *P.multiseri* untuk biosintesis triptofan, sedangkan pada gen *Sulfitobacter* yang terkait dengan biosintesis auksin, indole-3-asetat Asam (IAA), dari triptofan diregulasi, menunjukkan bahwa bakteri menggunakan asam amino yang dipasok dari Diatom untuk mensintesis senyawa ini[9]. Bakteri yang juga mempengaruhi pertumbuhan mikroalga adalah bakteri pemfiksasi nitrogen. Nitrogen merupakan "*limiting factor*" yang harus diperhatikan dalam suatu ekosistem perairan. Nitrogen di perairan terdapat dalam bentuk gas N_2 , NO_2^- , NO_3^- , NH_3 dan NH_4^+ serta sejumlah N yang berikatan dalam senyawa organik yang kompleks. Akumulasi kandungan nitrogen dalam air dapat menjadi sumber penurunan kualitas air. Sumber nitrogen terbesar berasal dari udara, sekitar 80% dalam bentuk nitrogen bebas yang masuk melalui sistem fiksasi biologis (yang dilakukan oleh bakteri) dalam kondisi aerobik. Bakteri penghasil vitamin B12, bahwa bakteri adalah penyedia vitamin B12 untuk pertumbuhan mikroalga yang ditemukan di kolam budidaya ikan[10]. Sedangkan pertumbuhan mikroalga sangat dipengaruhi oleh vitamin B12 yang di sintesis oleh bakteri[11].



Pengelompokan Interaksi antara Algae dan Bakteri (Matthew B ,Cooper1 and Alison G Smith 2015)

Terdapat dua proses yang paling menentukan dalam proses bioteknologi mikroalga yaitu kultivasi serta pemanenan mikroalga. Metode yang umum digunakan dalam proses kultivasi mikroalga adalah sistem open raceway pond dan sistem closed photobioreactor. Sistem open pond memiliki kelemahan yaitu mudah terkena kontaminasi sementara dalam sistem photobioreactor kontaminasi dan parameter pertumbuhan seperti pH, temperatur dan karbon dioksida dapat dikontrol dengan baik. Walaupun demikian, sistem photobioreactor memerlukan biaya tinggi sehingga pengetahuan dalam pemilihan sistem kultivasi mikroalga sangat diperlukan. Selain metode kultivasi, metode pemanenan mikroalga juga sangat penting untuk menghasilkan biomassa konsentrasi tinggi dan proses yang ekonomis. Metode pemanenan mikroalga yang umum digunakan antara lain: flokulasi, koagulasi, sentrifugasi dan filtrasi.

Proses bioteknologi mikroalga telah dikembangkan untuk berbagai jenis aplikasi komersial. Salah satu teknologi yang dapat dikembangkan yaitu dengan co-culture. Co-culture antara bakteri sinergis dan mikroalga adalah salah satu upaya mengatasi masalah yang ditimbulkan akibat peningkatan populasi dan kebutuhan manusia, pengembangan produk berbasis sumber alam terbarukan mutlak diperlukan. Mikroalga dapat dikembangkan sebagai salah satu sumber biomassa masa depan. Mikroalga tidak hanya memiliki kapasitas untuk memproduksi produk yang bernilai tinggi tapi juga memiliki kemampuan untuk berkembang biak hanya dengan menggunakan cahaya matahari, karbon dioksida dan media yang disediakan. Mikroalga memiliki struktur yang dengan mudah mengkonversi energi

matahari menjadi energi kimia. Sebagai organisme fotosintetik, mikroalga memiliki kandungan klorofil yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan atau kosmetik.

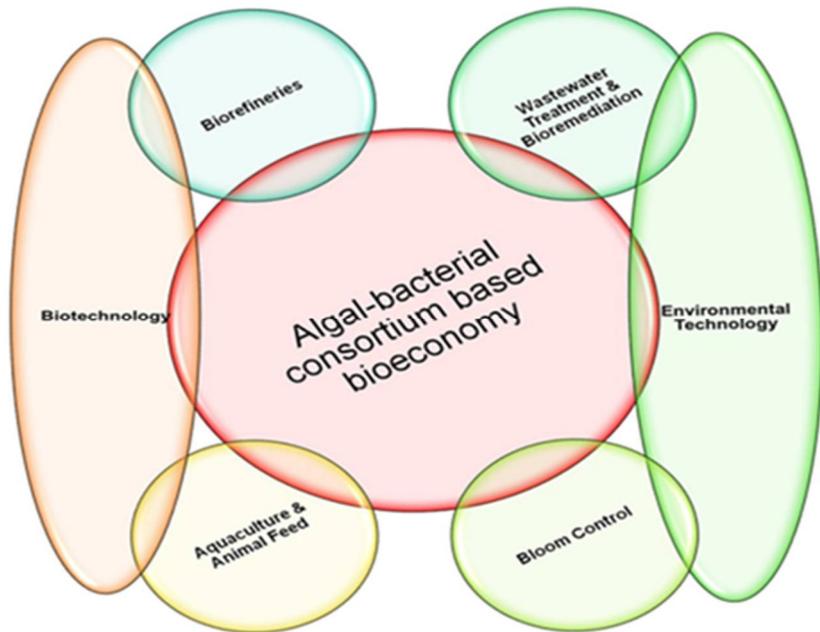
Hasil uji Co-culture bakteri potensial dan mikroalga menunjukkan ada perbedaan dengan kultur mikroalga yang tanpa bakteri. Bakteri dapat bersimbiosis mutualisme dengan mikroalga. Bakteri penghasil IAA akan memacu pertumbuhan mikroalga. Bakteri pelarut fosfat akan menyediakan fosfat yang siap diserap oleh mikroalga. Sebaliknya bakteri mendapatkan zat-zat organik dari mikroalga. Fotosintesis pada mikroalga menyediakan C organik yang dapat digunakan oleh bakteri sebagai nutrisi.



Gambar 2. Contoh perlakuan *co-culture* bakteri dan mikroalga

Keterangan : A= *Chlorella* sp. tanpa bakteri, B= *Chlorella* sp. + bakteri penghasil IAA, C= *Chlorella* sp. + bakteri pelarut fosfat, D= *Chlorella* sp. + bakteri penghasil vitamin B12

Mikroalga juga dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku untuk industri farmasi karena beberapa jenis dari mikroalga mengandung antioksidan dan antibiotik. Mikroalga memiliki kandungan protein, vitamin dan polisakarida yang memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai makanan tambahan. Beberapa jenis mikroalga juga diketahui mengandung lipid yang dapat diekstraksi dan diproses lebih lanjut untuk menjadi bahan bakar. Hasil samping dari proses ekstraksi lipid mikroalga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku biometana, bioethanol dan biohidrogen. Selain produk, mikroalga memiliki kontribusi positif terhadap lingkungan terutama penanganan masalah efek gas rumah kaca dan polusi air dari industri. Mikroalga dapat menyerap karbon dioksida untuk proses fotosintetisnya dan memproduksi nutrisi dengan biaya produksi rendah.



Gambar 3. Pemanfaatan Co-culture Mikroalga dan Bakteri dalam Berbagai Bidang Kehidupan [12]

Beberapa mikroalga memiliki kandungan protein yang sangat tinggi, sehingga mikroalga juga dikenal sebagai single cell protein (SCP). Sumber SCP yang dikenal masyarakat diantaranya *Spirulina maxima* dan *Chlorella vulgaris* [1]. Karbohidrat dalam mikroalga dapat ditemukan dalam bentuk pati, glukosa, gula dan polisakarida lainnya. Kandungan lemak rata-rata sel alga bervariasi antara 1% dan 70% tetapi bisa mencapai 90% dari berat kering pada kondisi tertentu [8]. Lemak dalam mikroalga terdiri dari gliserol, asam lemak jenuh atau asam lemak tak jenuh. Komposisi lemak pada masing-masing mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti perbedaan nutrisi, lingkungan dan fasa pertumbuhan [8]. Mikroalga juga merupakan sumber vitamin penting, seperti vitamin A, B, B1, B2, B6, B12, C, E, nikotinate, biotin, asam folat, dan asam panto-tenat [5]. Kandungan vitamin tersebut dapat meningkatkan nilai gizi dari sel alga, namun kuantitasnya berfluktuasi, hal ini disebabkan oleh faktor lingkungan, teknik pemanenan, dan metode pengeringan sel [8]. Mikroalga juga kaya akan pigmen seperti klorofil (0,5% - 1% berat kering), karotenoid (rata-rata 0,1 - 0,2% berat kering, hingga lebih dari 14% untuk β karoten untuk mikroalga *Dunaliella sp.*) dan phycobili-proteins [1]. Molekul tersebut dapat diaplikasikan untuk kepentingan komersial. Mikroalga adalah mikroorganisme yang mudah dicerna, sehingga penggunaan mikroalga dalam makanan atau pakan ternak tidak ada batasan. Produk Turunan Mikroalga Mikroalga merupakan sumber biomassa yang mengandung beberapa komponen penting diantaranya

karbohidrat, protein, asam lemak, dll, sehingga mikroalga dapat dijadikan sebagai bahan baku untuk memproduksi produk-produk yang lain.

Alga adalah produsen utama dalam ekosistem perairan, dan bakteri heterotrofik tumbuh pada bahan organik yang dihasilkan oleh alga dan mendaur ulang nutrisi. Studi ekologi telah mengidentifikasi keberadaan spesies alga dan bakteri tertentu, menunjukkan adanya interaksi spesifik di antara mereka. Interaksi alga dan bakteri dikategorikan menjadi pertukaran nutrisi, transduksi sinyal dan transfer gen. Telah dilakukan penelitian bagaimana interaksi ini membentuk komunitas perairan dan mempengaruhi siklus geokimia dalam lingkungan alam.

Alga diketahui menghasilkan berbagai senyawa, mulai dari bahan bakar sampai kosmetik. Biorefineries masa depan tidak hanya akan memanfaatkan potensi yang sangat besar ini, namun juga meningkatkan pendekatan (simbiosis bakteri dan alga) ini untuk menghasilkan lebih banyak senyawa dan meningkatkan jumlah masing-masing dengan menggunakan pendekatan teknik ekologi[13].

4. Kesimpulan

Rekayasa ekologi atau ekologi sintesis adalah istilah luas yang digunakan untuk sistem biomimetik buatan yang menggunakan pendekatan multi-organisme untuk solusi zaman sekarang. Setiap sistem biorefinery akan mendapatkan keuntungan dari interaksi bakteri yang mempercepat pertumbuhan alga dan pada pemanenannya.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kami ucapkan kepada Universitas Negeri Malang, melalui dana PNPB untuk proses pembuatan bookchapter ini. Terimakasih kepada jurusan Biologi dan FMIPA UM telah memberikan fasilitas untuk sampai pada penulisan bookchapter ini.

Konflik Kepentingan

Ganti keseluruhan dengan dengan konflik kepentingan yang digunakan. Deklarasikan secara tertulis pernyataan ada/ tidak ada "conflict of interest" dengan authors terkait atau pihak lain.

Referensi

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 2012. Brock Biology Of Microorganisms (8th edn.). *Upper Saddle River*: Prentice-Hall.
- [2] Mouget, J.L.et.al. 1995. Algal Growth Enhancement by Bacteria : Is Consumption of Photosynthetic Oxygen Involved. *Jurnal FEMS Microbial Ecology*. Vol.18 : 35-43
- [3] Park, Y.et.al. Growth Promotion of *Chlorella ellipsoidea* by Co-inoculation with *Brevundimonas* sp Isolated from the Microalga. *Jurnal Hydrobiologia*. Vol.598 : 219-228.

- [4] Sigeo, D.C. 2005. **Freshwater Microbiology Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment**, John Wiley & Sons Ltd, England. pp:251-263.
- [5] Kazamia E, Czesnick H, Nguyen T, Croft M, Sherwood E, Sasso S et al. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ Microbiol* 14: 1466–1476.
- [6] McKelvie, ID. (1999). Phosphate. *Handbook of Water Analysis*. New York, Marcel Dekker, Inc : 273-295.
- [7] Hutagalung, H.P and A. Rozak. (1997). *Metode Analisis Air Laut, Sedimen dan Biota*. Buku 2. Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi. LIPI. Jakarta.
- [8] Paytan, A. and K. McLaughlin. (2007). The Oceanic Phosphorus Cycle. *Chem. Rev.*, 107 (2): 563-576
- [9] Matthew B Cooper¹ and Alison G Smith Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age.) *Current Opinion in Plant Biology* 2015, 26:147–153
- [10] Sugita, A. Kuruma", C. Hirato", T. Ohkoshi, R. Okadab and Y. Deguchi The vitamin-B₁₂-producing bacteria in the water and sediment of a carp culture pond review. *Bioresource Technology*. 83: 1–11. *Aquaculture*, 119 (1994) 425-431 Elsevier Science B.V., Amsterdam
- [11] Grantt, Mathew. AA, Kazamia E, Cicuta P, Smith GA, 2014, Direct Exchange of Vitamin B12 is Demonstrated by Modelling the Growth dynamic of algal-Bacterial Co-culture, *The ISME Journal*, 8 : pp :1418-1427
- [12] Ramanan, R. Kim, B.H., Cho D.H., Hee-Mock Oh , Hee-Sik Kim , 2016 Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Research review paper at Biotechnology Advances* 34 : 14-29
- [13] Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., et al., 2015b. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresour. Technol.* 175, 578–585.